

Bianca Maria Ehbauer, geb. Winter  
Dr. med.

**Untersuchung neuer Chemotherapeutika im Hinblick auf ihre antiproliferativen, apoptoseinduzierenden und antisekretorischen Wirkungen beim medullären Schilddrüsenkarzinom und beim Walker Carcinosarcoma 256**

Geboren am 19.04.1972 in Ichenhausen  
Reifeprüfung am 15.05.1992 in Bruchsal  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1993 bis SS 2000  
Physikum am 30.03.1995 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Karlsbad- Langensteinbach  
Staatsexamen am 03.11.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Ziegler

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Austestung neuer Medikamente im Hinblick auf eine antiproliferative und antisekretorische Wirkung bei endokrin aktiven, malignen Tumoren. Hierzu wurden 2 Krankheitskomplexe, nämlich das medulläre Schilddrüsenkarzinom und die Tumorhypercalciämie untersucht. Das medulläre Schilddrüsenkarzinom zeigt klinisch eine spezifische Calcitoninsekretion, die Tumorhypercalciämie ist häufig durch eine Sekretion von Parathormon-related Protein (PTHrP) durch den zugrundeliegenden Tumor (z.B. beim Mammacarcinom) verursacht. Ziel der hier durchgeführten in-vitro Untersuchung war es, die Hormonsekretion bei diesen Krankheitsbildern besser zu verstehen und klinische Therapiealternativen zu finden. Hierzu wurden zwei neuentwickelte Substanzen, zum einen die Galliumverbindung KP46 und zum anderen das Somatostatinanalogon TT-232 untersucht.

Das medulläre Schilddrüsenkarzinom, das sich von den parafollikulären Zellen der Schilddrüse ableitet, kommt mit einer Häufigkeit von 4-10% aller Schilddrüsenmalignome vor. Calcitonin, welches von den parafollikulären C-Zellen sezerniert wird, stellt einen hochspezifischen und hochsensitiven Tumormarker dar. Das medulläre Schilddrüsenkarzinom zeigt in der Regel ein langsames Wachstum, metastasiert jedoch sehr früh lymphogen. Eine Heilung kann nur durch eine frühzeitige operative Entfernung aller Tumorzellen erfolgen. Die Ansprechrate auf eine Chemotherapie oder Bestrahlung ist äußerst gering, so daß selbst der palliative Einsatz von Zytostatika sehr zurückhaltend angewendet werden sollte. Vor dem Hintergrund dieser mangelhaften medikamentösen Therapieoptionen untersuchte ich die Wirkung des Somatostatinanalogons TT-232, das 1993 von Dr. Keri von der Semmelweis Universität in Ungarn synthetisiert wurde, auf seine antiproliferativen und antisekretorischen Eigenschaften in Zellen des medullären Schilddrüsenkarzinoms. Im Gegensatz zu anderen Somatostatinanaloga führt TT-

232 nicht zu einer Hemmung der Wachstumshormonfreisetzung, besitzt aber eine potente antiproliferative und Tyrosinkinase hemmende Wirkung. Auch in vivo Versuche zeigten die Wirksamkeit dieser Substanz bei gleichzeitig geringer Toxizität. Es konnte gezeigt werden, daß TT-232 selbst in sehr hoher Dosierung (20 mg/kg Körpergewicht) im Tierversuch keine nennenswerten toxischen Wirkungen entfaltet.

In dieser Studie verwendete ich 2 medulläre Schilddrüsenkarzinomzelllinien. Mit Hilfe des MTT-Assays erfaßte ich das Ausmaß der Zytotoxizität von TT-232 auf die adhärent wachsenden h-MTC-Zellen. Um zu untersuchen, inwiefern der zytotoxische Effekt von TT-232 auf eine apoptoseinduzierende Wirkung zurückzuführen ist, wurde die Nicoletti-Methode, der Annexin-V-Fluos-Staining Kit und die CD95-Rezeptorfärbung durchgeführt und im Durchflußzytometer ausgewertet. Im MTT-Assay zeigte TT-232 in den Konzentrationen 50 und 100µg/ml eine signifikante Abnahme des Anteils lebender Zellen bereits nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Nach einer Einwirkzeit von 48 Stunden entfaltete TT-232 in der Konzentration von 100µg/ml eine noch stärkere Wirkung. Sowohl durch die Nicoletti-Methode als auch durch den Annexin-Assay konnte gezeigt werden, daß durch die Behandlung mit TT-232 bei h-MTC-Zellen Apoptose ausgelöst werden kann und zwar deutlich stärker als durch Octreotid. Um den Mechanismus des apoptoseinduzierenden Effekts näher zu untersuchen, wurde die CD95-Färbung durchgeführt. Dabei zeigt sich jedoch kein Anstieg der Expression des CD95-Rezeptors unter der Behandlung mit TT-232.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen die potente zytotoxische und apoptoseinduzierende Wirkung von TT-232 auf Zellen des medullären Schilddrüsenkarzinoms, die deutlich stärker ausgeprägt ist als diejenige des klinisch routinemässig eingesetzten Octreotid. Dies lässt darauf schließen, daß TT-232 eine gute Therapiealternative bei der Behandlung des fortgeschrittenen medullären Schilddrüsenkarzinoms ist, insbesondere bei nachgewiesener geringer Toxizität im Tiermodell.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass KP46 im Vergleich zu Galliumnitrat ein potentes antiproliferatives Therapeutikum darstellt. Seine potente, CD95-Rezeptor vermittelte Apoptoseinduktion macht es für einen klinischen Einsatz interessant.

KP46 ist ein lipophiler organisch-metallischer Galliumkomplex, der für die Tumorthherapie entwickelt wurde. Es handelt sich hierbei um Tris (8-Quinolinolato) Gallium (C<sub>27</sub> H<sub>18</sub> N<sub>3</sub> O<sub>3</sub> Ga). Es wurde die zytotoxische und apoptoseinduzierende Wirkung von KP46 auf Zellen des medullären Schilddrüsenkarzinoms und auf ein Modell der Tumorphypercalciämie, dem Walker Carcinosarkom (WCS-256), untersucht und mit derjenigen von Galliumnitrat verglichen. Dies geschah mit dem Ziel zu erkennen, inwieweit die Wirkstärke des Metallions Gallium von der Struktur der Galliumverbindung abhängig ist. Im MTT-Assay zeigte KP46 eine signifikante, dosisabhängige Abnahme des Anteils lebender h-MTC-Zellen, sowohl nach einer Inkubationszeit von 24 als auch von 48 Stunden. KP46 zeigte darüberhinaus eine potente apoptoseinduzierende Wirkung auf h-MTC-Zellen im Nicolettiversuch und im Annexin-V-Fluos-Staining Kit im Gegensatz zu Galliumnitrat. Durch die CD95-

Rezeptorfärbung konnte gezeigt werden, daß KP46 die Expression des CD95-Rezeptors bei h-MTC-Zellen verstärkt, also einen ähnlichen Wirkmechanismus wie viele Chemotherapeutika besitzt. Die Bindung des spezifischen Liganden an den CD95-Rezeptor löst in der Zielzelle Apoptose aus. Dies erfolgt sowohl als autokriner Suizid als auch fratrizid. Es wurde auch der Einfluß der Testsubstanzen KP46 und Galliumnitrat auf WCS-256-Zellen untersucht. Unter der Behandlung mit KP46 stieg der Anteil apoptotischer Zellen in der Nicolettifärbung signifikant an, durch Galliumnitrat konnte dieser Effekt hingegen nicht erreicht werden. Weder TT-232 noch KP46 zeigten eine hemmende Wirkung auf die Calcitoninsekretion von Zellen des medullären Schilddrüsenkarzinoms (TT-Zellen) in vitro. Die Messungen mittels des Radioimmunoassays ergaben auch keine signifikante Abnahme der PTHrP-Produktion und -Sekretion der WCS-256-Zellen durch KP46.