Charakterisierung anti-proliferativer und molekularer Effekte einer kombinierten Behandlung von Nierenzellkarzinomzellen mit Tyrosinkinase- und mTOR-Inhibitoren

Diplomarbeit

Technische Universität Dresden
Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
Fachrichtung Chemie und Lebensmittelchemie
Professur für Allgemeine Biochemie

Claudia Mattissek
geboren am 18. Mai 1984 in Friedrichshafen

Gutachter:	**Prof. Dr. rer. nat. habil. Karl-Heinz van Pée**
Betreuer:	**Dr. rer. nat. Bernd Schwenzer**
	Dr. rer. nat. Susanne Füssel

Dresden, den 14. April 2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis i
Abbildungen und Tabellen iii
Abkürzungsverzeichnis v
1 Einleitung 1
1.1 Das Nierenzellkarzinom 1
1.2 Konventionelle Therapieoptionen des Nierenzellkarzinomes 4
1.3 Zielgerichtete Wirkstoffe und ihre Wirkprinzipien 5
1.3.1 Sorafenib 7
1.3.2 RAD001 9
1.4 Aktuelle Behandlungsempfehlungen für das Nierenzellkarzinom 11
1.5 Sphäroide in der Zellkulturforschung 12
1.6 Zielstellung der Arbeit 14
2 Material und Methoden 15
2.1 Material 15
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien 15
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits 16
2.1.3 Medien, Puffer und Lösungen 18
2.1.4 Antikörper für Western-Blot und Immunfluoreszenz 20
2.1.5 Verwendete Zelllinien 21
2.2 Methoden 22
2.2.1 Zelllinien 22
2.2.2 Zellkultivierung 22
2.2.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen 22
2.2.4 Mykoplasmentest 23
2.2.5 Sphäroidkultivierung und Handhabung 24
2.2.6 Expressionsnachweis der RTKs VEGF&PDGF: Immunfluoreszenz 27
2.2.7 WST-1-Zellviabilitätstest 28
2.2.8 Western-Blot 29
2.2.9 Zellzyklustest 30
3 Ergebnisse 31
3.1 Expressions- und Aktivitätsnachweis von VEGFR & PDGFR 31
3.2 Charakterisierung des Sphäroidwachstums 32
3.3 Optimierung der Sphäroiddisaggregation für den Western-Blot 35
3.4 RAD001-Behandlung 36

3.4.1 Charakterisierung der Viabilität mittels WST-Test 41
3.4.2 Charakterisierung der Proliferation mittels Zellzyklusmessung 42
3.5 Sorafenib-Behandlung 43
3.5.1 Charakterisierung der Viabilität mittels WST-Test 46
3.5.2 Phosphorylierung der *downstream-targets* ERK und AKT 47
3.6 Kombinationsbehandlung 48
3.6.1 Charakterisierung der Viabilität mittels WST-Test 52
3.6.2 Phosphorylierung des RAF-*downstream-targets* ERK 53
4 Diskussion 55
4.1 Zielgerichtete Therapien beim NZK 55
4.2 Das Modellsystem Tumorzellsphäroid 56
4.3 Sphäroidkultivierung 58
4.4 Expressionsnachweis der Wirkstofftargets 59
4.5 Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 59
4.6 Behandlung mit dem RAF- und RTK-Hemmer Sorafenib 62
4.7 Kombinierte Behandlung mit RAD001 und Sorafenib 64
4.8 Klinische Relevanz der Ergebnisse 67
4.9 Ausblick 68
5 Zusammenfassung 70
6 Referenzen 71
Danksagung 77
Erklärung 78

Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1-1: Konsequenz einer Mutation bzw. Inaktivierung des von Hippel-Lindau-Tumorsuppressorgens..... 2
Abbildung 1-2: vereinfachte Übersicht relevanter Signalwege……..... 3
Abbildung 1-3: Strukturformel Sorafenib..... 8
Abbildung 1-4: Bänderdiagramm der Röntgenkristallstruktur von Wildtyp BRAF komplexiert mit Sorafenib..... 8
Abbildung 1-5: Die multimolekularen Komplexe mTORC1 (*mammalian target of rapamycin C1)* und mTORC2..... 9
Abbildung 1-6: Strukturformel RAD001..... 10
Abbildung 1-7: Tumorzellsphäroid im Querschnitt..... 13
Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs von Einzel- und Kombinationsbehandlungen..... 26
Abbildung 2-2: Spaltung von WST-1 in Formazan durch das mitochondriale Tetrazolium-Reduktase-System..... 28
Abbildung 3-1: FITC-fluoreszenzmarkierte Rezeptoren PDGFRB und phospho-PDGFRB in A-498 Zellen..... 31
Abbildung 3-2: FITC-fluoreszenzmarkierte Rezeptoren PDGFRB und phospho-PDGFRB in 786-O Zellen..... 32
Abbildung 3-3: Ergebnisse des Western-Blots der VEGF-Rezeptoren FLT-1 (200 kDa) und KDR (150 kDa) in A-498 Zellen..... 32
Abbildung 3-4: Mit Hilfe der *soft agar*-Methode erzeugter Sphäroid..... 33
Abbildung 3-5: Lichtmikroskopische Aufnahmen eines A-498 Sphäroids..... 33
Abbildung 3-6: Schnitt eines HE-gefärbten A-498 Sphäroids..... 34
Abbildung 3-7: Zeitabhängige Veränderung des Durchmessers von A-498 Sphäroiden..... 34
Abbildung 3-8: Zeitabhängige Veränderung des Durchmessers von 786-O Sphäroiden..... 35
Abbildung 3-9: Verschiedene Sphäroidaufschlussverfahren am Beispiel des Western-Blots von AKT..... 36
Abbildung 3-10: Durchmesser von A-498-Sphäroiden unter RAD001-Behandlung; lichtmikroskopische Aufnahmen exemplarischer Sphäroide am 17. Beobachtungstag..... 36
Abbildung 3-11: Lichtmikroskopische Verlaufsstudie eines Cisplatin-behandelten A-498 Sphäroids..... 37
Abbildung 3-12: Konzentrationsabhängigkeit des Durchmessers von A-498 Sphäroiden am 7. RAD001-Behandlungstag..... 38
Abbildung 3-13: Lichtmikroskopische Verlaufsstudie eines RAD001-behandelten A-498 Sphäroids..... 39
Abbildung 3-14: Schnitte von HE-gefärbten A-498-Sphäroiden nach 18-tägiger Behandlung mit 1% DMSO bzw. 500 nM RAD001..... 39
Abbildung 3-15: Durchmesser von 786-O Sphäroiden unter RAD001-Behandlung..... 40
Abbildung 3-16: Viabilität von A-498-Sphäroiden nach 23-tägiger Behandlung mit RAD001..... 41

Abbildung 3-17: Relative Viabilität nach RAD001-Behandlung für 23d..... 42
Abbildung 3-18: Zellzyklusverteilung nach RAD001-Behandlung für 17d..... 42
Abbildung 3-19: Lichtmikroskopische Verlaufsstudie eines Sorafenib-behandelten A-498 Sphäroids..... 43
Abbildung 3-20: Duchmesser von A-498-Sphäroiden unter Sorafenib-Behandlung; lichtmikroskopische Aufnahmen exemplarischer Sphäroide vom 23. Beobachtungstag..... 44
Abbildung 3-21: Durchmesser von 786-O-Sphäroiden unter Sorafenib-Behandlung; lichtmikroskopische Aufnahmen exemplarischer Sphäroide vom 14. Beobachtungstag..... 45
Abbildung 3-22: Viabilität von A-498-Sphäroiden nach 22-tägiger Behandlung mit Sorafenib..... 46
Abbildung 3-23: Relative Viabilität nach Sorafenib-Behandlung für 22d..... 47
Abbildung 3-24: p-AKT-Expression in Sorafenib-behandelten 786-O-Sphäroiden..... 47
Abbildung 3-25: p-ERK-Expression in Sorafenib-behandelten 786-O-Sphäroiden..... 48
Abbildung 3-26: Durchmesser von A-498-Sphäroiden unter kombinierter Behandlung mit RAD001 und Sorafenib; lichtmikroskopische Aufnahmen exemplarischer Sphäroide vom 17. Beobachtungstag..... 49
Abbildung 3-27: Durchmesser von A-498-Sphäroiden unter kombinierter Behandlung mit RAD001 und Sorafenib; lichtmikroskopische Aufnahmen exemplarischer Sphäroide vom 18. Beobachtungstag..... 50
Abbildung 3-28: Prozentuale Reduktion des Sphäroiddurchmessers von kombiniert mit RAD001 und Sorafenib-behandelten Sphäroiden am 8. Tag nach Start der Behandlung..... 51
Abbildung 3-29: Viabilität von A-498-Sphäroiden nach 17-tägiger Kombinationsbehandlung mit RAD001 und Sorafenib..... 52
Abbildung 3-30: ERK und p-ERK-Expression in Sorafenib und RAD001-kombinationsbehandelten 786-O Sphäroiden..... 53
Abbildung 3-31: p-AKT-Expression in Sorafenib und RAD001-kombinationsbehandelten 786-O Sphäroiden..... 54

Tabelle 1-1: Behandlungsempfehlungen für metastasiertes NZK..... 11
Tabelle 2-1: Alphabetische Auflistung von Geräten und Verbrauchsmaterialen..... 15
Tabelle 2-2: Alphabetische Auflistung von Chemikalien, Reagenzien und Kits 16
Tabelle 2-3: Thematische Auflistung von Medien, Puffern und Lösungen 18
Tabelle 2-4: Verwendete Primäre Antikörper 20
Tabelle 2-5: Verwendete Sekundär-Antikörper..... 21
Tabelle 2-6: Verwendete Zelllinien 21
Tabelle 4-1: IC_{50}-Werte von Sorafenib auf RAF und verschiedene RTKs 64
Tabelle 4-2: Reduktion des Sphäroiddurchmessers von kombiniert mit RAD001 und Sorafenib-behandelten Sphäroiden am 8 Tag nach Start der Behandlung.....65

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AKT1	*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*
A. dest.	*Aqua destillata*
ATCC	*American Type Culture Collection*
bp	Basenpaare
cDNA	*copyDNA*
cRCC	*clear cell renal cell carcinoma*
CT	Chemotherapeutikum
d	Tage
D	Duplex
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
dNTP(s)	Desoxyribonukleosidtriphosphat(e)
DMEM	*Dulbecco´s modified Eagle-medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
4EBP1	Translationsfaktor
ECL	*enhanced chemiluminescence*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	*epidermal growth factor*
ELISA	*enzyme linked immunosorbent assay*
ERK	*extracellular regulated kinase*
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	*fluorescence activated cell sorter* (Durchflusszytometer)
FGF2	*fibroblast growth factor* 2
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FL	Fluorescein
mTOR	*mammalian target of rapamycin*
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIF	*hypoxia-inducible factor*
HRP	*horse radish peroxidase* (Meerrettichperoxidase)
IL-2	Interleukin-2
kb	Kilobasen
M	molar (Mol/Liter)
MAPK	*mitogen activated protein kinase*

MC	Methylzellulose
MCTS	*multicellular tumour spheroid*
MDR1	*multidrug resistance gene 1*
MEK	*mitogen activated extracelluler regulated kinase*
MEM	*minimum essential medium*
min	Minuten
MLST8	*mammalian lethal with sec thirteen 8*
MMP	Magermilchpulver
mRNA	Boten (*messenger)*-Ribonukleinsäure
ms	Millisekunden
MSIN1	*mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1*
MTP	Mikrotiterplatten
MW	Mittelwert
nt	Nukleotide
NZK	Nierenzellkarzinom
OD	optische Dichte
p70S6K	Serin/Threoninkinase S6K
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction* (Polymerasekettenreaktion)
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-kinase
PK	Proteinase K
P/S	Penicillin-Streptomycin-Lösung
PTEN	*phosphatase and tensin homolog*
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RAF	*rapidly growing fibrosarcoma* (Serin/Threoninkinase)
RAS	*rat sarcoma*
RHEB	*RAS homolog enriched in brain*
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTKs	Rezeptortyrosinkinasen
RT-PCR	*reverse transcriptase polymerase chain reaction*
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Taq	DNA-Polymerase aus Thermus aquaticus
TdT	*terminal deoxynucleotidyl transferase*
TE	Trypsin-EDTA
TEMED	N,N,N’,N’-Tetramethylethylendiamin
TGFA	*transforming growth factor, alpha*
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	*TdT-mediated dUTP nick end labelling*

ü.N.	über Nacht
UTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
VEGF	*vascular endothelial growth factor*
VHL	von Hippel-Lindau
WST-1	wasserlösliches Tetrazolium

1 Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

Man differenziert bei Nierentumoren - wie bei anderen Tumoren auch - zwischen gut- und bösartigen. Bösartige (maligne) Tumoren unterscheiden sich von gutartigen (benignen) durch ihr infiltrierendes und destruktives Wachstum sowie ihre Fähigkeit, Metastasen zu bilden. Sie werden volkstümlich auch als Krebs bezeichnet. Der Begriff Karzinom steht für bösartige Tumoren, die den Epithelien (Sammelbezeichnung für Deck- und Drüsengewebe) entstammen (Wagener, 1999). Mehr als 90% aller Nierentumoren werden als bösartig eingestuft.

Ein Nierenzellkarzinom (NZK) wird heutzutage in mehr als der Hälfte aller Fälle zufällig im Rahmen nicht-invasiver Untersuchungen (z.B. Ultraschall) aufgrund unspezifischer Symptome entdeckt. Die klassische Triade aus Flankenschmerz, sichtbarer Hämaturie und tastbarem Befund ist nur noch selten ursächlich für die Erkennung (6-10%). Weitere 25-30% der NZKs werden aufgrund von Symptomen wie Bluthochdruck, Gewichtsverlust oder schlechter Blutwerte diagnostiziert, die auf Metastasierung zurückzuführen sind (EAUGuidelines, 2009). Das Nierenzellkarzinom ist für etwa 4% aller malignen Tumorerkrankungen verantwortlich. Pro Jahr erkranken daran allein in Deutschland ca. 15.000 Menschen. Bei Männern ist das NZK für 4,7% aller malignen Tumoren verantwortlich. Die Rate übersteigt damit etwas die bei Frauen (3,2%). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Männern bei 67 und bei Frauen bei nahezu 71 Jahre (Krebsregister, 2008). Als Risikofaktoren für das Nierenzellkarzinom werden neben Übergewicht und der Zufuhr nierenschädigender Substanzen z.B. durch Rauchen, berufsbedingte Exposition oder Medikamentenmissbrauch (v.a. heutzutage nicht mehr verwendeter phenacetinhaltiger Schmerzmittel) auch chronische Niereninsuffizienz gehandelt. Die Möglichkeit einer erblichen Disposition ist ebenfalls bekannt (Krebsregister, 2008).

Die Prognose beim NZK hängt maßgeblich vom Stadium der Krankheit zum Zeitpunkt der Diagnose ab. Obgleich das NZK nach Prostata- und Blasenkrebs nur der dritthäufigste urologische Tumor ist, ist es derjenige mit der höchsten Todesrate (Jemal, 2006). Hierfür ist die hohe Metastasierungsrate des NZK verantwortlich: 30% der Patienten weisen bereits bei der Erstdiagnose Metastasen auf, weitere 30% entwickeln sie im weiteren Krankheitsverlauf (Buchner, 2006). Die durchschnittliche relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt für Männer bei 66%, für Frauen bei 67%. Im Falle bereits eingetretener Metastasierung überleben weniger

als 10% der Patienten die ersten fünf Jahre nach der erstmaligen Bestimmung der Krankheit (Krebsregister, 2008).

Die Klassifizierung von Nierentumoren in verschiedene Subtypen erfolgt anhand ihres histologischen Phänotyps sowie ihres Ursprungsortes. Der häufigste Nierenzellkarzinomsubtyp entspringt dem Tubulusepithel (Tubulus = Abschnitt eines Nephrons) (van Spronsen, 2005). Zu den dem Tubulusepithel entspringenden NZKs gehört auch das so genannte klarzellige Nierenzellkarzinom (kNZK) - mit 75% der weitaus am häufigsten auftretende Nierenzellkarzinomsubtyp (Vira, 2007). Neben dem kNZK existieren weitere Subtypen des Nierenzellkarzinomes. Dazu sind das papilläre NZK (Inzidenz 10-15%), das chromophobe NZK (Inzidenz 5-10%) und Karzinome mit Sammelgangsursprung (<1%) zu zählen (Chowdhury, 2008). Das kNZK ist durch häufige Mutationen des von Hippel-Lindau-Tumorsuppressorgens (*VHL*) charakterisiert, die in mehr als 75% aller sporadischen kNZK gefunden werden können (van Spronsen, 2005). Interessanterweise ist *VHL* in anderen Tumorentitäten nicht mutiert (Gnarra, 1994).

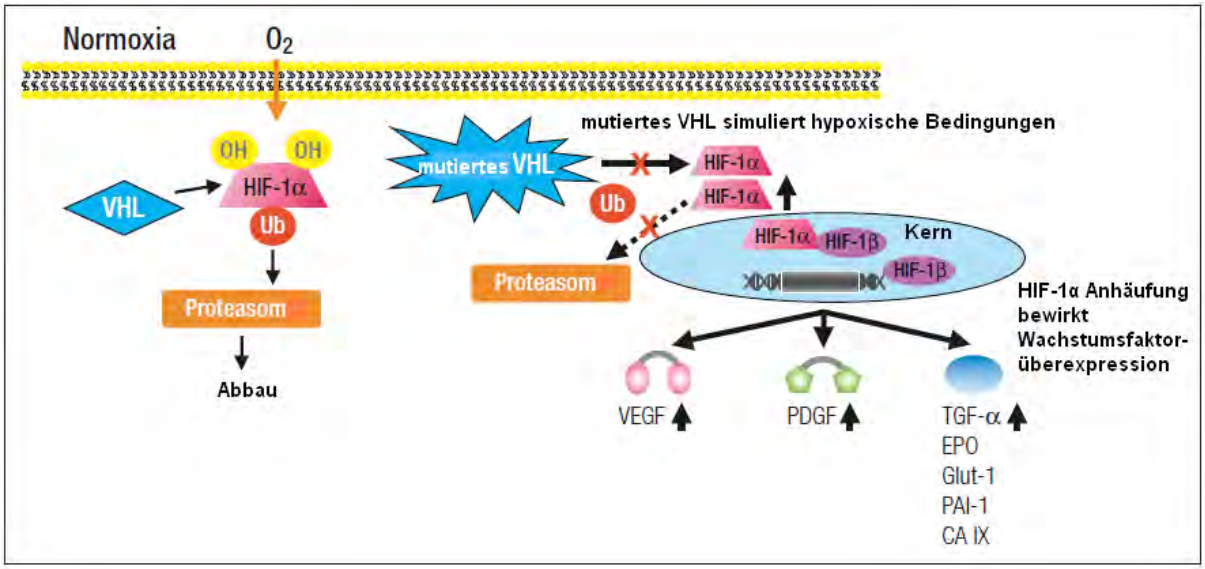


Abbildung 1-1: Konsequenz einer Mutation bzw. Inaktivierung des von Hippel-Lindau-Tumorsuppressorgens: Links im Bild ist der Prozess des HIF-1α-Abbaus unter normoxischen Bedingungen und unter Beteiligung von Wildtyp-VHL gezeigt. Der rechte Teil der Abbildung zeigt den Ablauf, wie er unter hypoxischen Bedingungen oder bei Beteiligung mutierten VHLs stattfindet und zur Transkription zahlreicher Wachstumsfaktoren führt (Hutson, 2007).

Wie in Abbildung 1-1 illustriert, kodiert *VHL* ein Protein, welches die Proteolyse des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF) induziert. Das aus einer Mutation im *VHL*-Gen resultierende defekte Protein kann diese Funktion nicht erfüllen; HIF wird infolgedessen nicht abgebaut. Aktiviertes HIF transloziert in den Nukleus und löst die verstärkte Transkription zahlreicher pro-proliferativer Gene, die z.B. Wachstumsfaktoren kodieren, aus. Zu diesen Genen zählen unter anderem die für VEGF (*vascular endothelial growth factor*),

PDGF (*platelet-derived growth factor*), *EGF (epidermal growth factor)*, TGFA (*transforming growth factor, alpha*) und FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) (Hutson, 2007).

Obige Wachstumsfaktoren vermögen all diejenigen Zellen zu stimulieren, die die entsprechenden Rezeptoren exprimieren, das sind in erster Linie Endothel- (kleiden die Blut- und Lymphgefäße aus) und Tumorzellen. Zum einen werden Endothelzellen zur Migration angeregt (parakriner Stimulationsmechanismus) und dadurch die Angiogenese befördert. Der Begriff Angiogenese bezeichnet die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits existenten, was für das Fortschreiten einer Tumorerkrankung von zentraler Bedeutung ist, da durch die entstehenden Blutgefäße die ausreichende Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet wird. Aufgrund der erhöhten Ausschüttung von Wachstumsfaktoren ist das Nierenzellkarzinom mit *VHL*-Mutation ein hochvaskulariserter Tumor. Überdies stimulieren die Wachstumsfaktoren aber auch die Tumorzellen selbst (autokriner Stimulationsmechanismus).

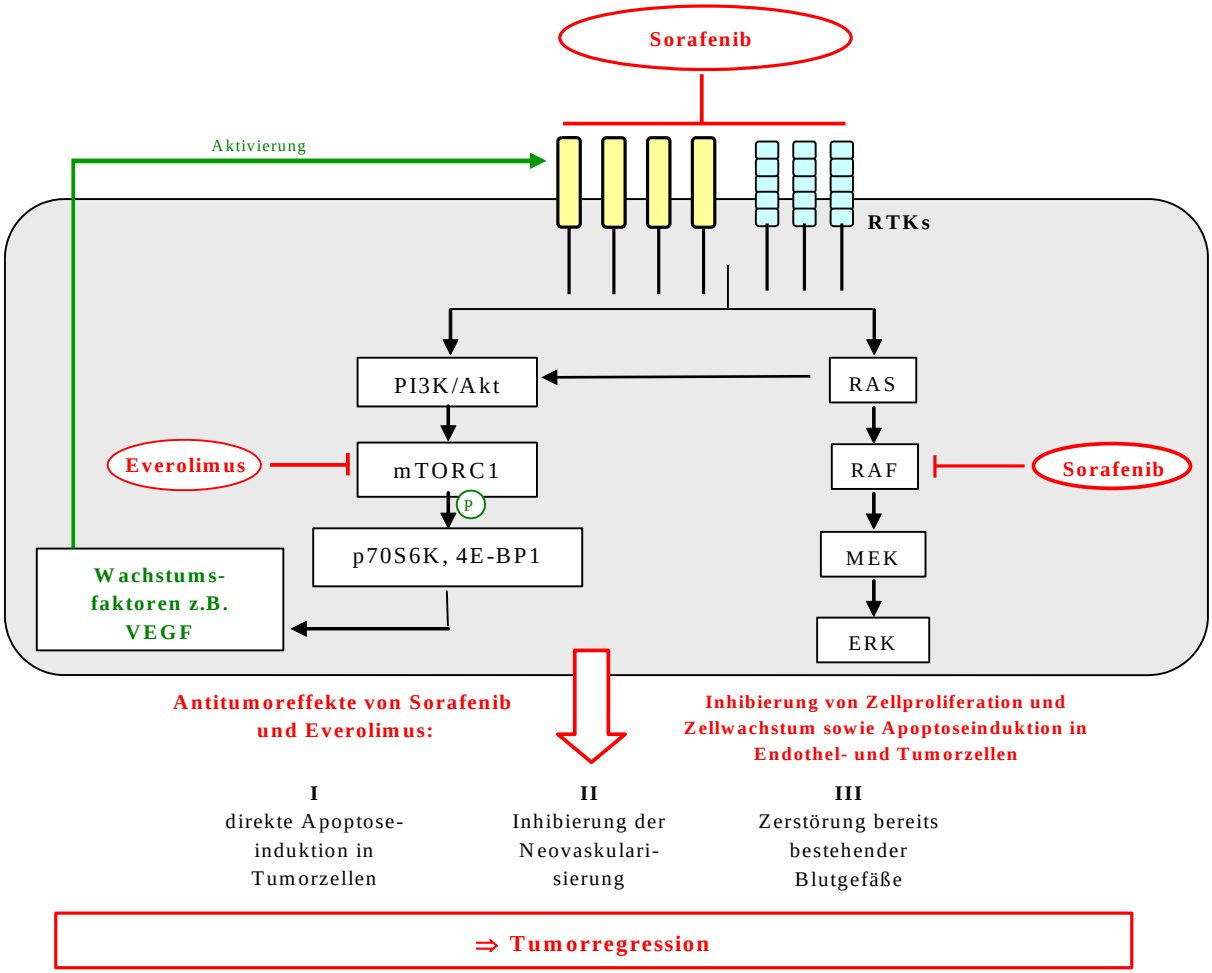


Abbildung 1-2: vereinfachte Übersicht relevanter Signalwege: Der RAF/MEK/ERK-Signalweg und die PI3K/AKT-Signalkaskade werden über Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) gesteuert. Der RAF/MEK/ERK-Signalweg schließt die RAF-Serin/Threoninkinasen ein. Der Wirkstoff Sorafenib hemmt sowohl RTKs als auch RAF. Die PI3K (Phosphoinositid-3-kinase)/AKT-Signalkaskade kann entweder direkt oder über RAS aktiviert werden und beinhaltet den Komplex mTORC1, der vom Wirkstoff Everolimus inhibiert wird. mTORC1 phosphoryliert die *downstream-targets* p70S6K und 4E-BP1. Diese werden durch die Phosphorylierung aktiviert und fördern die Translation z.B. von Wachstumsfaktoren wie VEGF, die als RTK-Liganden fungieren und sie damit aktivieren.

Unabhängig vom Zelltyp übermitteln die Wachstumsfaktoren ihr Signal über Rezeptortyrosinkinasen (RTKs). Das sind Membranrezeptoren, deren intrazelluläre Domäne eine Tyrosinkinase trägt. Nach Bindung eines Liganden dimerisieren die RTK-Monomere und aktivieren sich durch gegenseitige Phosphorylierung (Auto-(trans)-phosphorylierung) an zahlreichen Tyrosinresten. Die Aktivierung der RTKs führt schließlich zur Bindung verschiedener Signalproteine und damit zur Weiterleitung des Signals.
Eine Übersicht über die hier relevanten nachfolgenden Signalkaskaden ist in Abbildung 1-2 gegeben: Die PI3K (Phosphoinositid-3-kinase)/AKT-Signalkaskade führt über verstärkte Translation unter anderem zur Produktion von RTK-Liganden wie dem Wachstumsfaktor VEGF und kann entweder direkt oder über RAS aktiviert werden. Ebenfalls durch RAS wird der für Zellproliferation und -wachstum wichtige RAF/MEK/ERK-Signalweg gesteuert.
Sowohl Wachstumsfaktoren als auch ihre RTKs kommen in verschiedenen Isoformen vor, wobei auch verschiedene Isoformen eines Wachstumsfaktors an die gleiche RTK binden können. Für die VEGF-Isoformen kennt man die drei RTKs KDR, FLT1 und FLT4, für die PDGF-Isoformen die beiden Rezeptoren PDGFRA und PDGFRB und für EGF die 4 Mitglieder der EGFR-Familie EGFR und HER 2-4. TGFA bindet an TGFRA und FGF2 an FGFR2, wobei TGFA nah mit EGF verwandt ist und auch mit dessen Rezeptor interagieren kann.

1.2 Konventionelle Therapieoptionen des Nierenzellkarzinomes

Die Stadien einer Nierenzellkarzinomerkrankung lassen sich nach verschiedenen Systemen kategorisieren. International anerkannt ist die TNM (*tumor, nodes, metastases*)-Klassifikation, die das Stadium maligner Tumoren anhand der drei Kriterien Primärtumorgröße und -ausdehnung, Lymphknotenbefall und Metastasierungsgrad abschätzt. Wird ein NZK zum Zeitpunkt der erstmaligen Diagnose als lokal begrenzt (≤T3), ohne regionäre Lymphknotenmetastasen (N0) und Fernmetastasen (M0) bewertet, ist eine Heilung in vielen Fällen durch teilweise, also organerhaltende, oder vollständige Entfernung der betroffenen Niere (radikale Nephrektomie) möglich. Die Rezidivrate innerhalb eines Zeitraumes von 5 Jahren liegt in diesen Fällen je nach Größe des Primärtumors zwischen 13 und 34% (Marshall, 1997). Die 30% der Patienten, die mit bereits vorhandenen Metastasen vorstellig werden, besitzen eine wesentlich schlechtere Prognose als bei unmetastasiertem Primärtumor, was sich in der in Kapitel 1.1 erwähnten geringen 5-Jahres-Überlebensrate widerspiegelt. Umstritten ist, inwieweit auch die Patienten mit metastasiertem Primärtumor von einer Tumornephrektomie profitieren.
Bei anderen systemischen Krebsformen standardmäßig angewandte Therapieansätze wie Chemo- oder Strahlentherapie haben beim NZK aufgrund ihrer geringen Ansprechraten keine

Bedeutung (EAUGuidelines, 2009). Bezüglich des schlechten Ansprechens der NZK-Metastasen auf konventionelle Chemotherapie (65% Rezidivrate innerhalb der ersten 5 Jahre selbst bei nierenbegrenztem Primärtumor) existieren derzeit zwei Theorien: Die erste Theorie vermutet als Ursache das von Nierenkarzinomzellen überexprimierte *MDR1* (*multidrug resistance gene 1*)-Gen. Dieses kodiert das Glykoprotein P-GP aus der Gruppe der ABC (*ATP-binding cassette*)-Transporter, welches aufgrund seines breiten Substratspektrums viele Xenobiotika wirkungsvoll aus der Zelle zu schleusen vermag. Die zweite Hypothese mutmaßt, dass ihr langsames und/oder unstetiges Wachstum die NZK-Zellen gegen Zytostatika schützt, die in erster Linie sich schnell teilenden Zellen zu schaden vermögen. Jedoch sind beide Theorien mit Zweifeln behaftet, da die entsprechenden Gegenmaßnahmen wie MDR-Inhibitoren oder die Langzeitzufuhr der Zytostatika ebenfalls wenig Erfolg zeigten (Drucker, 2005).

Eine gewisse, wenn auch insgesamt geringe Ansprechrate des metastasierten NZKs ist für die Immuntherapie mit Zytokinen beschrieben. Das allgemeine Wirkprinzip ist hier die Aktivierung von anti-Tumor-Leukozyten, die dann ihrerseits die Tumorzellen töten sollen. Sowohl Interferone als auch Interleukine wurden standardmäßig zur Behandlung des metastasierten NZK eingesetzt. (Drucker, 2005; van Spronsen, 2005). Auf Interferon-α sprechen beispielsweise durchschnittlich etwa 14% der Patienten an, was zu einem progressionsfreien Intervall von 2 Jahren führen kann (Wirth, 1993). Die Bedeutung des Interferon-α wurde nach anfänglicher Euphorie von den neuen, zielgerichteten Wirkstoffen zurückgedrängt. Gegenwärtig kommt es nur noch in Kombination mit anderen Wirkstoffen zur Anwendung (EAUGuidelines, 2009). Interleukin-2 erreicht eine Ansprechrate in vergleichbarer Größenordnung, jedoch mit leicht verbesserter Nachhaltigkeit der Wirkung (Fyfe, 1995). Gemäß den Richtlinien zur NZK-Behandlung der *European Association of Urology* (EAU) von 2009 profitiert nur eine ausgewählte Patientengruppe mit kNZK und einem guten Risikoprofil von der Zytokintherapie (EAUGuidelines, 2009).

1.3 Zielgerichtete Wirkstoffe und ihre Wirkprinzipien

Aufgrund der geringen Ansprechraten konventioneller Therapien bestand die dringende Notwendigkeit der Erforschung neuer Wirkstoffklassen. Mithilfe eines verbesserten Verständnisses der Tumorbiologie konnten hierfür neue Ansatzpunkte gewonnen werden. Potentiell interessant sind Mutationen, die die Expression oder die Funktion von Genen betreffen, welche das Zellwachstum und die Differenzierung einer Zelle kontrollieren. Man unterscheidet zwischen aktivierenden Mutationen an Proto-Onkogenen (die damit zu Onkogenen werden) und solchen an Tumorsuppressorgenen, die zu einem Funktionsverlust ihres Proteins führen. Zahlreiche bekannte Onkogene kodieren etwa Wachstumsfaktoren oder

bewirken die Überexpression und/oder Hyperaktivierung von (Rezeptor-)Tyrosinkinasen (z.B. EGFR (Jin, 2008)). Andere Onkogene kodieren beispielsweise konstitutiv aktivierte Komponenten der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalkaskade oder Transkriptionsfaktoren, die am Ende dieser Kaskade stehen. Zum Beispiel kann man bei etwa 30% aller Tumoren Punktmutationen in einem der Gene der RAS-Familie finden (Saxena, 2008). Konstitutiv aktiviertes RAS aktiviert zahlreiche nachgeschaltete Signalwege. Zu diesen zählt der PI3K/AKT-Signalweg und die RAF/MEK/ERK- Signalkaskade (vergleiche Abbildung 1-2).

Dieses Wissen über die Charakteristika von Tumorzellen hat den Fokus von unspezifischen Chemotherapeutika auf gezielter wirkende Wirkstoffe verlagert, in der Hoffnung, auf diese Weise gesunde Körperzellen weniger in Mitleidenschaft zu ziehen. RTKs, RAS und Komponenten der genannten Signalwege bieten sich hierbei, falls hochreguliert, als potentielle Ziele an (Wilhelm, 2006). Nierenzellkarzinome sind für die konstitutive Aktivität der in Kapitel 1.1 genannten RTKs bekannt. Dies beruht nach dem derzeitigen Stand der Forschung allerdings nicht auf Mutation der *RTKs* selber, sondern auf dem erhöhten Level an Wachstumsfaktoren (Patel, 2006).

Die Tumorgenese lässt sich neben der direkten Ansteuerung der Tumorzellen auch indirekt durch Zerstörung der den Tumor versorgenden Blutgefäße bzw. durch Inhibierung der Neovaskularisierung hemmen. Wirkstoffe, die hier angreifen, werden unter dem Oberbegriff Antiangiogenetika zusammengefasst. Die Angiogenese ist insofern ein viel versprechender Ansatzpunkt, als sie im erwachsenen Organismus relativ selten ist (abgesehen vom weiblichen Reproduktionszyklus sowie Wundheilungs- und Entzündungsprozessen) und ihre Unterdrückung damit wenige Nebenwirkungen hervorzurufen verspricht. Außerdem gewährt diese Herangehensweise eine gewisse Unabhängigkeit von Resistenzmechanismen der Tumorzellen und ein breites Anwendungsspektrum auf viele Tumorarten. Der antiangiogenetische Effekt kann auf zwei verschiedenen Wegen erzielt werden: Ursächlich verhindern lässt sich die Angiogenese durch Hemmung der Produktion und/oder der Bindung sie induzierender Wachstumsfaktoren. Dabei haben bisher nur Wirkstoffe, die den VEGF-Signalweg zum Ziel haben, den Sprung in die klinische Anwendung geschafft. VEGF wird als einer der wichtigsten Angiogenese-Vermittler angesehen (Hemmerlein, 2004). Sozusagen symptomatisch kann man der Angiogenese durch Hemmung von RTKs entgegenwirken.

Verschiedene Vertreter der neuen Generation zielgerichteter Wirkstoffe befinden sich bereits in der klinischen Anwendung bzw. im Zulassungsprozess. Dazu gehören der Multikinase- und RAF-Inhibitor Sorafenib (BAY 43-9006/Nexavar®, Bayer) und der Multikinaseinhibitor Sunitinib (SU 11248/Sutent®, Pfizer). Sie werden oft zur Gruppe der Antiangiogenetika gezählt, wirken jedoch sowohl auf Endothel- als auch auf Tumorzellen. Sorafenib ist seit dem 19. Juli 2006 von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMEA) zur Behandlung fortgeschrittener NZK zugelassen, ebenso wie Sunitinib, das noch bei weiteren

Tumorentitäten Anwendung findet. Mit Hochdruck wird auch die Erforschung weiterer antiangiogenetisch wirkender Stoffe verfolgt. Einige sind alte Bekannte wie etwa das Thalidomid (Contergan®, Grünenthal). Neovastat, ein kompetitiver KDR-Hemmer, und PTK787/ZK222584, ein selektiver Inhibitor der Tyrosinkinasen KDR, FLT1 und PDGFRB, konnten in klinischen Phase III-Studien ebenso überzeugen wie Bevacizumab (Avastin®, Roche), ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen alle Subtypen des Wachstumsfaktors VEGF. Bevacizumab wurde nach Auswertung der multizentrischen AVOREN-Studie im Dezember 2007 in der Europäischen Union in Kombination mit Interferon-α zur Erstlinientherapie des metastasierten Nierenzellkarzinomes zugelassen.
Ein anderes Wirkprinizip hat das auf mTORC1 *(mammalian target of rapamycin*), einem Komplex im PI3K-Signalweg, abzielende Temsirolimus (Torisel®, Wyeth). Es gehört zu den Rapalogs, den Rapamycin-Analoga, auf die in Kapitel 1.3.2 noch genauer eingegangen wird. Temsirolimus fand im Dezember 2007 Zugang zum europäischen Markt.
Ebenfalls zu den Rapalogs zählt RAD001 (Everolimus/Afinitor®, Novartis), das nach einer Erfolg versprechenden Phase III-Studie (RECORD-1) (Motzer, 2008b) am 30. März 2009 in den USA für die Behandlung metastasierten NZK, das nach der Behandlung mit Sunitinib und Sorafenib weiter fortgeschritten ist, zugelassen wurde.
Alternative Forschungsbemühungen beschäftigen sich mit der so genannten spezifischen Immuntherapie. Denkbar sind beispielsweise auf dendritischen Zellen basierende Impfstoffe. Auch eine Immunisierung mit Hitzeschockproteinen oder eine Transplantation mit allogenen Stammzellen werden diskutiert (van Spronsen, 2005). Des Weiteren werden die Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen nur von Tumorzellen exprimierte Antigene (z.B. CA9) und gegen Interleukin-6 oder Tumornekrosefaktor alpha vorangetrieben, wobei den letzten beiden eine Rolle in der autokrinen und parakrinen Stimulation beigemessen wird (van Spronsen, 2005).

1.3.1 Sorafenib

In Hinblick auf die Hemmung der im Zellmetabolismus wichtigen RAF/MEK/ERK-Signalkaskade bieten sich die RAF-Kinasen als Mitglieder dieser Kaskade und zentrale Regulatoren von Zellproliferation, -überleben, -differenzierung, -adhäsion und -migration an. Die Familie der RAF-Kinasen besteht aus drei Mitgliedern: RAF1 (CRAF), BRAF und ARAF. RAF1 scheint das Überleben der Zelle zudem auch unabhängig vom MEK/ERK-Weg durch Zusammenspiel mit anti-apoptotischen und apoptotischen Regulatorproteinen zu befördern (O'Neill, 2004). Hyperaktive RAF- Kinasen finden sich in rund 30% aller malignen Tumoren (Kolch, 2002). Dabei liegt entweder *RAF* selbst in mutierter Form vor oder es ist in Folge vorgelagerter Mutationen (z.B. an RAS, RTKs) hochreguliert. Beim NZK findet man

mit 50% - verglichen zu anderen Tumoren - überdurchschnittlich oft eine gesteigerte Expression von RAF1 (Oka, 1995). Nachdem RAF1 zu Beginn der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts als Erfolg versprechendes Ziel in der Tumortherapie identifiziert worden war, wurde im Rahmen eines großen Projektes zunächst die wirkstoffrelevante Leitstruktur gefunden, deren chemische Optimierung schließlich zur Struktur von Sorafenib führte (Abbildung 1-3) (Wilhelm, 2006).

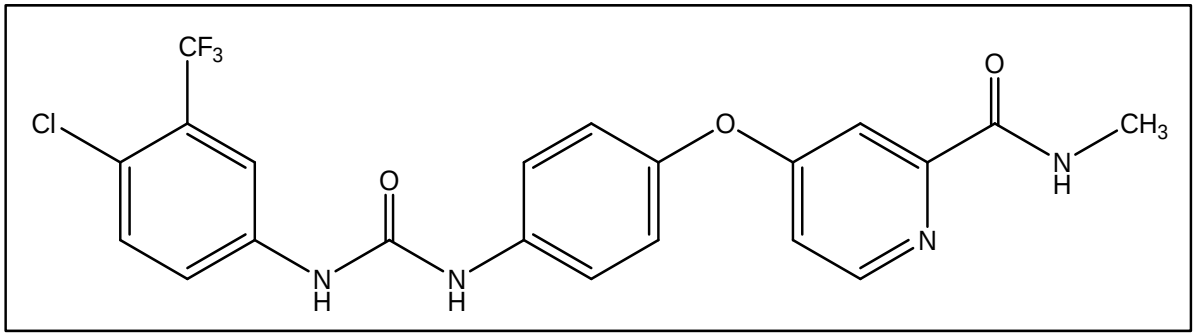


Abbildung 1-3: Strukturformel Sorafenib

Mit einem IC_{50}-Wert (halbmaximale Inhibitorkonzentration) von 6 nM wurde Sorafenib in einem biochemischen Kinase-Assay *in vitro* als potenter Inhibitor der RAF1-Kinase bestätigt (Wilhelm, 2006). Darüber hinausgehende biochemische Analysen zeigten, dass zudem weitere Mitglieder der RAF-Familie wie BRAF und zahlreiche pro-angiogenetische RTKs wie die VEGF-Rezeptoren FLT1, KDR und FLT4, der PDGF-Rezeptor PDGFRB und der FGF-Rezeptor FGFR1 sowie andere, in die Tumorgenese involvierte RTKs (KIT und RET) wirkungsvoll gehemmt werden (Wilhelm, 2004; Carlomagno, 2006). Im Jahre 2004 wurden kristallographische Daten von Komplexen zwischen Sorafenib und verschiedenen RAF-Isoformen publiziert (Abbildung 1-4) (Wan, 2004).

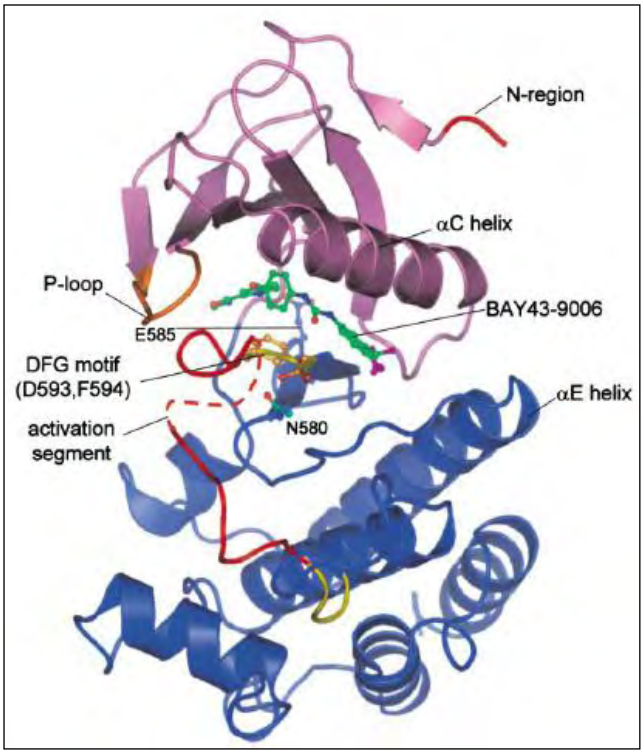


Abbildung 1-4: Bänderdiagramm der Röntgenkristallstruktur von Wildtyp BRAF komplexiert mit Sorafenib: N-Domäne magenta, C-Domäne marineblau und P-Schleife orange gezeichnet. Die Positionen von Asp593 und Phe594 des DFG (Asparagin-Phenylalanin-Glycin)-Motivs sind gezeigt; DFG und APE (Alanin-Prolin-Gluaminsäure)-Motiv in gelb, der Rest des Aktivierungssegments und der N-Region in rot. Der gestrichelte Teil markiert einen ungeordneten Bereich (Wan, 2004).

Darin zeigte sich, dass der inhibitorische Effekt der Wechselwirkung von Sorafenib mit den RAF-Kinasen auf einer Stabilisation des DFG (Asparagin-Phenylalanin-Glycin)-Motivs in seiner inaktiven Konformation beruht (Wan, 2004).
Die hemmende Wirkung auf die RTKs kommt durch Verhinderung ihrer Autophosphorylierung zustande. Durch die Inhibierung von RAF und die RTK-Hemmung werden zum einen Tumorzellproliferation und -wachstum vermindert und zum anderen Apoptose induziert. Einer der Hauptgründe hierfür scheint die Herunterregulation des anti-apoptotischen Proteins MCL1 zu sein (Rahmani, 2005). Die RTK-Hemmung führt außerdem zur Drosselung von Lymphangiogenese und Angiogenese, womit durch Nährstoffmangel ein wachstumsmindernder Effekt auf die Tumorzellen erzielt wird (Wilhelm, 2004; Wilhelm, 2006).

1.3.2 RAD001

Der PI3K/AKT-Signalweg ist ebenso wie die RAF/MEK/ERK-Signalkaskade an einer Vielzahl zellulärer Funktionen beteiligt. Fehlsteuerung bzw. Hochregulation der an ihm beteiligten Kinasen kann zu Krebs führen (Bazigou, 2007). Ein Herzstück der PI3K-Kaskade ist die Familie der mTOR-Komplexe. Es gibt zwei verschiedene Komplexe, in denen mTOR enthalten ist: mTORC1 und mTORC2 (Faivre, 2006).

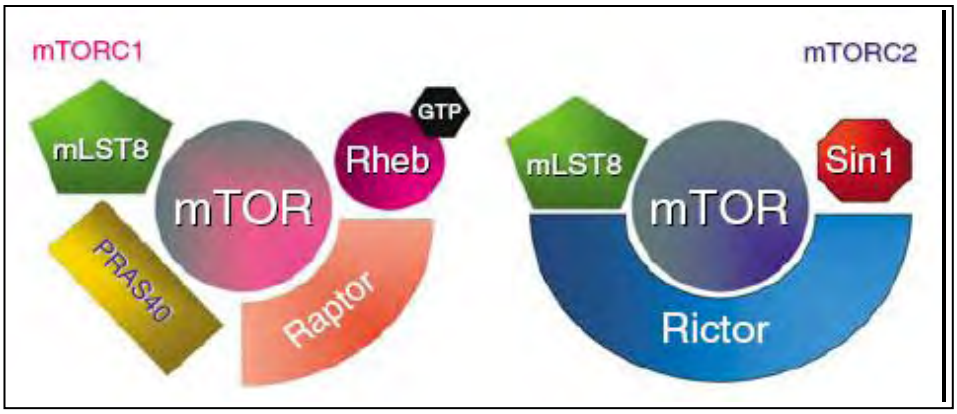


Abbildung 1-5: Die multimolekularen Komplexe mTORC1 (*mammalian target of rapamycin C1)* und mTORC2: mTOR1-Komplex (mTORC1), im linken Teil der Abbildung schematisch dargestellt, besteht im Wesentlichen aus mTOR1, mLST8 (LST8 = *lethal with sec thirteen 8*) und RAPTOR (*regulatory-associated protein of mTOR*). mTOR2-Komplex (mTORC2), im rechten Teil der Abbildung zu sehen, wird von mTOR2, mLST8, mSIN1 (=*mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1*) und RICTOR (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) gebildet

Der mTOR1-Komplex (mTORC1), im linken Teil der Abbildung 1-5 schematisch dargestellt, besteht im Wesentlichen aus mTOR1, mLST8 (LST8 = *lethal with sec thirteen 8*) und RAPTOR (*regulatory-associated protein of mTOR*). Er wird durch Rapamycin, ein makrozyklisches Lakton, das vom Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* produziert wird,

gehemmt. Die durch mTORC1 regulierten biologischen Prozesse schließen Translation, ribosomale Biogenese, Autophagozytose, Glukosemetabolismus und die zelluläre Antwort auf Aminosäure- und Nährstoffmangel ein. Die Aktivität von mTORC1 wird von einer Reihe verschiedener Signalwege gesteuert, der Wachstumsfaktor/PI3K/AKT-Signalweg ist davon der am umfassendsten charakterisierte. Der mTOR2-Komplex (mTORC2), im rechten Teil der Abbildung 1-5 zu sehen, wird von mTOR2, mLST8, mSIN1 (=*mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1*) und RICTOR (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) gebildet und ist - wie der Name RICTOR schon sagt - Rapamycin-insensitiv. Die biologische Funktion von mTORC2 ist im Unterschied zu mTORC1 weniger klar. Mit dem derzeitigen Wissensstand geht man davon aus, dass er das Zellüberleben und die Organisation des Actin-Zytoskeletts kontrolliert (Ballou, 2008).

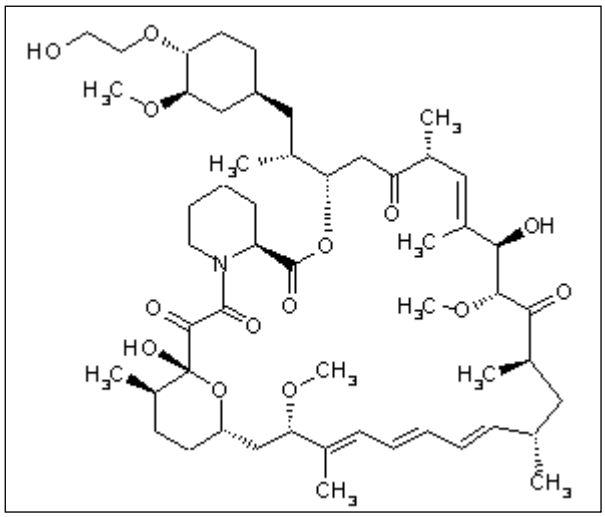


Abbildung 1-6: Strukturformel RAD001

Anders als Sorafenib wurde der mTORC1-Hemmer RAD001 (Abbildung 1-6) nicht „auf dem Reißbrett“ entworfen. Modell stand vielmehr Rapamycin (Sirolimus). Neben seiner Eigenschaft als starkes Fungizid besitzt es immunosuppressive Wirkung, was zunächst zur Anwendung als Immunosuppressivum nach Organtransplantationen führte. RAD001 ist ein Esterderivat des Rapamycins, bei dem die ursprünglich am C-40 vorhandene Hydroxygruppe durch eine Hydroxyethylgruppe ersetzt wurde. Es verfügt, ebenso wie Rapamycin, über eine geringe Wasserlöslichkeit und wird deshalb oral verabreicht. Rapamycin und seine Analoga unterscheiden sich lediglich in ihren pharmakokinetischen Eigenschaften und nicht in ihrer Antitumorwirkung (Le Tourneau, 2008), da sich die Modifikationen außerhalb der Bindungsstellen befinden (Faivre, 2006). Rapalogs nehmen Einfluss auf die Zelle, indem sie an das Immunophilin FKBP12 (12 kDA FK506-*binding protein*) binden. Dieser Komplex interagiert seinerseits mit der FKBP12-Rapamycin-Bindungsdomäne am mTORC1 (Ballou, 2008). Über den genauen Mechanismus wird in der Fachliteratur noch diskutiert. Leone *et al.* vermuten einen allosterischen Einfluss auf die katalytische Domäne von mTOR1, hervorgerufen durch Bindung von Rapamycin an die FKBP12/Rapamycin-Bindungsdomäne (Leone, 2006). Kim *et al.* sehen die Ursache in einer durch Rapamycin hervorgerufenen Destabilisierung des mTOR1-RAPTOR-Komplexes (Kim, 2002). Bai *et al.* wiederum führen die Wirkung darauf zurück, dass der FKBP12/Rapamycin-Komplex nicht von GTP-Rheb ersetzt werden kann (Bai, 2007).

Ungeachtet der strittigen Details beeinträchtigt Rapamycin mTORC1 dahingehend, dass es seine Autophosphorylierung und die Phosphorylierung der *downstream-targets* p70S6K1 *(ribosomal protein S6 kinase 1*) bzw. des Translationshemmers 4EBP1 verhindert (Ballou, 2008). Die mTORC1-p70S6K-Signalgebung ist in den meisten klarzelligen Nierenzellkarzinomen aktiviert (Robb, 2007). 4EBP1 unterdrückt in unphosphoryliertem Zustand die Proteintranslation indem es fest an ElF4E *(eukaryotic translation initiation factor 4E*) bindet und damit dessen Funktion als Translationsfaktor hemmt. Die Phosphorylierung der Serin/Threoninkinase p70S6K am Threoninrest 389 würde zur Phosphorylierung des 40S ribosomalen Proteins SK6 führen, dies zur Einbindung der 40S-Untereinheit in aktiv translatierende Polysomen mit dem Ergebnis verstärkter mRNA-Translation.
Neben der Phosphorylierungsinhibition von 4EBP1 und p70S6K (siehe Abbildung 1-2) wirken mTORC1 Inhibitoren auch über Blockierung der Zellzyklusprogression und verändern die Transkription (Faivre, 2006). Insgesamt wirkt RAD001 abhängig von der Zelllinie zytostatisch und/oder zytotoxisch (Huang et al., 2003).

1.4 Aktuelle Behandlungsempfehlungen für das Nierenzellkarzinom

Die aktuellen Behandlungsempfehlungen befürworten die Anwendung von Tyrosinkinaseinhibitoren, also Wirkstoffen wie Sorafenib oder Sunitinib, als Erst- oder Zweitlinientherapie bei metastasiertem NZK (Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1: Behandlungsempfehlungen für metastasiertes NZK (EAUGuidelines, 2009)

Behandlung	Risikoeinstufung oder vorangehende Behandlung	Empfohlener Wirkstoff
• Erstlinientherapie	niedriges oder mittleres Risiko	Sunitinib Bevacizumab + Interferon-α
	hohes Risiko	Temsirolimus
• Zweitlinientherapie	Zytokine	Sorafenib
	VEGFR mTOR(-)	Everolimus klinische Studien

Sorafenib wird für die Zweitlinientherapie bei metastasiertem NZK vorgeschlagen, der Einsatz von Sunitinib oder Bevacizumab + Interferon-α in Form einer Erstlinientherapie bei Patienten mit guter oder mittelguter Prognose nahe gelegt. Temsirolimus sollte als Erstlinientherapie bei Patienten mit schlechter Prognose in Erwägung gezogen werden. Everolimus findet, wie in Kapitel 1.3 bereits erwähnt, als Zweitlinientherapien bei Patienten,

deren NZK nach vorangehender antiangiogenetischer Therapie weiter fortgeschritten ist, Anwendung (EAUGuidelines, 2009). Eine der Hauptfragestellungen in Hinblick auf das optimale Behandlungsvorgehen ist, inwieweit sich die Effekte einzelner Wirkstoffe durch kombinierte oder sequentielle Gabe verstärken lassen oder ob sich gar ein synergistischer Effekt, also ein Effekt, der über die Summe der Einzeleffekte hinausgeht, erzielen lässt.
Im Falle der beiden in dieser Arbeit untersuchten Wirkstoffe Sorafenib und RAD001 ist ein solcher synergistischer Effekt insofern denkbar, als die gehemmten Signalwege miteinander verknüpft sind (Abbildung 1-2): Eine RTK-Inhibierung sollte zu verminderter Aktivierung der angeschlossenen Signalwege führen. Ferner zöge eine Unterbindung der Kinasefunktion des mTOR1-Komplexes durch RAD001 zusätzlich eine verminderte Translation und Transkription u.a. von Wachstumsfaktoren nach sich. Da jedoch zu vermuten ist, dass die Zellen auf einen derartigen Eingriff beispielsweise durch verstärkte Expression der betroffenen RTKs reagieren oder sich anderweitig adaptieren, ist es nicht unwahrscheinlich, dass die Reihenfolge der Verabreichung von Sorafenib und RAD001 für das Ausmaß des Ansprechens auf die Therapie beziehungsweise in Hinsicht auf die Verhinderung der Entwicklung von Resistenzmechanismen eine Rolle spielt.

1.5 Sphäroide in der Zellkulturforschung

Zellkulturexperimente sind ein integraler Bestandteil der Krebsforschung. In erster Linie werden sie angewandt, um Wirkstoffkandidaten aus Bibliotheken potentiell aktiver Substanzen herauszufiltern, aber auch um die Wirkmechanismen bereits existenter Wirkstoffe eingehender zu untersuchen. In der Vergangenheit bediente man sich hierbei zumeist *monolayer*- oder Suspensionskulturen, die jedoch für die Zellen ein höchst artifizielles Umfeld darstellen, was die Vergleichbarkeit mit *in vivo*-Experimenten oder gar klinische Studien stark limitiert (Friedrich, 2007). Aus diesem Grund haben sich in den letzten Jahren zusätzlich verschiedene Zellkulturmodelle etabliert, mit dem Ziel, eine funktionelle Differenzierung der Zellen zu erreichen und zu erhalten. Grundsätzlich können die gegenwärtigen Bemühungen in drei verschiedene Herangehensweisen untergliedert werden: (a) Kultivierung von Primärgeweben oder isolierten Primärzellen in niedrigen Passagen, (b) Einsatz etablierter Zelllinien auf speziellen Oberflächen und/oder in kontrollierten heterologen *monolayer*-Systemen und (c) Verwendung etablierter Zelllinien in 3-D-Kultursystemen. Unter den verschiedenen 3-D-Zellkultursystemen ist das *multicellular tumour spheroid* (MCTS)-Modell am aussichtsreichsten - unter anderem, weil es beträchtliches Potential als Hilfsmittel in der automatisierten Wirkstofftestung besitzt (Kunz-Schughart, 2004). Die dreidimensionalen Zellaggregate sphärischer Geometrie werden Sphäroide oder auch Organoide genannt. Die Begriffe Tumeroid oder gemischter Sphäroid

werden für Co-Kulturen aus zwei oder mehr Zelltypen verwendet. Das Konzept der Sphäroide ist kein ganz neues, bereits 1971 wurde es als Modell vorgestellt (Sutherland, 1971). Der Vorteil des MCTS-Modells besteht in seiner Ähnlichkeit zu avaskulären Mikrometastasen (<1 mm Durchmesser) bzw. Mikroregionen größerer Tumoren. Analog zu Mikrotumoren oder Mikrometastasen liegen auch in Sphäroiden Versorgungsgradienten (siehe Abbildung 1-6) vor, die dazu führen, dass vitale Zellen lediglich in der Sphäroidrinde (in der Regel 100-300 µm) zu finden sind. Weiter im Inneren stößt man auf Zellen im Ruhezustand, ab einem kritischen Durchmesser von 500–600 µm besitzen die Sphäroide der meisten permanenten Zelllinien einen nekrotischen Kern (Friedrich, 2007).

Diese Proliferationsunterschiede sind auf die schlechtere Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen in Richtung Sphäroidmitte zurückzuführen; parallel ist der Katabolitenabtransport aus dem Inneren erschwert. Des Weiteren beobachtet man bei multizellulären Tumorzellsphäroiden häufig die Ausbildung einer ausgedehnten extrazellulären Matrix und die Existenz eines komplexen dreidimensionalen Netzwerkes von Zell-Matrix und Zell-Zell-Interaktionen. Diese Charakteristika wirken sich unter anderem auf die Verteilung und Wirkung von Hormonen, Wachstums-faktoren und Wirkstoffen aus (Friedrich, 2007).

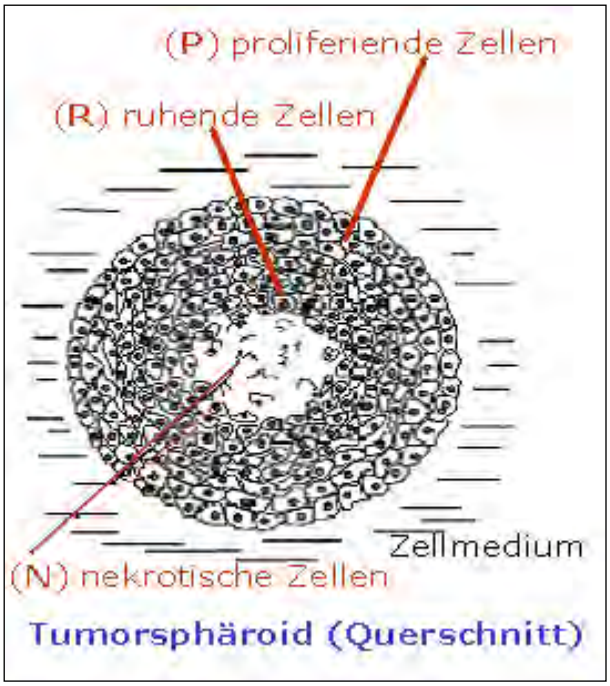


Abbildung 1-7: Tumorzellsphäroid im Querschnitt; modifiziert nach (Mueller-Klieser, 2000)

Ein großer Vorteil der Sphäroide liegt in der technisch einfach durchführbaren Messung des Sphäroiddurchmessers als Indikator für Proliferation bzw. auf die Behandlung folgende Hemmung der Proliferation. Hierfür werden lediglich ein Lichtmikroskop, eine Digitalkamera und die passende Bildbearbeitungssoftware benötigt. Weitere Analysemethoden arbeiten mit Gewebeschnitten oder mit disaggregierten Sphäroiden.

1.6 Zielstellung der Arbeit

Das Nierenzellkarzinom als dritthäufigste urologische Tumorentität mit seiner geringen 5-Jahres-Überlebensrate im Falle bereits bestehender Metastasierung zum Zeitpunkt der initialen Diagnose ist derzeit Gegenstand intensiver Forschungen. Durch das bessere Verständnis molekularer Charakteristika der Nierenzellkarzinomzellen konnte eine neue Generation so genannter zielgerichteter Wirkstoffe entwickelt werden. Zu diesen gehört sowohl der mTOR-Inibitor RAD001 als auch der RAF- und Rezeptortyrosinkinasehemmer Sorafenib. Obwohl *in vivo* die Angiogenese eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese spielt, ist es wichtig, auch die direkte Beeinflussung der Tumorzellen und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch genauer zu untersuchen.

Ziel der Arbeit ist zunächst die Charakterisierung der kNZK-Zelllinien A-498 und 786-O hinsichtlich der Expression und Aktivität von VEGF- und PDGF-Rezeptoren. Danach gilt es, ein Tumorsphäroid-Modellsystems anhand dieser Zelllinien zu etablieren, was die Ermittlung der optimalen Kultivierungsbedingungen sowie die Beschreibung des Wachstumsverhaltens unbehandelter Sphäroide beinhaltet. Anschließend muss ein geeignetes Behandlungsregime für die Wirkstoffe Sorafenib und RAD001 hinsichtlich Behandlungsdauer und Wirkstoffkonzentrationen erarbeitet werden. Im Anschluss sollen die Effekte der Wirkstoffe sowohl einzeln als auch in Kombination untersucht werden. Hierbei wird der Effekt der sequentiellen mit der gleichzeitigen Wirkstoffverabreichung verglichen. Als Maß für das Ansprechen auf die Therapie wird die Veränderung des Sphäroiddurchmessers herangezogen. Im Falle eines messbaren Einflusses der eingesetzten Wirkstoffe auf den Sphäroiddurchmesser soll nachfolgend eine Charakterisierung der Viabilität sowie der, durch die Wirkstoffe initiierten, molekularen Veränderungen erfolgen. Zu diesem Zweck ist die Phosphorylierung des mTORC1-*downstream-targets* 4EBP1 und des RAF-*downstream-targets* ERK sowie AKT als Indikator für Rezeptortyrosinkinaseaktivität zu untersuchen. Insbesondere ist dabei der Fragestellung nachzugehen, ob bei der Kombinationsbehandlung aus beiden Wirkstoffen die vermutbaren synergistischen Effekte auftreten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-1 Alphabetische Auflistung von Geräten und Verbrauchsmaterialen

Produkt	Firma
Autoradiographiezubehör: Entwicklungsgerät, Film *Bio Max MR*, Kassetten	Eastman Kodak, Rochester (USA)
Brutschrank *BB6220*	Heraeus, Hanau
Combitips Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Digitalkamera PowerShot A620	Canon, Krefeld
Einwegpipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Corning Inc., New York (USA)
Elektroblottermodul	VWR, Darmstadt
Elektrophoresesystem (vertikal)	VWR, Darmstadt
epT.I.P.S (0,5 - 20 µl, 2 - 200 µl, 50 - 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Filterpapier (für Western-Blot)	Schleicher & Schuell, Dassel
Flockeneisbereiter	KEP, Dresden
flüssiger Stickstoff	Air Liquide, St. Georges (Frankreich)
Fluoreszenzmikroskop *Axioskop2 MOT*	Zeiss, Jena
Geldokumentationsgerät *Compu-Cam-Imager*	INTAS, Göttingen
Gelelektrophoresekammer *Agagel Maxi*	Biometra, Göttingen
Heizblock Dri-Block DB 2A	Techne, Cambridge (UK)
Kammerobjektträger *culture slides*	BD Biosciences, Heidelberg
Kryokonservierungsgerät *NICOOL LM 10*	Air Liquide, Düsseldorf
Kryoröhrchen (2 ml)	Greiner, Frickenhausen
Laborwaage 510	Kern, Albstadt-Ebingen
Lichtmikroskop *Axiovert 40C*	Zeiss, Göttingen
Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Netzgerät für Elektrophorese Electrophoresis Power Supply – EPS 3500	GE Healthcare, Freiburg

Pipetten Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe *Pipetboy*	Integra Biosciences, Fernwald
Plattenphotometer	anthos labtec instruments, Wals-Siezenheim
PVDF Transfer Membran	GE Healthcare, München
Spektrophotometer *Ultrospec 3000*	GE Healthcare, Freiburg
Sterilbank Holten LaminAir S-2012 1.2	Heto-Holten, Allerod (Dänemark)
Tischzentrifugen *(5415 R, 5810 R)*	Eppendorf, Hamburg
Tubes (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Ultraschall-Homogenisator *Sonoplus UW/HW 2070*	Bandelin, Berlin
Vortex-Schüttler *REAX 2000*	Heidolph, Schwabach
Zellkulturflaschen 25 cm^2, 75 cm^2, 175 cm^2	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6-, 24-, 96- well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellzählgerät *Coulter Z2*	Beckman-Coulter, Krefeld
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Corning Inc., New York (USA)

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Tabelle 2-2 Alphabetische Auflistung von Chemikalien, Reagenzien und Kits

Produkt	**Firma**
Agarose	Roth, Karlsruhe
Antioxidanz NuPAGE Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe
Aqua destillata (A.dest.)	Braun, Melsungen
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Bis-Tris Gel NuPAGE 4-12%	Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue G-250	Bio-Rad, München
Coulter Isoton II Diluent	Beckman-Coulter, Krefeld
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DNase I	GE Healthcare, Freiburg
dNTP-Mix (10 mM/dNTP)	Promega, Mannheim
Dulbecco's Mod. Eagle Medium (DMEM) (+ 4,5 g/l Glukose, + L-Glutamin, Pyruvat)	Invitrogen, Karlsruhe

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories, Pasching (Österreich)
ECL-Kit (Chemilumineszenz-Nachweis)	GE Healthcare, Freiburg
Einbettmedium, wässrig *Aquatex*	Merck, Darmstadt
Einbettmedium für Immunfluoreszenz, wässrig *Fluoromount-G*	SouthernBiotech (Vertrieb Biozol), Birmingham (USA)
Einbettmedium auf Harzbasis, *Entellan Neu*	Merck, Darmstadt
Ethanol (96 Vol.-%), vergällt	Apotheke des Universitätsklinikums Dresden
Ethanol (99,9 Vol.-%)	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Fast Red Substrat Kit	DAKO, Eching
Fötales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe
In Situ Cell Death Detection Kit, AP	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit	Invitek, Berlin
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Laufpuffer NuPAGE MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Levamisole Solution	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Lysepuffer Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technologies, Beverly (USA)
Magermilchpulver	Heirler Cenovis, Radolfzell
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylzellulose	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Mycoplasma Detection Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Natriumdodekylsulfat (SDS)	MP Biomedicals, Eschwege
Ponceau S Solution	Serva, Heidelberg
Probenpuffer NuPAGE LDS Sample Buffer (4×)	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Proteingrößenstandard *spectra multicolor broad range protein ladder*	Fermentas, St. Leon-Rot
Reprobing-Lösung *ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution, 10×*	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

Transferpuffer NuPAGE Transfer Buffer (20×)	Invitrogen, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
TritonX-100	Apotheke des Universitätsklinikums Dresden
Trypsin/EDTA (10×)	Biochrom AG, Berlin
Tween 20	Sigma Aldrich, Taufkirchen
VEGF Elisa DuoSet ELISA Development kit	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Wasser für Injektionszwecke	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg
WST-1 *Cell Proliferation Reagent*	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

2.1.3 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 2-3 Thematische Auflistung von Medien, Puffern und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	
Zellzucht		
Penicillin/Streptomycin	100 IE/ml 200 µg/ml	Penicillin Streptomycin
Einfriermedium (100 ml)	10 ml 40 ml 50 ml	DMSO FKS RPMI 1640
Trypsin-EDTA-Lsg. (1 l)	100 ml 900 ml	0,05% Trypsin-EDTA A. dest.
Vollmedium RPMI 1640 (500 ml)	440 ml 50 ml 5 ml 5 ml	RPMI 1640 FKS L-Glutamin P/S
Western-Blot		
Lämmli-Probenpuffer (9,5 µl)	2 ml 1 ml 1,25 ml 5,25 ml => zu je 950 µl aliquotieren und bei 20°C lagern +50 µl +Pipettenspitze	Glycerin 20% SDS Sammelgelpuffer A.dest. β-Mercaptoethanol Bromphenolblau

Sammelgelpuffer (500 ml 1M TRIS-Lsg)	60,57 g auf 500 ml	TRIS A.dest. => pH-Wert auf 6,8 einstellen
SDS-PAGE-Probenpuffer (100 µl)	56,3 µl 5,63 µl 38,11 µl	Probenpuffer β-Mercaptoethanol A.dest.
Blot-Transferpuffer (10 % Methanol)	50 ml 100 ml 1 ml auf 1 l	20×Laufpuffer Methanol Antioxidant mit A. dest. auffüllen
Gel-Entfärber-Lösung (1,1 l)	300 ml 100 ml 700 ml	Methanol Essigsäure A. dest.
5 % Magermilchpulver-Blockpuffer	5 g auf 100 ml	Milchpulver mit PBS-Tween 20 auffüllen
0,5 % Magermilchpulver-Blockpuffer	1 g auf 200 ml	Milchpulver mit PBS-Tween 20 auffüllen
0,1 % Tween 20 in PBS	1 l 1000 µl	PBS Tween 20

2.1.4 Antikörper für Western-Blot und Immunfluoreszenz

Tabelle 2-4: Verwendete Primär-Antikörper

Bezeichnung	Klon (wenn monoklonal)	Wirt	Verdünnung WB = Western-Blot IF = Immun-fluoreszenz	Firma
ACTB	AC-74	Maus	1 : 17.000 in MMP (WB)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
AKT1	E45W	Kaninchen	1:500 in BSA (WB)	Epitomics, Burlingame (USA)
Phospho-AKT1 (Ser473)	104A282	Maus	1:100 in BSA (WB)	Imgenex, San Diego (USA)
4E-BP1	53H11	Kaninchen	1:500 in MMP (WB)	Cell Signaling Technologies, Berverly (USA)
Phospho-4E-BP1 (Thr70)	EPR654(2)A	Kaninchen	1:250 in MMP (WB)	Novus Biologicals, Littleton (USA)
FLT1	-	Kaninchen	1:33 in BSA (IF) 1:25 in MMP (WB)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
GAPDH	6C5	Maus	1:4000 (WB)	Novus Biologicals, Littleton (USA)
KDR	sc-6251	Maus	1:50 in BSA (IF) 1:125 in MMP (WB)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
p44/42 MAPK (ERK1/2)	-	Kaninchen	1:100 in MMP (WB)	Cell Signaling Technologies, Berverly (USA)
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)	-	Kaninchen	1:100 in MMP (WB)	Cell Signaling Technologies, Berverly (USA)
p70S6K	16/p70[s6k]	Maus	1:500 in MMP (WB)	BD Biosciences, Heidelberg
Phospho-p70S6K (Thr389)	-	Kaninchen	1:500 in MMP (WB)	Acris Antibodies, Hiddenhausen
PDGFRA	-	Kaninchen	1:25 in BSA (IF)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
Phospho-PDGFRA (Tyr720)	-	Kaninchen	1:50 in BSA (IF)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)

PDGFRB	-	Kaninchen	1:25 in BSA (IF)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
Phospho-PDGFRB (Tyr751)	-	Kaninchen	1:50 in BSA (IF)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
Tubulin, alpha	DM1A	Maus	1:500 in BSA (WB)	Calbiochem (Merck), Darmstadt

Tabelle 2-5: Verwendete Sekundär-Antikörper

Bezeichnung	**Klon (wenn monoklonal)**	**Wirt**	**Verdünnung** **WB = Western-Blot** **IF = Immun-fluoreszenz**	**Firma**
Anti-Kaninchen-immunoglobuline HRP	-	Schwein	1 : 1000 (WB)	Dako, Eching
Anti-Kaninchen-immunoglobuline FITC	-	Schwein	1 : 30 (IF)	Dako, Eching
Anti-Mausimmuno-globuline HRP	-	Kaninchen	1 : 1000 (WB)	Dako, Eching
Anti-Mausimmuno-globuline AF488	-	Ziege	1:200 (IF)	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.5 Verwendete Zelllinien

Tabelle 2-6: Verwendete Zelllinien

Name	**Ursprung**	**Bezugsquelle**	**Eigenschaften**
A-498	Primäres klarzelliges Adenokarzinom	Cell Lines Service	bildet Sphäroide; VHL-Mutation
786-O	Primäres klarzelliges Adenokarzinom	Cell Lines Service	bildet Sphäroide; VHL-Mutation

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien A-498 und 786-O sind kommerziell erhältliche Zelllinien. Beide entstammen dem Primärtumor eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms und sind für ihre Fähigkeit, Sphäroide zu bilden, bekannt (Friedrich, 2007). Des Weiteren weisen beide Zelllinien eine mit Funktionsverlust verbundene *VHL*-Mutation auf (Gnarra, 1994).

2.2.2 Zellkultivierung

Die standardmäßige Kultivierung der Zellen erfolgt in Form von Monolayerkulturen in 75 cm^2 - Zellkulturflaschen unter sterilen Bedingungen bei 37°C, 5% CO_2-Partialdruck und gesättigter Wasserdampfatmosphäre. Im Abstand von zwei bis drei Tagen wird die Wachstumsdichte der Zellen mikroskopisch beurteilt, wobei sie im subkonfluenten Bereich zu halten ist. Bei geringer Wachstumsdichte wird lediglich ein Wechsel des Kulturmediums vollzogen. Nähert sich die Zelldichte der Konfluenz, werden die Zellen in folgender Art und Weise passagiert:
Nach Dekantieren des verbrauchten Mediums werden die Zellen zweimal mit je 10 ml PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen. Anschließend werden 4 ml Trypsin-EDTA (T/E) zugegeben, die Flasche etwa 30 s geschwenkt und 3 ml T/E wieder abgenommen. Nach Ablauf der 5-minütigen Inkubationszeit im Brutschrank wird die Enzymreaktion durch Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium abgestoppt und ein Teil der Zellsuspension - in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate - in eine neue Zellkulturflasche überführt, in der bereits 15 ml Medium vorgelegt wurden.
Für weiterführende Experimente wird die Konzentration der Zellen in der Zellsuspension bestimmt. Dazu werden 100 µl Suspension mit 9,9 ml *Coulter Isoton II Diluent* verdünnt und mit Hilfe eines Partikelzählgerätes (Z2, Coulter) gezählt.

2.2.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Analog zum Passagieren der Zellen wird für die Kryokonservierung zunächst der Zellkulturüberstand entfernt und die Zellen zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Es werden 4 ml T/E zupipettiert, für 30 s einwirken lassen, 3 ml T/E wieder entfernt und die Zellkulturflasche 5 min im Brutschrank inkubiert. Im Unterschied zum Passagieren der Zellen werden die Zellen nun in 25 ml frischem Kulturmedium aufgenommen, in ein 50 ml-

Röhrchen gegeben und 5 min bei 4°C und 453×g zentrifugiert. Im Anschluss an einen Waschschritt mit 15 ml frischem Kulturmedium und abermaliger Zentrifugation wird der Überstand dekantiert und das Pellet in n ×1,5 ml (n entspricht der vorgesehenen Menge an Kryotubes) Einfriermedium resuspendiert. Das Abfüllen in die Kryotubes sollte möglichst zügig vonstatten gehen, da DMSO bei Raumtemperatur die Zellen schädigt. Das Einfrieren wird mit Hilfe eines Kryostats bewerkstelligt und erfolgt in 4 Schritten: 1.) auf Ventilatorstufe 3 bis -10°C runterkühlen; 2.) auf Ventilatorstufe 6 bis -45°C kühlen; 3.) auf Ventilatorstufe 9 bis -120°C kühlen und abschließend 4.) in flüssigen Stickstoff absenken und 5 bis 10 min durchfrieren lassen.
Für den Ansatz einer Rekultur werden die Zellen dem Stickstofftank entnommen und schnell in den Händen oder im Brutschrank aufgetaut. Sobald nur noch kleine Eisstückchen im Kryotube sichtbar sind, wird dieses kurz aufgemischt, geöffnet und der Inhalt komplett in ein 50 ml Röhrchen mit 15 ml frischem Kulturmedium überführt. Das Kryogefäß wird ausgespült und die Zellsuspension im 50 ml-Röhrchen durch leichtes Schwenken gemischt. Die Zellen werden 10 min bei 4°C und 453×g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgegossen und dieser Waschschritt mit 15 ml Kulturmedium wiederholt. Anschließend wird der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die entstandene Suspension wird in eine 25 cm^2- Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.4 Mykoplasmentest

Mykoplasmen sind parasitär in Säugetieren, Pflanzen und anderen Organismen lebende Bakterien. Durch FKS oder unsachgemäße Handhabung gelangen sie in die Zellkultur. Sie sind aufgrund ihrer geringen Größe von etwa 0,3 µm lichtmikroskopisch nicht detektierbar, bewirken jedoch metabolische, Wachstums- und Viabilitätsveränderungen im Wirtsorganismus (Razin, 1998). Um eine Mykoplasmeninfektion auszuschließen, werden die kultivierten Zellen regelmäßig (10. bis 15. Passage) sowie vor jeder Kryokonservierung auf Infektionen getestet. Hierfür wird der *Mycoplasma Detection Kit* der Fa. Roche verwendet, der die vier in Säugerzellkulturen hauptsächlich auftretenden Mykoplasmenarten *M. arginini, M. hyorhinis, M. laidlawii* und *M. orale* erkennt. Die Detektion beruht auf einem Enzym-Immunoassay mit polyklonalen Antikörpern. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben.

2.2.5 Sphäroidkultivierung und Handhabung

Herstellung der Methylzelluloselösung

Die Anzucht der Sphäroide erfolgt in einer Methylzelluloselösung (MC-Lösung). Diese erhöht die Dichte des Mediums und erleichtert infolgedessen eine Aggregation der Zellen. Zur Herstellung von 50 ml MC-Stammlösung werden 25 ml Zellkulturmedium auf 60°C erwärmt, 0,6 g MC-Pulver zugegeben und 20 min bei 60°C gerührt. Anschließend werden bei Raumtemperatur (RT) weitere 25 ml Medium zugegeben, die Lösung auf 4°C gekühlt und für mindestens 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Zur Entfernung ungelöster MC-Fasern wird 60 min bei 4°C mit 2.500×g zentrifugiert. Nach Sterilfiltration des Überstandes (0,2 µm-Filter) kann die Lösung bei 4°C gelagert werden.

Anzucht und Kultivierung der Sphäroide

Die Sphäroide werden in 96-*Well*-Platten á 10.000 Zellen pro *well* kultiviert. Zur Anzucht werden die Zellen gezählt und im spezifischen Medium inklusive 20% MC-Stammlösung entsprechend der Zellzahl verdünnt. Jeweils 200 µl pro *well* dieser Mischung werden in eine Suspensionskulturplatte pipettiert. Dann wird die Platte sieben Tage im Brutschrank unter gleichen Bedingungen wie die Monolayerkulturen inkubiert, um den Zellen Gelegenheit zu geben zu aggregieren und eine extrazelluläre Matrix auszubilden. Nach dieser Zeit werden die Sphäroide auf agarosebeschichtete 96-*well*-Platten mit flachem Boden umgesetzt (50 µl 1% Agarose in PBS). Durch die Agarosebeschichtung wird eine Adhäsion der Sphäroide am Plattenboden verhindert. Umgesetzt werden die Sphäroide in einem Volumen von 100 µl mittels einer modifizierten 100 µl-Pipette, bei der die Austrittsöffnung durch Anschrägen mit Hilfe eines Skalpells vergrößert wurde. Nach dem Umsetzen wird jedes *well* mit 50 µl frischem Zellkulturmedium ergänzt.

Wirkstoffbehandlung der Sphäroide

Von RAD001 wird ausgehend von der 20 mM Stammlösung in DMSO (Dimethylsulfoxid) zunächst eine Vorverdünnung (1:400), ebenfalls in DMSO, erzeugt; alle weiteren Verdünnungsschritte erfolgen in Zellkulturmedium. Die Vorverdünnung in DMSO ist notwendig, weil RAD001 in hohen Konzentrationen in wässrigen Medien ausfällt.
Die Sorafenib-Stammlösung in DMSO hat eine Konzentration von 10 mM. In diesem Fall ist keine Vorverdünnung in DMSO wie beim RAD001 notwendig; für alle Verdünnungsschritte kann Zellkulturmedium verwendet werden.
Die Behandlungen werden in 96-*well*-Platten ausgeführt, wobei jeweils mindestens acht Sphäroide gleich behandelt werden. Für die Wachstumskurven wird der Mittelwert dieser Achtfachbestimmung herangezogen. Als Startpunkt wird der Tag gewählt, an dem die Sphäroiddurchmesser nach der Aussaat eine konstante Größe erreicht haben. Zu jeder Wirkstoffkonzentration wird eine Kontrolle mit dem entsprechenden DMSO-Gehalt, aber ohne Wirkstoff, mitgeführt, um eine mögliche Toxizität des DMSO abschätzen zu können. Als Positivkontrolle zur Validierung des Modellsystems werden Sphäroide mit 15 µg/ml Cisplatin (CDDP) versetzt. Zusätzlich wird in jedem Behandlungsdurchlauf eine Gruppe Sphäroide unbehandelt gelassen. Die Einzelbehandlungen mit RAD001 und Sorafenib sowie die Kombinationsbehandlungen mit gleichzeitiger Wirkstoffgabe (z.B. Abbildung 3-26) werden folgendermaßen ausgeführt: Zu den Sphäroiden in 150 µl Medium wird jeweils 50 µl Wirkstofflösung gegeben. Alle angegebenen Konzentrationen beziehen sich dabei auf die Endkonzentration im Gesamtvolumen von 200 µl. Die Platten werden im Brutschrank inkubiert und der Einfluss auf das Sphäroidwachstum durch regelmäßiges Photographieren der Sphäroide nachvollzogen. Nach je 7 Tagen Behandlung (Tag 7 und 14) wird das Kulturmedium teilweise durch frisches ersetzt: Aus Gründen der besseren Handhabbarkeit werden erst 50 µl frisches Kulturmedium zugegeben und durch leichtes Rütteln der Platte mit dem alten Medium vermischt. Dann werden 100 µl entfernt und anschließend erneut 50 µl frisches Kulturmedium zugemischt, so dass das Gesamtvolumen am Ende wieder 200 µl beträgt und der Wirkstoff 1:1,67 verdünnt wurde. In den Kombinationsbehandlungen mit sequentieller Wirkstoffgabe (z.B. Abbildung 3-27) werden zu den Sphäroiden in 150 µl Medium zunächst 25 µl des ersten Wirkstoffs gegeben. Nach 4 Behandlungstagen werden weitere 25 µl zugegeben. Diese enthalten sowohl den zweiten Wirkstoff als auch den ersten, so dass dessen Konzentration durch Erhöhung des Volumens nicht verändert wird. Weitere 4 Behandlungstage später (und nachfolgend in einem Intervall von 7 Tagen) werden die Wirkstoffe durch teilweisen Ersatz des Kulturmediums 1:1,67 verdünnt.

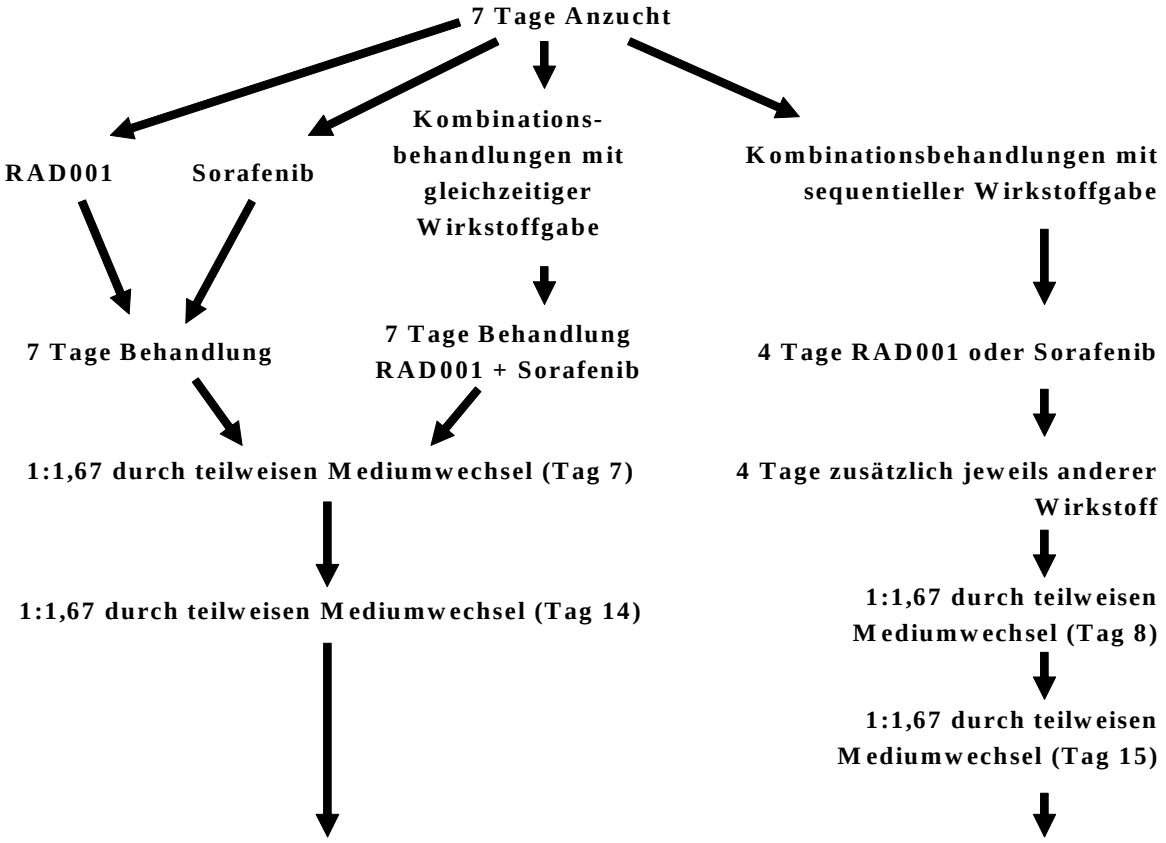


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs von Einzel- und Kombinationsbehandlungen: Die für die Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit gleichzeitiger Wirkstoffgabe vorgesehenen Sphäroide werden nach 7 Tagen Anzucht jeweils 7 Tage behandelt und der Wirkstoff an Tag 7 und 14 nach Start der Behandlung durch teilweisen Mediumwechsel 1:1,67 verdünnt. Die für die Kombinationsbehandlung mit sequentieller Wirkstoffgabe vorgesehenen Sphäroide werden nach 7 Tagen Anzucht 4 Tage mit einem der beiden Wirkstoffe RAD001 oder Sorafenib und im Anschluss 4 Tage zusätzlich mit dem jeweils anderen Wirkstoff behandelt. Am 8. und 15. Tag nach Start der Behandlung werden die Wirkstoffkonzentrationen durch teilweisen Mediumwechsel 1:1,67 verdünnt.

Messung des Sphäroiddurchmessers

Die Erfassung und Dokumentation des Sphäroiddurchmessers erfolgt nach Photographie der Sphäroide unter Verwendung der im Internet erhältlichen Bildbearbeitungssoftware *ImageJ* (http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html). Um den Durchmesser mit der Anzahl der Pixel korrelieren zu können, wird ein Gegenstand bekannter Länge photographiert (hier: Neubauer-Zählkammer), die Anzahl der Pixel bestimmt und dem bekannten Wert der Länge zugeordnet. Für die verwendete Digitalkamera- (Modus: *P;* Auflösung: *S + M3;* 4×Zoom.) und Mikroskopeinstellungen (10×Vergrößerung) entsprachen 290 Pixel 250µm.

Einbetten der Sphäroide in Paraffin

Die Sphäroide werden in ein 2 ml-Eppendorfröhrchen geerntet und zweimal mit PBS gewaschen. Nach 30-minütiger Fixierung in 4% Formaldehyd schließt sich ein abermaliger

Waschschritt mit PBS an. Dann wird die Dehydrierung durch jeweils 30-minütige Inkubationen in 75% Ethanol (EtOH), 85% EtOH, 95% EtOH, Isopropanol (zweimal) und Xylol vollzogen. Nun werden die Sphäroide für 30 min in geschmolzenes Paraffin gegeben und der Paraffinblock anschließend am Mikrotom in 4 µm dicke Sphäroidschnitte geschnitten.

HE (Hämatoxylin-Eosin) –Färbung

Die Färbung der Sphäroidschnitte wird analog zur Färbung von Gewebeschnitten durchgeführt. Zunächst wird folgendes Rehydrierungsprotokoll durchlaufen: 2×10 min Xylol, gefolgt von 5 min Isopropanol und je 2-minütiger Inkubation in einer absteigenden Ethanolreihe (96%, 80% und 50%). Nach Inkubation in A.dest. für 2 min schließt sich der Färbeschritt in frisch filtriertem und mit A.dest. 1:2 verdünntem Hämalaun an. Nach 7 min Inkubationszeit werden die Schnitte kurz mit Leitungswasser gespült, 10 s in 1,2% Salzsäure (3 ml konz. HCl zu 250 ml A.dest) getaucht und 15 min unter fließendem lauwarmem Leitungswasser gebläut. 10 g Eosin werden in einem Liter 50% Ethanol gelöst und 1 ml konzentrierte Ethansäure zugegeben. Nach 10 min in der Eosinlösung werden die Schnitte wieder dehydriert. Dafür werden sie 10 bis 30 s in 80% Ethanol, 1 min in 96% Ethanol, je 1 min in Isopropanol, 5 min im ersten Xylolbad und mindestens 10 min im zweiten Xylolbad inkubiert. Die Schnitte sind nun für die permanente Einbettung in *Entellan* vorbereitet.

2.2.6 Expressionsnachweis der RTKs VEGF&PDGF: Immunfluoreszenz

Wird die Immunfluoreszenz an Sphäroid-Paraffinschnitten durchgeführt, ist eine Deparaffinierung selbiger, wie in Abschnitt 2.2.5 für die HE-Färbung beschrieben, notwendig. Sollen frische Zellen untersucht werden, werden diese am Vortag in Kammerobjektträgern (*culture slides)* so ausgesät, dass sie am Tag des Experiments Subkonfluenz erreicht haben. Für die Zelllinien A-498 und 786-O werden dazu 80.000 Zellen/Kammer ausgesät. Die Zellen werden 2× kurz mit je 400 µl PBS gewaschen und mit Hilfe einer 4% Formalin-Lösung 15 min bei RT fixiert. Nach einem erneuten Waschschritt erfolgt die Permeabilisierung mit 0,1% TritonX-100 Lösung (in PBS) für 3 min bei RT. Anschließend wird durch 3×5-minütiges Waschen die vollständige Entfernung des Tensids sichergestellt. Ab diesem Schritt werden Sphäroidschnitte und *culture slides* analog behandelt. Nach kurzem Waschen mit 1% BSA-Lösung kann der entsprechende primäre AK, gelöst in 1% BSA-Lösung, in den in Tabelle 2-4 angegebenen Konzentrationen für 1 h bei RT inkubiert werden. Die Objektträger werden dazu mit 60 µl, die einzelnen Kammern auf den *culture slides* mit je 150 µl AK-Lösung inkubiert. Zusätzlich wird immer eine

Negativkontrolle ohne primären AK mitgeführt. Nach 3×5-minütigem Waschen mit PBS wird der sekundäre AK, mit 1% BSA-Lösung 1:30 verdünnt, für 1 h bei RT inkubiert. Aufgrund des lichtempfindlichen Fluorophors FITC sind die Proben ab diesem Arbeitsschritt vor direkter Lichteintrahlung zu schützen. Abschließend werden die Proben 3×5 min mit PBS gewaschen. Von den *culture slides* wird der Kammeraufsatz entfernt und die Oberseite der Objektträger mit 60 µl Fluoromount-G mit 0,3% DAPI und einem Deckgläschen bedeckt. Am Fluoreszenzmikroskop kann die Intensität der Fluoreszenz überprüft werden. Aus praktischen Gründen ist es zudem sinnvoll, die Ergebnisse in Form digitaler Photos festzuhalten. Um das Ausmaß der Fluoreszenz desselben Antikörpers in verschiedenen Zelllinien vergleichen zu können, muss die Belichtungszeit konstant gewählt werden. Bewährt haben sich hierfür 15,9 s für FITC und 9 ms für DAPI.

2.2.7 WST-1-Zellviabilitätstest

Der WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat)-Assay ist ein Viabilitätstest. Tetrazoliumsalze werden durch mitochondriale Dehydrogenasen zu Formazan, einem wasserlöslichen Farbstoff, gespalten (Abbildung 2-2). Um die Viabilität der Sphäroide zu überprüfen, wird pro *well* soviel WST-1 zugegeben, dass dessen Volumen 10% des Volumens des auf den Zellen befindlichen Kulturmediums beträgt. Alle Messungen an Sphäroiden werden als Sechsfachbestimmungen durchgeführt. Zusätzlich werden zur Bestimmung des Nullwertes drei *wells* mitgeführt, die nur Agarose, Kulturmedium und WST-1 enthalten. Die Platte wird im Brutschrank 4 h inkubiert. Die produzierte Farbstoffmenge kann mittels Absorptionsmessung unter Zuhilfenahme eines Plattenphotometers detektiert werden und ist proportional zur Menge der in der Probe befindlichen metabolisch aktiven Zellen. Die Absorption wird bei 450 nm quantifiziert; die Referenzwellenlänge beträgt 620 nm. Die erhaltenen Absorptionswerte einer Sechsfachbestimmung werden gemittelt und der Nullwert substrahiert.

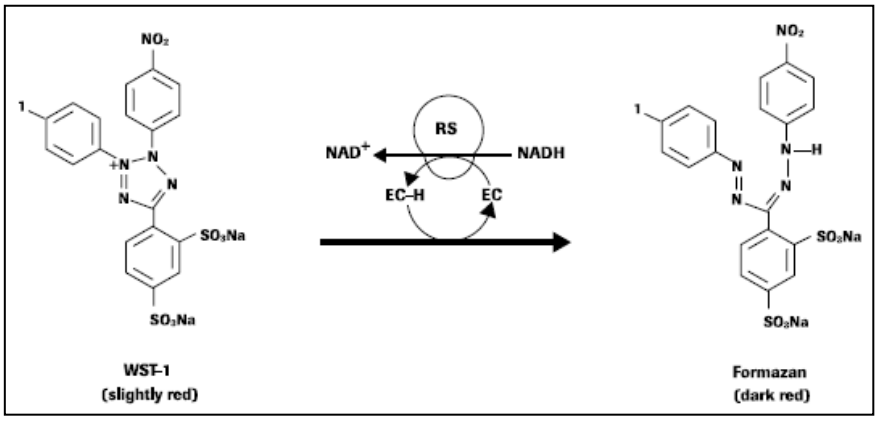


Abbildung 2-2: Spaltung von WST-1 in Formazan durch das mitochondriale Tetrazolium-Reduktase-System (WST-1-Gebrauchsanweisung; Roche)

2.2.8 Western-Blot

Dienen als Probenmaterial gefrorene Zellpellets, werden diese zunächst in 12,5 µl Lysepuffer pro 25.000 Zellen resuspendiert. Nachfolgend werden die Eppendorfröhrchen 5 min auf Eis inkubiert, kurz dem Ultraschallbad ausgesetzt und die unlöslichen Bestandteile durch 10-minütige Zentrifugation bei 14.000×g und 4°C abgetrennt. Jeweils 12,5 µl des Überstandes werden in ein neues Eppendorfröhrchen überführt und mit 10 µl LDS-Probenpuffer versetzt. Zur Denaturierung der Proteine wird die Probe 10 min bei 70°C im Thermoblock inkubiert.
Da sich die Sphäroide nicht mit der Lysemethode für Zellpellets zerstören lassen, wurden verschiedene Aufschlussmethoden getestet:

Methode 1) 6 Sphäroide werden im Lämmli-Probenpuffer 5 min bei 95°C gekocht und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer dünnen Pipettenspitze werden Sphäroidreste zerstört.

Methode 2) 6 Sphäroide werden zunächst in 30 µl 10×Lysepuffer eingefroren. Daraufhin werden sie einem dreimaligen Auftau-Einfrier-Zyklus, bestehend aus 2 min Inkubation in flüssigem Stickstoff gefolgt von 3 min Inkubation in warmem H_2O, unterzogen. Die Probe wird auf 2×12,5 µl aufgeteilt, mit jeweils 12 µl Lämmli-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C und anschließend 5 min auf Eis inkubiert.

Methode 3) Wie Methode 2 aber LDS- statt Lämmli-Probenpuffer.

Nachfolgend wurden die Sphäroide nach dem Waschen mit PBS auf die als „Methode 1“ beschriebene Art aufgeschlossen. Alle Proben werden anschließend auf ein Bis-Tris Gel (4-12%) aufgetragen. Vom Proteinstandard werden 10 µl eingesetzt. Für die innere Elektrophoresekammer fügt man dem Laufpuffer 0,25% Antioxidanz zu. Die Gelelektrophorese wird bei einer Spannung von 150 V durchgeführt. Sobald die Bromphenolblaubande die untere Gelkante erreicht hat, wird der Gellauf gestoppt.
Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung nach dem Molekulargewicht werden die Proteine durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld unter Verwendung des *Semi-Dry-Electroblot*-Systems auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran übertragen. Die hydrophobe PVDF-Membran muss dazu vorher 10 s mit Methanol benetzt und danach in Transferpuffer äquilibriert werden. Für den Transfer der Proteine wird für 2 h eine Spannung von 50 V angelegt. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindung an die PVDF-Membran wird diese nach dem Blotten 90 min bei RT (bzw. über Nacht im Kühlschrank) in 5% Magermilchpulver (MMP), gelöst in PBS mit 0,1% Tween20 (PBS-T), geblockt. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min mit 0,5% MMP kann die Membran mit den primären Antikörpern (AK) inkubiert werden. Diese werden in 0,5% MMP verdünnt. Der primäre AK (Konzentrationen siehe Tabelle 2-4) wird 3 h, der sekundäre AK 1 h auf der Membran

belassen. Zwischen diesen Arbeitsschritten wird durch Waschen in 0,5% MMP für 3×10 min die vollständige Entfernung ungebundenen primären AK gewährleistet. Nach Inkubation mit dem sekundären AK wird die Membran zunächst mit PBS-T (1×15 min, 2×5 min) und abschließend mit PBS (2×5 min) gespült.
Die Detektion des AK-Proteinkomplexes geschieht unter Ausnutzung des ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Prinzips. Dafür ist es notwendig, sekundäre AK zu verwenden, an die das Enzym HRP (*horse raddish peroxidase*) gekoppelt ist. Dieses Enzym ist in der Lage Sauerstoff von Wasserstoffperoxid auf Luminol zu übertragen, welches unter Emission von Licht zum Dicarboxylat-Dianion oxidiert wird. Die beiden, im ECL-Kit enthaltenen Lösungen werden hierbei im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran für 1 min in der Mischung inkubiert, bevor die Lösung abgegossen und das freigesetzte Licht durch Auflegen eines Röntgenfilmes detektiert wird. Nach der Entwicklung des Films kann die Auswertung durch Einscannen des Röntgenfilms und Analyse mit der Software *Kodak 1D image analysis software* (V3.6; Fisher Scientific, Schwerte) erfolgen. Dabei wird densitometrisch die Menge des jeweiligen Proteins semiquantitativ bestimmt und auf das Referenzprotein bezogen.

Reprobing der Membran

Das Entfernen der primären und sekundären Antikörper von der Membran erfolgt durch 15-minütige Inkubation in 20 ml *reprobing solution* unter leichtem Schütteln bei RT. Im Anschluss wird die Membran 2×5 min in 5% MMP geblockt und ist nach 3×10 min Waschen in 0,5% MMP für die erneute Antikörperinkubation vorbereitet.

2.2.9 Zellzyklustest

Um Aussagen über den relativen Anteil von Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen (G0/G1, S, G2/M) zu erhalten, wird der Gehalt PI-gefärbter DNA durchflusszytometrisch bestimmt. Unter Verwendung des *CycleTest Plus DNA Reagent Kits* werden die Zellmembranen aufgelöst, Zytoskelett und Kernproteine entfernt, RNA abgebaut, das Chromatin stabilisiert und die DNA der isolierten Kerne mit PI gefärbt. Mit der Software *ModFitLT V1.00* wird der prozentuale Anteil der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen ermittelt. Die Sphäroide werden nach Abschluss des Experiments geerntet und die Sphäroide einer Behandlungsgruppe gepoolt. Je 6 Sphäroide werden in 100 µl *buffer solution* resuspendiert und bis zur späteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Aufarbeitung, durchflusszytometrische Messung und Auswertung erfolgen im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Dresden.

3 Ergebnisse

3.1 Expressions- und Aktivitätsnachweis von VEGFR & PDGFR

Um die Expression der hier relevanten RTKs in den verwendeten NZK-Zelllinien A-498 und 786-O nachzuweisen, wurden Immunfluoreszenzexperimente an in Kammerobjektträgern ausgesäten Zellen durchgeführt. Zur Anwendung kamen Antikörper gegen die beiden VEGF-Rezeptoren FLT1 und KDR und die beiden PDGF-Rezeptoren PDGFRA und PDGFRB sowie gegen deren phosphorylierte Formen phospho-PDGFRA (Tyrosinrest 720) und phospho-PDGFRB (Tyrosinrest 751). Dabei konnte in beiden Zelllinien die Expression aller getesteten RTKs in 100% der Zellen (durch Vergleich mit der DAPI-gefärbten DNA) nachgewiesen werden. Abbildung 3-1 zeigt exemplarisch zwei der Fluoreszenzaufnahmen für den Rezeptor PDGFRB in der Zelllinie A-498. FITC- und DAPI-Fluoreszenz wurden jeweils getrennt voneinander photographiert und die Aufnahmen anschließend mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware *ImageJ* zusammengefügt. Man erkennt, dass PDGFRB, ebenso wie seine phosphorylierte Form gehäuft und teilweise punktuell exprimiert ist.

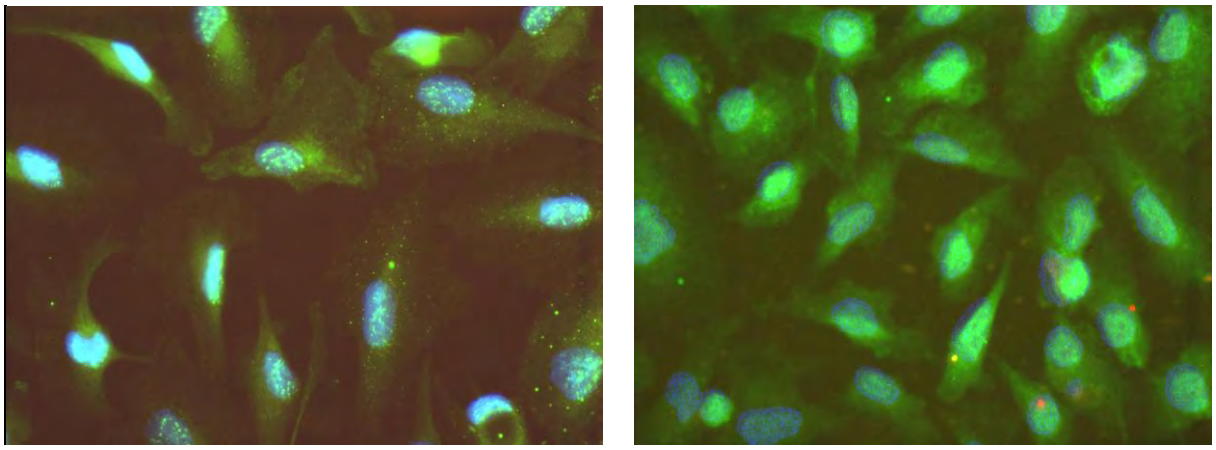


Abbildung 3-1: FITC-fluoreszenzmarkierte Rezeptoren PDGFRB (linkes Bild) und phospho-PDGFRB (rechtes Bild) in A-498 Zellen: DNA mit DAPI gefärbt. Vergrößerung 400x; Belichtungszeit FITC 15,9 s, DAPI 9 ms. PDGFRB-Antikörper 1:25, phospho-PDGFRB-Antikörper 1:50 verdünnt.

Gleiches galt für die Zelllinie 786-O, die in Abbildung 3-2 analog dargestellt ist.

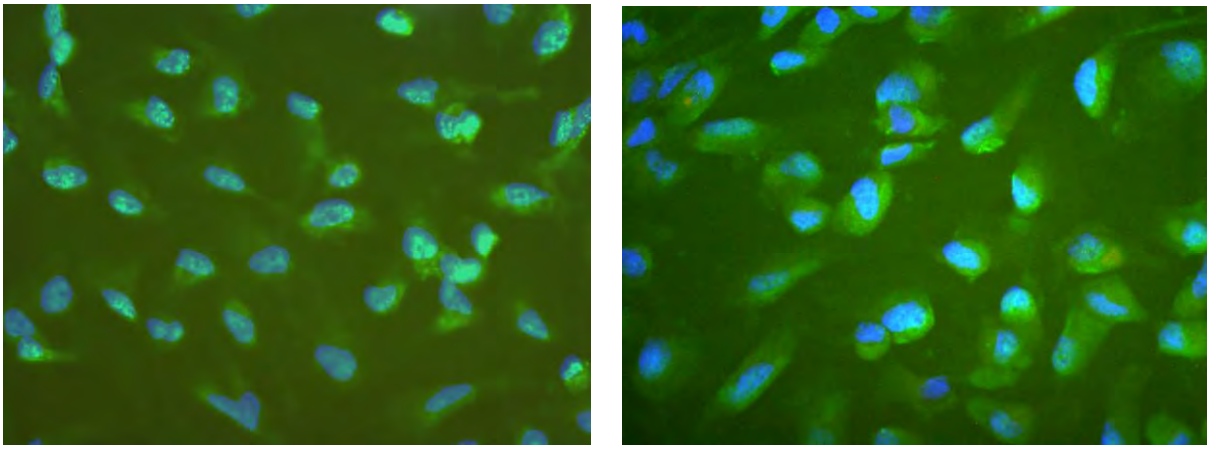


Abbildung 3-2: FITC-fluoreszenzmarkierte Rezeptoren PDGFRB (linkes Bild) und phospho-PDGFRB (rechtes Bild) in 786-O Zellen: DNA mit DAPI gefärbt. Vergrößerung 400x; Belichtungszeit FITC 15,9 s, DAPI 9 ms. PDGFRB-Antikörper 1:25, phospho-PDGFRB-Antikörper 1:50 verdünnt.

Für den Nachweis der VEGF-Rezeptoren KDR und FLT1 in der Zelllinie A-498 wurde zusätzlich ein Western-Blot (Abbildung 3-3) angefertigt. Die Expression von FLT1 und KDR in A498 bestätigte sich auch mit dieser Methode.

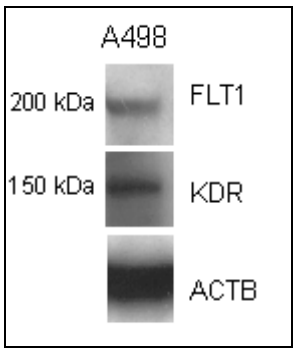


Abbildung 3-3: Ergebnisse des Western Blots der VEGF-Rezeptoren FLT1 (200 kDa) und KDR (150 kDa) in A-498 Zellen: FLT1 (AK 1:25) und KDR (AK 1:125) Expression; ACTB (β-Actin) als Referenzprotein.

3.2 Charakterisierung des Sphäroidwachstums

Bereits in Vorarbeiten zu der hier vorgelegten Arbeit war mit 10.000 Zellen/*well* eine geeignete Zellzahl zur Aussaat der Sphäroide ermittelt worden. Anschließend wurde für die Sphäroidzucht die *soft agar*-Methode mit der Methylzellulosetechnik verglichen. Wurde der Zellsupension 20% Methylzellulose zugesetzt und das Ganze in Suspensionskultur-Rundbodenplatten pipettiert, bildete sich innerhalb eines Tages eine sphärische Zusammenballung von Zellen, die sich im Laufe der nächsten 6 Tage verdichtete (Abbildung 3-5). Ab etwa dem 8. Tag nach Kultivierungsbeginn konnten Zeichen beginnender Adhäsion an der Platte festgestellt werden: Die Sphäroide bewegten sich weniger beim Schwenken der Platte und unter dem Mikroskop wurden einzelne Zellen in der Nachbarschaft des Sphäroids sichtbar, die am Plattenboden wuchsen (nicht gezeigt). Die daraufhin getestete *soft agar* Methode wies einen anderen Nachteil auf: Wurde die Zellsuspension direkt in die

agarosebeschichteten *wells* pipettiert, lagerten sich die Zellen zwar zusammen, bildeten allerdings meist keinen symmetrischen Sphäroid kugelförmiger Gestalt (Abbildung 3-4).

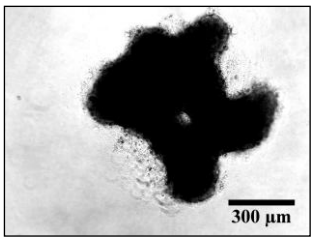


Abbildung 3-4: Mit Hilfe der *soft agar*-Methode erzeugter Sphäroid: Eine Zellsuspension der Zelllinie A-498 wurde in eine agarosebeschichtete 96-*well*-Platte pipettiert (10.000 Zellen/*well*). Die Aufnahme wurde 4 Tage nach der Aussaat gemacht.

Abbildung 3-5 veranschaulicht den Vorgang der Sphäroidbildung am Beispiel eines einzelnen Sphäroids der Zelllinie A-498. Zu Beginn (Beobachtungstag 1; 24 h nach Aussaat der Zellen) waren noch einzelne Zellen erkennbar. Die Zusammenballung war locker und durchscheinend. Im Verlauf der Zeit verdichtete sich der Sphäroid, nach Beobachtungstag 4 war die Außenseite glatt, einzelne Zellen waren nicht mehr auszumachen.

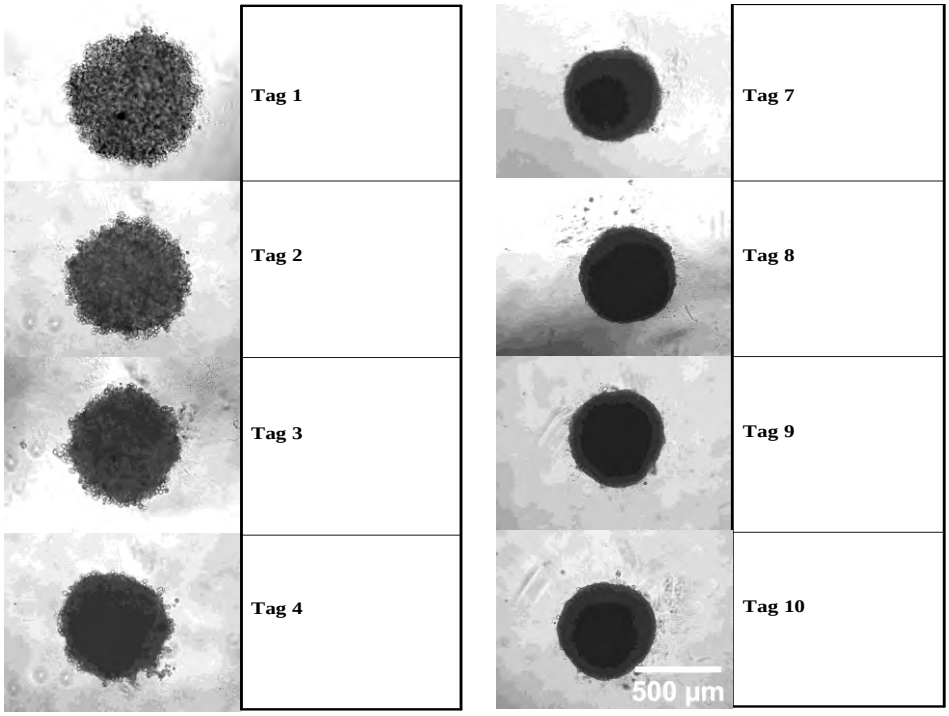


Abbildung 3-5: Lichtmikroskopische Aufnahmen eines A-498 Sphäroids: Am Tag 0 wurden 10.000 Zellen ausgesät. Der Beobachtungszeitraum betrug insgesamt 10 Tage, wobei die Sphäroide am 7.Tag auf eine agarosebeschichtete 96-well-Platte umgesetzt wurden.

HE-gefärbte Gewebeschnitte der Sphäroide zeigten (Abbildung 3-6), dass das Innere der Sphäroide – zumindest nach optischer Beurteilung – homogen aufgebaut ist. Ein nekrotischer Kern ist nicht erkennbar.

Abbildung 3-6: Schnitt eines HE-gefärbten A-498 Sphäroids: Die 18 Tage alten Sphäroide wurden dehydriert, in Paraffin eingebettet und 4µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden mit der Hämatoxlin-Eosin-Methode gefärbt. Die Aufnahme wurde mit einer 200fachen Vergrößerung angefertigt.

Als Quintessenz dieser Versuche wurden in der Folge die beiden Techniken dahingehend kombiniert, dass die Zellsuspension in 20%iger Methylzelluloselösung in Suspensionskulturplatten ausgebracht und die entstandenen Sphäroide nach 7 Tagen auf agarosebeschichtete Platten überführt wurden (siehe Kapitel 2.2.5).
Im nächsten Schritt wurde das Wachstumsverhalten der Sphäroide charakterisiert.

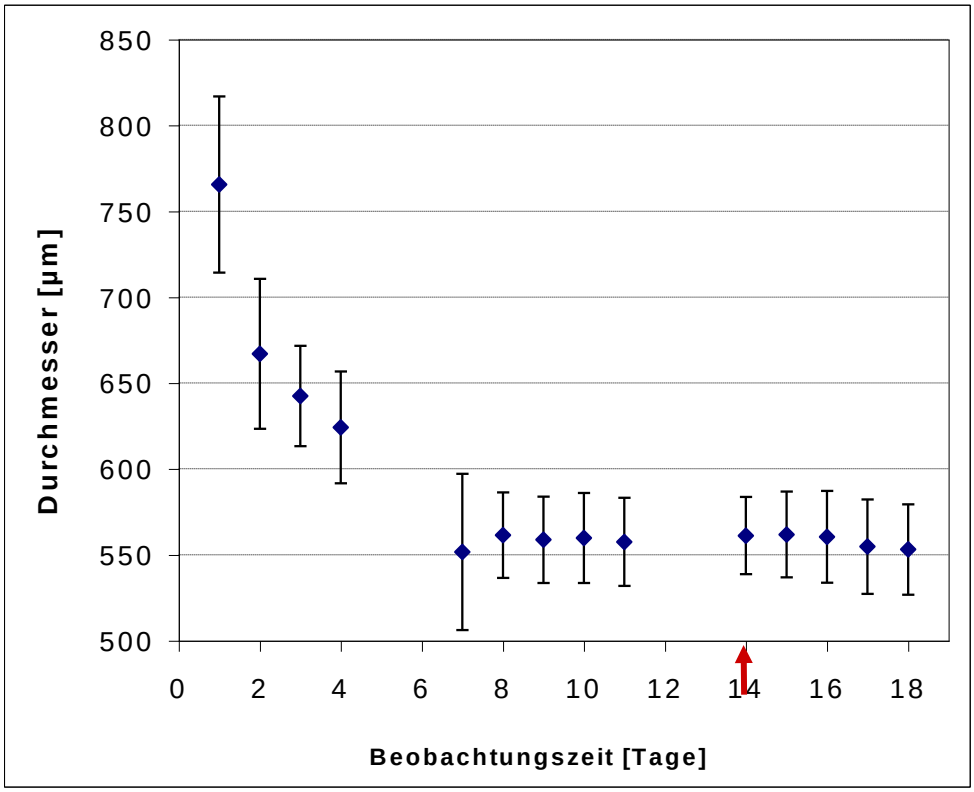


Abbildung 3-7: Zeitabhängige Veränderung des Durchmessers von A-498 Sphäroiden: Mithilfe der Bildbearbeitungssoftware *ImageJ* wurde aus den Werten einer horizontalen und einer dazu orthogonalen vertikalen Messung der Durchmesser eines Sphäroids bestimmt. Aufgetragen ist der Mittelwert aus insgesamt 15 Sphäroiden, die über einen Zeitraum von 18 Tagen beobachtet wurden. Der rote Pfeil markiert das Umsetzen auf eine agarosebeschichtete Platte. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung.

In Abbildung 3-7 und 3-8 ist die Entwicklung des Sphäroiddurchmessers über die Dauer der Beobachtung aufgetragen. Aus dem Durchmesser von je 15 (A-498) beziehungsweise 12 (786-O) Sphäroiden wurde der Mittelwert gebildet und zusammen mit der Standardabweichung aufgetragen. Man erkennt, dass sich der Sphäroiddurchmesser zunächst

verringerte und dann stagnierte (A-498) bzw. leicht anstieg (786-O). Um einen Einfluss des Transfers der Sphäroide auf agarosebschichtete Platten auf den Sphäroiddurchmesser zu ergründen, wurden die Sphäroide der Zelllinie A-498 (Abbildung 3-7) erst nach 14 Tagen umgesetzt. Ein Effekt des Umsetzens auf den Sphäroiddurchmesser ist anhand der Wachstumskurve nicht erkennbar.

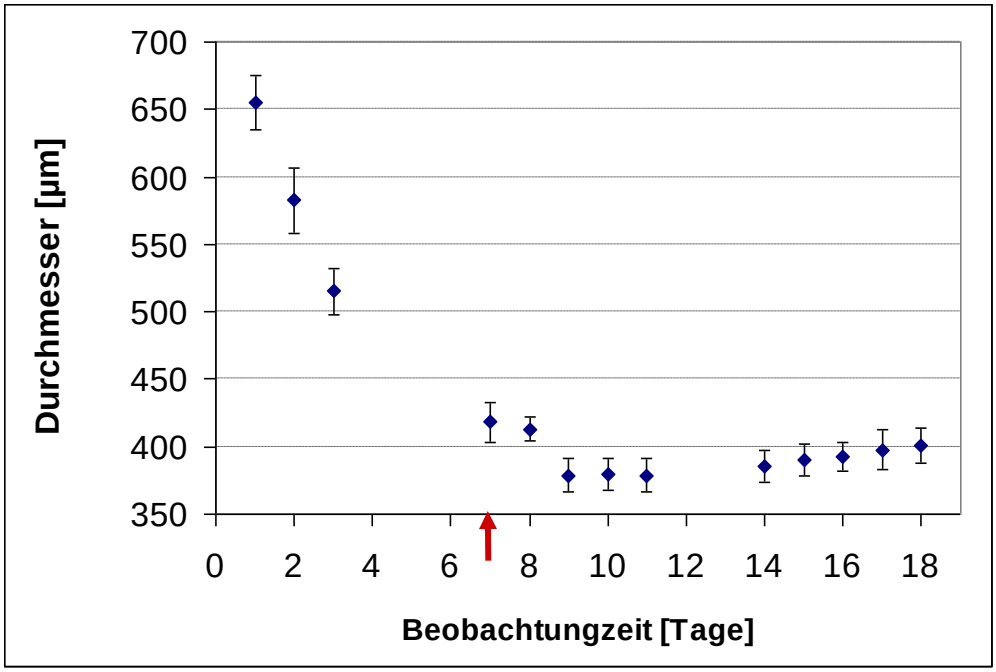


Abbildung 3-8: Zeitabhängige Veränderung des Durchmessers von 786-O Sphäroiden: Mithilfe der Bildbearbeitungssoftware *ImageJ* wurde aus den Werten einer horizontalen und einer dazu orthogonalen vertikalen Messung der Durchmesser eines Sphäroids bestimmt. Aufgetragen ist der Mittelwert aus insgesamt 12 Sphäroiden, die über einen Zeitraum von 18 Tagen beobachtet wurden. Der rote Pfeil markiert das Umsetzen auf eine agarosebeschichtete Platte. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung.

3.3 Optimierung der Sphäroiddisaggregation für den Western-Blot

Da sich die Sphäroide als sehr stabil erwiesen und bei Anwendung der Lysemethode für Zellpellets intakt blieben, wurden verschiedene andere Aufschlussmethoden miteinander verglichen. Durch direkte Behandlung mit dem Ultraschallstab ließen die Sphäroide sich zwar wirkungsvoll lysieren (Western-Blot nicht gezeigt), allerdings erwies es sich als unvermeidlich, dass dabei ein Teil der Probe verloren ging, wodurch die Reproduzierbarkeit gefährdet wurde. Die Effektivität der daraufhin untersuchten Sphäroidaufschlussmethoden (vergleiche Kapitel 2.2.8) ist am Beispiel des AKT-Antikörpers in Abbildung 3-9 gezeigt. Dem Blot zufolge fand die effektivste Lyse - gekennzeichnet durch die dickste AKT-Bande - für die Probe 1 statt. Diese Methode produzierte im Gegensatz zu den anderen beiden anderen kein viskoses Lysat und ist auch *in puncto* Zeitaufwand vorzuziehen, weswegen sie für die nachfolgenden Experimente verwendet wurde.

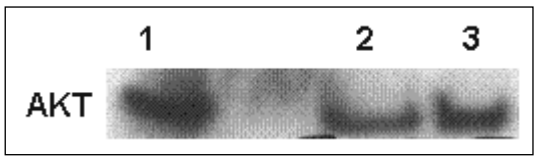


Abbildung 3-9: Verschiedene Sphäroidaufschluss-verfahren am Beispiel des Western-Blots von AKT: Vergleich der Effektivität verschiedener Aufschlussmethoden an Sphäroiden der Zelllinie 786-O. In jeden *slot* wurde eine Menge Lysat pipettiert, die 2,5 Sphäroiden (etwa 25.000 Zellen) entsprach. Probe 1 wurde 5 min in Lämmli-Probenpuffer gekocht. Probe 2 wurde erst wiederholtem Einfrieren und Auftauen in Lysepuffer unterzogen und nach Zugabe von Lämmli-Probenpuffer 5 min gekocht. Probe 3 wurde erst wiederholtem Einfrieren und Auftauen in Lysepuffer unterzogen und nach Zugabe des Probenpuffers von Invitrogen 5 min gekocht. Verdünnung des AKT-Antikörpers: 1:500.

3.4 RAD001-Behandlung

Nach Auswertung der Experimente zum Wachstumsverhalten unbehandelter Sphäroide (Abbildung 3-7 und 3-8) wurde Tag 7 nach der Aussaat der Sphäroide als geeigneter Startpunkt für die Behandlung gewählt, da sich ab diesem Zeitpunkt der Sphäroiddurchmesser nicht mehr verkleinerte. Zunächst wurden RAD001-Konzentrationen zwischen 1 und 500 nM gewählt, in weiteren Experimenten wurde der Bereich auf 5 bis 500 nM festgesetzt, weil sich die mit 1 nM behandelten Sphäroide in ihrer Größe und Gestalt nicht von den unbehandelten unterschieden. Abbildung 3-10 zeigt für die Zelllinie A-498, Abbildung 3-15 für die Zelllinie 786-O anhand der Messung der Sphäroiddurchmesser nach Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 erhobene Daten.

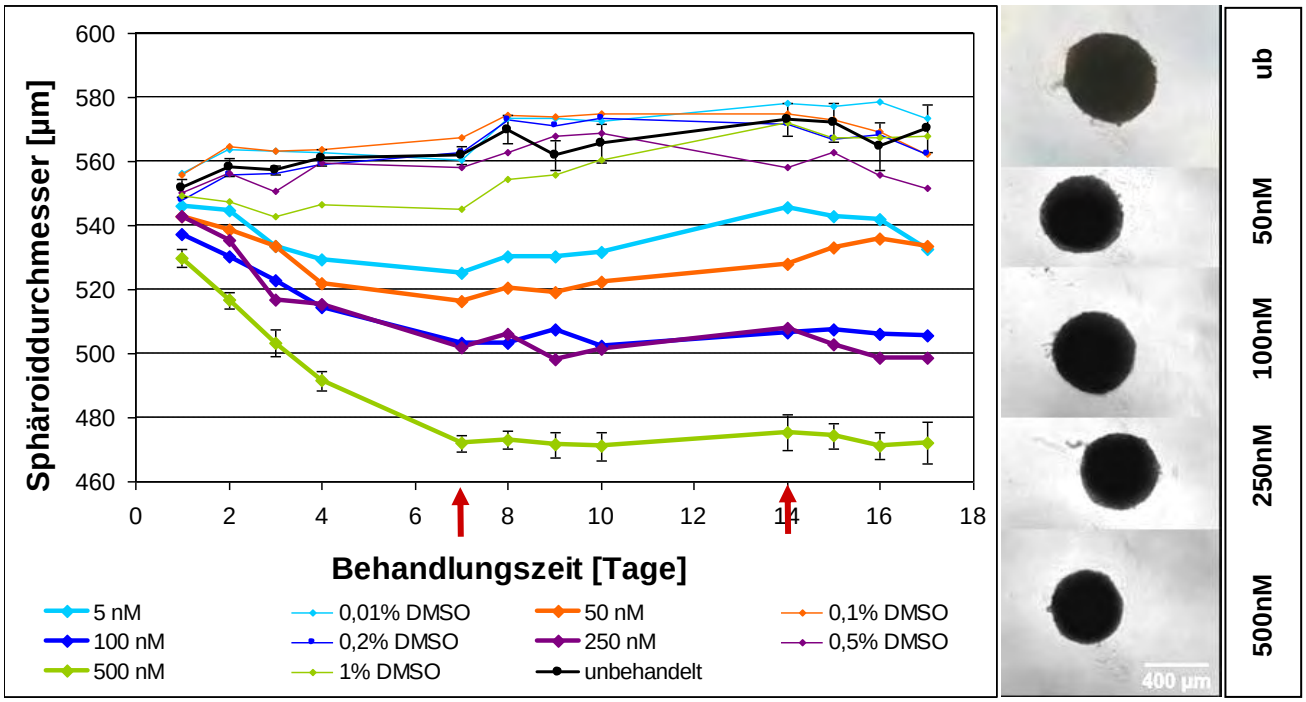
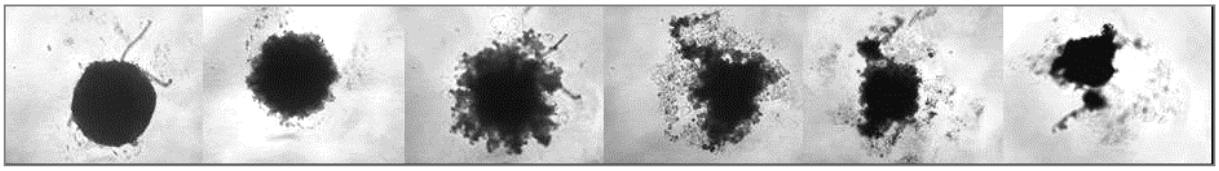


Abbildung 3-10: links: Durchmesser von A-498-Sphäroiden unter RAD001-Behandlung: Jeweils 8 Sphäroide wurden mit einer RAD001-Konzentration bzw. den entsprechenden Lösungsmittelkonzentration (DMSO; gleichfarbig dargestellt) behandelt und die Mittelwerte aufgetragen. Die Behandlung dauerte insgesamt 17 Tage, an Tag 7 und 14 wurde der Wirkstoff durch partiellen Austausch des Kulturmediums jeweils 1:1,67 verdünnt (rote Pfeile). Für die unbehandelten Sphäroide und die höchste RAD001-Konzentration ist der Standardfehler aufgetragen. **rechts: lichtmikroskopische Aufnahmen exemplarischer Sphäroide am 17. Beobachtungstag:** ‚ub' bedeutet unbehandelt.

Jeweils 8 Sphäroiden wurden mit derselben Wirkstoffkonzentration behandelt. Im rechten Teil der Abbildung 3-10 sind lichtmikroskopische Aufnahmen der Sphäroide vom letzten Beobachtungstag (Tag17) zu sehen. Die Gruppe der unbehandelten Sphäroide, schwarz dargestellt, verzeichnete über die Dauer der Beobachtung eine leichte Vergrößerung des Durchmessers. Da das RAD001 in DMSO gelöst und vorverdünnt wurde, wurde zu jeder Wirkstoffkonzentration eine Kontrolle mit entsprechender DMSO-Konzentration mitgeführt, um die Toxizität des DMSO an sich einschätzen zu können. Die DMSO-Konzentration in der Kontrolle zu 500 nM entsprach 1%, die der anderen Kontrollen entsprechend weniger (250 nM 0,5%, 100 nM 0,2%, 50 nM 0,1% und 5 nM 0,01%). Die Sphäroide der Zelllinie A-498 wurden, wie aus dem Diagramm ersichtlich, durch höhere Konzentrationen (1 und 0,5%) DMSO leicht in ihrem Wachstum gehemmt (Abbildung 3-10), d.h. die Durchmesser dieser beiden DMSO-Kontrollen (dünne Linien) stiegen, verglichen mit denen der unbehandelten Sphäroide weniger an, wobei die höchste DMSO-Konzentration die stärkste Verminderung aufwies. Die zu den niedrigeren RAD001-Konzentrationen gehörenden DMSO-Kontrollen (0,01-0,5% DMSO) verhielten sich im Rahmen der Messgenauigkeit wie die unbehandelten Sphäroide. Zur Validierung des Modellsystems wurden in jeder Behandlung eine Gruppe Sphäroide mit 15 µg/ml Cisplatin behandelt. Abbildung 3-11 zeigt die morphologische Veränderung eines Sphäroids im Verlauf einer 18-tägigen Behandlung. Die Cisplatin-behandelten Sphäroide verloren als Erstes ihre glatte Oberfläche. Der Disaggregationsprozess äußerte sich zunächst in einer starken Vergrößerung der Sphäroiddurchmesser, bevor diese vollständig disaggregierten.



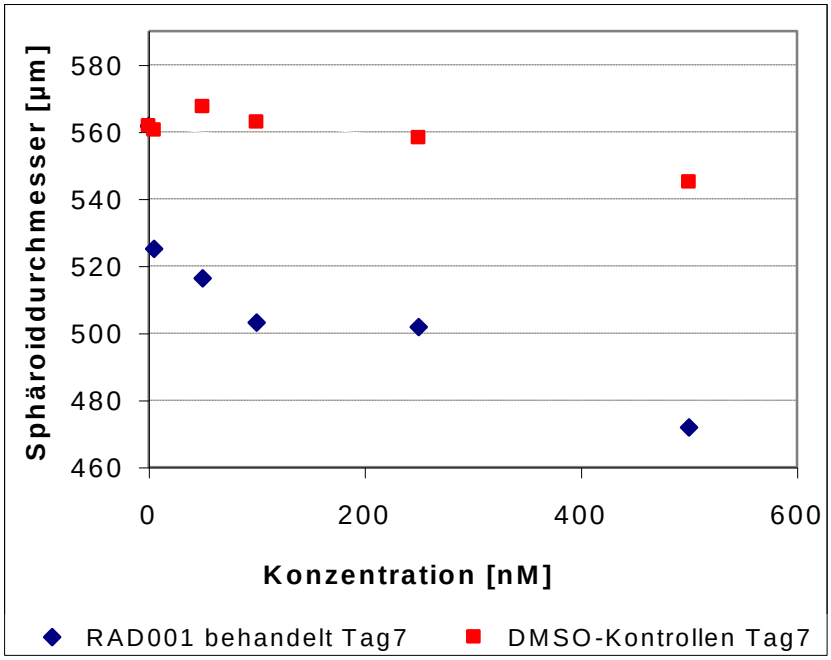
Tag0 Tag4 Tag8 Tag11 Tag16 Tag18

Abbildung 3-11: Lichmikroskopische Verlaufsstudie eines Cisplatin-behandelten A-498 Sphäroids: Gezeigt ist exemplarisch die morphologische Veränderung eines Sphäroid aus der Gruppe der Cisplatin behandelten Sphäroide über einen Behandlungszeitraum von 18 Tagen.

Die Durchmesser der mit RAD001 behandelten Sphäroide zeigten eine konzentrationsabhängige Verringerung des Durchmessers gegenüber den unbehandelten Sphäroiden. Erkennbar ist der Einfluss der Verdünnung der RAD001-Konzentration an Tag 7 und 14 durch teilweise Erneuerung des Kulturmediums (siehe Kapitel 2.2.5). Die Durchmesser der Sphäroide der höheren Konzentrationen stagnierten in den Folgetagen des 1. Mediumwechsels, die Sphäroiddurchmesser der niedrigeren Konzentrationen wuchsen

leicht. Infolge des 2. Mediumwechsels an Tag 14 ist für die beiden niedrigsten RAD001-Konzentration ein Wachstum zu sehen.

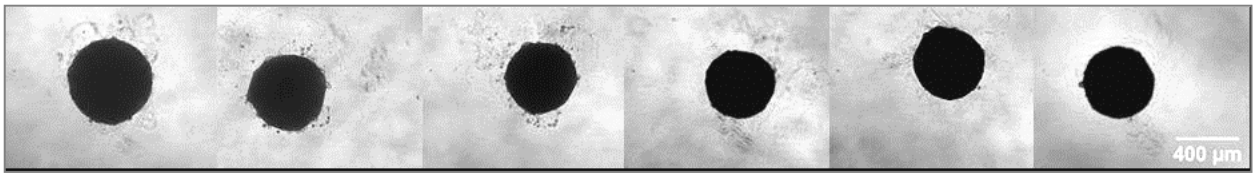
In Abbildung 3-12 wurden die Werte der Durchmesser für Tag 7 herausgegriffen. Die Darstellungsform verdeutlicht die Konzentrationsabhängigkeit des Wirkstoffeffekts für RAD001. Weiterhin zeigt die Abbildung, dass höhere DMSO-Konzentrationen ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des Durchmessers führten. In der nebenstehenden Tabelle ist die prozentuale Wachstumsreduktion des Sphäroidvolumens (unter Annahme streng sphärischer Geometrie) in Bezug auf die DMSO-Kontrollen für die Tage 7 und 15 angegeben. Den Zahlen ist zu entnehmen, dass auch unter Berücksichtigung des Lösungsmitteleinflusses 500 nM RAD001 den stärksten Hemmeffekt auf die Sphäroide ausübte.



	Tag 7	Tag 15
5 nM	18%	17%
50 nM	25%	20%
100 nM	29%	28%
250 nM	27%	29%
500 nM	35%	42%

Abbildung 3-12: Konzentrationsabhängigkeit des Durchmessers von A-498 Sphäroiden am 7. RAD001-Behandlungstag: Durchmesser nach RAD001-Behandlung im Vergleich zu den entsprechenden DMSO-Kontrollen. Eine Behandlungsgruppe bestand aus je 8 Sphäroiden, aufgetragen ist der Mittelwert. Die nebenstehende Tabelle gibt für die Tage 7 und 15 die prozentuale Reduktion der Sphäroidvolumina in Bezug auf die jeweiligen DMSO-Kontrollen an.

Der Trend der konzentrationsabhängigen Durchmesserreduktion unter RAD001-Behandlung wurde in drei unabhängigen Experimenten reproduziert. Exemplarisch ist dazu in Abbildung 3-13 ein mit 500nM RAD001 behandelter Sphäroid im Verlauf einer 18 Tage andauernden Behandlung abgebildet. Man sieht, dass der Sphäroid zwar kleiner wurde, aber morphologisch unverändert erschien.



Tag0	Tag3	Tag7	Tag10	Tag14	Tag18

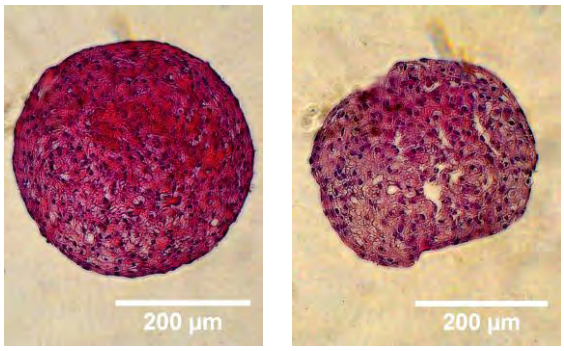
Abbildung 3-13: Lichtmikroskopische Verlaufsstudie eines RAD001-behandelten A-498 Sphäroids: Gezeigt ist exemplarisch ein Sphäroid aus der Gruppe der mit 500nM RAD001 behandelten Sphäroide über einen Behandlungszeitraum von 18 Tagen.

Vergleicht man die verschiedenen Wiederholungsexperimente hinsichtlich des Ausmaßes der absoluten Veränderungen der Sphäroiddurchmesser, so unterschied sich dieses mitunter deutlich. Die Sphäroiddurchmesser der unbehandelten Sphäroide sowie der DMSO-Kontrollen vergrößerten sich in einigen Experimenten stärker, als in dem in Abbildung 3-10 gezeigten.

Relativ gering waren hingegen die Schwankungen zwischen den Wiederholungsexperimenten was die prozentualen Abnahmen der Durchmesser RAD001-behandelter Sphäroide, bezogen auf die DMSO-Kontrollen, betraf. Aus den prozentualen Durchmesserreduktionen berechnete Volumensreduktionen sind in eckigen Klammern dargestellt. So wurden beispielsweise für die Konzentration 250 nM am 15. Tag nach Start der Behandlung Werte zwischen 17 und 11% [43 und 29%] ermittelt. Für die höchste Konzentration (500nM) war der Hemmeffekt mit 13% [32-35%] nach 7 Tagen und 15% [38-42%] nach 15 Tagen reproduzierbar. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist in Abbildung 3-10 nur für die unbehandelten Sphäroide und die höchste RAD001-Konzentration (500nM; dicke grüne Linie) der Standardfehler angegeben.

In Abbildung 3-14 sind HE-Schnitte von, nach Abschluss einer 18-tägigen Behandlung mit 1% DMSO bzw. 500 nM RAD001, geernteten Sphäroiden zu sehen.

Abbildung 3-14: Schnitte von HE-gefärbten A-498-Sphäroiden nach Abschluss einer 18-tägigen Behandlung mit 1% DMSO (links) bzw. 500 nM RAD001 (rechts): Die Sphäroide wurden dehydriert, in Paraffin eingebettet und 4µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden mit der Hämatoxlin-Eosin-Methode gefärbt. Die Aufnahme wurde mit einer 200fachen Vergrößerung angefertigt.



Das Sphäroidinnere der RAD001-behandelten Sphäroide unterscheidet sich demnach in seinem Aufbau nicht von dem der DMSO-behandelten Sphäroide. Ein nekrotischer Kern oder eine Anhäufung apoptotischer Körperchen sind nicht erkennbar.

Für die Zelllinie 786-O wurde in zwei unabhängigen Experimenten im Wesentlichen das gleiche Ansprechen auf die Behandlung mit RAD001 gefunden (Abbildung 3-15).

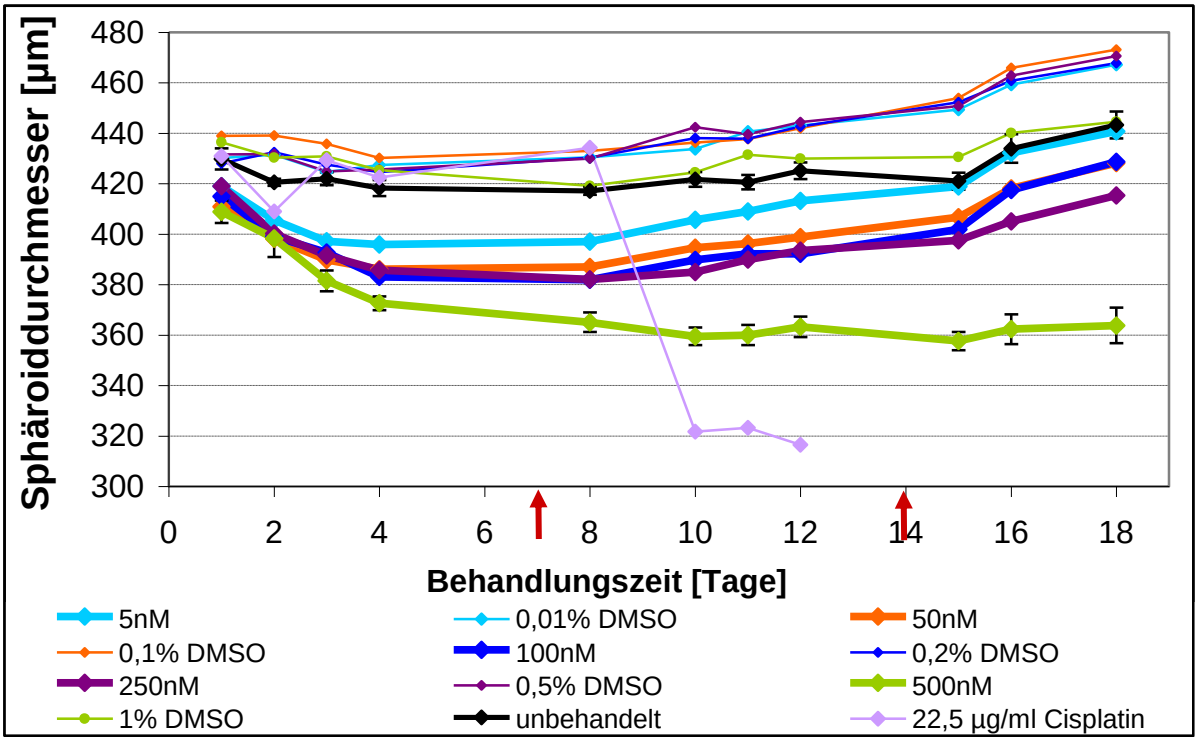


Abbildung 3-15: Durchmesser von 786-O-Sphäroiden unter RAD001-Behandlung: Jeweils 8 Sphäroide wurden mit einer RAD001-Konzentration bzw. der entsprechenden Lösungsmittelkonzentration (DMSO; gleichfarbig dargestellt) behandelt und die Mittelwerte aufgetragen. Die Behandlung dauerte insgesamt 18 Tage, an Tag 7 und 14 wurde der Wirkstoff durch partiellen Austausch des Kulturmediums jeweils 1:1,67 verdünnt (rote Pfeile). Für die unbehandelten Sphäroide und die höchste RAD001-Konzentration ist der Standardfehler aufgetragen.

Die Werte der Durchmesser der unbehandelten Sphäroide sind wieder in schwarz dargestellt. Die Positivkontrolle (15 µg/ml Cisplatin) bricht am 12. Tag nach Start der Behandlung ab, da sich die Durchmesser dieser Sphäroide aufgrund starker Disaggregation nicht mehr bestimmen ließen. Die Sphäroiddurchmesser der DMSO-Kontrollen (dünne Linien) vergrößerten sich in Experimenten dieser Zelllinie im Unterschied zur Zelllinie A-498 gegenüber denen der unbehandelten sogar leicht. Wieder besaßen die Sphäroide der DMSO-Kontrolle mit der höchsten Konzentration (1% DMSO) den geringsten Durchmesser unter allen DMSO-Kontrollen. Die konzentrationsabhängige Verringerung des Durchmessers der RAD001-behandelten Sphäroide bewegte sich im Rahmen der Messgenauigkeit in denselben Dimensionen wie bei der Zelllinie A-498. So ist sie für die RAD001-Konzentration 500 nM nach 7 Tagen etwa 13% (geschätzter Wert, da für das in Abbildung 3-15 gezeigte Experiment kein Messpunkt für den 7. Tag vorlag; durchschnittlicher Wert A-498: 13%), für 250 nM 11% (A-498: 12%) und für 100 nM 11% (A-498: 10%).

3.4.1 Charakterisierung der Viabilität mittels WST-Test

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde ein WST-Test durchgeführt. Betrachtet man die Rohdaten in Abbildung 3-16, so erkennt man, dass die unbehandelten Sphäroide die höchste gemessene Viabilität besaßen, die fast doppelt so groß war wie die der Cisplatin-behandelten Sphäroide. Auch ein Einfluss des DMSO auf die Viabilität war zu sehen. Des Weiteren lag eine konzentrationsabhängige Reduktion der Viabilität der RAD001-behandelten Sphäroide vor. In Diskrepanz zu dem, bei der Messung der Sphäroiddurchmesser entstandenen Eindruck - hier waren die Durchmesser der Sphäroide aller RAD001-Behandlungen kleiner als die ihrer DMSO-Kontrollen - überstieg die Viabilität der mit niedrigen RAD001-Konzentrationen behandelten Sphäroide (5 bis 100 nM) die der DMSO-Kontrollen.

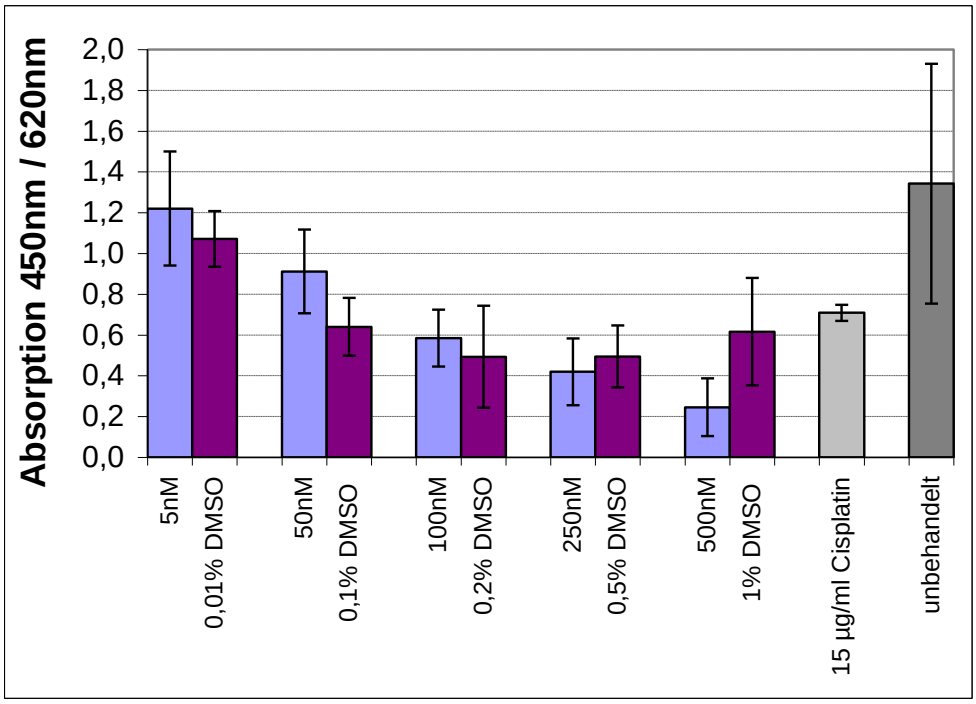


Abbildung 3-16: Viabilität von A-498-Sphäroiden nach 23-tägiger Behandlung mit RAD001: Zu den, sich in 200 µl Kulturmedium befindlichen Sphäroiden wurden 20 µl WST-1 Reagenz (10%) zugegeben und die Platte 4 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 450 nm gegenüber der bei 620 nm gemessen. Eine Behandlungsgruppe bestand aus je 8 Sphäroiden, aufgetragen ist der Mittelwert. Die Fehlerbalken illustrieren die Standardabweichung.

Um den tatsächlichen Effekt des RAD001 besser erkennen zu können, wurden die Werte in Abbildung 3-17 auf die jeweiligen DMSO-Kontrollen bezogen. Die Konzentrationsabhängigkeit der RAD001-Behandlungen bleibt auch nach dieser Normierung erhalten. Die Messwerte wurden mit einer exponentiellen Regressionskurve angenähert, deren Standardabweichung im Diagramm dargestellt ist.

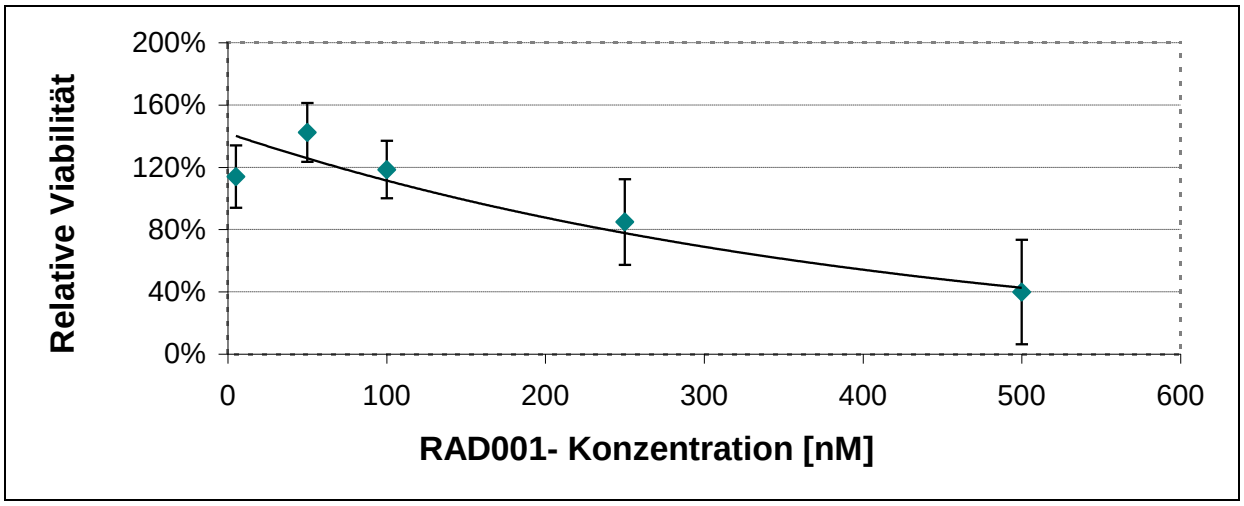


Abbildung 3-17: Relative Viabilität nach RAD001-Behandlung für 23d: Die Mittelwerte der Viabilität von 8 RAD001-behandelten Sphäroiden der Zelllinie A-498 wurden auf Mittelwerte der DMSO-Kontrollen normiert und über der Wirkstoffkonzentration aufgetragen. Die Fehlerbalken illustrieren den Variationskoeffizienten. Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgerade ist im Diagramm angegeben.

3.4.2 Charakterisierung der Proliferation mittels Zellzyklusmessung

Zur Charakterisierung des Proliferationsstatus der RAD001-behandelten Sphäroide wurde eine Zellzyklusmessung durchgeführt (Abbildung 3-18).

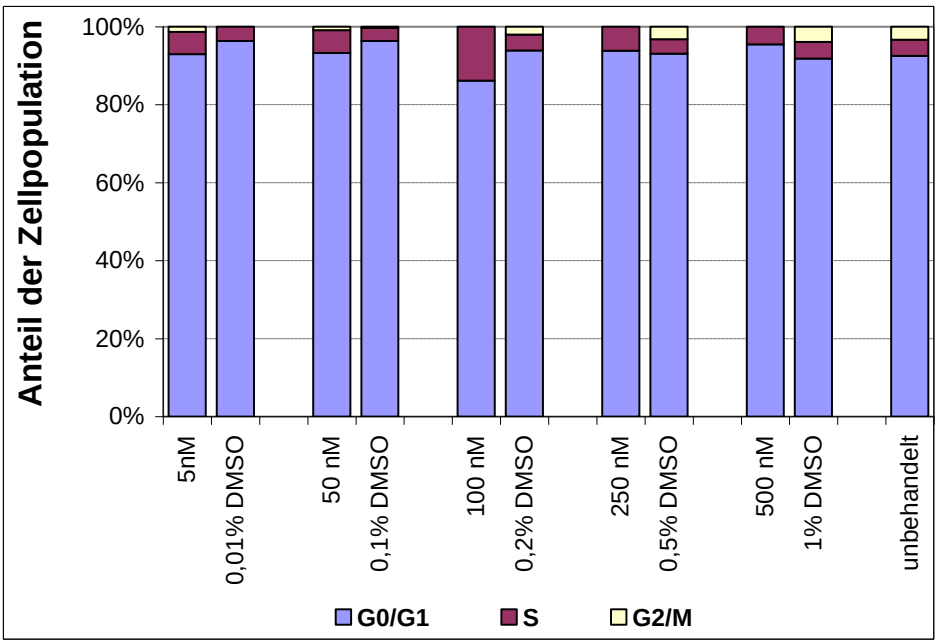
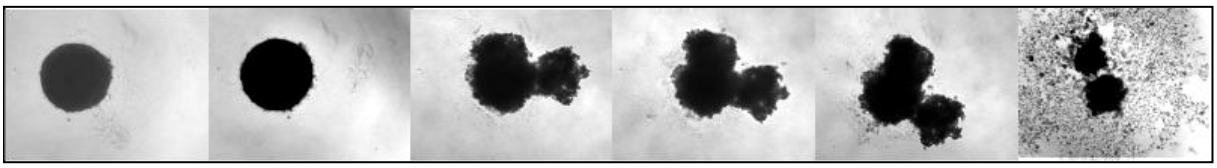


Abbildung 3-18: Zellzyklusverteilung nach RAD001-Behandlung für 17d: Die Sphäroide der Zelllinie A-498 wurden nach Abschluss der RAD001-Behandlung geerntet und die Sphäroide einer Behandlungsgruppe (8 Sphäroide) in 140 µl *buffer solution* gepoolt. Unter Verwendung des *CycleTest Plus DNA Reagent Kits* wurde der DNA-Gehalt PI-gefärbter Zellkerne durchflusszytometrisch bestimmt.

Man erkennt, dass sich in allen Behandlungsgruppen ein sehr hoher Anteil der Zellen im G_1-Arrest befand. Zwischen den Behandlungen mit unterschiedlichen RAD001-Konzentrationen sind keine Unterschiede ersichtlich.

3.5 Sorafenib-Behandlung

Die Behandlung mit dem RAF- und RTK-Inhibitor Sorafenib erfolgte unter analogen Bedingungen zu denjenigen mit dem mTOR-Inhibitor RAD001. Bei der Charakterisierung des Wachstumsverhaltens bot sich diesmal ein gänzlich anderes – und vor allem zelllinienabhängiges Bild (Abbildung 3-20 und 3-21). Die reinen Wachstumskurven können nicht als alleiniges Maß für das Ansprechverhalten auf Sorafenib gelten. Die Sphäroide durchliefen über die Dauer der Beobachtung starke morphologische Veränderungen. Am Beispiel eines mit 10 µM behandelten Sphäroids der Zelllinie A-498 ist dies in Abbildung 3-19 dargestellt. Zunächst wurden an den Rändern dieser Sphäroide einzelne Zellen sichtbar, dann verloren die Sphäroide ihre runde Ursprungsgestalt und fielen auseinander. Ab Tag 8 nach Beobachtungsbeginn waren die Sphäroide so stark disaggregiert, dass von einer weiteren Messung des Durchmessers abgesehen wurde, weswegen im Diagramm Abbildung 3-20 die Kurve für die Konzentration 10 µM am 8. Behandlungstag abbricht.



Tag1	Tag2	Tag5	Tag6	Tag8	Tag12

Abbildung 3-19: Lichtmikroskopische Verlaufsstudie eines Sorafenib-behandelten A-498 Sphäroids: Gezeigt ist exemplarisch die morphologische Veränderung eines Sphäroid aus der Gruppe der mit 10 µM Sorafenib behandelten Sphäroide über einen Beobachtungszeitraum von 12 Tagen.

Die vollständige Zerstörung der Sphäroide war nur bei der höchsten Wirkstoffkonzentration (10 µM) zu beobachten. Bei den niedrigeren Konzentrationen deutete sich der Effekt durch eine Vergrößerung des Sphäroiddurchmessers gegenüber den DMSO-Kontrollen an. In Abbildung 3-20 sind die Durchmesser von A-498-Sphäroiden über die Dauer der Behandlung mit Sorafenib aufgetragen, daneben exemplarische Photos von Sphäroiden vom letzten (23.) Behandlungstag. Die Ergebnisse wurden in drei weiteren unabhängigen Experimenten bestätigt.

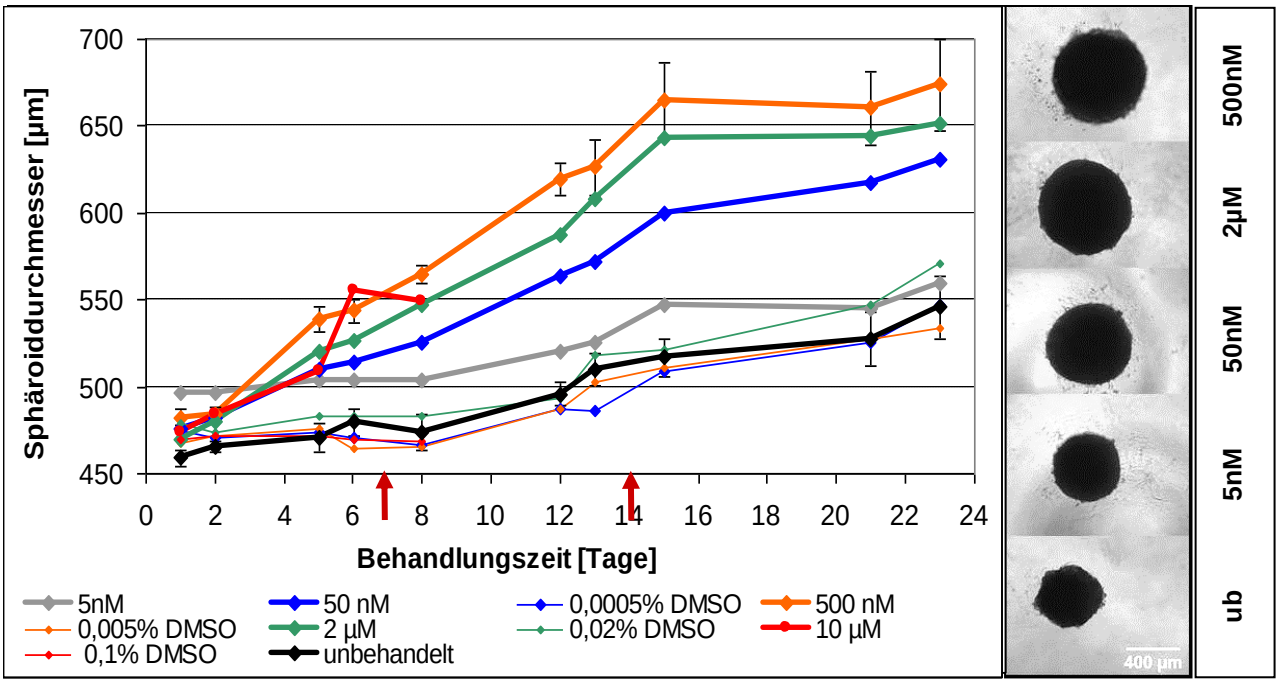


Abbildung 3-20: links: Durchmesser von A-498-Sphäroiden unter Sorafenib-Behandlung: Jeweils 8 Sphäroide wurden mit einer Sorafenib-Konzentration bzw. der dieser entsprechenden Lösungsmittelkonzentration (DMSO; gleichfarbig dargestellt) behandelt und die Mittelwerte aufgetragen. Die Behandlung dauerte insgesamt 23 Tage, an Tag 7 und 14 wurde der Wirkstoff durch partiellen Austausch des Kulturmediums jeweils 1:1,67 verdünnt (rote Pfeile). Für die unbehandelten Sphäroide und die Sorafenib-Konzentration 500 nM ist der Standardfehler aufgetragen. **rechts: lichtmikroskopische Aufnahmen exemplarischer Sphäroide vom 23. Beobachtungstag: ‚**ub' bedeutet unbehandelte Sphäroide.

Die Durchmesser unbehandelter Sphäroide (schwarze Kurve) vergrößerten sich im Laufe der 23 Beobachtungstage um etwa 17%. Die DMSO-Kontroll-Sphäroide unterschieden sich in ihrem Wachstum im Rahmen der Fehlergrenze nicht von den unbehandelten. Die mit 5 nM Sorafenib behandelten Sphäroide wichen nur unwesentlich von den Kontrollsphäroiden ab. Die Sphäroiddurchmesser aller anderen Sorafenib-Behandlungen vergrößerten sich bezogen auf ihre DMSO-Kontrollen. Bis auf die mit 10 µM behandelten Sphäroide zeigten sich dabei keine sichtbaren morphologischen Veränderungen. Deren Verhalten wurde bereits in Abbildung 3-19 illustriert.

Die Sphäroide der Zelllinie 786-O reagierten anders auf die Behandlung mit Sorafenib als die der Zelllinie A-498 (Abbildung 3-21). Die Durchmesser der unbehandelten Sphäroide sowie der DMSO-Kontrolle und die der Sorafenib-Behandlung 2,5 µM unterschieden sich im Rahmen der Fehlergrenze nicht voneinander und vergrößerten sich über die 14 Tage der Beobachtung leicht. Die Durchmesser der mit 5 µM behandelten Sphäroide nahmen etwas stärker zu als die der DMSO-Kontrolle. Die Sphäroide der höheren Konzentrationen, respektive 10 und 20 µM reduzierten bis zum 8. Behandlungstag beide ihre Durchmesser, wobei sie sich zu diesem Zeitpunkt bereits morphologisch voneinander unterschieden. Während die mit 10 µM behandelten Sphäroide morphologisch unverändert erschienen und

ihre Durchmesser nach dem Mediumwechsel auf einen, den restlichen Sphäroiddurchmessern ähnlichen Wert vergrößerten, war den mit 20 µM Sorafenib-behandelten Sphäroiden am 8. Tag bereits eine Schädigung, ähnlich wie den mit 10µM behandelten der Zelllinie A-498, anzusehen. Im Gegensatz zu diesen ging der Verlust der sphärischen Gestalt aber nicht mit einer Vergrößerung des Durchmessers einher. Am letzten Tag der Beobachtung (Tag 14) ähnelten die mit 20 µM behandelten Sphäroide der Zelllinie 786-O (siehe Abbildung 3-21) in ihrer Gestalt denen der Zelllinie A-498, die mit 10 µM behandelt worden waren, nach circa einer Woche Behandlung.

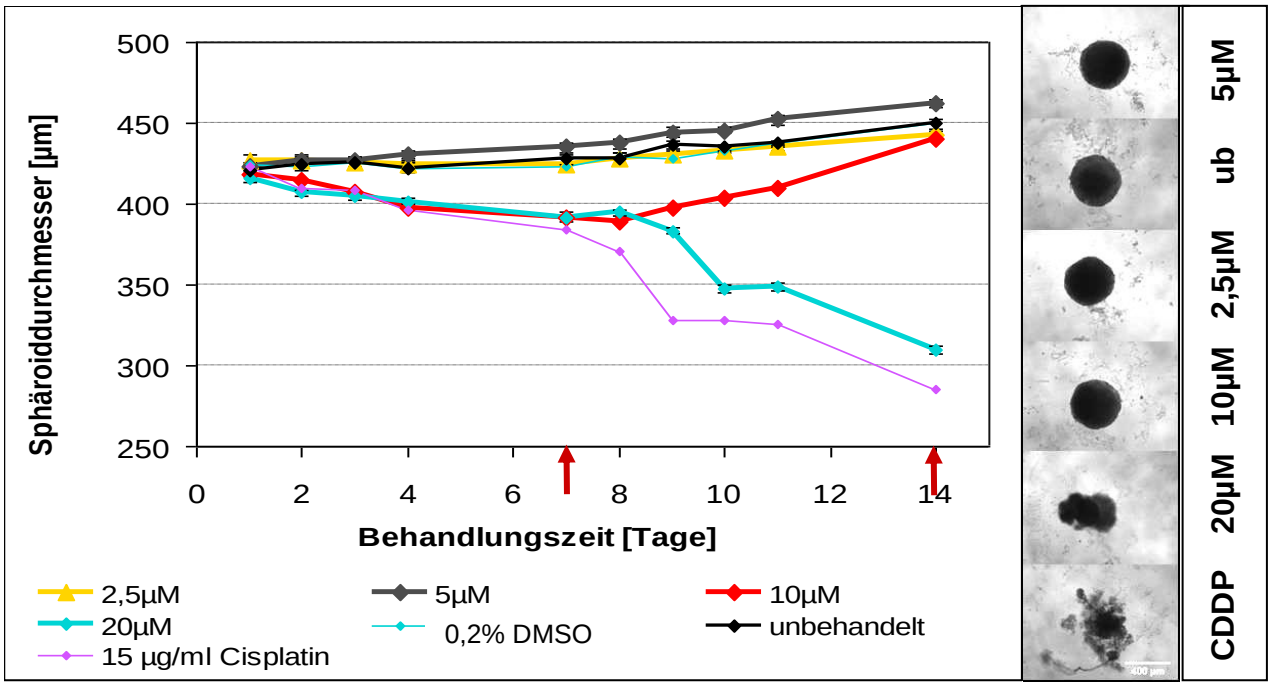


Abbildung 3-21: Durchmesser von 786-O Sphäroiden unter Sorafenib-Behandlung: Jeweils 12 Sphäroide wurden mit einer Sorafenib-Konzentration bzw. der entsprechenden Lösungsmittelkonzentration (DMSO; gleichfarbig dargestellt) behandelt und die Mittelwerte aufgetragen. Die Behandlung dauerte insgesamt 14 Tage, an Tag 7 wurde der Wirkstoff durch partiellen Austausch des Kulturmediums 1:1,67 verdünnt (rote Pfeile). Für die unbehandelten Sphäroide und die Sorafenib-Konzentration 5 µM ist der Standardfehler aufgetragen. **rechts: lichtmikroskopische Aufnahmen exemplarischer Sphäroide vom 14. Behandlungstag:** ‚ub' steht für unbehandelte Sphäroide, ‚CDDP' für Cisplatin-behandelte.

In einem Wiederholungsexperiment der Sorafenib-Behandlung von 786-O Sphäroiden war die Durchmesservergrößerung für die Sorafenib-Konzentrationen 2,5 und 5 µM etwas ausgeprägter als in dem in Abbildung 3-21 gezeigten Experiment. Außerdem wurde dasselbe Verhalten wie zuvor für die mit 20 µM behandelten Sphäroide nun für mit 10 µM behandelte beobachtet.

3.5.1 Charakterisierung der Viabilität mittels WST-Test

Auch die Viabilität von Sorafenib-behandelten Sphäroiden wurde mittels eines WST-Tests untersucht. In Abbildung 3-22 ist ein für die Sorafenib-Behandlung der Zelllinie A-498 repräsentativer WST-Test gezeigt. Es fällt auf, dass die unbehandelten Sphäroide nicht die höchste Viabilität besaßen. Im Unterschied zu dem in Abbildung 3-16 gezeigten WST-Test war die Viabilität der Cisplatin-behandelten Sphäroide den unbehandelten gegenüber auch nicht deutlich erniedrigt. Vergleichbar mit dem RAD001 war eine konzentrationsabhängige Reduktion der Viabilität behandelter Sphäroide zu verzeichnen. Ferner erkennt man in diesem Diagramm für die DMSO-Kontrollen ebenfalls eine leichte Konzentrationabhängigkeit, die aber in Wiederholungsexperimenten nicht reproduziert wurde.

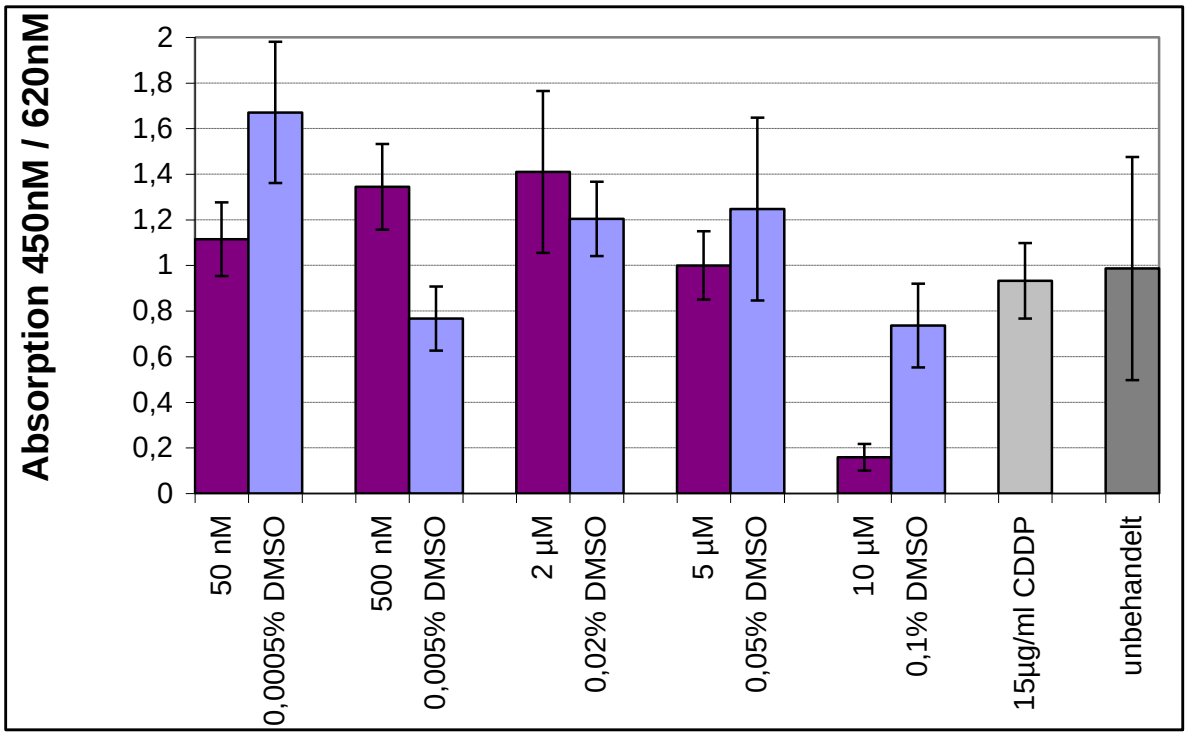


Abbildung 3-22: Viabilität von A-498-Sphäroiden nach 22-tägiger Behandlung mit Sorafenib: Zu den sich in 200 µl Kulturmedium befindlichen Sphäroiden wurden 20 µl WST-1 Reagenz (10%) zugegeben und die Platte 4 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 450 nm gegenüber der bei 620 nm gemessen. Eine Behandlungsgruppe bestand aus je 8 Sphäroiden, aufgetragen ist der Mittelwert. Die Fehlerbalken illustrieren die Standardabweichung.

Die zu Abbildung 3-22 berechnete relative Viabilität (Abbildung 3-23) zeigt eine von der Sorafenib-Konzentration abhängige Reduktion, sieht man von dem Wert der mit 50 nM behandelten Sphäroide ab.

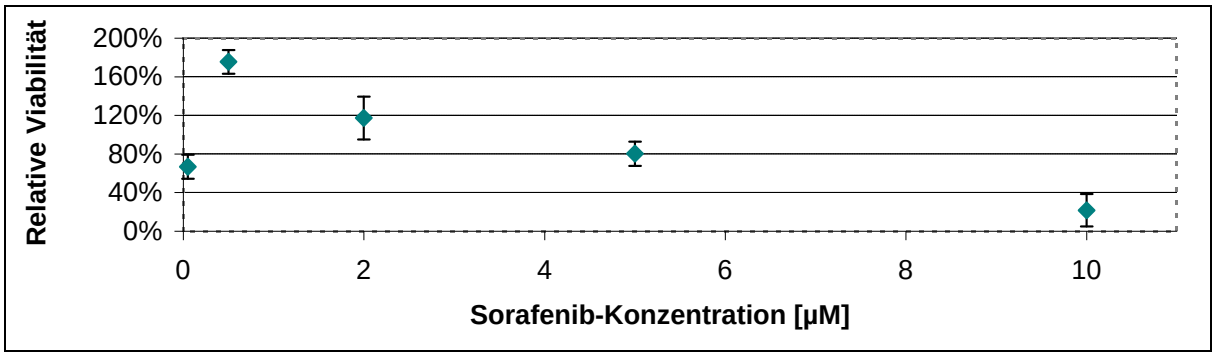


Abbildung 3-23: Relative Viabilität nach Sorafenib-Behandlung für 22d; Zelllinie A-498: Die Mittelwerte der Viabilität von 8 Sorafenib-behandelten Sphäroiden wurden auf Mittelwerte der DMSO-Kontrollen normiert und über der Wirkstoffkonzentration aufgetragen. Fehlerbalken illustrieren den Variationskoeffizienten.

3.5.2 Phosphorylierung der *downstream-targets* ERK und AKT

Die Prüfung der Phosphorylierung von AKT in Sorafenib-behandelten Sphäroiden wurde mit Hilfe von Western-Blots durchgeführt. In Abbildung 3-24 ist ein an 786-O-Sphäroiden durchgeführter Western-Blot gezeigt. Diese wurden zuvor 4 Tage mit Sorafenib-Konzentrationen zwischen 2,5 und 20 µM behandelt. Als Referenzprotein diente GAPDH. Das Ergebnis der semiquantitativen Auswertung ist in Abbildung 3-24 unter dem Blot angegeben. Die Menge an p-AKT war demnach in den mit 2,5 µM behandelten Sphäroiden vergleichbar mit den unbehandelten und in den Proben der Behandlungen mit höherer Sorafenib-Konzentration (5 bis 20 µM) im Vergleich zu den unbehandelten Sphäroiden erniedrigt.

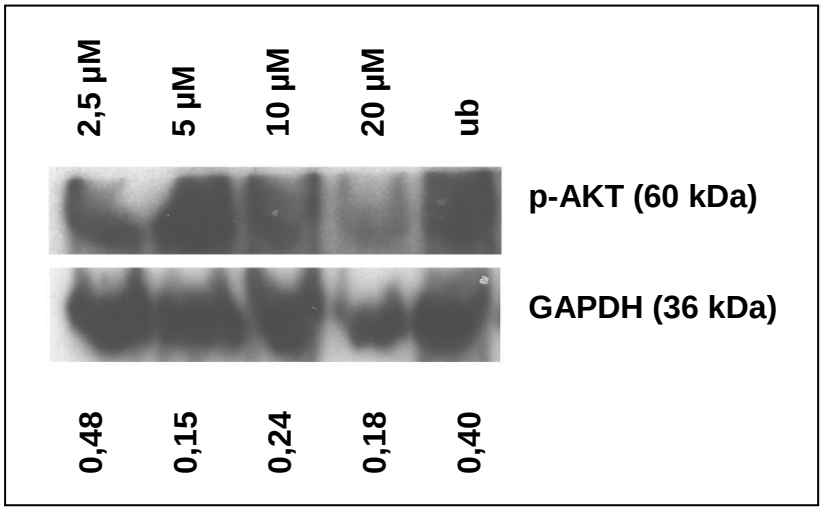


Abbildung 3-24: p-AKT-Expression in Sorafenib-behandelten 786-O Sphäroiden: Die Sphäroide wurden 4 Tage mit verschiedenen Sorafenib-Konzentrationen behandelt, anschließend geerntet und lysiert. GAPDH dient als Referenzprotein. AK-Konzentrationen: p-AKT 1:100; GAPDH: 1:4000. Unter dem Blot sind die durch densitometrische Auswertung der Banden mit Hilfe der Software *Kodak 1D image analysis software* durch Bezug auf das Referenzprotein GAPDH erhaltenen Werte angegeben.

Im Anschluss wurde der Blot gestrippt und mit dem Antikörper gegen p-ERK inkubiert (Abbildung 3-25). Wieder sind die, durch Bezug der Menge von p-ERK auf das Referenzprotein GAPDH, erhaltenen Werte unter dem Blot dargestellt. Der Gehalt an p-ERK

war in allen Sorafenib-Behandlungen geringer als in den unbehandelten Sphäroiden, wobei das Ausmaß der Verringerung in allen Proben ungefähr gleich war.

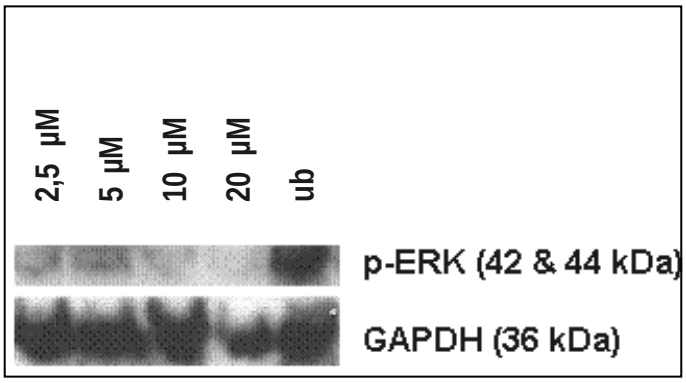


Abbildung 3-25 p-ERK-Expression in Sorafenib-behandelten 786-O Sphäroiden: Die Sphäroide wurden 4 Tage mit verschiedenen Sorafenib-Konzentrationen behandelt, anschließend geerntet und lysiert. GAPDH dient als Referenzprotein. AK-Konzentrationen: p-ERK 1:100; GAPDH: 1:4000. Unter dem Blot sind die durch densitometrische Auswertung der Banden mit Hilfe der Software *Kodak 1D image analysis software* (V3.6; Fisher Scientific, Schwerte) durch Bezug auf das Referenzprotein GAPDH erhaltenen Werte angegeben.

3.6 Kombinationsbehandlung

Entsprechend der Fragestellung, inwieweit eine kombinierte Therapie mit den beiden Wirkstoffen RAD001 und Sorafenib einen synergistischen Effekt erzielen kann, wurden verschiedene Kombinationsbehandlungen durchgeführt. Hierbei gibt es zwei Variablen: die Veränderung der eingesetzten Konzentrationen sowie die zeitliche Komponente, also entweder gleichzeitige oder sequentielle Gabe der Wirkstoffe. Für die initiale Testung an Sphäroiden der Zelllinie A-498 wurden Konzentrationen gewählt, die in den Einzelexperimenten eher im unteren Teil der Testbereiches lagen, aber bereits einen deutlichen Effekt gezeigt hatten. Die Wahl fiel auf eine RAD001-Konzentration von 100 nM und Sorafenib-Konzentrationen von 50 bzw. 250 nM. Die Wirkstoffe wurden zunächst zeitgleich eingesetzt (Abbildung 3-26). Die zu Vergleichszwecken mitgeführten Einzelbehandlungen verhielten sich über die Dauer des Beobachtungszeitraums wie aus Experimenten mit den Einzelbehandlungen bekannt. Die Sorafenib-behandelten Sphäroide vergrößerten ihre Durchmesser verglichen mit ihren DMSO-Kontrollen über die Dauer der Behandlung. Die RAD001-behandelten Sphäroide verkleinerten sich bis zum 1. Mediumwechsel und vergrößerten ihre Durchmesser danach bis zum Ende der Beobachtung. Die Durchmesser der Sphäroide der beiden Kombinationsbehandlungen bewegten sich zwischen diesen Extremen und zeigten gegenüber ihren DMSO-Kontrollen eine geringere Vergrößerung ihrer Durchmesser. Morphologisch verändert präsentierte sich nach 17 Tagen Behandlung keine der Sphäroidgruppen.

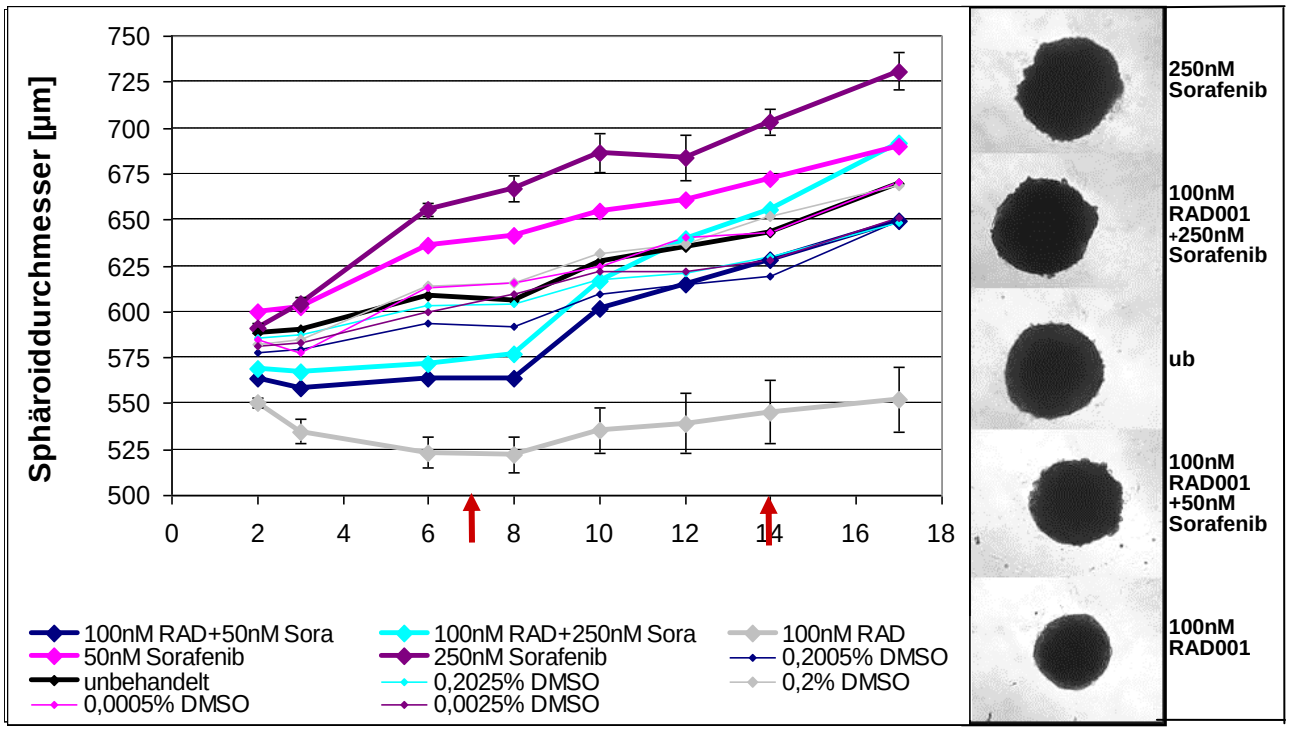


Abbildung 3-26: Durchmesser von A-498-Sphäroiden unter kombinierter Behandlung mit RAD001 und Sorafenib: Jeweils 8 Sphäroide wurden entweder mit einer Sorafenib- oder einer RAD001-Konzentration oder beidem in Kombination bzw. der entsprechenden Lösungsmittelkonzentration (DMSO; gleichfarbig dargestellt) behandelt und die Mittelwerte aufgetragen. Die Behandlung dauerte insgesamt 17 Tage, an Tag 7 und 14 wurde der Wirkstoff durch partiellen Austausch des Kulturmediums jeweils 1:1,67 verdünnt (rote Pfeile). Für die unbehandelten Sphäroide und eine der Kombinationsbehandlungen ist der Standardfehler aufgetragen. **rechts: lichtmikroskopische Aufnahmen exemplarischer Sphäroide vom 17. Behandlungstag**

In der Hoffnung, einen stärkeren Effekt erzielen zu können, wurde im darauf folgenden Experiment (nicht gezeigt) die RAD001-Konzentration auf 250 nM heraufgesetzt und mit Sorafenib-Konzentrationen von 250 nM bzw. 2 µM kombiniert. Wie im vorausgegangenen Experiment wurden die Wirkstoffe gleichzeitig auf die Sphäroide gegeben. Die Einzelbehandlungen zeigten das auch in vorangegangenen Versuchen beobachtete Ansprechverhalten: Sorafenib-behandelte Sphäroide vergrößerten ihren Durchmesser leicht gegenüber den DMSO-Kontrollen, RAD001-behandelte erfuhren eine Durchmesserreduktion. Die Durchmesser der Kombinationsbehandlungen (250 nM RAD001 + 250 nM Sorafenib bzw. 250 nM Rad001 + 2 µM Sorafenib) verhielten sich zunächst ähnlich wie die der RAD001-behandelten, vergrößerten sich nach dem 1. Mediumwechsel allerdings stärker. Der Durchmesser der Sphäroide der Kombination mit der höheren Sorafenib-Konzentration war dabei wieder, wie im vorherigen Experiment (Abbildung 3-26), etwas größer als die der Kombination mit der niedrigeren Sorafenib-Konzentration. Keiner der Sphäroide in den verschiedenen Behandlungsgruppen veränderte seine Morphologie.

Da auch für die Kombination der Konzentrationen 250 nM RAD und 250 nM bzw. 2 µM Sorafenib kein synergistischer Effekt erkennbar war, wurden diese im nachfolgenden Experiment abermals erhöht und zwar auf 500 nM RAD001 und 5 µM Sorafenib (Abbildung

3-27); rechts daneben: exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen von Sphäroiden am letzten (18.) Behandlungstag.

Zusätzlich zur Konzentrationserhöhung wurden drei verschiedene Zeitschemata gestestet: a) die gleichzeitige Verabreichung der beiden Wirkstoffe wie in den vorherigen Experimenten, b) erst alleinige RAD001-Behandlung für 4 Tage, dann 4 Tage zusätzlich Sorafenib (kurz: 4d RAD + 4d Sora) sowie c) erst 4 Tage Sorafenib allein, dann 4 Tage zusätzlich RAD001 (kurz: 4d Sora + 4d RAD). Die mit 500 nM RAD001 behandelten Sphäroide verkleinerten ihre Durchmesser gegenüber den unbehandelten Sphäroiden bzw. der DMSO-Kontrolle bis zum 8. Beobachtungstag, danach stagnierten sie. Die mit 5 µM Sorafenib behandelten Sphäroide vergrößerten innerhalb der ersten 4 Behandlungstage ihre Durchmesser. Anschließend verkleinerten sie sich und veränderten dabei ihre Morphologie, erkennbar an den unebenen Sphäroidrändern. Die sequentiellen Kombinationsbehandlungen entsprachen in den ersten vier Behandlungstagen denen der jeweiligen Einzelbehandlungen und verhielten sich dementsprechend analog.

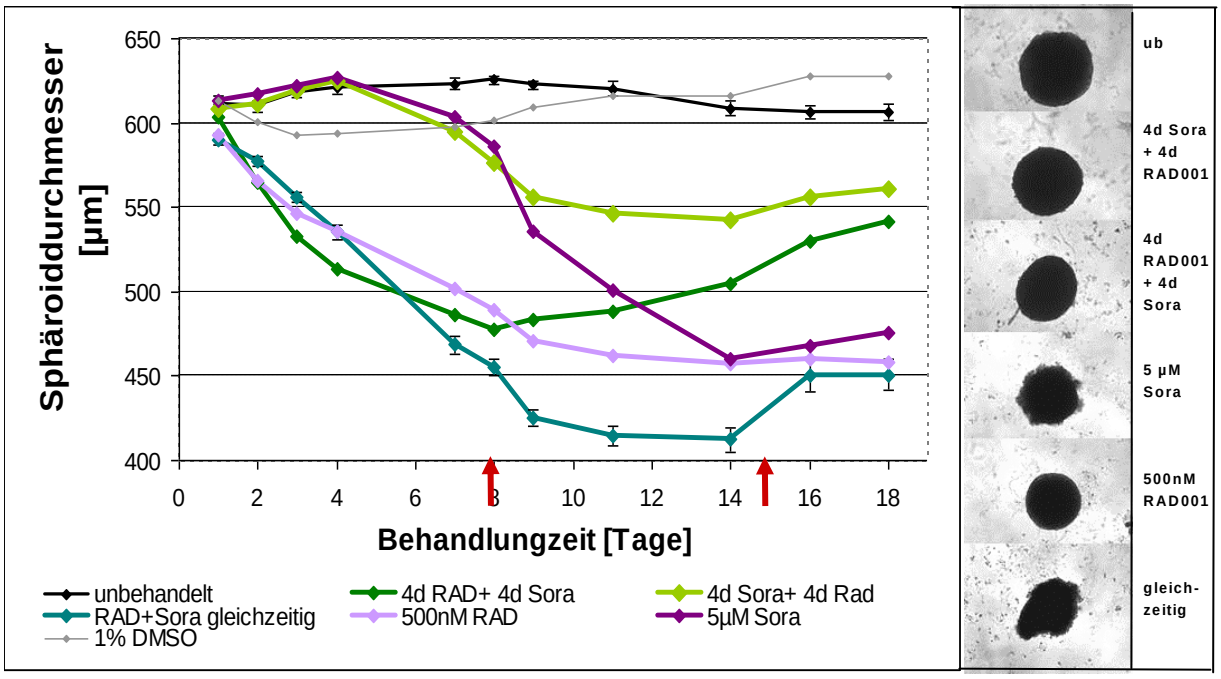


Abbildung 3-27: Durchmesser von A-498 Sphäroiden unter kombinierter Behandlung mit RAD001 und Sorafenib: Jeweils 12 Sphäroide wurden entweder mit einem der beiden Wirkstoffe Sorafenib oder RAD001 oder einer Mischung der beiden Wirkstoffe behandelt bzw. ihnen wurden die Wirkstoffe sequentiell gegeben. Die RAD001-Konzentration betrug immer 500 nM, die von Sorafenib 5 µM. Die Mittelwerte einer Behandlungsgruppe wurden aufgetragen. Die Behandlung dauerte insgesamt 18 Tage, an Tag 8 und 15 wurde der Wirkstoff durch partiellen Austausch des Kulturmediums jeweils 1:1,67 verdünnt (rote Pfeile). Für die unbehandelten Sphäroide und die gleichzeitige Kombinationsbehandlung ist der Standardabweichung aufgetragen. **rechts: lichtmikroskopische Aufnahmen exemplarischer Sphäroide vom 18. Behandlungstag**

Auch nach Zugabe des jeweils anderen Wirkstoffs blieben die Durchmesser diesen zunächst ähnlich. Erst nach dem 8. Behandlungstag erfolgte eine Trennung der Behandlungsgruppen: Die Durchmesser der Sphäroide der Kombinationsbehandlung 4d Sorafenib + 4d RAD001

stagnierten nach dem 8. Tag, anders als die ausschließlich mit Sorafenib behandelten Sphäroide, die ihren Durchmesser weiterhin verkleinerten. Die Durchmesser der Kombinationsbehandlung 4d RAD001 + 4d Sorafenib hingegen stiegen nach dem 8. Behandlungstag im Gegensatz zu den mit RAD001 behandelten merklich an. Die Sphäroide in den beiden sequentiellen Kombinationsbehandlungen veränderten ihre Morphologie bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nicht. Den stärksten Effekt bewirkte die Kombinationsbehandlung mit gleichzeitiger Wirkstoffgabe. Die Durchmesser dieser Sphäroide verkleinerten sich am Anfang der Behandlung in gleichem Maße wie die RAD001-behandelten Sphäroide (innerhalb der Fehlergrenze) und ab dem 6. Beobachtungstag mehr als alle anderen Behandlungen.

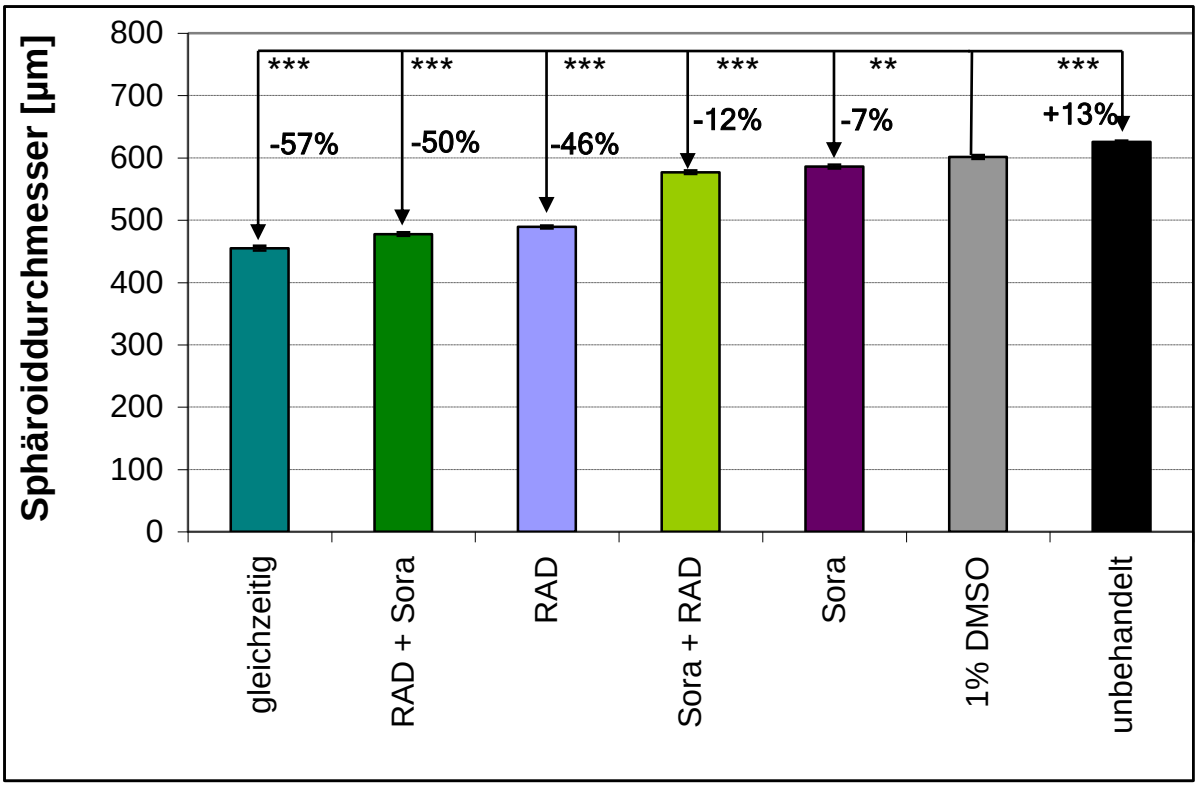


Abbildung 3-28: Prozentuale Reduktion des Sphäroiddurchmessers von kombiniert mit RAD001 und Sorafenib-behandelten Sphäroiden am 8. Tag nach Start der Behandlung: Jeweils 12 Sphäroide der Zelllinie A-498 wurden mit einem der Wirkstoffe Sorafenib oder RAD001 oder einer Mischung der beiden behandelt oder die Wirkstoffe wurden sequentiell gegeben. Die RAD001-Konzentration betrug immer 500 nM, die von Sorafenib 5 µM. Aufgetragen wurden die Mittelwerte einer Behandlungsgruppe. Die prozentuale Reduktion des Durchmessers [des Volumens] bezieht sich auf die DMSO-behandelten Sphäroide Die Signifikanz der Durchmesserreduktion wurde mit dem Student'schen t-Test berechnet ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) sowie $p < 0,001$ (***)). Die Fehlerbalken markieren den Standardfehler.

Bis zum 14. Beobachtungstag schrumpften die Durchmesser der gleichzeitigen Kombinationsbehandlung, danach stiegen sie aufgrund von Disaggregation an, wobei sich eine deutliche morphologische Beeinträchtigung (siehe Photo vom 18. Beobachtungstag)

erkennen ließ. Die Ergebnisse des in Abbildung 3-27 dargestellten Experiments wurden in einer unabhängigen Wiederholung bestätigt.

Die Berechnung der prozentualen Reduktion der Sphäroiddurchmesser [Volumina] bezogen auf DMSO-behandelten Sphäroide für den 8. Tag nach Start der Behandlung ermöglicht den direkten Vergleich der Wirksamkeit des jeweiligen Behandlungsregimes (Abbildung 3-28). Es handelt sich um eine andere Darstellungsform des Experiments aus Abbildung 3-27. Im Unterschied zum letzten Beobachtungstag (Tag 18) waren die Sphäroiddurchmesser der sequentiellen Kombinationsbehandlungen 4d RAD001 + 4d Sorafenib kleiner als die der Einzelbehandlung mit 500 nM RAD001 und die der sequentielle Kombinationsbehandlung 4d Sorafenib + 4d RAD001 kleiner als die der Einzelbehandlung mit Sorafenib. Die Durchmesser [Volumina] derjenigen Sphäroide, die in den ersten 4 Behandlungstagen mit RAD001 behandelt wurden, verkleinerten sich am stärksten. Die prozentualen Reduktion ihrer Durchmesser [Volumina] betrug für die RAD001-Einzelbehandlung -19% [-46%], für die sequentielle Behandlung 4 Tage RAD001 + 4 Tage Sorafenib -21% [-50%] und für die gleichzeitige Behandlung mit RAD001 und Sorafenib -24% [-57%]. Die Durchmesser der DMSO-behandelten Sphäroide unterschieden sich statistisch signifikant von den anderen Sphäroidgruppen.

3.6.1 Charakterisierung der Viabilität mittels WST-Test

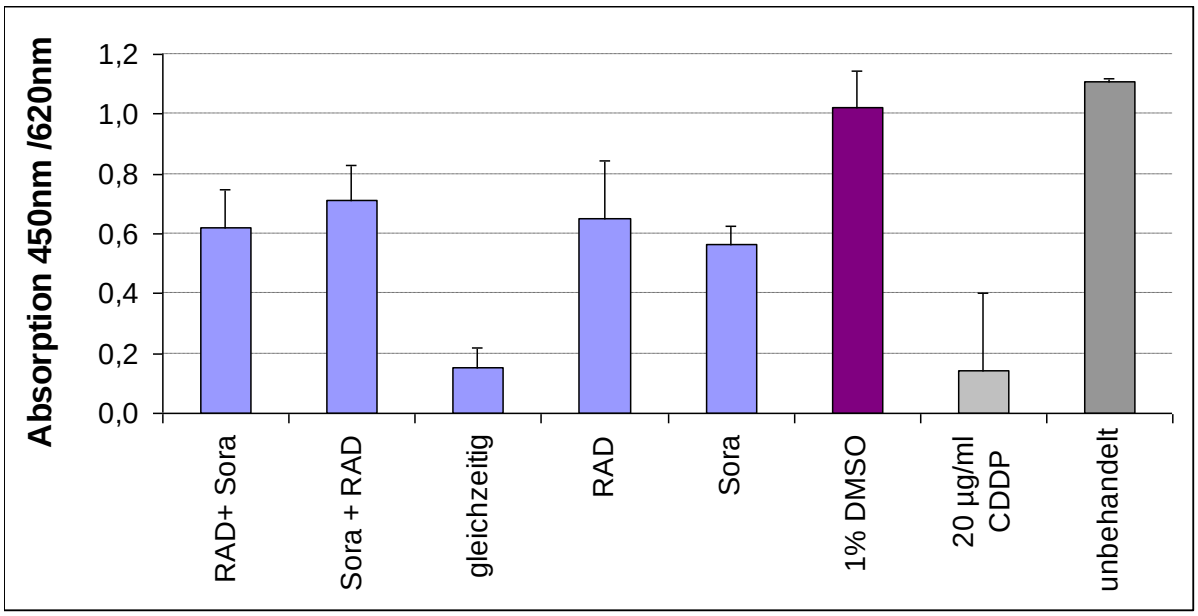


Abbildung 3-29: Viabilität von A498-Sphäroiden nach 17-tägiger Kombinationsbehandlung mit RAD001 und Sorafenib: Die RAD001-Konzentration betrug immer 500 nM, die von Sorafenib 5 µM.Zu den jeweils 12 Sphäroiden einer Behandlungsgruppe, die sich in 200 µl Kulturmedium befanden. wurden 20 µl WST-1 Reagenz (10%) gegeben und die Platte 4 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 450 nm gegenüber der bei 620 nm gemessen. Die Fehlerbalken illustrieren die Standardabweichung.

Die Viabilität der Kombinationsbehandlung aus Abbildung 3-27 wurde unter Zuhilfenahme eines WST-1-Tests quantifiziert. Die unbehandelten Sphäroide zeigten die höchste Viabilität, die Sphäroide der gleichzeitigen Kombinationsbehandlung die niedrigste. Die Viabilität der gleichzeitigen Behandlung mit RAD001 und Sorafenib war gegenüber der DMSO-Kontrolle um 95% erniedrigt. Die Viabilitäten der anderen Kombinations- und der Einzelbehandlungen lagen wie auch ihre Sphäroiddurchmesser zwischen diesen Eckpunkten. Ihre Viabilitäten waren gegenüber der DMSO-Kontrolle zwischen 31% (4d Sorafenib+ 4d RAD001) und 45 % (Sorafenib alleine) vermindert.

3.6.2 Phosphorylierung des RAF-*downstream-targets* ERK

Ein zur Überprüfung der Phosphorylierungsrate von ERK in kombiniert mit RAD001 und Sorafenib behandelten Sphäroiden durchgeführter Western-Blot war aufgrund schwacher p-ERK Banden nicht densitometrisch auswertbar, man kann jedoch erkennen, dass p-ERK in allen Proben, die mit Sorafenib behandelt wurden, verglichen mit RAD001- und unbehandelten Sphäroiden in geringerer Menge vorhanden war (Abbildung 3-30). Ebenfalls deutlich war die insgesamt geringe Proteinmenge in der gleichzeitigen Behandlung.

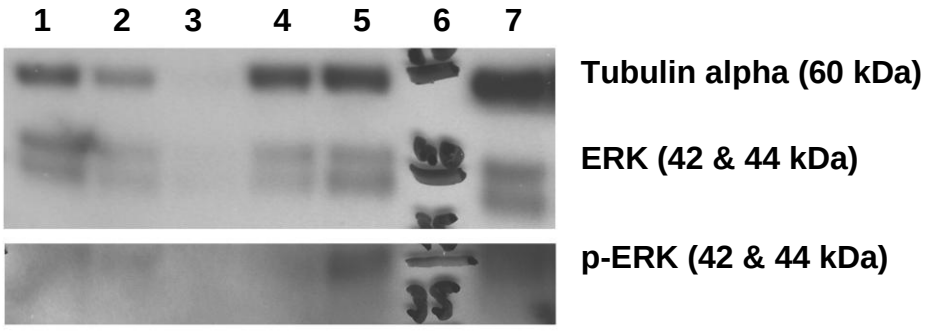


Abbildung 3-30: ERK und p-ERK-Expression in Sorafenib und RAD001-kombinationsbehandelten 786-O-Sphäroiden: Die Sphäroide wurden insgesamt 8 Tage entweder mit einem der beiden Wirkstoffe Sorafenib oder RAD001 oder einer Mischung der beiden Wirkstoffe behandelt bzw. ihnen wurden die Wirkstoffe sequentiell gegeben (4d RAD001 + 4d Sorafenib oder 4d Sorafenib + 4d RAD001). Die RAD001-Konzentration betrug immer 500 nM, die von Sorafenib 10 µM. Anschließend wurden die Sphäroide geerntet und lysiert. Probe **1**: 4 Tage Sorafenib + 4 Tage RAD001, Probe **2**: RAD001 + 4 Tage Sorafenib; Probe **3**: RAD001 + Sorafenib gleichzeitig; Probe **4**: 10 µM Sorafenib; Probe **5**: 500 nM RAD001; Probe **6**: Proteingrößenstandard; Probe **7**: unbehandelt. Tubulin dient als Ladungskontrolle. AK-Konzentrationen: ERK & p-ERK: 1:100, Tubulin: 1:500.

An derselben Membran wurde nachfolgend die Phosphorylierung von AKT untersucht (Abbildung 3-31). In Probe 5 und 6, den RAD001- und unbehandelten Sphäroiden, war eine deutliche p-AKT-Bande erkennbar, in den Proben 1-4 (Sorafenib-behandelte Sphäroide) war die entsprechende Bande sehr schwach. Auch dieser Blot war nicht quantitativ auswertbar.

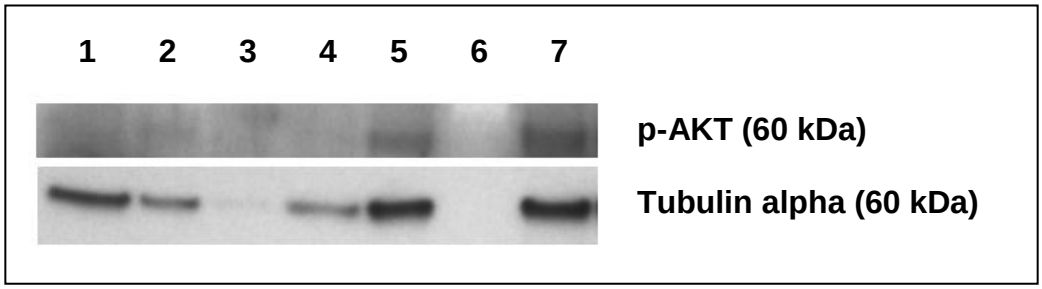


Abbildung 3-31: p-AKT-Expression in Sorafenib und RAD001-kombinationsbehandelten 786-O-Sphäroiden: Die Sphäroide wurden insgesamt 8 Tage entweder mit einem der beiden Wirkstoffe Sorafenib oder RAD001 oder einer Mischung der beiden Wirkstoffe behandelt bzw. ihnen wurden die Wirkstoffe sequentiell gegeben (4d RAD001 + 4d Sorafenib oder 4d Sorafenib + 4d RAD001). Die RAD001-Konzentration betrug immer 500 nM, die von Sorafenib 10 µM. Anschließend wurden die Sphäroide geerntet und lysiert. Probe **1**: 4 Tage Sorafenib + 4 Tage RAD001, Probe **2**: RAD001 + 4 Tage Sorafenib; Probe **3**: RAD001 + Sorafenib gleichzeitig; Probe **4**: 10 µM Sorafenib; Probe **5**: 500 nM RAD001; Probe **6**: Proteingrößenstandard; Probe **7**: unbehandelt. Tubulin dient als Ladungskontrolle. AK-Konzentrationen: p-AKT: 1:100, Tubulin: 1:500.

Die Ergebnisse bedürfen noch der Bestätigung in unabhängigen Wiederholungsexperimenten.

4 Diskussion

4.1 Zielgerichtete Therapien beim NZK

Obwohl die jüngsten Erfolge in der Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms mit zielgerichteten Wirkstoffen viel versprechend sind, besteht noch Forschungsbedarf: dazu gehören der Einfluss dieser Medikamente auf das Überleben und die Lebensqualität, das effektivste Mittel in der Erstlinientherapie, die Rolle der Kombinationstherapie und die dafür zu verwendenden Wirkstoffe, der optimale Plan für die Zweitlinientherapie, die Mechanismen, die zu Resistenzen gegenüber der antiangiogenetischen Behandlung führen, die erforderlichen Modalitäten, ein Therapieansprechen vorhersagen und bewerten zu können und schlussendlich die Auswirkungen einer Langzeitmedikation.

Bereits die grundlegende Frage, inwieweit die neuen Therapieansätze das Überleben der Patienten verlängern, ist nicht ganz einfach zu beantworten. Das liegt daran, dass sich die Generation der zielgerichteten Wirkstoffe, wie in Kapitel 1.3 bereits dargelegt, noch nicht lange in der klinischen Anwendung befindet und somit keine langjährigen Verlaufskontrollen vorliegen. Zum anderen werden Studien häufig entblindet und ein Wechsel in die andere Gruppe erlaubt, sobald einer der getesteten Wirkstoffe ein signifikant besseres Ansprechen zeigt. Der RAF- und RTK-Hemmer Sorafenib wurde beispielsweise im Jahr 2006, basierend auf einer multizentrischen placebokontrollierten Phase III-Doppelblind-Studie an insgesamt 903 Patienten (Escudier, 2007), zugelassen. Die Studie wurde an Patienten durchgeführt, deren Erkrankung nach einer vorausgehenden nichtantiangiogenetischen systemischen Behandlung fortgeschritten war. Nachdem zunächst das Gesamtüberleben als Bewertungsmaßstab dienen sollte, wurde die Studie nach einer ersten Auswertung der Daten abgebrochen und allen Patienten die Behandlung mit Sorafenib angeboten. Zu diesem Zeitpunkt betrug das mittlere progressionsfreie Überleben in der Sorafenib-Gruppe 5,5 Monate im Vergleich zu 2,8 Monaten in der Placebogruppe (Escudier, 2007). Die Rede ist also von relativ kurzen Zeiträumen. Gleiches gilt für Studien anderer Angiogenesehemmer wie Sunitinib (Motzer, 2006a), Bevacizumab (Yang, 2003) oder Neovastat (Escudier, 2004) (Motzer, 2006b). Die der Zulassung des mTOR-Inhibitors RAD001 vorausgegangene klinische Studie konnte eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens von 1,9 auf 4,0 Monate bezogen auf die Placebogruppe verzeichnen. Im Unterschied zu oben genannten Studien nahmen hier nur Patienten teil, bei denen eine vorausgehende zielgerichtete Therapie versagt hatte (Motzer, 2008a).

Was die Nebenwirkungen betrifft, so werden sie im Allgemeinen als moderater und leichter zu behandeln beschrieben als bei Standardchemotherapeutika. Für Sorafenib sind die am

häufigsten beschriebenen toxischen Effekte Diarhhoe, Erschöpfung und dermatologische Symptome wie zum Beispiel das Hand-Fuss-Syndrom oder Hautausschlag. Zu den schwerwiegenden, allerdings seltenen Effekten zählen kardiovaskuläre Probleme (Escudier, 2007). Für RAD001 sind Entzündungen der Mundhöhle (Stomatitis), Anämie (Blutarmut) und Asthenie (Schwächegefühl) als häufige adverse Effekte beschrieben (Motzer, 2008a). Auch *in puncto* Nebenwirkungen und Resistenzmechanismen ist die Auswertung von Studien zu den Einflüssen einer Langzeitmedikation abzuwarten.

Die aktuellen Behandlungsempfehlungen bei metastasiertem NZK laut EAU wurden bereits in Kapitel 1.4 referiert. Derzeit laufen verschiedene Phase I/II-Studien zur kombinierten Therapie des fortgeschrittenen NZKs mit Sorafenib und RAD001 (www.clinicaltrial.gov). In diesem Forschungsfeld sind noch zahlreiche Fragen bezüglich des Potentials der einzelnen Wirkstoffe, der Sequenz der Verabreichung usw. zu beantworten. Festzuhalten bleibt, dass die neuen zielgerichteten Wirkstoffe eine längerfristige Stabilisierung metastasierten NZK versprechen, wobei die Wirkung gegenüber toxischen Effekten und der Lebensqualität abgewogen werden muss (EAUGuidelines, 2009).

Während nur die klinische Erprobung eine abschließende Beurteilung neuer Wirkstoffe ermöglicht, lassen sich viele Fragestellungen methodischer in Zellkulturexperimenten unter vergleichsweise reproduzierbaren Bedingungen bearbeiten. Auch für die Untersuchung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen ist eine *in vitro* Testung unabdingbar. Auf der Suche nach einem geeigneten Modellsystem für metastasiertes NZK bieten sich Tumorzellsphäroide als Modell avaskulärer Mikrometastasen an (siehe Kapitel 1.5).

4.2 Das Modellsystem Tumorzellsphäroid

Multizelluläre Tumorzellsphäroide sind dabei, sich als Modellsystem in der *in vitro*-Testung neuer Wirkstoffe zu etablieren (Kunz-Schughart, 2004). Dabei beschränken sich die Analogien zu avaskulären Mikrometastasen nicht nur auf die Metaboliten- und Sauerstoffgradienten. Vielmehr wird den Zellen, wie bereits in Kapitel 1.5 angesprochen, durch den direkten, dreidimensionalen Kontakt zu anderen Zellen ein Umfeld geboten, welches dem *in vivo*-Zustand nahe kommt und die Sensitivität gegenüber Wirkstoffen beeinflusst. In der Literatur wurde häufig die größere Resistenz multizellulärer Tumorzellsphäroide gegenüber Medikamenten und Bestrahlung abweichend zu Monolayerzellkulturen beschrieben (Olive, 1994). Nahe liegende Begründungen dafür wären Unterschiede in der Zellzyklusverteilung, limitiertes Eindringen der Wirkstoffe ins Sphäroidinnere oder die Existenz hypoxischer Zellen. Sie beantworten allerdings nicht alle Fragen, wie z.B. die, warum auch sehr kleine Sphäroide aus nur 20-25 Zellen sich anders als Zellen in Monolayerkulturen verhalten. Hier greifen differenziertere Erklärungsansätze, die

sich mit den Zell-Zell-Interaktionen befassen, dem so genannten *‚contact effect'*. Es wurden verschiedene Hypothesen von interzellulärer Kommunikation über veränderte DNA-Packung bis hin zur Zellform als mögliche Ursache für erhöhte Resistenz aufgestellt (Nederman, 1984; Olive, 1994). Neuere Publikationen begründen den Effekt durch Integrin-Interaktionen, die über die Ausschüttung des Transkriptionsfaktors NF-κB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) Einfluss auf die Genregulation nehmen (Weaver, 2002).

Bei der Wirkstofftestung an Tumorzellsphäroiden gehören Sphäroidwachstum und Wachstumsverminderung nach Behandlung zu den standardmäßig observierten Parametern. Dies lässt sich schnell und einfach durch lichtmikroskopische Begutachtung des Sphäroiddurchmessers bewerkstelligen. Während in Monolayerkulturen eine Größenveränderung einzelner Zellen kaum auffallen dürfte, tritt ein solcher Effekt in Sphäroiden deutlich zu Tage. Hierbei sollte man sich stets vor Augen halten, dass einer Veränderung des Durchmessers in Wahrheit eine Veränderung des Volumens zugrunde liegt. So bedeutet beispielsweise eine Verringerung des Durchmessers um 10% von 500 auf 450 µm in Wahrheit eine Reduktion des Volumens (unter Annahme streng sphärischer Geometrie) von 0,065 auf 0,034 mm^3, also um etwa 48%. Man sollte sich auch bewusst sein, dass sich anhand des Sphäroiddurchmessers keine direkten Rückschlüsse auf die Viabilität der Sphäroide ziehen lassen, weil sich sowohl eine Verkleinerung der einzelnen Zellen, ein erhöhter Anteil ruhender Zellen als auch eine verstärkte Apoptose- bzw. Nekroserate wachstumsmindernd auswirken könnten (Friedrich, 2007). Umgekehrt steht eine Vergrößerung des Durchmessers nicht zwangsweise für verstärkte Proliferation, sondern könnte auch durch verminderte Zell-Zell-Adhäsion zustande kommen (Shimazui, 2004). Um einen Wirkstoffeffekt umfassend zu charakterisieren, sind somit stets zusätzliche Analysen, wie zum Beispiel der Zellviabilität oder der Zellzyklusverteilung, notwendig.

Längst nicht alle Zellen bzw. Zelllinien besitzen allerdings die Fähigkeit zur Sphäroidbildung. Bei Friedrich *et al.* findet sich eine Auflistung menschlicher Tumorzelllinien, die für diese Eigenschaft bekannt sind (Friedrich, 2007). Dazu gehören auch die *VHL*-mutierten NZK-Zelllinien A-498 und 786-O. Interessanterweise scheint ein Zusammenhang zwischen *VHL*-Mutation und der Eignung zur Sphäroidbildung zu bestehen. So verloren Zellen der Linie 786-O ihre Befähigung Sphäroide zu formen, nachdem sie mit dem Wildtyp des *VHL*-Gens transfiziert worden waren. Sie arrangierten sich nur noch im losen Verbund und erzeugten ein Netzwerk tubulärer und trabekulärer Strukturen (Lieubeau-Teillet, 1998). Ursächlich ist vermutlich die Unfähigkeit mutierten VHL, an Fibronektin, ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix, zu binden (Stickle, 2004). Diese Beobachtung würde auch die geringe Neigung der NZK-Zelllinie Caki1 zur Sphäroidbildung erklären. Auch könnte ein Zusammenhang zwischen der hohen VHL-Mutations- und der hohen

Metastasierungsrate beim NZK begründet auf der Fähigkeit, Metastasen zu bilden, in Betracht gezogen werden.

4.3 Sphäroidkultivierung

Für die Anzucht von Sphäroiden sind verschiedene Methoden in der Literatur beschrieben. Dazu zählt die Kultivierung in bewegter Lösung (*roller tub*e, *spinner flask, gyratory shaker* oder *rotating wall vessel*), auf nicht-adhärenten Oberflächen (z.B. *soft agar, liquid overlay*), in einem hängenden Tropfen Kulturmedium (*hanging drop*) (Friedrich, 2007) oder hochviskoser Lösung (Methylzellulose-Technik) (www.spherogenex.de). Allen Methoden ist ihr Ziel gemeinsam, eine Adhäsion der Zellen an der Gefäßwand zu verhindern und stattdessen eine Zusammenlagerung zu erzielen. Die Vorteile von auf 96-*well*-Platten durchführbaren Systemen wie der *soft agar*-Methode und Methylzellulosetechnik liegen in den geringeren Volumina (und damit geringeren benötigen Wirkstoffmenge), der hohen Reproduzierbarkeit und der Möglichkeit, einzelne Sphäroide vor und nach Behandlung zu analysieren (Friedrich, 2007). Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, erwies sich eine Kombination der beiden letztgenannten Methoden als geeignet, reproduzierbar symmetrische Sphäroide herzustellen und eine Adhäsion am Plattenboden zu verhindern.

Die initiale Größe der Sphäroide lässt sich durch die Anzahl der ausgesäten Zellen steuern. Hier gilt es, die optimale Dimension zu finden. Bei Aussaat von 10.000 Zellen pro *well* erlangten die Sphäroide der Zelllinie A-498 nach 7 Tagen im Durchschnitt einen Durchmesser von knapp 550 µm, die der Zelllinie 786-O waren mit durchschnittlich 430 µm kleiner (siehe Graphen Kapitel 3). Die Sphäroide beider Zelllinien waren auch mit bloßem Auge gut erkennbar. Paraffinschnitte der Sphäroide zeigen eine homogene Anordnung der Zellen im Sphäroidinneren, ein nekrotischer Kern ist nicht zu sehen (Abbildung 3-6). Wesentlich höhere Zellzahlen (>50.000) sind nicht zu empfehlen. Hier wichen die Sphäroide sichtbar von einer kugelförmigen Gestalt ab und ähnelten in ihrem Aussehen dem von Erythrozyten.

Die Wachstumskurven der unbehandelten Sphäroide (Abbildung 3-7 und 3-8) illustrieren das oben Beschriebene: Innerhalb der ersten 6 (Zelllinie A-498, Abbildung 3-7) bzw. 8 (Zelllinie 786-O, Abbildung 3-8) Tage nach der Aussaat verringert sich der Sphäroiddurchmesser durch die Ausbildung eines kompakten Sphäroids deutlich. Danach stagniert er bzw. vergrößert sich wieder leicht. Welches von beidem eintritt entscheidet sich anscheinend nicht nach der Zelllinie, sondern ist auf den unterschiedlichen Proliferationsstatus (Mellor, 2005) der Sphäroide zurückzuführen, da auch in den durchgeführten Versuchen zum Wirkstoffeinfluss beobachtet wurde, dass die unbehandelten Sphäroide sich in verschiedenen Experimenten hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens unterschieden (vergleiche z.B.

Abbildung 3-20 und 3-21, schwarze Kurven). Obwohl sie dieselbe Vorgeschichte, nämlich eine Woche Sphäroidbildung und anschließende Behandlung, teilten, vergrößerten sich ihre Durchmesser mit 12% (Abbildung 3-20) bzw. 6% (Abbildung 3-21) in abweichendem Maße. Dieses unterschiedliche Wachstumsverhalten unterstreicht die Bedeutung der Mitführung einer Vergleichsgruppe unbehandelter Sphäroide bei allen Experimenten. Eventuelle Wirkstoffeffekte müssen immer in Hinblick auf die unbehandelten Sphäroide und eventuelle Kontrollen bei Verwendung eines toxischen Lösungsmittels gewertet werden.

4.4 Expressionsnachweis der Wirkstofftargets

Um die verwendeten Zellen als repräsentative Vertreter des klarzelligen Nierenzellkarzinoms zu verifizieren und durch Expressionsnachweis der relevanten Rezeptortyrosinkinasen als potentiell empfänglich für die zielgerichteten Wirkstoffe RAD001 und Sorafenib einzustufen, wurden sie immunhistochemisch untersucht. Alternativ hätte man dieser Fragestellung auch – wie in Abbildung 3-3 für die VEGF-Rezeptoren FLT1 und KDR gezeigt - mittels Western-Blot-Analyse nachgehen können. Wie in Kapitel 3.1 angeführt und in Abbildung 3-1 für die Zelllinie A-498 bzw. in Abbildung 3-2 für die Zelllinie 786-O anhand des Rezeptors PDGFRB und seiner phosphorylierten Form exemplarisch gezeigt, konnten alle getesteten RTKs (FLT1, KDR, PDGFRA, phospho-PDGFRA, PDGFRB und phospho-PDGFRB) in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Dass der Nachweis der Rezeptoren auch in phosphorylierter Form glückte, kann als Zeichen ihrer konstitutiven Aktivierung gedeutet werden. Über die Stärke der Expression der einzelnen RTKs indes lässt sich keine Aussage treffen, da hier die Spezifität des jeweiligen Antikörpers einen entscheidenden Einfluss ausübt. Es lassen sich lediglich die beiden Zelllinien gegenüberstellen. Hierbei wurden keine eklatanten Unterschiede in der Expressionsstärke festgestellt, was gegebenenfalls in Wiederholungsexperimenten zu bestätigen wäre.

4.5 Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor RAD001

Eine Literatursuche zu bisherigen Zellkulturexperimenten mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 brachte weder Resultate zu Experimenten an in Monolayer kultivierten NZK-Zelllinien noch an Sphäroiden, so dass ein Vergleich der eigenen Daten mit Experimenten an Monolayerkulturen oder Xenograft-*in vivo*-Experimenten anderer Tumorentitäten erfolgen muss. Unter anderem für Glioblastom- und Ovarialkarzinomzellen konnte *in vivo* eine Verlangsamung des Tumorwachstums bzw. eine Reduktion des Tumorvolumens unter RAD001-Administration gegenüber dem Placebo gezeigt werden (Goudar, 2005; Mabuchi, 2007). Bei Tierexperimenten ist die Messung des Tumorvolumens zwar gängige Praxis,

allerdings hängt dieses von einer Reihe Parametern ab, ist also nicht direkt mit *in vitro*-Ergebnissen vergleichbar. In Monolayerzellkulturexperimenten an Ovarial- Brust- und endometrialen Adenokarzinomzellen hatten die untersuchten Konzentrationen von 1-100 nM RAD001 einen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum (Treeck, 2006).

In Anlehnung an diese Daten wurde, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, der Konzentrationsbereich für die initiale Testung an Sphäroiden von 1 bis 500 nM gewählt und im Folgenden die niedrigste Konzentration (1 nM) weggelassen, da sie keinen sichtbaren Einfluss auf die Sphäroide ausübte. Die Behandlung der Tumorzellsphäroide mit RAD001 führte ab 5 nM zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des Durchmessers in den beiden getesteten Zelllinien A-498 und 786-O (Abbildung 3-10 und 3-15). Dabei blieben die Sphäroide äußerlich vollkommen intakt und bewahrten sich ihre glatte Oberfläche (Abbildung 3-13). Bemerkenswerterweise vergrößert sich der Standardfehler für die behandelten Sphäroide, aber auch in geringerem Ausmaß für die unbehandelten, über die Dauer der Beobachtung. Dies deutet darauf hin, dass sich die Unterschiede zwischen den einzelnen Sphäroiden mit zunehmendem Alter vergrößern. Bei den behandelten Sphäroiden kommen zusätzlich noch Pipettierfehler und daraus resultierende leicht abweichende Wirkstoffkonzentrationen als mögliche Ursache hinzu. Wie zum Abschluss der RAD001-Experimente durchgeführte WST-Tests belegen, geht die konzentrationsabhängige Durchmesserreduktion der Sphäroide mit einer konzentrationsabhängigen Verringerung der Viabilität einher (Abbildung 3-16). Dieser Trend bleibt auch dann erhalten, wenn man die gemessenen Absorptionswerte auf den jeweiligen durchschnittlichen Sphäroiddurchmesser normiert (Daten nicht gezeigt). Allerdings ist die Anwendung des WST-Tests für Sphäroide zur Bemessung der Viabilität zwar beschrieben (Napolitano, 2007), aber nicht ganz unumstritten. Aufgrund von limitierter Diffusion etc. können Abweichungen von der Linearität auftreten (Friedrich, 2007).

Über eine eventuell größere Resistenz der Sphäroide gegenüber Monolayerzellkulturen lässt sich anhand der durchgeführten Experimente keine Aussage treffen. Wie in Kapitel 4.2 bereits angesprochen sind für die Verkleinerung der Sphäroide prinzipiell verschiedene Ursachen denkbar: a) eine Dysbalance von Apoptose und/oder Nekrose gegenüber der Mitoserate b) ein erhöhter Anteil ruhender Zellen gegenüber sich teilender oder c) eine Verkleinerung der einzelnen Zellen (Faivre, 2006). Um diese Fragen zu klären, wurden u.a. HE-Schnitte angefertigt sowie TUNEL-Tests, Western-Blots und Zellzyklusmessungen durchgeführt. Die HE-Schnitte der RAD001-behandelten Sphäroide glichen - in Übereinstimmung mit dem lichtmikroskopisch gewonnenen Eindruck - morphologisch den unbehandelten Kontrollen, Nekrose war nicht zu erkennen (Abbildung 3-14). Die nächste Hypothese, verstärkte Apoptose sollte unter Zuhilfenahme eines TUNEL-Tests, der die apoptose-typischen DNA-Strangbrüche kenntlich macht, überprüft werden. Leider war das

Ergebnis schwer zu deuten, da zum einen Experiment und Wiederholung nicht übereinstimmten und zum anderen die DMSO-Kontrollen bisweilen eine höhere Anzahl apoptotischer Zellen als die RAD001-behandelten Sphäroide aufwiesen (nicht gezeigt). Die Methode bedarf weiterer Optimierung. Die Zellzyklusmessungen wiederum hatten das Problem, dass mit 10.000 Zellen/Sphäroid und insgesamt 6 Sphäroiden pro Behandlungsgruppe eine für diese Methode sehr geringe Probenmenge vorlag (Abbildung 3-18). In einigen Proben wurden bei der Durchflusszytometrie nur 2000 Ereignisse gezählt. Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Sphäroiden bewegten sich im Rahmen der Fehlergrenzen, weswegen eine detaillierte Auswertung der Daten unterblieb. Festzuhalten bleibt allerdings, dass sich 90% aller gemessenen Zellen im G_1-Arrest, befanden, ein Ergebnis, dass auf eine allgemein niedrige Mitoserate der Sphäroide unter den hier gewählten Versuchsbedingungen hinweist. Die Hypothese, dass die Verkleinerung der Sphäroide auf eine Verkleinerung der einzelnen Zellen zurückzuführen sein könnte, beruht auf der ausbleibenden Phosphorylierung von p70S6K1 nach mTORC1-Hemmung und der daraus resultierenden verminderten Proteinsynthese. Dadurch könnte sich unter anderem die Zellgröße verringern. Bedauerlicherweise konnte ein solcher Nachweis verminderter Phosphorylierung von p70S6K, obgleich in der Literatur ausführlich beschrieben (Bianco, 2008), im vorliegenden Fall bislang noch nicht stichhaltig erbracht werden.

Abbildung 3-12 verdeutlicht nochmals die oben beschriebene Konzentrationsabhängigkeit in der Durchmesserreduktion. In den Experimenten wurden zwar keine Konzentration getestet, bei denen ein maximaler Hemmeffekt erreicht wurde, man könnte anhand des Verlaufs der Regressionsgeraden allerdings für die Zelllinie A-498 grob einen IC_{50}-Wert im Bereich von 50-100 nM RAD001 abschätzen. Für die Zelllinie 786-O erhielte man auf die gleiche Weise einen IC_{50}-Wert in derselben Größenordnung (Abbildung 3-15). Zur Überprüfung dieser These wären weiterführende Tests mit höheren RAD001-Konzentrationen notwendig. In der Literatur sind für Experimente an Monolayerzellkulturen verschiedener Tumorarten IC_{50}-Werte zwischen 0,4 nM und 95 nM RAD001 angegeben (Treeck, 2006). Damit sind beide getesteten NZK-Zelllinien als RAD001-sensitiv einzustufen. Gleichzeitig widerspricht die Ähnlichkeit der Sensitivität der beiden Zelllinien den von Robb *et al.* erhobenen Daten. Sie verglichen als *monolayer* kultivierte A-498 und 786-O Zellen hinsichtlich ihres Ansprechens auf Rapamycin mittels des Einbaus von ^{3}H-Thymidin, wobei die Zelllinie 786-O durch ein wesentlich geringeres Ansprechen auffiel (Faktor 10) (Robb, 2007).

Durchaus nicht selbstverständlich ist der unmittelbar beobachtbare Einfluss des Mediumwechsels an Tag 7 und 14 (Abbildung 3-10 und 3-15), der sich in einer Abflachung bzw. einem Anstieg der Sphäroidkurven äußerte. In der Literatur ist von einer anhaltenden signifikanten Inhibition der mTORC1-Aktivität *in vivo* für 2-5 Tage die Rede (Boulay, 2004; Le Tourneau, 2008). Nur der Gruppe der Sphäroide mit der höchsten (500 nM) (bzw. für die

Zelllinie A-498 der zweit- (250 nM) und dritthöchsten (100 nM)), Abbildung 3-10) Wirkstoffkonzentration scheint eine solche anhaltende Hemmung zu widerfahren. Ihre Sphäroiddurchmesser wachsen nach dem 8. Beobachtungstag nicht wie die der anderen Sphäroidgruppen, sondern verändern sich in den verbleibenden 9 (Abbildung 3-10) bzw. 10 (Abbildung 3-15) Beobachtungstagen kaum.

Das DMSO scheint einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Sphäroide auszuüben. An den gemessenen Wachstumskurven (Abbildung 3-10 und 3-15) ist für eine DMSO-Konzentration von 1% eine Wachstumsinhibition ersichtlich. Auch auf die mit Hilfe eines WST-Tests gemessene Viabilität konnte häufig ein hemmender Einfluss des DMSO beobachtet werden (Abbildung 3-16, 3-22 und 3-29), selbst wenn die Sphäroiddurchmesser dieser DMSO-Kontrollen denen der unbehandelten glichen. Die Ursachen für die Schwankungen in der Ausprägung des Effekts sind vermutlich, wie oben diskutiert, in der Messmethode (WST) zu suchen. Dass DMSO in höheren Konzentrationen toxisch wirkt, ist hinlänglich bekannt. Cao *et al.* berichten etwa von einer Reduktion der Zellviabilität um 10% in Monolayerzellkultur durch 1% DMSO (Cao, 2007). Folglich ist es wichtig, stets eine DMSO-Kontrolle mitzuführen, um den Einfluss des DMSO auf die beobachteten Effekte abschätzen zu können.

4.6 Behandlung mit dem RAF- und RTK-Hemmer Sorafenib

Auch für das Sorafenib konnten keine Veröffentlichungen zu Zellkulturexperimenten an Sphäroiden gefunden werden. In Monolayerzellkulturexperimenten an Leberkarzinom- bzw. Leukämiezellen wurde ein wachstumsmindernder Effekt ab Konzentrationen zwischen 1 nM und 1 µM beobachtet (Liu, 2006); (Lierman, 2006). Daraus wurde ein Konzentrationsbereich von 5 nM bis 10 µM für die Sphäroidexperimente abgeleitet.

Die nach Behandlung der Sphäroide mit Sorafenib erstellten Wachstumskurven (Abbildung 3-20 und 3-21), lassen sich schwieriger deuten als beim RAD001. Das liegt zum einen daran, dass sich in diesem Fall der Wirkstoffeffekt nur begrenzt über den Sphäroiddurchmesser charakterisieren lässt. Zusätzlich zeigen die beiden Zelllinien ein unterschiedliches Ansprechverhalten auf das Sorafenib. Die Unzulänglichkeit der Messmethode lässt sich bei Betrachtung von Abbildung 3-19 nachvollziehen. Sobald die Sphäroide ihre kugelförmige Gestalt verlieren, ist ein Durchmesser nicht mehr eindeutig zu bestimmen, wodurch die Bewertung des Effekts stark vom Untersucher abhängig wird. Den späteren Zahlen sieht man nicht an, ob eine einheitliche Vergrößerung des Durchmessers oder eine unsymmetrische Schädigung vorlag (vergleiche Abbildung 3-21, Photo des mit 20 µM behandelten Sphäroids). Zerfallen die Sphäroide, wie das Photo von Tag 12 zeigt, wird man der wahren Situation nur mit der Messung des Durchmessers nicht gerecht. Die für die Behandlung mit

Sorafenib erhaltenen Wachstumskurven müssen somit immer im Zusammenhang mit der Sphäroidmorphologie bewertet werden. In der Zelllinie A-498 führte die Sorafenib-Behandlung bei den Konzentrationen 5 nM-2 µM zu einer Vergrößerung des Sphäroiddurchmessers bei weiterhin intakter Morphologie und bei der höchsten Konzentration (10 µM) zu einer Zerstörung der Sphäroide (Abbildung 3-20). Die Vergrößerung der Sphäroide die mit niedrigeren Konzentrationen (50 nM–2 µM) behandelt wurden, könnte prinzipiell auf zwei verschiedenen Wegen zustande kommen: entweder stimuliert Sorafenib die Zellproliferation und es liegt ein echtes Wachstum vor oder es induziert die Disaggregation der Sphäroide beispielsweise durch verminderte Expression von Zelladhäsionsmolekülen. Für die Zelllinie 786-O bot sich ein anderes Bild: die Vergrößerung der Sphäroide der niedrigeren Sorafenib-Konzentrationen (2,5 und 5 µM) war weniger ausgeprägt als bei der Zelllinie A-498. Für die hohen Sorafenib-Konzentrationen (10 und 20 µM) verkleinerten sich die Durchmesser. Im Unterschied zur RAD001-Behandlung ging die Durchmesserverkleinerung aber zumindest für die höchste Konzentration (20 µM) mit einem Verlust der Sphäroidsymmetrie durch Auswölbungen an den Rändern einher (Abbildung 3-21). Hintergrund für die morphologischen Veränderungen der mit hohen Sorafenib-Konzentrationen (5-20 µM) behandelten Sphäroide bei beiden Zelllinien könnte Apoptose infolge der Behandlung sein, wie sie in *in vitro*-Monolayerzellkulturexperimenten für Leukämie- (1 nM) bzw. Leberkarzinomzellen (ab 10 µM) (Lierman, 2006; Liu, 2006) publiziert ist. Yu *et al.* berichten hingegen von geringer Apoptoseinduktion in der Zelllinie 786-O (*monolayer*) durch 2-tägige Behandlung mit einer Sorafenib-Konzentration von 7,5 µM (Yu, 2006). Möglicherweise erklärt sich die Diskrepanz zu den Resultaten der vorliegenden Arbeit durch die kürzere Behandlungszeit.

Trotz äußerlich intakter Morphologie zeigten sich die mit niedrigen Sorafenib-Konzentrationen behandelten Sphäroide beider Zelllinien beim Schneiden empfindlicher als die unbehandelten, was sich in Form von Rissen in den HE-Schnitten äußerte. Einen Hinweis auf die durch die Behandlung induzierten Veränderungen in den Sphäroiden liefern auch die durchgeführten WST-Tests (Abbildung 3-22). Es zeigt sich eine konzentrationsabhängige Verminderung der relativen Viabilität (Abbildung 3-23) für die Zelllinie A-498. Unklar bleibt, worauf die Erhöhung der relativen Viabilität bei niedrigeren Konzentrationen (500 nM und 2,5 µM) zurückzuführen ist. Man könnte in diesem Zusammenhang über eine bessere Zugänglichkeit der Zellen für das WST-Reagenz durch Sphäroiddisaggregation spekulieren. Um die auf den Sphäroiddurchmesser bzw. die Zellviabilität gemessenen Effekte mit der Hemmung von RTKs und RAF in Verbindung zu bringen, wurde für die Zelllinie 786-O die Aktivität von AKT und ERK in Sorafenib-behandelten Sphäroiden der Zelllinie 786-O anhand des Ausmaßes ihrer Phosphorylierung überprüft (Abbildung 3-24 bzw. 3-25). Die Western-Blots weisen auf eine konzentrationsabhängige Reduktion von AKT für die höheren

Sorafenib-Konzentrationen und Reduktion von phospho-ERK in allen Sorafenib-Behandlungen gegenüber den unbehandelten Sphäroiden hin. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass sich die inhibitorische Wirkung des Sorafenib auf RAF ab einer Konzentration von 2,5 µM nicht mehr weiter verstärkt, die Rezeptortyrosinkinasen aber erst ab einer höheren Sorafenib-Konzentration gehemmt werden. *In vitro* gemessene IC_{50}-Werte sind in Tabelle 4-1 aufgeführt (Wilhelm, 2006).

Tabelle 4-1: IC_{50}-Werte von Sorafenib auf RAF und verschiedene RTKs [Wilhelm 2006]

	RAF1	**Wildtyp BRAF**	**FLT1**	**KDR**	**Muriner PDGFRB**
IC_{50} [nM]	6	25	26	90	57

4.7 Kombinierte Behandlung mit RAD001 und Sorafenib

Wie in Kapitel 4.1 dargelegt, befindet sich die klinische Erprobung der Kombination von RAD001 mit Sorafenib noch in der Anfangsphase. Für das Leberzellkarzinom liegen jedoch bereits Erfahrungen zur kombinierten Behandlung mit Rapamycin und Sorafenib im Xenotransplantat-Tiermodell vor (Wang, 2008b; Huynh, 2009). Wang *et al.* konnten zeigen, dass 5 Wochen nach Behandlungsstart das Tumorvolumen in kombiniert behandelten Mäusen am geringsten war, gefolgt von Rapamycin- und Sorafenib-Einzelbehandlungen. Die unbehandelten Mäuse hatten mit Abstand die größten Tumoren. Die Reduktion des Tumorvolumens ging mit Verminderung der Proliferation, verstärkter Apoptose und verringerter Vaskularisierung einher.

Bei der kombinierten Behandlung der Sphäroide mit RAD001 und Sorafenib galt es, die Parameter Konzentration und Zeit zu optimieren. Zunächst mussten Konzentrationen gefunden werden, die zwar wirksam sind, aber nicht schon als Einzelbehandlung die Sphäroide zu stark schädigen, um einen eventuellen synergistischen Effekt beobachten zu können. Daher wurde die Kombinationsbehandlung in der Zelllinie A-498 mit relativ niedrigen Konzentrationen (100 nM RAD001 und 50 bzw. 250 nM Sorafenib) begonnen (Abbildung 3-26). Für diese Konzentrationen konnte an den Sphäroiden der beiden kombinationsbehandelten Gruppen weder eine wesentliche Veränderung der Sphäroidgröße noch eine Beeinträchtigung der Morphologie beobachtet werden. Die Sphäroide der Kombinationsbehandlung mit der höheren Sorafenib-Konzentration waren etwas größer als die der Kombinationsbehandlung mit der niedrigeren, aber kleiner als die der Einzelbehandlung mit Sorafenib. Darin könnte man eine zugrunde liegende leichte, durch Sorafenib verursachte, Disaggregation der Sphäroide sehen, die von einer Verkleinerung der Zellen (durch RAD001) maskiert wird.

Im darauf folgenden Experiment an der Zelllinie A-498 (nicht gezeigt) wurden die Konzentrationen auf 250 nM RAD001 und 250 nM bzw. 2 µM Sorafenib erhöht. Die Konzentrationsabhängigkeit des Wirkstoffeffekts in den Kombinationsbehandlungen äußerte sich wieder in etwas größeren Sphäroiden der Kombinationsbehandlung mit der höheren Sorafenib-Konzentration im Vergleich zur Kombination mit der niedrigeren Sorafenib-Konzentration. Interessanterweise dominierte in diesem Versuch der Effekt des RAD001: Die Sphäroidgrößen der Kombinationsbehandlungen ähnelten stark denen der RAD001-Einzelbehandlung.

Ein deutlicher Effekt, verbunden mit morphologische Veränderungen der Sphäroide, wurde im Anschlussexperiment erzielt, in dem eine RAD001-Konzentration von 500 nM und eine Sorafenib-Konzentration von 5 µM anhand gleichzeitiger und sequentieller Verabreichung gestestet wurde (A-498; Abbildung 3-27). Die gleichzeitige Behandlung bewirkte die stärkste Verkleinerung und Gestaltveränderung der Sphäroide. Betrachtet man die prozentuale Reduktion des Sphäroiddurchmessers [Sphäroidvolumens] bezogen auf die DMSO-Kontrolle nach den ersten 8 Behandlungstagen so zeigt sich, dass dier mit gleichzeitiger Wirkstoffgabe erzielbare Reduktion verglichen mit der Summe der Einzelbehandlungen (Tabelle 4-2) als additiv oder schwach synergistisch einzustufen ist (-24% vs. -22% [-57% vs. -53%]).

Tabelle 4-2: Reduktion des Sphäroiddurchmessers von kombiniert mit RAD001 und Sorafenib-behandelten Sphäroiden am 8. Tag nach Start der Behandlung

Behandlung / Reduktion nach 8d bezogen auf DMSO-Kontrolle	RAD001 (500 nM)	Sorafenib (5 µM)	Berechnete Σ der Einzel-behandlungen	gleichzeitige Behandlung mit RAD001 und Sorafenib	4d RAD001 + 4d Sorafenib	4d Sorafenib + 4d Rad001
Durchmesser	-19%	-3%	**-22%**	**-24%**	-21%	-4%
Volumen	-46%	-7%	**-53%**	**-57%**	-50%	-12%

Die sequentielle Kombinationsbehandlung 4 Tage RAD001 + 4 Tage Sorafenib bewirkt nach 8 Behandlungstagen eine prozentuale Reduktion des Sphäroiddurchmessers von -21%, also ebenfalls im Bereich einer additiven Effekts, wohingegen die sequentielle Kombinationsbehandlung 4 Tage Sorafenib + 4 Tage RAD001 mit -4% prozentualer Durchmesserreduktion die Einzelbehandlung mit Sorafenib mit -3% nur wenig übertrifft. Im Gegensatz zur gleichzeitigen Kombinationsbehandlung scheinen Sphäroide der sequentiellen Kombinationsbehandlungen nach Verdünnung der Wirkstoffe durch teilweisen Mediumwechsel an Tag 8 wieder stärker zu proliferieren und vergrößern sich. Die Behandlungssequenz RAD001 + Sorafenib bewirkt auch nach 18 Behandlungstagen den

stärkeren Effekt auf den Sphäroiddurchmesser als die Behandlungssequenz Sorafenib + RAD001.

Da sich Effekte von RAD001 und Sorafenib auf den Sphäroiddurchmesser schwer gegeneinander abgrenzen lassen und sich visuell betrachtet möglicherweise teilweise kompensieren (Disaggregation vs. Zellverkleinerung), wurden weiterführende Anstrengungen unternommen, die zugrunde liegenden molekularen Veränderungen in den Sphäroiden zu ergründen. Die Messung der Viabilität mittels eines WST-Tests bekräftigte die Überlegenheit der gleichzeitigen gegenüber den Einzel- und sequentiellen Behandlungen. Deren Viabilitäten waren bezogen auf die DMSO-Kontrolle schwächer gemindert und unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abbildung 3-29). Diese Ergebnisse könnten als Hinweis darauf gewertet werden, dass die sequentiell behandelten Sphäroide am Ende des Beobachtungszeitraums trotz ihrer intakten Sphäroidgestalt und der größeren Sphäroiddurchmesser als die Einzelbehandlungen eine deutliche Beeinträchtigung erfuhren. Im zur Prüfung der Phosphorylierung des RAF-*downstream-targets* ERK angefertigten Western-Blot (Abbildung 3-30) spiegelt die geringe Menge des Gesamtproteins ERK in den Proben der Cisplatin- (nicht gezeigt) und gleichzeitigen Kombinationsbehandlung die starke Schädigung dieser Sphäroide und die damit verbundene geringe Zellzahl wider. Die Banden für p-ERK sind insgesamt schwach, trotzdem lässt sich erkennen, dass p-ERK in allen Proben, die mit Sorafenib behandelt wurden, in geringerer Menge vorhanden ist. Die Inkubation mit dem Antikörper gegen p-AKT als Indikator der RTK-induzierten Signalgebung zeigte, dass auch p-AKT in allen Sorafenib behandelten Proben in niedrigerer Konzentration vorliegt. In den RAD001-behandelten Sphäroiden ist AKT verglichen mit den unbehandelten Sphäroiden etwas schwächer (Abbildung 3-31). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die indirekte Hemmung der RTKs durch Inhibition von mTORC1 mit RAD001 sich nur in einer geringen Verminderung der AKT-Phosphorylierung äußert. Die reduzierte Phosphorylierung von ERK und AKT in Sorafenib-behandelten Sphäroiden steht im Einklang mit den Ergebnissen der Einzelbehandlung mit Sorafenib (Abbildung 3-24 und 3-25). In welcher Weise sich die Reihenfolge der Wirkstoffgabe in den sequentiellen Kombinationsbehandlungen auf molekularer Ebene auswirkt, kann anhand der durchgeführten Experimente nicht beantwortet werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Auch Resultate zu Kombinationsbehandlungen von Sphäroiden der Zelllinie 786-O stehen noch aus.

Mithin lässt sich abschließend feststellen, dass die kombinierte Behandlung mit den Wirkstoffen RAD001 und Sorafenib den Einzelbehandlungen sowie der sequentiellen Behandlung vorzuziehen ist. Auch aus klinischer Sicht ist eine kombinierte Behandlung schon allein deshalb sinnvoll, weil sich das Risiko bzw. die Geschwindigkeit des Entstehens resistenter Tumorzellen mit der Zahl der Angriffsorte verringert.

4.8 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Belastbare klinische Daten zur Resistenz gegenüber Rapalogs oder Sorafenib liegen zwar aufgrund der bislang geringen Anwendungsdauer in beiden Fällen noch nicht vor, Resistenzen gegenüber den Einzelwirkstoffen sind aber in jedem Fall zu erwarten, zumal sie in Zellkulturexperimenten beobachtet wurden (Huang, 2003; Panka, 2006). Für die Resistenz gegenüber Rapalogs sind verschiedene Mechanismen beschrieben: den unmittelbarsten Effekt haben dabei Mutationen an FKBP12 oder der FKBP12-Rapamycin-Bindungsdomäne am mTORC1. Des Weiteren wurden mehrere Mechanismen zur Rapamycin-Resistenz beschrieben, die mTORC1-nachfolgende Signalwege betreffen (Huang, 2003). Eine der Haupttriebfedern zur Rapalog-Resistenz ist aber vermutlich die verstärkte Aktivierung von AKT, wie sie bei anhaltender Rapalog-Exposition auftritt. Als Erklärung wurde eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den mTOR-Komplexen mTORC1 und mTORC2 zugunsten von mTORC2 vorgeschlagen (Hay, 2005). Wang *et al.* vermuten hingegen einen mTORC2-unabhängigen Mechanismus (Wang, 2008a). Ungeachtet der Ursache ließe sich dem auf gesteigerter AKT-Phosphorylierung beruhenden Resistenzmechanismus durch simultane Gabe des Rapalogs zusammen mit einem AKT- oder PI3K-Inhibitor entgegenwirken.

Auch gegenüber Sorafenib ist die Entwicklung von Resistenzen möglich. Da Sorafenib an die inaktive Konformation von RAF bindet, bewirken aktivierende RAF-Mutationen eine verminderte Affinität und damit Resistenzentwicklung (Wan, 2004). Ferner wurde Sorafenib-Resistenz über eine RAF-unabhängige MEK-Aktivierung (Wilhelm, 2004) postuliert. Generell ist aber eine komplette Resistenz gegenüber Sorafenib unwahrscheinlicher als beim RAD001, da es sich gegen mehrere *targets* richtet. Das Problem der Resistenz ist auch für andere zielgerichtete Wirkstoffe zu erwarten. Gerade sehr spezifisch agierende Wirkstoffe wie der KDR-Hemmer Neovastat oder der VEGF-Antikörper Bevacizumab (vergleiche Kapitel 1.3) sind für diese Problematik prädestiniert und sind deshalb bevorzugt in Kombination mit anderen Wirkstoffen einzusetzen.

Bezüglich der neuen zielgerichteten Wirkstoffe wie RAD001 und Sorafenib wird von einigen Wissenschaftlern die Aussagekraft von Zellkulturexperimenten dahingehend diskutiert, dass die *in vivo* erreichten Plasmakonzentrationen nicht mit den in Zellkultur verwendeten vergleichbar seien und die Ergebnisse mithin nur begrenzte Gültigkeit besäßen (Le Tourneau, 2008). Betrachtet man indes die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen für RAD001, so bewegen sich diese im Bereich von 5 bis 500 nM oder anders ausgedrückt 0,048-4,79 ng/ml. Die in klinischen Studien (in diesem Fall am Rapalog Temsirolimus) gemessenen Plasmakonzentrationen reichten von 2,2 bis 11,4 ng/ml (Raymond, 2004), also durchaus in der gleichen Größenordnung. Für Sorafenib lässt sich die gleiche Berechnung anstellen. Hier

wurden in der vorliegenden Arbeit Konzentrationen zwischen 2,5 nM und 20 µM benutzt, was 0,001-9,3 mg/l entspricht. In einer klinischen Phase I-Studie wurde für die, auch später in Folgestudien verabreichte, Dosis von 2×400 mg/Tag Plasmakonzentrationen zwischen 2,3 und 10,0 mg/l erreicht. Folglich sind die in den Zellkulturexperimenten verwendeten Sorafenib-Konzentrationen auch als realistisch anzusehen.

Gegenstand von Debatten ist derzeit die Frage, zu welchem Grad die Reduktion des Tumorvolumens bzw. die Wachstumsinhibierung *in vivo* auf die unmittelbare Wirkung auf die Tumorzellen zurückzuführen ist oder vielmehr auf antiangiogenetische Effekte. Die Arbeitsgruppen um Chang und Levy sprechen sich im Falle des Sorafenib entschieden für letzteres aus (Chang, 2007). Am Mausmodel (subkutan und orthotop; murine und humane (Zelllinie 786-O)) studierten sie die Auswirkungen einer Sorafenib-Behandlung auf Tumorvolumen und –wachstumsverzögerung. Dabei konnten sie nach 3-tägiger Behandlung eine Reduktion des Tumorgefäßsystems und damit verbundene Apoptose und zentrale Nekrose im Tumor nachweisen. Diese Beobachtung war hingegen nicht mit einem Rückgang der Phosphorylierung von ERK oder des Ki-67-Levels (einem Proliferationsmarker) verknüpft, woraus sie die Schlussfolgerung zogen, dass die Anti-Tumorwirkung hauptsächlich auf den antiangiogenetischen Effekt zurückzuführen sei. Auch für die *in vivo*-Wirkung des mTOR-Inibitors scheint die antiangiogenetische Komponente gerade bei Zelllinien, die keine direkte aktivierende Mutation im PI3K/AKT-Signalwegs besitzen (wie z.B. PTEN), eine wichtige Rolle zu spielen (Faivre, 2006). Lane *et al.* verglichen das *in vivo*-Ansprechen verschiedener Zelllinien auf RAD001 mit ihrer *in vitro*-Sensitivität. Die Abweichungen führten sie auf die *in vivo* gefundenen antiangiogenetischen Effekte wie Reduktion des Gefäßsystems und der VEGF-Konzentrationen im Plasma zurück (Lane, 2009).

Vermutlich lässt sich die Frage, ob die Anti-Tumorwirkung auf die direkten Effekte auf die Tumorzellen zurückzuführen ist oder indirekt durch Zerstörung von Endothelzellen zustande kommt, auch gar nicht pauschal beantworten, sondern hängt vom jeweiligen Genotyp der Tumorzellen und ihrem Vaskularisierungsgrad ab.

4.9 Ausblick

Nachdem für beide Zelllinien ein deutliches Ansprechen auf die Wirkstoffe RAD001 und Sorafenib gezeigt werden konnte, sind in weiterführenden Experimenten die molekularen Ursachen genauer zu spezifizieren.

Für RAD001 stellt sich insbesondere die Frage, worauf die Reduktion des Sphäroidvolumens zurückzuführen ist. Die denkbaren Gründe, also Proliferationsstatus, Apoptose, Nekrose oder verminderte Proteinsynthese wurden in Kapitel 4.5 benannt. Beim Sorafenib wäre das

Hauptaugenmerk auf die Fragestellung zu richten, ob die beobachtete Disaggregation der Sphäroide tatsächlich durch Apoptose begründet ist.

Über den möglicherweise veränderten Proliferationsstatus könnten Zellzyklusmessungen mit größerem Probenvolumen Auskunft geben. Apoptose ließe sich in verschiedenen Stadien nachweisen: durch vermehrte Expression pro-apoptotischer bzw. Apoptose-assoziierter Faktoren wie BCL2, BAX, XIAP, Survivin oder CytochromC, anhand von Spaltprodukten wie etwa von Caspase3 und PARP (alle Western-Blot) oder aufgrund von DNA-Fragmentierung (TUNEL-Test). Zusätzlich wäre der Expression und veränderten Phosphorylierungsrate der *downstream-targets* 4EBP1 und p70S6K sowie der RTKs FLT1, KDR, FLT4, PDGFRB und FGFR mit Hilfe von Western-Blot und/oder immunhistochemischer Analyse nachzugehen. Die Messung der mTOR-Expression und Aktivität könnte Auskunft darüber geben, inwieweit diese mit dem Ansprechen auf RAD001 in Verbindung zu setzen sind.

Für die kombinierte Behandlung sind ebenfalls noch offene Fragen zu klären. Neben weiteren Variationen von Konzentration und Behandlungsdauer wäre auch hier die molekulare Basis eingehender zu beleuchten. Zum Nachweis eines synergistischen Effekts bietet sich insbesondere die Untersuchung von AKT und RTKs (Western-Blot, Immunohistochemie) und Wachstumsfaktorlevels (z.B. VEGF-Elisa) (siehe Abbildung 1-2) an.

Zu guter Letzt wäre die Abhängigkeit der beobachteten Effekte von der Ausgangsgröße der Sphäroide zu prüfen. Außerdem sollten die Ergebnisse durch Experimente an weiteren klarzelligen Nierenzellkarzinomzelllinien und anschließend in Tierexperimenten abgesichert werden.

5 Zusammenfassung

Das Nierenzellkarzinom ist für etwa 3% aller Tumorerkrankungen verantwortlich. Es zeichnet sich durch seine hohe Metastasierungs- und die niedrige 5-Jahres-Überlebensrate von unter 10% bei Vorliegen von Metastasen aus. Aufgrund des Mangels an alternativen Behandlungsoptionen konnte sich eine neue Wirkstoffklasse schnell im klinischen Alltag etablieren. Zu ihnen zählt man unter anderem den mTORC1-Inhibitor RAD001 und den RAF- und RTK-Hemmer Sorafenib. Trotz der Tatsache, dass die Wirkstoffe bereits am Patienten angewendet werden, sind noch offene Fragen insbesondere in Hinblick auf die Auswirkungen kombinierter Behandlung zu klären.

Die Zellkulturexperimente wurden unter Verwendung der klarzelligen NZK-Zelllinien A-498 und 786-O durchgeführt. Diese wurden zunächst anhand immunhistochemischer Untersuchungen als geeignet charakterisiert, da sie die RTKs KDR, FLT1, PDGFRA und PDGFRB exprimieren. Multizelluläre Tumorzellsphäroide bieten sich aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit avaskulären Mikrometastasen als Untersuchungsmodell an. Zunächst wurden zweckmäßige Kultivierungsbedingungen für die verwendeten Zelllinien erprobt und das Verhalten unbehandelter Sphäroide untersucht.

Die Verabreichung von RAD001 führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Sphäroiddurchmesser, ohne die Morphologie der Sphäroide äußerlich zu beeinträchtigen. Der wachstumshemmende Effekt des RAD001 hielt bei einer Konzentration von 500 nM auch nach Verdünnung des Wirkstoffs bis zum Ende des Beobachtungszeitraums (weitere 10 Tage) an. Beide Zelllinien zeigten ein vergleichbares Ansprechen auf RAD001. Eine Sorafenib-Behandlung mit niedrigen Konzentrationen (5 nM-5 µM) führte zur Vergrößerung der Sphäroide, für höhere Konzentration (10 und 20 µM) disaggregierten diese, was sich durch Veränderung der Morphologie ankündigte. Die Zelllinie 786-O war weniger sensitiv gegenüber Sorafenib als die Zelllinie A-498. Die Behandlungen mit RAD001 und Sorafenib reduzierten in beiden Fällen die Viabilität. Für Sorafenib konnte eine verminderte Phosphorylierung von AKT und ERK als Folge der Behandlung gezeigt werden.

Für die Kombinationsbehandlung mit beiden Wirkstoffen wurden verschiedene Konzentrationen und zeitliche Variationen getestet. Sowohl anhand der Sphäroid-wachstumskurven als auch der Viabilität, zeigte sich die gleichzeitige Kombinationsbehandlung den sequentiellen und Einzelbehandlungen in beiden Zelllinien überlegen. Von den sequentiellen Kombinationsbehandlungen bewirkte die Reihenfolge RAD001 + Sorafenib die stärkere Reduktion der Sphäroiddurchmesser in der Zelllinie A-498. Nach diesen erfolgversprechenden Resultaten zur Kombinationsbehandlung von NZK-Sphäroiden mit RAD001 und Sorafenib bedürfen die molekularen Hintergründe weiterer Überprüfung.

6 Referenzen

Bai, X., Ma, D., Liu, A., Shen, X., Wang, Q.J., Liu, Y. and Jiang, Y. (2007). *Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38.* Science **318**(5852): 977-80.

Ballou, L.M. and Lin, R.Z. (2008). *Rapamycin and mTOR kinase inhibitors.* J Chem Biol **1**: 27-36.

Bazigou, E. and Rallis, C (2007). *Cell signaling and cancer.* Genome Biol **8**(7): 310.

Bianco, R., Garofalo, S., Rosa, R., Damiano, V., Gelardi, T., Daniele, G., Marciano, R., Ciardiello, F. and Tortora, G. (2008). *Inhibition of mTOR pathway by everolimus cooperates with EGFR inhibitors in human tumours sensitive and resistant to anti-EGFR drugs.* Br J Cancer **98**(5): 923-30.

Boulay, A., Zumstein-Mecker, S., Stephan, C., Beuvink, I., Zilbermann, F., Haller, R., Tobler, S., Heusser, C., O'Reilly, T., Stolz, B., Marti, A., Thomas, G. and Lane, H.A. (2004). *Antitumor efficacy of intermittent treatment schedules with the rapamycin derivative RAD001 correlates with prolonged inactivation of ribosomal protein S6 kinase 1 in peripheral blood mononuclear cells.* Cancer Res **64**(1): 252-61.

Buchner, A., Riesenberg, R., Kotter, I., Hofstetter, A., Stief, C. and Oberneder, R. (2006). *Frequency and prognostic relevance of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with metastatic renal cell carcinoma.* Cancer **106**(7): 1514-20.

Cao, X.G., Li, X.X., Bao, Y.Z., Xing, N.Z. and Chen, Y. (2007). *Responses of human lens epithelial cells to quercetin and DMSO.* Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(8): 3714-8.

Carlomagno, F., Anaganti, S., Guida, T., Salvatore, G., Troncone, G., Wilhelm, S.M. and Santoro, M. (2006). *BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants.* J Natl Cancer Inst **98**(5): 326-34.

Chang, Y.S., Adnane, J., Trail, P.A., Levy, J., Henderson, A., Xue, D., Bortolon, E., Ichetovkin, M., Chen, C., McNabola, A., Wilkie, D., Carter, C.A., Taylor, I.C., Lynch, M. and Wilhelm, S. (2007). *Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models.* Cancer Chemother Pharmacol **59**(5): 561-74.

Chowdhury, S., Larkin, J.M. and Gore, M.E. (2008). *Recent advances in the treatment of renal cell carcinoma and the role of targeted therapies.* Eur J Cancer **44**(15): 2152-61.

Drucker, B.J. (2005). *Renal cell carcinoma: current status and future prospects.* Cancer Treat Rev **31**(7): 536-45.

EAUGuidelines (2009). Ljungberg, B., Hanbury, D.C., Kuczyk, M.A., Merseburger, A.S., Mulders, P.F.A., Patard, J-J.and Sinescu I.C. *Guidelines on Renal Cell Carcinoma,* European Association of Urology.

Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W.M., Szczylik, C., Oudard, S., Siebels, M., Negrier, S., Chevreau, C., Solska, E., Desai, A.A., Rolland, F., Demkow, T., Hutson, T.E., Gore, M., Freeman, S., Schwartz, B., Shan, M., Simantov, R. and Bukowski, RM (2007). *Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma.* N Engl J Med **356**(2): 125-34.

Escudier, B., Venner, P., Stern, L., Donovan, M., Croteau, D., Champagne, P. and Bukowski, R. (2004). *Prognostic factors in metastatic renal cell carcinoma after failure of immunotherapy: Lessons from a large phase III trial.* Journal of Clinical Oncology **22**(14): 4547.

Faivre, S., Kroemer, G. and Raymond, E. (2006). *Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents.* Nat Rev Drug Discov **5**(8): 671-88.

Friedrich, J., Ebner, R. and Kunz-Schughart, L.A. (2007). *Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge?* Int J Radiat Biol **83**(11-12): 849-71.

Fyfe, G., Fisher, R.I., Rosenberg, S.A., Sznol, M., Parkinson, D.R. and Louie, A.C. (1995). *Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy.* J Clin Oncol **13**(3): 688-96.

Gnarra, J.R., Tory, K., Weng, Y., Schmidt, L., Wei, M.H., Li, H., Latif, F., Liu, S., Chen, F., Duh, F.M. Lubensky, I., Duan, D.R., Florence, C., Pozzatti, R., Walther, M.M., Bander, N.H., Grossman, H.B., Brauch, H., Pomer, S., Brooks, J.D., Isaacs, W.B., Lerman, M.I., Zbar, B. and Lineham, W.M. (1994). *Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma.* Nat Genet **7**(1): 85-90.

Goudar, R.K., Shi, Q., Hjelmeland, M.D., Keir, S.T., McLendon, R.E., Wikstrand, C.J., Reese, E.D., Conrad, C.A., Traxler, P., Lane, H.A., Reardon, D.A., Cavenee, W.K., Wang, X.F., Bigner, D.D., Friedman, H.S. and Rich, J.N. (2005). *Combination therapy of inhibitors of epidermal growth factor receptor/vascular endothelial growth factor receptor 2 (AEE788) and the mammalian target of rapamycin (RAD001) offers improved glioblastoma tumor growth inhibition.* Mol Cancer Ther **4**(1): 101-12.

Hay, N. (2005). *The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer.* Cancer Cell **8**(3): 179-83.

Hemmerlein, B., Galuschka, L., Putzer, N., Zischkau, S. and Heuser, M. (2004). *Comparative analysis of COX-2, vascular endothelial growth factor and microvessel density in human renal cell carcinomas.* Histopathology **45**(6): 603-11.

Huang, S., Bjornsti, M.A. and Houghton, P.J. (2003). *Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance.* Cancer Biol Ther **2**(3): 222-32.

Hutson, T.E. (2007). *Targeted therapy for renal cell carcinoma: a new treatment paradigm.* Proc (Bayl Univ Med Cent) **20**(3): 244-8.

Huynh, H., Ngo, V.C., Koong, H.N., Poon, D., Choo, S.P., Thng, C.H., Chow, P., Ong, H.S., Chung, A. and Soo, K.C. (2009). *Sorafenib and Rapamycin Induce Growth Suppression in Mouse Models of Hepatocellular Carcinoma.* J Cell Mol Med.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C. and Thun, M.J. (2006). *Cancer statistics, 2006.* CA Cancer J Clin **56**(2): 106-30.

Jin, Q. and Esteva, F.J. (2008). *Cross-talk between the ErbB/HER family and the type I insulin-like growth factor receptor signaling pathway in breast cancer.* J Mammary Gland Biol Neoplasia **13**(4): 485-98.

Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H, Tempst, P and Sabatini, DM (2002). *mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery.* Cell **110**(2): 163-75.

Kolch, W., Kotwaliwale, A., Vass, K. and Janosch, P. (2002). *The role of Raf kinases in malignant transformation.* Expert Rev Mol Med **4**(8): 1-18.

Krebsregister (2008). Krebs in Deutschland 2003–2004 Häufigkeiten und Trends. *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes.* Berlin, Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.

Kunz-Schughart, L.A., Freyer, J.P., Hofstaedter, F. and Ebner, R. (2004). *The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model.* J Biomol Screen **9**(4): 273-85.

Lane, H.A., Wood, J.M., McSheehy, P.M., Allegrini, P.R., Boulay, A., Brueggen, J., Littlewood-Evans, A., Maira, S.M., Martiny-Baron, G., Schnell, C.R., Sini, P. and O'Reilly, T. (2009). *mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) has antiangiogenic/vascular properties distinct from a VEGFR tyrosine kinase inhibitor.* Clin Cancer Res **15**(5): 1612-22.

Le Tourneau, C., Faivre, S., Serova, M. and Raymond, E.(2008). *mTORC1 inhibitors: is temsirolimus in renal cancer telling us how they really work?* Br J Cancer **99**(8): 1197-203.

Leone, M., Crowell, K.J., Chen, J., Jung, D., Chiang, G.G., Sareth, S., Abraham, R.T. and Pellecchia, M. (2006). *The FRB domain of mTOR: NMR solution structure and inhibitor design.* Biochemistry **45**(34): 10294-302.

Lierman, E, Folens, C, Stover, EH, Mentens, N, Van Miegroet, H, Scheers, W, Boogaerts, M, Vandenberghe, P, Marynen, P and Cools, J (2006). *Sorafenib is a potent inhibitor of FIP1L1-PDGFRalpha and the imatinib-resistant FIP1L1-PDGFRalpha T674I mutant.* Blood **108**(4): 1374-6.

Lieubeau-Teillet, B., Rak, J., Jothy, S., Iliopoulos, O., Kaelin, W. and Kerbel, R.S. (1998). *von Hippel-Lindau gene-mediated growth suppression and induction of differentiation in renal cell carcinoma cells grown as multicellular tumor spheroids*. Cancer Res **58**(21): 4957-62.

Liu, L., Cao, Y., Chen, C., Zhang, X., McNabola, A., Wilkie, D., Wilhelm, S., Lynch, M. and Carter, C. (2006). *Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5.* Cancer Res **66**(24): 11851-8.

Mabuchi, S., Altomare, D.A., Cheung, M., Zhang, L., Poulikakos, P.I., Hensley, H.H., Schilder, R.J., Ozols, R.F. and Testa, J.R. (2007). *RAD001 inhibits human ovarian cancer cell proliferation, enhances cisplatin-induced apoptosis, and prolongs survival in an ovarian cancer model.* Clin Cancer Res **13**(14): 4261-70.

Marshall, F.F., Stewart, A.K. and Menck, H.R. (1997). *The National Cancer Data Base: report on kidney cancers. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society.* Cancer **80**(11): 2167-74.

Mellor, H.R., Ferguson, D.J. and Callaghan, R. (2005). *A model of quiescent tumour microregions for evaluating multicellular resistance to chemotherapeutic drugs.* Br J Cancer **93**(3): 302-9.

Motzer, R.J., Escudier, B., Oudard, S., Hutson, T.E., Porta, C., Bracarda, S., Grunwald, V., Thompson, J.A., Figlin, R.A., Hollaender, N., Urbanowitz, G., Berg, W.J., Kay, A., Lebwohl, D. and Ravaud, A. (2008a). *Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial.* Lancet **372**(9637): 449-56.

Motzer, R.J., Michaelson, M.D., Redman, B.G., Hudes, G.R., Wilding, G., Figlin, R.A., Ginsberg, M.S., Kim, S.T., Baum, C.M., DePrimo, S.E., Li, J.Z., Bello, C.L., Theuer, C.P., George, D.J. and Rini, B.I. (2006a). *Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma.* J Clin Oncol **24**(1): 16-24.

Motzer, R.J., Rini, B.I., Bukowski, R.M., Curti, B.D., George, D.J., Hudes, G.R., Redman, B.G., Margolin, K.A., Merchan, J.R., Wilding, G., Ginsberg, M.S., Bacik, J., Kim, S.T., Baum, C.M. and Michaelson, M.D. (2006b). *Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma.* Jama **295**(21): 2516-24.

Motzer, R.J., Oudard, S..; Porta, C., Hutson, T.E.; Bracarda, S. (2008b). *RAD001 vs placebo in patients with metastatic renal cell carcinoma (RCC) after progression on VEGFr-TKI therapy: Results from a randomized, double-blind, multicenter Phase-III study.* J Clin Oncol **26**.

Mueller-Klieser, W. (2000) *Tumor biology and experimental therapetics,* Crit Rev Oncol Hematol. **36**(2-3):123-39.

Napolitano, A.P., Dean, D.M., Man, A.J., Youssef, J., Ho, D.N., Rago, A.P., Lech, M.P. and Morgan, J.R. (2007). *Scaffold-free three-dimensional cell culture utilizing micromolded nonadhesive hydrogels.* Biotechniques **43**(4): 494, 496-500.

Nederman, T. (1984). *Effects of vinblastine and 5-fluorouracil on human glioma and thyroid cancer cell monolayers and spheroids.* Cancer Res **44**(1): 254-8.

O'Neill, E., Rushworth, L., Baccarini, M. and Kolch, W. (2004). *Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1.* Science **306**(5705): 2267-70.

Oka, H., Chatani, Y., Hoshino, R., Ogawa, O., Kakehi, Y., Terachi, T., Okada, Y., Kawaichi, M., Kohno, M. and Yoshida, O. (1995). *Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma.* Cancer Res **55**(18): 4182-7.

Olive, P.L. and Durand, R.E. (1994). *Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics.* Cancer Metastasis Rev **13**(2): 121-38.

Panka, D.J., Wang, W., Atkins, M.B. and Mier, J.W. (2006). *The Raf inhibitor BAY 43-9006 (Sorafenib) induces caspase-independent apoptosis in melanoma cells.* Cancer Res **66**(3): 1611-9.

Patel, P.H., Chadalavada, R.S., Chaganti, R.S. and Motzer, R.J. (2006). *Targeting von Hippel-Lindau pathway in renal cell carcinoma.* Clin Cancer Res **12**(24): 7215-20.

Rahmani, M., Davis, E.M., Bauer, C., Dent, P. and Grant, S. (2005). *Apoptosis induced by the kinase inhibitor BAY 43-9006 in human leukemia cells involves down-regulation of Mcl-1 through inhibition of translation.* J Biol Chem **280**(42): 35217-27.

Raymond, E., Alexandre, J., Faivre, S., Vera, K., Materman, E., Boni, J., Leister, C., Korth-Bradley, J., Hanauske, A. and Armand, J.P. (2004). *Safety and pharmacokinetics of escalated doses of weekly intravenous infusion of CCI-779, a novel mTOR inhibitor, in patients with cancer.* J Clin Oncol **22**(12): 2336-47.

Razin, S., Yogev, D. and Naot, Y. (1998). *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.* Microbiol Mol Biol Rev **62**(4): 1094-156.

Robb, V.A., Karbowniczek, M., Klein-Szanto, A.J. and Henske, E.P. (2007). *Activation of the mTOR signaling pathway in renal clear cell carcinoma.* J Urol **177**(1): 346-52.

Saxena, N., Lahiri, S.S., Hambarde, S. and Tripathi, R.P. (2008). *RAS: target for cancer therapy.* Cancer Invest **26**(9): 948-55.

Shimazui, T., Schalken, J.A., Kawai, K., Kawamoto, R., van Bockhoven, A., Oosterwijk, E. and Akaza, H. (2004). *Role of complex cadherins in cell-cell adhesion evaluated by spheroid formation in renal cell carcinoma cell lines.* Oncol Rep **11**(2): 357-60.

Stickle, N.H., Chung, J., Klco, J.M., Hill, R.P., Kaelin, W.G., Jr. and Ohh, M. (2004). *pVHL modification by NEDD8 is required for fibronectin matrix assembly and suppression of tumor development.* Mol Cell Biol **24**(8): 3251-61.

Sutherland, R.M., McCredie, J.A. and Inch, W.R. (1971). *Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas.* J Natl Cancer Inst **46**(1): 113-20.

Treeck, O., Wackwitz, B., Haus, U. and Ortmann, O. (2006). *Effects of a combined treatment with mTOR inhibitor RAD001 and tamoxifen in vitro on growth and apoptosis of human cancer cells.* Gynecologic Oncology **102**(2): 292-299.

van Spronsen, D.J., Mulders, P.F. and De Mulder, P.H. (2005). *Novel treatments for metastatic renal cell carcinoma.* Crit Rev Oncol Hematol **55**(3): 177-91.

Vira, M.A., Novakovic, K.R., Pinto, P.A. and Linehan, W.M. (2007). *Genetic basis of kidney cancer: a model for developing molecular-targeted therapies.* BJU Int **99**(5 Pt B): 1223-9.

Wagener, C. (1999). *Molekulare Onkologie*. 2. Auflage, Hamburg, Thieme Verlag, ISBN-10: 3131035129.

Wan, P.T., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D. and Marais, R. (2004). *Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF.* Cell **116**(6): 855-67.

Wang, X., Yue, P., Kim, Y.A., Fu, H., Khuri, F.R. and Sun, S.Y. (2008a). *Enhancing mammalian target of rapamycin (mTOR)-targeted cancer therapy by preventing mTOR/raptor inhibition-initiated, mTOR/rictor-independent Akt activation.* Cancer Res **68**(18): 7409-18.

Wang, Z., Zhou, J., Fan, J., Qiu, S.J., Yu, Y., Huang, X.W. and Tang, Z.Y. (2008b). *Effect of rapamycin alone and in combination with sorafenib in an orthotopic model of human hepatocellular carcinoma.* Clin Cancer Res **14**(16): 5124-30.

Weaver, V.M., Lelievre, S., Lakins, J.N., Chrenek, M.A., Jones, J.C., Giancotti, F., Werb, Z. and Bissell, M.J. (2002). *beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium.* Cancer Cell **2**(3): 205-16.

Wilhelm, S., Carter, C., Lynch, M., Lowinger, T., Dumas, J., Smith, R.A., Schwartz, B., Simantov, R. and Kelley, S. (2006). *Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer.* Nat Rev Drug Discov **5**(10): 835-44.

Wilhelm, S.M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., Chen, C., Zhang, X., Vincent, P., McHugh, M., Cao, Y., Shujath, J., Gawlak, S., Eveleigh, D., Rowley, B., Liu, L., Adnane, L., Lynch, M., Auclair, D., Taylor, I., Gedrich, R., Voznesensky, A., Riedl, B., Post, L.E., Bollag, G. and Trail, P.A. (2004). *BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis.* Cancer Res **64**(19): 7099-109.

Wirth, M.P. (1993). *Immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma.* Urol Clin North Am **20**(2): 283-95.

www.clinicaltroals.gov, *website of the* U.S. National Institutes of Health

www.spherogenex.de, *website of the* Department of Vascular Biology & Angiogenesis Research Tumor Biology Center Freiburg i.Breisgau, Germany

Yang, J.C., Haworth, L., Sherry, R.M., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Steinberg, S.M., Chen, H.X. and Rosenberg, S.A. (2003). *A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer.* N Engl J Med **349**(5): 427-34.

Yu, C., Friday, B.B., Lai, J.P., Yang, L., Sarkaria, J., Kay, N.E., Carter, C.A., Roberts, L.R., Kaufmann, S.H. and Adjei, A.A. (2006). *Cytotoxic synergy between the multikinase inhibitor sorafenib and the proteasome inhibitor bortezomib in vitro: induction of apoptosis through Akt and c-Jun NH2-terminal kinase pathways.* Mol Cancer Ther **5**(9): 2378-87.

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz van Pée für die Genehmigung meines spannenden Diplomthemas bedanken. Herrn Prof. Dr. Manfred P. Wirth danke ich für die Möglichkeit meine Diplomarbeit im Forschungslabor der Klinik für Urologie im Universitätsklinikum Carl Gustav Carus anfertigen zu können.

Herrn Dr. Schwenzer danke ich für die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Von ganzem Herzen möchte ich mich beim Team des Urologischen Labors des Uniklinikums Dresden bedanken! Egal ob es die tatkräftige praktische Unterstützung von Jana Herrmann und Ulrike Lotzkat, von Arthur Taylor, der es fertig brachte, sogar beim Einstöpseln eines Netzsteckers kommentarlos zu helfen, die Stunden der fachlichen Diskussion mit Herrn Dr. Kai Krämer und Frau Dr. Susanne Füssel, die ein bewundernswertes Maß an Geduld mit mir aufbrachten oder die vielen anderen Hilfestellungen waren, ohne euch alle wäre ich vermutlich oder sogar ganz sicher nicht weit gekommen!
Nicht zuletzt für die herzliche Aufnahme und die Tatsache, dass ich beinahe jeden Tag wieder gerne hingegangen bin, bin ich euch zu Dank verpflichtet!

Danken möchte ich auch meinen Freunden - sowohl denjenigen „Leidensgenossinnen und –genossen“, die mir zahllose Praktika versüßt und all’ die Höhen und Tiefen miterlebt haben, die so ein Studium mit sich bringt. (Maria – ohne Dich hätte ich wohl schon die Einschreibung zum allerersten Praktikum versäumt ;-) !) als auch jenen, die mir immer wieder gezeigt haben, dass es auch noch andere Dinge im Leben gibt!

Besonderer Dank gilt meiner Familie: meinen Eltern, die mir stets den Rücken freigehalten und mich sowohl finanziell als auch moralisch enorm unterstützt haben und meiner Schwester die mich so manches Mal vor dem Verzweifeln bewahrt hat.

Ein Dank geht ferner an den Bayer-Konzern für die Bereitstellung des Sorafenib und an den Novartis-Konzern für das RAD001.

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe. Andere als die angegebenen Hilfsmittel wurden von mir nicht benutzt. Alle angeführten Zitate wurden kenntlich gemacht.

Dresden, den 14. April 2009

Claudia Mattissek