

Aus der
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
Direktor Professor Dr. med. Dr. hc. Walter Jonat
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

***In vitro* Untersuchungen von
Therapiekombinationen mit Chemotherapeutika und dem
Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib am Mammakarzinom**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

LINDA DAHMKE

aus Bad Segeberg

Kiel 2011



Referent: Prof. Dr. Mundhenke, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe

Korreferent: Priv. – Doz. Dr. Hoffmann, Klinik für Hals-, Nasen- und
Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie

1. Berichterstatter: PD Dr. med. I. Heer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Strauss

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.12

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 18.10.12

Gez.

Inhaltsverzeichnis

	Seiten
1. Einleitung	6
1.1 Imatinib Mesylat	6
1.2 Nilotinib	9
1.3 Tyrosinkinaserzeptoren	10
1.3.1 PDGFR	11
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	12
2. Material und Methoden	14
2.1 Zellkultur	15
2.1.1 Material	15
2.1.2 Geräte	15
2.1.3 Ansetzen von Imatinib Mesylat	16
2.1.4 MTT Auswertung	16
2.1.4.1 Zellproliferation unter Kombinationsinkubation von Imatinib und Doxorubicin	16
2.1.4.2 Zellproliferation unter Kombinationsinkubation von Imatinib und Paclitaxel	18
2.1.4.3 Zellproliferation unter Inkubation mit Nilotinib	19
2.1.4.4 Zellproliferation unter Kombinationsinkubation von Nilotinib und Doxorubicin	19
2.1.4.5 Zellproliferation unter Kombinationsinkubation von Nilotinib und Paclitaxel	20
2.1.5 Zellzählung-Auswertung	20
2.1.5.1 Zellproliferationsversuche zu synergistischem/additivem Effekt	21
2.2 TUNEL-Assay	23
2.2.1 Material	23
2.2.2 Methode	24

2.3 Migrations-Assay	26
2.3.1 Material	26
2.3.2 Methode	27
3. Ergebnisse	30
3.1 Zellproliferation	30
3.1.1 Ergebnisse des MTT-Assay für Imatinib	30
3.1.2 Ergebnisse des MTT-Assay für Nilotinib	35
3.1.3 Ergebnisse der Zellzählung	38
3.2 TUNEL-Assay	45
3.2.1 TUNEL-Assay mit Imatinib	45
3.2.2 TUNEL-Assay mit Nilotinib	47
3.3 Migrations Assay	49
3.3.1 Migrations-Assay mit Ligand	52
4. Diskussion	56
5. Zusammenfassung	67
Danksagung	69
Lebenslauf	70
6. Anhang	72
Veröffentlichung	74
Literaturverzeichnis	88

1. Einleitung

Nach den Erkrankungen des Herzkreislaufsystems sind maligne Tumorerkrankungen derzeit die häufigste Todesursache in Deutschland. Mit einem Anteil von 29% ist Brustkrebs die häufigste Krebsform, die bei Frauen in der Bundesrepublik Deutschland diagnostiziert wird. Es werden rund 58.000 Erstdiagnosen jedes Jahr in Deutschland gestellt (Stand 2006), das bedeutet, dass jede zehnte bis zwölfte Frau im Laufe ihres Lebens an bösartigem Brustkrebs erkrankt. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt mit 64 Jahren deutlich niedriger als bei den meisten anderen Krebserkrankungen. In der westlichen Welt stellt das Mammakarzinom in der Altersgruppe der 35- bis 55-jährigen Frauen die häufigste Todesursache dar (Manfred Stauber 2007; Robert-Koch-Institut 2010).

In den letzten 20 Jahren haben sich die Überlebensraten von Mammakarzinompatientinnen kontinuierlich verbessert. 69% betrug die 5-Jahres-Überlebensrate des Jahres 1980 - bei Frauen die Anfang dieses Jahrzehnts diagnostiziert wurden, konnte ein Anstieg der Rate auf 81% festgestellt werden. Die 5- bzw. 10-Jahres-Prävalenzen nahmen zwischen 1990 und 2004 um etwa 40% zu. Ein besonders signifikanter Anstieg dieser Prävalenz ist bei der Altersgruppe zwischen 50 bis 69 Jahren zu erkennen. Für das Jahr 2010 ergibt sich bei unveränderter Inzidenz und Überlebensrate eine 5-Jahres-Prävalenz von 249.600 Frauen (Krebsprävalenz RKI 2010).

Erst nach 20 bis 40 Jahren kann eine endgültige Heilung nach der Erstdiagnose festgestellt werden und wird in 50 % der Fälle erreicht (Manfred Stauber 2007).

Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass durch verbesserte Technik eine Früherkennung im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen möglich gemacht wird und Tumore schon im Anfangsstadium erkannt werden können.

1.2 Imatinib Mesylat

Seitdem herausgefunden wurde, dass die Aktivität der Bcr-Abl Tyrosinkinase eine zentrale Rolle bei der malignen Entartung von Zellen spielt, wurde mit der Suche nach spezifischen Inhibitoren begonnen. Ausgehend von der Ähnlichkeit der katalytischen Domänen mehrerer Tyrosinkinasen, sollte eine neue Verbindung gefunden werden (Deininger 2004).

In den späten 1980er-Jahren begann eine Gruppe unter der Leitung von Nick Lydon und Alois Matter (Schweiz) mit der Suche nach einer neuen Verbindung, die eine inhibitorische Aktivität gegenüber Tyrosinkinasen zeigte. Eine Verbindung der Phenyaminopyrimidin

Klasse, die ursprünglich als Protein Kinase C Inhibitor entwickelt wurde, zeigte eine schwache Aktivität gegen die platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) Kinase und wurde für die weitere Entwicklung ausgewählt (Buchdunger et al. 1995).

Spätere Modifikationen des Moleküls setzten die Serin-/Threoninkinaseinhibition außer Kraft, wohingegen die Aktivität gegen Tyrosinkinase leicht erhöht wurde. Zusätzlich wurden die Wasserlöslichkeit und die Aktivität gegen intrazelluläre Ziele verbessert. Das Ergebnis war eine Verbindung mit dem Namen CGP57148, dann STI571 und schließlich Imatinib oder (Glivec®) (Deiniger 2004).

Imatinib besitzt die Fähigkeit die Tyrosinkinaserzeptoren zu denen Abl, Bcr-Abl, c-kit und der PDGF-Rezeptor gehören, zu hemmen, indem kompetitiv und selektiv die ATP-Bindungsstelle des Rezeptors blockiert wird. Dadurch ist eine Übertragung eines Phosphatrestes auf das Substrat nicht möglich. Auch die Rezeptoren gesunder Zellen werden durch Imatinib gehemmt. Diese besitzen jedoch alternative Signalwege und werden dadurch nur wenig in ihrer Funktion eingeschränkt. Krebszellen sind jedoch auf den Signalweg über die Tyrosinkinasen angewiesen und werden durch die Inhibition stark in ihrer Proliferationsfähigkeit eingeschränkt (Druker et al. 1996; Buchdunger et al. 2000; Joensuu and Dimitrijevic 2001; Sjoblom et al. 2001).

Kürzlich wurde darüber berichtet, dass als weiteres Ziel für Imatinib der Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktor (M-CSF) Rezeptor identifiziert werden konnte (Hiraga and Nakamura 2009).

Die Wirkung von Imatinib wird sich bei der Therapie der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) zu Nutze gemacht. Bei ungefähr 90% der Patienten mit CML kann das Philadelphia Chromosom nachgewiesen werden, das aus einer Translokation des Chromosoms 9 und dem Chromosom 22 entsteht. Das Genprodukt dieser Mutation ist das Fusionsprotein BCR-ABL, das aus der natürlichen Tyrosinkinase ABL des Chromosom 9 und dem BCR-Gen des Chromosom 22 entstanden ist. Die veränderte Tyrosinkinase hat im Vergleich zur natürlichen Tyrosinkinase eine erhöhte Aktivität und ist für die unkontrollierte Vermehrung der Leukozyten im Falle der CML verantwortlich.

Eine Imatinib-Therapie kann die Aktivität der mutierten BCR-ABL Tyrosinkinase hemmen und unterdrückt somit die gesteigerte Proliferation der Blutzellen. Bei über 95% der Patienten kann mit dieser Therapie eine komplette hämatologische Remission erreicht werden (O'Brien et al. 2003; Deininger 2004).

Darüber hinaus wird Imatinib auch zur Therapie anderer maligner Tumorerkrankungen eingesetzt, da es die Fähigkeit besitzt unter anderem den c-kit Rezeptor zu hemmen. Dieser Rezeptor ist maßgeblich an der Entstehung des Gastrointestinalen Stromatumors beteiligt, was eine Therapie mit Imatinib hier ermöglicht (Krystal et al. 2000; Sjoblom et al. 2001; Demetri 2002). Zelllinien verschiedener solider Tumore mit c-kit und/oder PDGFR-Expression wurden zuvor auf ihre Imatinib-Sensitivität hin überprüft. Die Zellproliferation der c-kit exprimierenden Zellen des Kolonkarzinoms und des kleinzelligen Bronchialkarzinoms konnten *in vitro* und *in vivo* durch Imatinib gehemmt werden (Attoub et al. 2002). Inhibitorisches Potential wurde auch bei der Behandlung von Neuroblastomen mit Imatinib gesehen, hier beruhte die Imatinib Wirkung sowohl auf einem zytotoxischen Effekt als auch auf einer Apoptoseinduktion, die durch Imatinib-bedingte Inhibition der PDGFR- β -Phosphorylierung erfolgte (Beppu et al. 2004).

Bei Osteosarkomzellen weist Imatinib nicht nur die Inhibition der PDGFR β auf, sondern es lassen sich auch die Hemmung der PDGFR α und der intrazellulären Signaltransduktionalenzyme AKT sowie mitogen-activated protein (MAP) Kinase feststellen (McGary et al. 2002).

Außerdem wurde ein Imatinib vermittelter Effekt bei Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen, der auf die Inaktivierung der Tyrosinkinase PDGFR α und Akt zurückzuführen ist (Matei et al. 2004). Im Jahr 2008 konnte die Forschungsgruppe um Prof. Dr. C. Mundhenke ebenfalls an Ovarialkarzinomzellen nachweisen, dass Imatinib in der Lage ist, das Zellwachstum zu reduzieren und sich positiv auf die Apoptoserate der Zellen auswirkt. Hier wurden unter anderem Kombinationsversuche mit Imatinib plus Carboplatin oder Imatinib plus Paclitaxel unternommen, die einen synergistischen Effekt zeigten (Mundhenke et al. 2008).

Ein Imatinibeffekt durch Hemmung des c-kit Rezeptors und der PDGF Rezeptor Familie wurde auch bei Mammakarzinomzellen nachgewiesen (Weigel et al. 2009).

Da die Entstehung von Mammakarzinomen ein multifaktorielles Geschehen ist, scheint eine Kombination von Chemotherapeutika eine viel versprechende Option bei der Therapie von malignen Mammakarzinomen zu sein. Dabei sollten Standardzytostatika mit den neuen zielgerichteten Tyrosinkinaseinhibitoren kombiniert werden, um so eine eventuelle Dosisreduktion des Zytostatikums zu erreichen. Denn die Hemmung der Tyrosinkinase-rezeptoren wird dadurch ausgelöst, dass Imatinib kompetitiv die intrazelluläre ATP-

Bindungsstelle der Kinasen blockiert und somit die für die Signalübertragung wichtige Aktivierung der jeweiligen Rezeptoren nicht stattfinden kann (Druker et al. 1996). Dadurch wird die Zelldifferenzierung, das Zellwachstum sowie Mitoserate und die Angiogenese blockiert (Heldin et al. 1998; Heldin and Westermark 1999). Eine verminderte Dosis des Standardchemotherapeutikums scheint daher durch Gabe eines Tyrosinkinaseinhibitors möglich und würde eine geringere Toxizität der üblichen Chemotherapie für die Patienten bedeuten.

Als Kombinationsmedikamente wurden die evidenzbasierten Medikamente Doxorubicin und Paclitaxel als mögliche Partner für Imatinib ausgewählt, die im klinischen Alltag eine wichtige Rolle in der zytostatischen Therapie des Mammakarzinoms spielen.

1.2 Nilotinib

Wie oben beschrieben, wird Imatinib erfolgreich bei der Therapie der CML eingesetzt, doch nicht alle Patienten sprechen auf diese Therapie an. Aus diesem Grund wurden weitere Tyrosinkinaseinhibitoren entwickelt. Zu diesen gehören Dasatinib (BMS-354825) spezifisch für ABL nicht-Rezeptor zytoplasmatische Kinase, Nilotinib (AMN 107) und INNO-406 (NS-187) spezifisch für c-Kit Kinase sowie Gefitinib, Erlotinib und Sunitinib, die spezifisch für VEGF-Rezeptor-Kinasen sind (Pytel et al. 2009).

Nilotinib ist nicht nur gegen die c-Kit Kinase wirksam, sondern besitzt auch die Fähigkeit 32 der 33 bekannten Mutationen zu hemmen. Dieser neue Tyrosinkinaseinhibitor wurde für die Behandlung von Philadelphia Chromosom-positiven Patienten in der chronischen Phase und Akzelerationsphase der CML, die Resistenz oder Intoleranz gegen eine primäre Imatinib Therapie zeigten, erstmals 2007 in der Schweiz zugelassen. Nilotinib ist ein oral bioverfügbarer Tyrosinkinaseinhibitor, der *in vitro* eine höhere Effektivität gegen CML Zellen aufweist als Imatinib. Der Wirkmechanismus von Nilotinib entspricht weitestgehend dem von Imatinib: Durch eine kompetitive Blockade der ATP-Bindungsstelle an dem BCR-ABL Tyrosinkinase-Rezeptor kann die Phosphorylierung nicht stattfinden. Folglich wird der intrazelluläre Signalweg blockiert (Kantarjian et al. 2006).

Für Nilotinib konnten mehrere Zielkinasen festgestellt werden, bei denen Nilotinib einen unterschiedlich starken inhibitorischen Effekt zeigte. Eine Rangfolge der Kinasen ergab sich wie folgt mit der höchsten Inhibitionsstärke Nilotinibs beginnend DDR-1 > DDR-2 > BCR-Abl > PDGFR α/β > KIT > CSF-1R (Manley et al. 2010)

Nilotinib weist gegenüber Imatinib eine höhere Affinität und Selektivität für die ABL-Tyrosinkinase auf sowie eine 20-bis 50-mal so hohe inhibitorische Aktivität auf die Kinase in Imatinib-sensitiven CML Zellen im Vergleich zu Imatinib. Bei Imatinib resistenten CML Zellen konnte eine 3-bis 7-mal so hohe Aktivität im Gegensatz zu Imatinib festgestellt werden (Kantarjian et al. 2006).

Da Imatinib bereits erfolgreich bei anderen Krebsarten angewandt wurde, liegt die Fragestellung nahe in wie weit auch Nilotinib, als Vertreter, der zweiten Generation der Tyrosinkinaseinhibitoren, bei anderen malignen Veränderungen als Monotherapie oder auch in Kombination mit anderen Standardchemotherapeutika wirksam ist. Bis zu diesem Zeitpunkt scheint es auf diesem Forschungsgebiet nur wenige wissenschaftliche Erkenntnisse zu geben.

1.3 Tyrosinkinase-Rezeptoren

Imatinib und Nilotinib sind Tyrosinkinaseinhibitoren, die die Übertragung von extrazellulären Signalen ins Zellinnere hemmen und somit die Fähigkeit besitzen die Signaltransduktion zu stören. Die Tyrosinkinase-Rezeptoren sind Proteine, die zur Gruppe der Proteinkinasen gehören und sich in der Membran von Zellen befinden. Die Kinasen phosphorylieren reversibel die Aminosäure Tyrosin eines anderen Proteins und beeinflussen somit die Aktivitätssteigerung bzw. – inhibition des Zielproteins.

Die Tyrosinkinase-Rezeptoren können in membrangebundene zum Beispiel c-kit, EGF-Rezeptor, Insulinrezeptor, HER 2/neu und nicht-membrangebundene Tyrosinkinasen zum Beispiel c-ABL, c-SRC und Januskinasen unterteilt werden. Die verschiedenen Rezeptoren können anhand ihres Molekulargewichtes unterschieden werden.

Die membrangebundenen Rezeptoren können weiter in Rezeptoren mit intrinsischer Kinaseaktivität und Rezeptoren mit assoziierter Proteinkinaseaktivität unterteilt werden.

Die intrazytosolischen Tyrosinkinasen, die eine intrinsische Aktivität besitzen, werden dadurch aktiviert, dass ein spezifischer Ligand an den Rezeptor bindet, dies wiederum führt zur Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren des Rezeptors. Die Tyrosinkinasen sind im aktivierten Zustand in der Lage Tyrosinreste anderer Proteine dieses Rezeptors zu phosphorylieren (Autophosphorylierung). Diese Phosphatreste können von intrazellulären Proteinen mit SH₂-Domänen erkannt werden, die daraufhin intrazelluläre Signalwege, unter anderem die Phospholipase C und PI3-Kinase, stimulieren können.

Die Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase funktionieren im Prinzip ähnlich, benötigen jedoch einen Zwischenschritt nach der Rezeptordimerisierung, der eine Annäherung und Autophosphorylierung der Januskinase vorsieht, bevor es zur Rezeptorphosphorylierung durch die Januskinasen kommen kann. Die sich anlagernden Proteine entsprechen bei diesem Rezeptortyp Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls phosphoryliert werden und anschließend dimerisieren, um einen Einfluss auf die DNS der Zelle auszuüben (Muller-Tidow et al. 2005).

1.3.1 PDGFR

Die platelet-derived growth factor Rezeptoren (PDGFR) gehören zu den Tyrosinkinaserzeptoren. Die PDGFR-Familie besteht aus dem α - und β -Rezeptor, die wiederum aus zwei Untereinheiten aufgebaut sind. PDGFR α kann von allen Liganden, zu denen AA, AB, BB zählen, aktiviert werden. Der β -Subtyp kann hingegen nur durch PDGF BB und DD aktiviert werden (Heldin et al. 1998; Li et al. 2003). Diese Liganden können die Rezeptoren auf parakrinem Weg, bei dem der Ligand von einer anderen Zelle produziert wird, oder auf autokrinem Weg, bei dem die Zelle selbst den Ligand für den entsprechenden Rezeptor bildet, aktivieren. Bei Rezeptormutationen kann es zur Autoaktivierung kommen, das bedeutet, dass kein Ligand an den Rezeptor bindet aber trotzdem eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird. Diese Rezeptormutationen beim PDGFR- α kann vermehrt bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) beobachtet werden (Heinrich et al. 2003).

Über den PDGFR-Signalweg werden gleich mehrere wichtige Aufgaben der Zelle reguliert. Wenn der Rezeptor aktiviert ist, werden die Angiogenese, das Zellwachstum, die Mitoserate und die Zelldifferenzierung positiv beeinflusst (Dirks and Bloemers 1995). Darüber hinaus wird die Apoptose der Zellen indirekt über den PDGFR mittels Phosphoinositol-3'-Kinase und Akt gehemmt (Druker et al. 1996). Im Jahr 2000 wurde eine Regulation der Depolymerisation der Mikrotubuli bei der Zellteilung durch den PDGFR-Signalweg beschrieben (Yoon et al. 2000).

Der Grund, warum vermehrt an der Expression der PDGF-Rezeptoren geforscht wird, ist, dass viele maligne Prozesse mit einer erhöhten PDGFR-Anzahl einhergehen. Dazu gehören das Melanom, das Meningeom, das Ovarialkarzinom (Mundhenke et al. 2008), das Magen- und Pankreaskarzinom (Schiffer 2001), das Colonkarzinom (Lindmark et al. 1993), das Lungenkarzinom (Antoniades et al. 1992), das Prostatakarzinom (Fudge et al. 1996) und auch

das Mammakarzinom (Seymour and Bezwoda 1994), das in dieser vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse ist.

Eine vermehrte Expression der PDGF-Rezeptoren bedeutet eine erhöhte Teilungsrate und ein verbessertes Überleben der Tumorzellen (Vivanco and Sawyers 2002). Beim Mammakarzinom konnten Seymour und Bezwoda 1994 feststellen, dass eine erhöhte Expression der Tyrosinkinase-Rezeptoren positiv mit der Metastasierungsrate korreliert und einen negativen Einfluss auf das Ansprechen der Chemotherapie hat, das zusammengenommen eine schlechtere Prognose für die Patienten darstellt.

Die Faktoren, die nun an diese Rezeptoren binden können, werden in PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C und PDGF-D subtypisiert. Sie wirken als Mitogen auf Zellen mesenchymalen Ursprungs. Bei einer Verletzung sind Blutplättchen in der Lage PDGF frei zu setzen. PDGF spielt auch in der Embryogenese sowie in der Wundheilung eine wichtige Rolle und ist in der Lage Zellen, wie bereits aufgeführt zur Proliferation und Migration anzuregen (Li and Eriksson 2003); (Heldin and Westermark 1999).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit waren die Wirkmechanismen und der wachstumshemmende Effekt von Imatinib Mesylat bereits bekannt. Durch *in vivo* Studien wurde versucht die *in vitro* Ergebnisse von Imatinib als Monotherapie und in Kombination mit anderen Chemotherapeutika zu bestätigen. In dieser Arbeit wurden neue Medikamentenkombinationen mit Imatinib *in vitro* untersucht. Die Versuche wurden an den Mammakarzinomzelllinien MDAMB 231 und MCF7 mit Hilfe von Proliferationsassay, TUNEL-Assay und Migrations-Assay durchgeführt.

Im Vordergrund steht das Proliferationsverhalten und die Apoptosehäufigkeit bei der IC 50-Konzentration von Imatinib als Monotherapie sowie in Kombination mit dem Standard-Chemotherapeutikum Doxorubicin und dessen IC 50 Konzentration, die zunächst in Vorversuchen bestätigt werden mussten.

Des Weiteren wurden andere Standard Chemotherapeutika wie Paclitaxel in Kombinationen mit Imatinib untersucht. Zu diesem Zeitpunkt der Arbeit wurden bereits klinische Untersuchungen an Mammakarzinompatientinnen, die eine Chemotherapie bestehend aus Paclitaxel und Imatinib oder Doxorubicin und Imatinib erhielten, durchgeführt.

In zweiten Teil dieser Arbeit galt das Interesse dem Tyrosinkinase Inhibitor der zweiten Generation Nilotinib. In diesem Fall wurde die Fragestellung untersucht, in wie weit sich dieser neue Inhibitor auf das Proliferationsverhalten und die Apoptoseneigung der Mammakarzinomzelllinien MDAMB 231 und MCF7 auswirkt. Ein Ziel der Versuche war die IC 50 Konzentration von Nilotinib bei der Therapie der oben genannten Zelllinien zu bestimmen. Auch hier sollte ein möglicher additiver oder synergetischer Effekt einer Kombinationsinkubation mit Doxorubicin untersucht werden.

Die durchgeführten Versuche zielen auf die Beantwortung der oben genannten Fragestellungen ab, aus der sich die Hauptfragestellung ergibt: Vermag Imatinib in Kombination mit einem weiteren Chemotherapeutikum einen Effekt auf das Wachstumsverhalten der Mammakarzinomzellen *in vitro* auszuüben? Kann diese Kombination der Medikamente in Zukunft eine neue effektivere Therapie mit geringen Nebenwirkungen für betroffene Patienten darstellen? Beziehungsweise in welcher Form und Stärke kann Nilotinib das Wachstum der Zelllinien MDAMB 231 und MCF7 beeinflussen? Ist es möglich, dass Nilotinib als Thyrosinkinaseinhibitor der zweiten Generation in die Behandlungsmöglichkeiten für das Mammakarzinom mit aufgenommen wird?

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Material

2.1.2 Geräte

2.1.3 Ansetzen von Imatinib

2.1.4 MTT Auswertung

2.1.4.1 Zellproliferation unter Kombinationsinkubation von Imatinib und Doxorubicin

2.1.4.2 Zellproliferation unter Kombinationsinkubation von Imatinib und Paclitaxel

2.1.4.3 Zellproliferation unter Inkubation mit Nilotinib

2.1.4.4 Zellproliferation unter Kombinationsinkubation von Nilotinib und Doxorubicin

2.1.4.5 Zellproliferation unter Kombinationsinkubation von Nilotinib und Paclitaxel

2.1.5 Zellzählung-Auswertung

2.1.5.1 Zellproliferationsversuche zu synergistischem/additivem Effekt

2.2 TUNEL Assay

2.2.1 Material

2.2.2 Methode

2.3 Migrations Assay

2.3.1 Material

2.3.2 Methode

2.1 Zellkultur

2.1.1 Material	
Zelllinien: MDA MB 231, MCF7	American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA
Cell Titer Aqueous One Solution Reagent	Promega, Madison, WI, USA
Imatinib Mesylat	zur Verfügung gestellt von der Firma Novartis, Basel, Schweiz
Nilotinib	mit freundlicher Unterstützung von der Firma Novartis, Basel, Schweiz zur Verfügung gestellt
Doxorubicin	Sigma, St Louise, MO, USA
Paclitacel	Sigma, St Louise, MO, USA
Vinoelbrine ditartrate	Sigma, St Louise, MO, USA
VLE RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS-Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fetal bovine serum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tissue Culture Flask 75 cm ²	Sarstedt, Newton, USA
Tissue Culture Plate 96-well	Sarstedt, Newton, USA
Tissue Culture Plate 12-well	Sarstedt, Newton, USA
Trypan blue	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin/EDTA Solution	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.1.2 Geräte	
Dynatech MR 5000 Elisa Reader	Dynatech, Guernsey Channel Islands

Es wurden die Mammakarzinomzelllinien MDA MB 231, MCF7 (Zellen beschrieben) *in vitro* untersucht. Die Zellen wurden zunächst aufgetaut und anschließend in einer Zellkulturflasche 75cm² mit VLE RPMI 1640-Medium, das mit 10% fetalem Kälberserum (FSC) sowie 10000 U Penicillin und Streptomycin versetzt wurde, kultiviert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

Eine Passagierung wurde bei 80%iger Subkonfluenz der Zellen durchgeführt, um die Zellen anschließend in geringeren Verdünnungen wieder in Zellkulturflaschen mit erwähntem Medium auszusäen. Dieses Vorgehen erlaubt ein weitgehend logarithmisches Wachstum der Zellen.

In den folgenden Versuchen wurden Zellen bis zur 25. Generation verwendet.

Um die Versuchsbedingungen konstant zu halten, wurde die Zellzahl im Vitaltest einheitlich nach Anfärbung mit Trypanblau in der Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

2.1.3 Ansetzen von Imatinib Mesylat

Imatinib Mesylat wurde mit freundlicher Unterstützung von Novartis Pharma (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Imatinib besitzt ein Molekulargewicht von 589,71 g. Ausgehend von dieser Angabe wurde das Medikament eingewogen, so dass eine 10 mmol – Lösung in Aqua dest. hergestellt werden konnte. Jeweils 100 µl der 10 mmol- Imatinib-Konzentration wurden in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gefüllt und unter lichtarmen Bedingungen bei -20° C aufbewahrt. Die entsprechenden Imatinib-Konzentrationen für die einzelnen Versuche wurden durch eine Verdünnung mit RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10%igem FCS sowie Penicillin/Streptomycin hergestellt.

2.1.4 Zellproliferationsversuche mit MTT Auswertung

2.1.4.1 Zellproliferation unter Kombinationsinkubation von Imatinib und Doxorubicin

Die mögliche additive oder synergetische Wirkung des Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib Mesylat (Glivec®) mit einem in der Chemotherapie von Mammakarzinomen häufig verwendeten Medikament, dem Anthrazyklin Doxorubicin, sollte in folgenden *in vitro* Versuchen getestet werden.

Doxorubicin gehört zur Wirkstoffgruppe der Interkalantien, deren Wirkung auf einer Interkalation der DNS der Tumorzellen beruht.

Um geeignete Bedingungen für die endgültigen Versuche zu schaffen, wurden zunächst Vorversuche gemacht, in denen die geeignete Zellzahl selbst und die Inkubationsdauer des Medikamentes auf die Zellen variiert wurden. Schließlich ergaben sich folgende Versuchsbedingungen: Die Zellenzahl variierte dabei für MDAMB 231 zwischen 250 und 500 Zellen. Für MCF7 wurden 1500 Zellen verwendet. Die Inkubationsdauer bezeichnet eine Zeitspanne von mindestens fünf bis maximal zehn Tagen.

Das Ziel dieser Variation war es, eine geeignete Zellzahl zu finden, die bei Versuchsende eine 90%ige Konfluenz der Kontrollzellen ohne Zytostatikum ergab.

In der endgültigen Versuchsdurchführung wurde für MDAMB 231 eine Zellzahl von 250 Zellen und für MCF7 eine Zellzahl von 1500 Zellen verwendet. Die Inkubation von 6 Tagen erwies sich bei beiden Zelllinien als am besten geeignet.

Die Zellen wurden auf 96-well Platten ausgebracht, auf denen jedes well 100 μ l VLE RPMI 1640 Medium enthielt. Danach folgte eine Inkubation von 24 Stunden, damit sich die Zellen adäquat adaptieren konnten.

Nach dieser 24-stündigen Bebrütung wurde Imatinib in der IC 50 von 6 μ mol für beide Zelllinien appliziert. Die hinzu gegebenen Konzentrationen von Doxorubicin lagen für MDAMB 231 zwischen 2 nmol und 12,5 nmol. Für MCF7 wurden die Konzentrationen 2,5 nmol, 5 nmol, 10 nmol, 12,5 nmol, 25 nmol, 50 nmol, 100 nmol, 200 nmol und 300 nmol verwendet.

Die in H₂O hergestellte Imatinib 10mM Stocklösung wurde für die Versuche mit RPMI 1640-Medium unter Zusatz von 10%igem FCS sowie Penicillin/Streptomycin verdünnt.

Das Zytostatika-enthaltende Medium wurde alle 48 Stunden gewechselt. Nach dreimaliger Medikamentenapplikation erfolgte nach sechs Tagen die Versuchsauswertung mittels MTT. Der MTT-Test ist ein Zytotoxizitäts-Test. Die Mammakarzinomzellen werden *in vitro* mit dem namensgebenden Farbstoff, einem gelben Tetrazoliumsalz, behandelt, um ihre Lebensfähigkeit im Vergleich zur Kontrolle von unbehandelten Zellen zu messen (Mosmann 1983).

Für die Messung des Zellwachstums wurde das aufgetragene Medium aspiriert und 100 μ l des Standardmediums pro Well aufgetragen. Zusätzlich wurden 20 μ l Cell Titer Aqueous One Solution Reagent pro well hinzugefügt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ konnte mittels ELISA-Reader die Absorption des entstandenen farbigen Formazanprodukts bei 490 nm gemessen werden.

Das Formazan ist das Reduktionsprodukt von metabolisch aktiven Mammakarzinomzellen der im Cell Titer Aqueous One Solution Reagent enthaltenen MTS Tetrazolium Komponente.

Die Absorption verhält sich proportional zur Zellzahl, aus diesem Grund kann nun das Zellwachstum berechnet werden.

Zur Bewertung dieser Zellproliferation wurde aus der Dreifachbestimmung der Mittelwert gebildet. Im Folgenden wurde der Mittelwert der unbehandelten Kontrollzellgruppe gleich dem Ausgangswert von 100% gesetzt. Für jede Konzentration der Medikamente bei den beiden Zelllinien wurde das prozentuale Zellwachstum in Bezug auf die Kontrolle berechnet und als Grafik dargestellt.

Auf diese Weise sollte der möglich additive bzw. synergetische Effekt von Imatinib auf die Behandlung mit Doxorubicin gezeigt werden.

2.1.4.2 Zellproliferation unter Kombinationsinkubation von Imatinib und Paclitaxel

Des Weiteren wurde das mögliche additive bzw. synergetische Potential von Imatinib bei der Behandlung von Mammakarzinomzellen mit Paclitaxel untersucht.

Paclitaxel entstammt der Wirkstoffgruppe der Taxane, die die Fähigkeit besitzen die Zellen in der Mitose zu stören. Somit wird der Abbau der Mikrotubuli gehemmt. Die Mikrotubuli sind essentielle Bestandteile der Mitosespindel, die für die Zellteilung benötigt wird.

Dieser Wirkmechanismus bezieht sich demnach auf sich teilende Zellen und erklärt die zum Teil starken Nebenwirkungen (Bartsch 2005); (Leistner 2005).

Der Versuchsablauf wurde wie im vorher gehenden Absatz bereits beschrieben durchgeführt: Zunächst wurde in Vorversuchen die in der Literatur angegebene IC 50 für beide Zelllinien überprüft, um danach das eigentliche Experiment zu starten.

Dabei wurden sowohl die Zelllinie MDAMB 231 als auch MCF7 der IC 50 von Imatinib, welche 6 μmol entspricht, ausgesetzt. Die Kombination erfolgte mit einer Paclitaxelkonzentration für MDAMB 231 von 0,1 nmol bis 1 nmol. Für die Zelllinie MCF7 wurde eine Taxankonzentration von 0,5 nmol bis 2,5 nmol gewählt.

Mittels dieses Versuchsansatzes sollte überprüft werden, ob diese Medikamentenkombinationen eine bessere zytotoxische Wirkung im Vergleich zu den Einzelmedikationen ergeben.

Die erhaltenen Absorptionsergebnisse nach einer Inkubation von sechs Tagen wurden wie bereits erwähnt mittels ELISA-Reader bestimmt und auf das Wachstum einer unbehandelten Kontrollzellgruppe bezogen.

2.1.4.3 Zellproliferation unter Inkubation mit Nilotinib

In den folgenden Versuchen sollte die Wirkung des BCR-ABL-Tyrosinkinase Inhibitors Nilotinib auf die Proliferation von Mammakarzinomzellen untersucht werden.

Um die Versuche mit Nilotinib durchführen zu können, wurde zunächst eine 1 mmol Stocklösung des Medikaments in H₂O hergestellt. Die weitere Verdünnung erfolgte mit dem Standardmedium. Die Versuchsbedingungen wurden wie beschrieben übernommen: Bei einer Inkubationsdauer von 6 Tagen wurden für die Zelllinie MDAMB 231 zunächst 250 Zellen und später 500 Zellen pro Ansatz getestet. Für die Zelllinie MCF7 wurden 1500 Zellen pro Ansatz verwendet.

Nach der Zellaussaat und 24-stündiger Inkubation unter normalen Bedingungen erfolgte zur Determinierung der IC 50 für Nilotinib die Medikamentenapplikation. In Vorversuchen wurden Konzentrationen bis zu 500 µmol aufgetragen. Im Zielversuch wurden die Zelllinien MDAMB 231 (250 Zellen) und MCF7 (1500 Zellen) den Nilotinibkonzentrationen 1 µmol, 1,5 µmol, 2 µmol, 2,5 µmol, 3 µmol, 3,5 µmol, 4 µmol, 4,5 µmol, 5 µmol, 5,5 µmol, 6 µmol, 6,5 µmol, 7 µmol, 7,5 µmol, 8 µmol, 8,5 µmol, 9 µmol, 9,5 µmol und 10 µmol ausgesetzt. In einem weiteren Versuch wurde die Zellzahl der Mammakarzinomzelllinie MDAMB 231 auf 500 Zellen erhöht und die Nilotinibkonzentrationen variierten zwischen 1 µmol und 19 µmol.

Die nach Versuchsende erhaltenen Absorptionsparameter wurden wie bereits beschrieben auf das Wachstum der Zellkontrollgruppe (nur mit Standardmedium behandelt) bezogen. Dadurch wurde die Definition der IC 50, bei der das Wachstum der Zellen 50% der Kontrollgruppe ergab, für die Zelllinie MCF7 möglich. Diese Konzentration diente in weiteren Versuchen als Richtlinie.

2.1.4.4 Zellproliferation unter Kombinationsinkubation von Nilotinib und Doxorubicin

Bei dieser Kombinationsinkubation sollte untersucht werden, inwiefern Nilotinib die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin auf die Mammakarzinomzellen positiv oder negativ beeinflussen kann.

Für die Zelllinie MCF7 wurden die Versuchsbedingungen mit 1500 Zellen wie beschrieben übernommen und die im Vorversuch getestete IC 50 von Nilotinib verwendet. Die Doxorubicin Konzentrationen wurden entsprechend den im Kombinationsversuch mit Imatinib gewählt: Konzentrationen 2,5 nmol, 5 nmol, 10 nmol, 12,5 nmol, 25 nmol, 50 nmol,

100 nmol, 200 nmol und 300 nmol. Diese Angaben erfolgten, damit eine mögliche Vergleichbarkeit der Absorptionswerte von der Kombination mit Nilotinib und Doxorubicin sowie der Kombination mit Imatinib und Doxorubicin gewährleistet bleibt.

Die Auswertung der Absorptionsmessung erfolgte durch das übliche Verfahren.

2.1.4.5 Zellproliferation unter Kombinationsinkubation von Nilotinib und Paclitaxel

Eine Kombinationsinkubation wurde ebenfalls mit Nilotinib und Paclitaxel für die Zelllinie MCF7 durchgeführt um, wie im vorangegangenen Versuch beschrieben, mögliche Wirkungsverstärkungen oder -abschwächungen herauszufinden.

Es wurden in diesem Versuch 1500 Zellen pro Ansatz ausgesät und die IC 50 von Nilotinib hinzugegeben. Die Paclitaxelkonzentrationen variierten dabei, wie im Kombinationsversuch mit Imatinib für MCF7 zwischen 0,5 nmol und 2,5 nmol.

Nach Versuchsende wurde die Auswertung mittels MTT vorgenommen.

2.1.5 Zellproliferationsversuche mit Zellzählung

Um die Ergebnisse der MTT-Versuche der Kombination von Doxorubicin und Imatinib zu überprüfen, wurden die Proliferationsversuche manuell ausgezählt.

Die Zellreihe MDAMB 231 wurde mit 2000 Zellen pro well auf einer 12-well-plate-Platte und die Zellreihe MCF7 mit 20.000 Zellen pro well auf einer 12-well-plate-Platte ausgesät. Die Zellen waren zum Zeitpunkt des Versuchsansatzes zu ca. 70% konfluent und wurden daraufhin trypsiniert. Nach 10-minütiger Inkubation erfolgte eine Zentrifugation mit 1350 Umdrehungen bei 20° C für zehn Minuten. Danach wurden die Zellen im Standard Medium (RPMI, plus 10%ig FCS, plus Streptomycin und Penicillin) resuspendiert und anschließend die Zellzahl mit Trypanblau in der Neubauer Zählkammer bestimmt.

Ein Milliliter Standardmedium wurde in jedes der wells vorgelegt, um diese anschließend mit der entsprechenden Zellzahl zu beimpfen.

Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die Medikamente verabreicht. Für MDAMB 231 wurde Doxorubicin in den Konzentrationen 0,5 nmol, 1 nmol, 1,5 nmol und 2 nmol sowie jeweils die Kombination von 6 µmol Imatinib und Doxorubicin in genannten Konzentrationen auf die Zellen appliziert. Pro Konzentration wurde eine 3-fach-Bestimmung vorgenommen.

Für die Zellreihe MCF7 wurden die Konzentrationen für Doxorubicin wie folgt gewählt: 2,5 nmol, 5 nmol, 7,5 nmol, 10 nmol und 12,5 nmol. Die Konzentrationen wurden ebenfalls

mit 6 μmol Imatinib kombiniert und auf die Zellen aufgetragen. Auch hier wurde eine 3-fach-Bestimmung angestrebt.

Eine unbehandelte Kontrolle wurde sowohl bei MDAMB 231 als auch bei MCF7 mitgeführt. Der Wechsel des Chemotherapeutikums erfolgte alle 48 Stunden. Nach sechs Tagen mit dem Medikament wurde der Versuch ausgewertet.

Zunächst wurde das Chemotherapeutikum abgesaugt und es wurden 400 μl Trypsin in die Wells gegeben. Nach 10-minütiger Inkubation wurde die Reaktion des Trypsins mit 800 μl Medium gestoppt. Diese Zellsuspension wurde in 1,5 ml Eppendorftubes gefüllt, um anschließend eine Zellzählung mit Hilfe einer Trypanblaureaktion in der Neubauer Zählkammer durchzuführen.

Die ermittelte vitale Zellzahl der unterschiedlichen Konzentrationen wurde prozentual auf die vitale Zellzahl der unbehandelten Kontrolle bezogen und grafisch dargestellt

2.1.5.1 Zellproliferationsversuche zu synergetischem /additivem Effekt

Die folgenden Kombinationsexperimente wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob Imatinib einen additiven oder einen synergetischen Effekt auf die Behandlung mit dem Zytostatikum Doxorubicin hat.

In dieser Versuchsreihe wurden die MCF7 Zellen sowie die MDAMB 231 Zellen mit steigenden Konzentrationen sowohl von Imatinib als auch des Zytostatikums Doxorubicin als Mono- und Kombinationstherapie auf einer 12-well-Platte für 24 Stunden inkubiert. Die Medikamente wurden alle mit dem Standardmedium hergestellt und alle 48 Stunden neu aufgetragen (Standardversuchsbedingungen).

Die Medikamentenkonzentrationen wurden für die Zelllinie MDAMB 231 mit 2000 Zellen pro well wie folgt gewählt: Unbehandelte Kontrolle, Doxorubicin: 0,25 nmol, 0,5 nmol, 1 nmol, 2 nmol. Imatinib mit: 1,5 μmol , 3 μmol , 6 μmol , 12 μmol .

Die Konzentrationen entsprechen 0,25 x IC 50; 0,5 x IC 50; 1x IC 50; 2x IC 50 der beiden Medikamente.

Die entsprechenden Konzentrationen wurden als Monotherapie aufgetragen und miteinander kombiniert: 0,25 nmol+1,5 μmol ; 0,5 nmol+ 3 μmol ; 1 nmol+6 μmol ; 2 nmol+12 μmol . Es wurde jeweils eine 3-fach-Bestimmung vorgenommen.

Für die Zelllinie MCF7 wurde dasselbe Verfahren angewandt. Hier wurden 20.000 Zellen auf einer 12-well-Platte für eine 3-fach-Bestimmung, die mit 1 µl Standardmedium zuvor präpariert wurde, ausgesät. Die Medikamente wurden auch hier alle 48 Stunden gewechselt. Für Doxorubicin wurden folgende Konzentrationen verwandt: 1,25 nmol; 2,5 nmol; 5 nmol; 10 nmol.

Für den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib: 1,5 µmol; 3 µmol; 6 µmol; 12 µmol. Die Kombination der Medikamente erfolgte nach dem bereits beschriebenen Prinzip: 0,25 x IC 50; 0,5 x IC 50; 1x IC 50; 2x IC 50.

Die Auswertung erfolgte nach sechstägiger Inkubation mit dem zuvor beschriebenen Zellzählverfahren durch Trypanblaufärbung und anschließender Zellzählung in einer Neubauerzählkammer. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte prozentual in Bezug auf eine unbehandelte Kontrolle mit Hilfe von Diagrammen und der Berechnung mittels Calcsyn Software.

2.2 TUNEL-Assay

2.2.1 TUNEL-Assay Material	
Zelllinien: MDA MB 231, MCF7	American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, POD	Roche, Penzberg, Deutschland
Imatinib Mesylat	zur Verfügung gestellt von der Firma Novartis, Basel, Schweiz
Nilotinib	mit freundlicher Unterstützung von der Firma Novartis (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt
Doxorubicin	Sigma, St Louise, MO, USA
Vecta Stain	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Vinoelbrine ditartrate	Sigma, St Louise, MO, USA
VLE RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS-Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fetal bovine serum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Chamber Slide	Nagle Nunc International, 75 Panorama Creek Dr., Rochester, NY 14625 USA
3% H ₂ O ₂ in Methanol	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
4% Paraformaldehyd	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tris HCL, pH 7,5	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
MgCl ₂	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Permeabilisationslösung: 0,1% Triton x 100 in 0,1% in Sodium Citrat	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
DNAaseI, recombinat, grade 1	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.2.2 TUNEL-Methode

Die TUNEL-Assays wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Tyrosinkinaseinhibitoren Imatinib und Nilotinib in der Lage sind bei den Mammakarzinomzelllinien, MDAMB 231 und MCF7 eine Apoptose zu induzieren.

Der TUNEL-Assay dient dazu apoptotische Zellkerne darzustellen. Während des Apoptosevorgangs wird der DNS-Strang der Zelle durch Endonuklease-Enzyme in einzelne Fragmente zerteilt, an den Bruchenden befinden sich Hydroxylgruppen, die unter Verwendung des „TdT“-Enzyms (Deoxynucleotidyltransferase) mit markierten Nukleotiden behaftet werden; diese Nukleotide sind mit Fluorescein markiert und lassen sich bei einer Extinktionswellenlänge von 450-500 nm im Fluoreszenzmikroskop erkennen.

Der erste Versuchsansatz für Nilotinib wurde anhand von Literaturangaben ausgewählt. Dabei wurden 80% konfluente Zellkulturen der Brustkrebszelllinien MDAMB 231 und MCF7 wie folgt verwendet: 20.000 Zellen wurden pro Kammer auf acht Objektträgern ausgesät und 24 Stunden mit Standardmedium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, damit die Zellen genügend Zeit besitzen wieder in eine Proliferationsphase überzugehen. Nach der Kultivierung wurde das Normalmedium aspiriert und durch ein Medium mit den Nilotinibkonzentrationen von 2 µmol bzw. 4 µmol (IC 50) für jeweils beide Zelllinien ersetzt. Dieses Nilotinib enthaltende Medium wurde alle 48 Stunden frisch aufgetragen. Die erste Auswertung durch die TUNEL-Methode erfolgt nach 24 Stunden und eine zweite nach 72-stündiger Inkubation.

Für einen zweiten Versuchsansatz mit Imatinib alleine und in Kombination mit Doxorubicin wurden die Zelllinie MDAMB 231 mit 20.000 Zellen pro chamber auf 2er chamberslides und die Zelllinie MCF7 mit 40.000 Zellen pro chamber auf 2er chamberslides ausgesät.

Für MDAMB 231 wurden insgesamt 14 chamberslides angelegt: Jeweils 7 für die 24h Inkubation und 7 für die 48 h Inkubation.

Diese sieben chamberslides beinhalteten: Eine Negativkontrolle, zwei Positivkontrollen (wie im Versuch vorgesehen), eine unbehandelte Kontrolle, 1 nmol Doxorubicin, 6 µmol Imatinib und die Kombination: 1 nmol Doxorubicin und 6 µmol Imatinib.

Für MCF7 wurden 16 chamberslides beimpft, um eine Auswertung nach 24 h und eine nach 48 h vorzunehmen. Auch hier wurden eine Negativkontrolle, zwei Positivkontrollen, eine

unbehandelte Kontrolle, 2,5 nmol Doxorubicin, 5 nmol Doxorubicin, 6 µmol Imatinib, eine Kombination mit 2,5 nmol Doxorubicin und 6 µmol Imatinib sowie eine Kombination mit 5 nmol Doxorubicin und 6 µmol Imatinib angelegt.

Die chamberslides wurden für 24 Stunden mit dem Standardmedium inkubiert, bevor die Medikamente bzw. das Standardmedium auf die Kontrollen und die unbehandelten Zellen aufgetragen wurden. Die Auswertung erfolgte anhand von Literaturangaben nach 24 h bzw. 48 h.

Die Auswertung mit Hilfe der TUNEL-Methode erfolgte zunächst durch die Aspiration des Mediums und eine Waschung der Zellobjektträger mit PBS. Danach wurden die Zellen kurz an der Luft getrocknet, um dann die Fixierung mit 4% Paraformaldehyd in PBS vorzunehmen. Der Fixationsvorgang fand innerhalb einer Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur statt. Anschließend folgten wieder eine Waschung mit PBS und darauf eine Blockierung mit einer Lösung aus 3% H₂O₂ in Methanol. Nach 10-minütiger Inkubation mit der Blockierungslösung wird eine weitere PBS-Waschung durchgeführt. Als nächster Schritt folgt die Permeabilisierung der Zellmembranen mittels 0,1% Triton x -100 in 0,1% Natriumcitrat Lösung für zwei Minuten bei 8° Celsius.

Die Positivkontrolle, die bei jeder TUNEL Auswertung mitgeführt wurde, wurde nach dem Permeabilisierungsschritt zehn Minuten mit DNase I inkubiert, sodass sich während dieser Phase DNS-Strangbrüche entstehen können.

Der nächste Versuchsschritt beinhaltet die Herstellung des TUNEL-Reaktionsmixes aus der Enzymlösung und der Label Solution, die im Kit enthalten waren. Jeweils 50 µl dieses TUNEL-Reaktionsmixes wurden pro Kammer der Objektträger appliziert und bei 37°C eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Die Behandlung der Negativkontrolle, die ebenfalls bei jeder TUNEL-Auswertung mitgeführt wurde, erfolgte nur mit der Label-Solution.

Nach der Inkubationszeit wurden die Objektträger abschließend dreimalig mit PBS unter lichtarmen Bedingungen gespült, bevor der letzte Versuchsschritt, die Eindeckelung mit Vecta Stain, erfolgen konnte.

Die Auswertungen nach 24 Stunden, 48 Stunden und nach 72 Stunden erfolgten mittels des Fluoreszenzmikroskops bei einer Extinktionswellenlänge von 450-500 nm. Die apoptotischen Zellen sollen dabei grün fluoreszieren (515-565 nm).

Unter 1000-facher Vergrößerung wurden insgesamt fünf zufällige Gesichtsfelder pro Ansatz untersucht und dabei die Gesamtzahl der Zellen sowie die Anzahl der apoptotischen Zellen (grün fluoreszierend) ermittelt. Daraus konnte der mittlere prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen bestimmt werden. Die Nilotinibkonzentration war im ersten TUNEL-Experiment sowohl für MDAMB 231 als auch für MCF7 mit 2 μmol sowie 4 μmol definiert, als Bezugsgröße wurde eine unbehandelte Kontrollzellgruppe verwendet.

Die Imatinibkonzentrationen im zweiten TUNEL Experiment waren für MDAMB 231 und MCF7 mit 6 μmol angesetzt. Doxorubicin wurde bei MDAMB 231 in der Konzentration 1 nmol als Monoansatz und in der Kombination mit 6 μmol Imatinib verwendet.

Für MCF7 wurde Doxorubicin in den Konzentrationen 2,5 nmol und 5 nmol verwendet sowohl als Einzel- und als Kombinationsinkubation zusammen mit Imatinib 6 μmol .

Auch hier wurde als Bezugsgröße eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt.

Eine Bewertung der Apoptoseinduktion der einzelnen Medikamentenansätze wurde durch dieses Auswertungsverfahren möglich.

2.3 Migrations-Assay

2.3.1 Migrations-Assay Material	
Zelllinien: MDAMB 231, MCF7	American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA
Imatinib Mesylat	zur Verfügung gestellt von der Firma Novartis, Basel, Schweiz
Doxorubicin	Sigma, St Louise, MO, USA
Recombinant Human PDGF-BB	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland
VLE RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS-Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fetal bovine serum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tissue Culture Plate 12-well	Sarstedt, Newton, USA
Silikoneinsätze FlexiPERM	Sarstedt, Newton, USA

2.3.2 Methode des Migrations-Assays

Mit Hilfe des Migrations-Assays wurde der Abstand zweier aufeinander zu gerichteter Migrationsfronten ermittelt.

Für diesen Versuchsaufbau wurden die Silikoneinsätze zunächst in möglichst breite Mauern mit geraden Kanten geschnitten und gemäß Herstellerangaben gereinigt und sterilisiert. Die Trocknung erfolgte unter UV-Licht in einer sterilen Werkbank. Anschließend wurde der Einsatz eines Silikonblöckchens mittig in jedes well einer 12-well-Platte plaziert. Danach wurden 1000 µl Standardmedium vorsichtig in die zwölf wells der Versuchsplatte appliziert. Diese „Blöckchen“ verblieben für die ersten 24 Stunden in den wells, in denen sich die Zellen zu einem Zellrasen verdichten sollten, unter Aussparung der Flächen unter den Silikoneinsätzen.

Für die Zelllinie MDAMB 231 wurden die wells mit 200.000 Zellen und für die Zelllinie MCF7 mit 500.000 Zellen pro well beimpft. Diese Zellzahl erreichte in Vorversuchen nach 24 Stunden eine für den Migrations-Assay ausreichende Konfluenz. Es folgte wie erwähnt eine 24-stündige Inkubation, in der sich die Zellen möglichst zu diesem beschriebenen Zellrasen verdichten sollten. Danach wurden diese Silikon-Blöcke vorsichtig mit einer sterilisierten Pinzette entfernt. Nach Entfernung der Mauern sollte ein sauberer Zellrand entstanden sein, vom dem aus die Zellen in die von den Silikon-Blöcken freigehaltene Fläche hineinmigrieren. Nach dieser ersten Inkubationsphase wurden die Kontrollwells der beiden Zelllinien, nach dem Entfernen der Silikon-Blöcke, unter dem Mikroskop mit einem schwach vergrößernden Objektiv (2x), einer entsprechenden Kamera und einem angepassten Computerprogramm (Carl Zeiss Axio Vision 40 Release 4.7.0.0.; 05.2008) fotografiert. Zur Bestimmung der Migration wurde der Abstand der beiden Migrationsfronten an drei Stellen gemessen (Ausgangswert A1, A2, A3): Einmal links, einmal mittig und einmal am rechten Rand der Ausparung durch den Silikon-Block. Diese Werte dienten als Ausgangswerte für die folgenden Auswertungen der Migration nach 24 bzw. 48 Stunden.

Die Medikamentenkonzentrationen wurden wie im TUNEL-Assay gewählt, um eine mögliche Vergleichbarkeit der Effekte nachzuweisen.

Für MDAMB 231 wurde eine unbehandelte Kontrolle (in 3 wells), eine 3-fach-Bestimmung mit 1nmol Doxorubicin sowie 6 µmol Imatinib und eine Kombination von 1 nmol Doxorubicin und 6 µmol Imatinib getestet.

Für die Zelllinie MCF7 wurde ebenfalls eine 3-fach Bestimmung jeder Konzentration vorgenommen, die wie folgt lautete: Unbehandelte Kontrolle (Standardmedium), 2,5 nmol Doxorubicin, 5 nmol Doxorubicin, 6 µmol Imatinib, Kombination 2,5 nmol Doxorubicin plus 6 µmol Imatinib sowie 5 nmol Doxorubicin plus 6 µmol Imatinib.

Nach 24-stündiger Inkubation mit den Chemotherapeutika erfolgte, wie im TUNEL Assay, die erste Auswertung. Zuvor wurde der Inhalt der Wells aspiriert und 1000 µl PBS-Lösung aufgetragen, um überschüssige Zellbestandteile abzuschwemmen. Die PBS-Lösung wurde abgesaugt, um erneut die Medikamente zu applizieren. Die medikamentöse Behandlung der Zellen erfolgte somit alle 24 Stunden.

Danach wurde das oben bereits beschriebene Messverfahren angewandt und eine „virtuelle Linie“ durch die Migrationsfronten gelegt, um den Abstand zur gegenüberliegenden Migrationsfront zu bestimmen (E1, E2, E3). Es wurden erneut drei Werte bestimmt.

Es wurden Werte in µm ermittelt. Die tatsächliche „Migrationsleistung“ der Zellen ergibt sich wie folgt:

$$\{[(A1+A2+A3)/3] - [(E1+E2+E3)/3]\}/2 = \text{Migration}$$

Die Werte wurden halbiert, da es sich um zwei Migrationsfronten handelt, die sich aufeinander zu bewegen.

Zusätzlich wurde der Mittelwert der drei Abstandsmessungen zwischen den Fronten eines Wells bestimmt. Da eine dreifache Bestimmung für jede Konzentration unternommen wurde, wurde aus diesen drei Mittelwerten (für jede Konzentration) ebenfalls der Mittelwert errechnet und in prozentuale Beziehung zum Abstands-Ausgangswert vor der Medikamenteninkubation gesetzt. Daraus ließ sich ableiten wie stark die Zellen migriert waren. Die Ergebnisse wurden grafisch dargestellt (siehe Ergebnisteil).

Die zweite Auswertung erfolgte nach 48 Stunden. Es wurde in derselben Weise verfahren wie nach 24 Stunden.

Die Migrationsmethode wurde ebenfalls für einen Versuchsaufbau mit Imatinib in der Konzentration 10 µmol und den Liganden Recombinant Human PDGF-BB in der Konzentration 25 ng/ml angewandt. Es wurden wieder die beiden Standardzelllinien MCF7 und MDAMB 231 verwendet. Die Zellzahl wurde für MDAMB 231 mit 200.000 Zellen pro Well auf einer 12-well-Platte beibehalten, für MCF7 wurden 450.000 Zellen pro Well

verwendet. Beide Zelllinien wurden jeweils in drei Ansätzen getestet mit folgenden Konzentrationen: Unbehandelte Kontrolle, Ligand 25 ng/ml, Imatinib 10 μ mol und der Kombination Ligand 25 ng/ml plus Imatinib 10 μ mol.

Der Versuchsablauf wurde wie beschrieben beibehalten. Die konfluenten Kontrollwells wurden nach 24-stündiger Inkubation und Entfernung der Blöckchen als Ausgangsabstand fotografiert, woraufhin die Medikamentenapplikation erfolgte. Die Fotos wurden wie beschrieben mit Hilfe eines Mikroskops mit einem schwach vergrößernden Objektiv (2x), einer entsprechenden Kamera und einem angepassten Computerprogramm (Carl Zeiss Axio Vision 40 Release 4.7.0.0.; 05.2008) abfotografiert.

Bei diesem Versuch wurden die Abstände der Zellfronten nach 24, 48 und 72 Stunden beurteilt. Vor jeder Auswertung erfolgte eine Waschung mit 1000 μ l PBS-Pufferlösung zur Abschwemmung der Zelltrümmer und die anschließende erneute 1000 μ l Medikamentengabe. Die Auswertung fand bei diesem Versuch mit Hilfe der Mittelwertberechnung statt; zunächst der drei Abstände des jeweiligen wells und danach der drei wells für die jeweilige Konzentration. Daraus ergibt sich wie beschrieben die prozentuale Migration der Zellen im Vergleich zum Ausgangswert, die grafisch dargestellt wurde.

3. Ergebnisse

3.1 Zellproliferation

3.1.1 Ergebnisse des MTT-Assay für Imatinib

3.1.2 Ergebnisse des MTT-Assay für Nilotinib

3.1.3 Ergebnisse Zellzählung

3.2 TUNEL-Assay

3.2.1 TUNEL-Assay mit Imatinib

3.2.2 TUNEL-Assay mit Nilotinib

3.3 Migrations-Assay

3.3.1 Migrations-Assay mit Ligand

In vorangehenden Studien konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Zelllinien MCF7 und MDAMB 231, die Rezeptoren PDGFR β und *abl* exprimieren, die als Imatinibziele identifiziert werden konnten. Zusätzlich wurde bei MCF7 *c-kit* und MDAMB 231 PDGFR α nachgewiesen. Für beide Zelllinien konnte ein antiproliferativer Effekt bei einer IC 50 Konzentration von Imatinib mit 6 μmol festgestellt werden (Weigel et al. 2009), (Roussidis et al. 2007).

Diese Imatinibkonzentration von 6 μmol wurde in Vorversuchen unter Variation des Versuchsaufbaus erneut getestet und für die folgenden Versuche als IC 50 angewendet.

3.1 Zellproliferation

Die beiden Mammakarzinomzelllinien MDAMB 231 und MCF7 wurden Zellproliferationsversuchen unterzogen, um einen möglichen additiven Effekt des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib sowie Nilotinib auf eine Chemotherapie mit Doxorubicin oder Paclitaxel nachzuweisen. Diese Proliferationsversuche wurden mit Hilfe des MTT und durch manuelle Zellzählung ausgewertet.

3.1.1 Ergebnisse des MTT-Assay für Imatinib

Zunächst wurden mehrere Vorversuche für beide Zelllinien unternommen, um die geeignete Zellzahl, Inkubationsdauer sowie Medikamenten-Konzentration zu bestimmen.

Als mögliche Richtwerte für Imatinib wurden Literaturangaben verwendet (Weigel et al. 2009).

Für die Zelllinie MCF7 wurde daraufhin der Versuchsaufbau für den MTT mit 1500 Zellen über eine sechstägige Inkubation gewählt.

Die Zellen wurden mit Imatinibkonzentrationen bis 20 μmol inkubiert, da eine höhere Konzentration toxisch auf die Zellen wirkt; dies konnte mit Hilfe einer der Testauswertung vorangehenden Mikroskopkontrolle bestätigt werden.

Unter den beschriebenen Bedingungen wurde für die Zelllinie MCF7 das in der Abbildung 1 gezeigte Ergebnis ermittelt. Die Kurve zeigt einen Abfall der Zellproliferation mit ansteigender Medikamentenkonzentration bis der toxische Bereich erreicht wird.

Das Ziel dieses Versuchsaufbaus war die in der Literatur angegebene IC 50-Konzentration (6-7 μmol), die definiert ist als diejenige Konzentration, bei der die Zelllinien eine 50 prozentige Wachstumshemmung zeigen, von Imatinib zu bestätigen. Die Abbildung zeigt einen Abfall des Zellwachstums unter 50 Prozent jedoch erst bei Imatinibkonzentration zwischen 15 - 17,5 μmol . Somit konnte mit diesem Versuchsaufbau der Literaturwert nicht bestätigt werden.

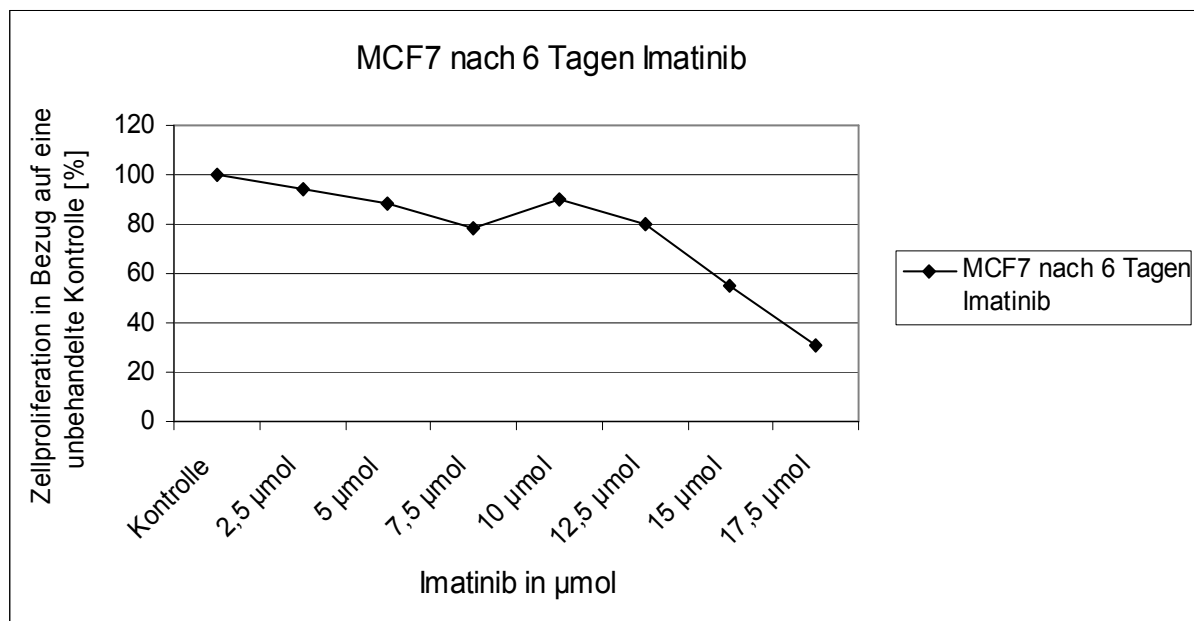


Abbildung 1: Wachstumskurve der MCF7 Zellen unter Inkubation mit steigenden Imatinibkonzentrationen über sechs Tage mit Absinken des Zellwachstums bei Erhöhung der Imatinibkonzentration.

Für die Zelllinie MDAMB 231 wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau gewählt wie bereits geschrieben, nur wurde hier die Zellzahl auf 500 pro well verringert, damit die Zellen keine Konfluenz über die sechstägige Inkubation erreichen.

Auch hier wurde eine Imatinibkonzentration bis 20 μmol angewandt. Abbildung 2 zeigt das Ergebnis der Auswertung. Auch bei dieser Zelllinie liegt die ablesbare IC 50-Konzentration für Imatinib zwischen 15 - 17,5 μmol und damit deutlich höher als der in der Literatur angegebene 6 - 7 μmol Wert.

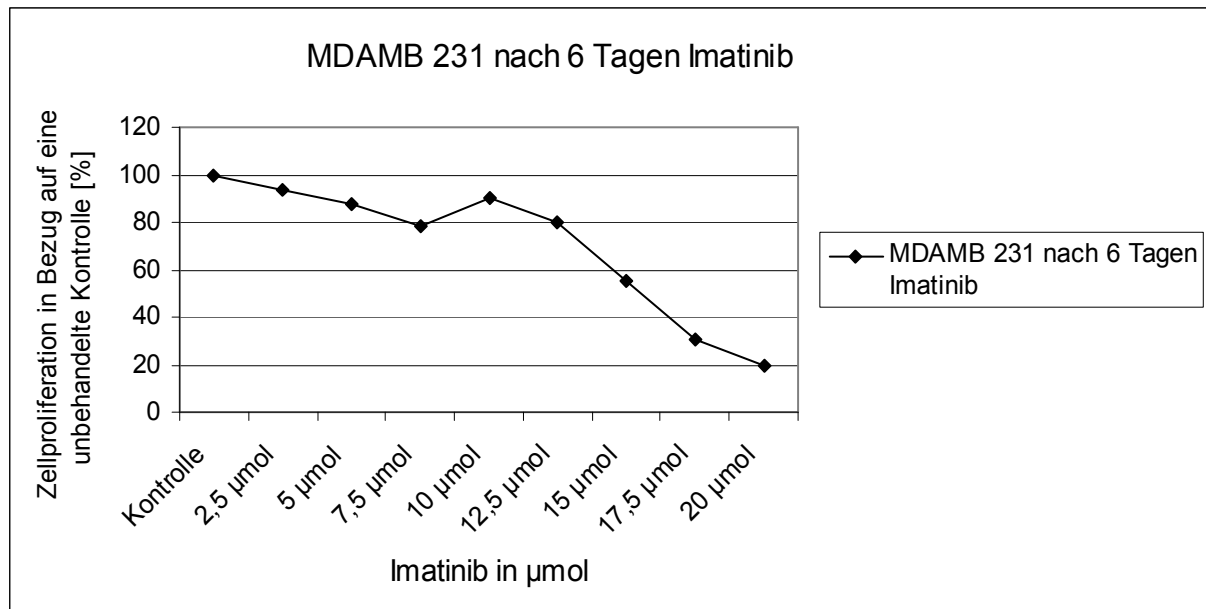


Abbildung 2: Wachstumskurve der MDAMB 231 Zellen unter Inkubation mit steigenden Imatinibkonzentrationen über sechs Tage mit erkennbarem Absinken des Zellwachstums.

In den folgenden Versuchen wurde trotz der ermittelten Ergebnisse, der in der Literatur vorgegebenen Wert von 6 μmol für die IC 50-Konzentration von Imatinib verwendet, da sonst keine klinisch relevante Konzentration eingehalten wird.

Bei der Kombinationsinkubation von Doxorubicin und der in der Literatur aufgeführten IC 50 Konzentration von Imatinib mit 6 μmol sollte der Fragestellung nachgegangen werden, inwiefern Imatinib einen zusätzlichen Effekt auf die Zellzahl hat.

In der Abbildung 3 ist die Zelllinie MCF7 mit 1500 Zellen über eine Zeitspanne von sechs Tagen dargestellt. Das Medikament Doxorubicin wurde in den Konzentrationen von 2,5 nmol- 300 nmol appliziert sowohl bei der Einzelinkubation als auch in Kombination mit Imatinib. Bei niedrigen Doxorubicin Konzentrationen zeigt Imatinib keinen zusätzlichen Effekt, auch die IC 50 Inhibition kann erneut nicht nachgewiesen werden, welches an dem Startpunkt der beiden Kurven bei 100% abgelesen werden kann.

Ab der Doxorubicin Konzentration von 10 nmol trennen sich die beiden Kurven und es lässt sich ein zusätzlicher Effekt von Imatinib erkennen, der bei einer Konzentration von 50 nmol am deutlichsten erscheint. 50 nmol ist nach dieser Art der Auswertung gleichzeitig die IC 50

für das Medikament Doxorubicin bei Anwendung auf die Zelllinie MCF7. Bei höheren Konzentrationen nähern sich die beiden Kurven wieder an.

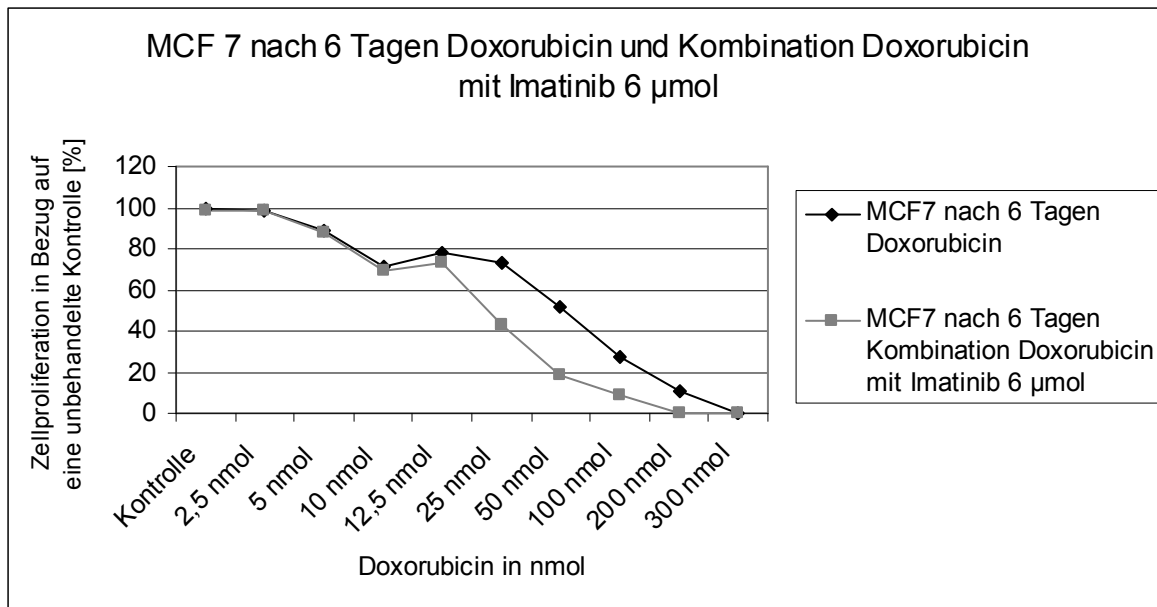


Abbildung 3: Wachstumskurve der MCF7 Zellen unter Inkubation mit steigenden Doxorubicin Konzentrationen sowie der zusätzlichen Applikation von Imatinib in der IC 50 Konzentration von 6 µmol.

Für die Zelllinie MCF7 wurden neben der Inkubation mit Doxorubicin auch eine Inkubation mit Paclitaxel (0,5 nmol-2,5 nmol) und die Kombinationsinkubation Paclitaxel (0,5 nmol-2,5 nmol) mit Imatinib 6 µmol durchgeführt. Im MTT konnten für diese Versuchsreihe jedoch keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden.

Eine Kombinationsinkubation wurde ebenfalls für die Zelllinie MDAMB 231 durchgeführt. 250 Zellen wurden über sechs Tage mit einer Doxorubicin Konzentration von 2 nmol- 12,5 nmol als Monotherapie und in Kombination mit 6 µmol Imatinib inkubiert. Im Gegensatz zu den MCF7 Zellen sind die Doxorubicin Konzentrationen geringer und eine IC 50-Konzentration lässt sich aus der Abbildung 4 ablesen: 5 nmol.

Die Kurven weisen insgesamt einen S-förmigen Verlauf auf, dies bedeutet, dass die Kurven bei niedrigen Medikamentenkonzentrationen nur wenig abfallen bis sie bei höheren Konzentrationen einen proportionalen Verlauf zeigen. Bei steigender Medikamentenkonzentration nimmt die Wachstumshemmung nur noch wenig zu. Daraus lässt sich folgern, dass sich der Verlauf der beiden Kurven der X- Achse asymptotisch annähert.

In diesem Experiment kann ein geringer Effekt der Kombination bei den Werten 6-7 nmol Doxorubicin gesehen werden – alle anderen Werte stellen sich als nicht signifikant dar.

Auch hier konnte die in der Literatur angegebene IC 50 von Imatinib nicht bestätigt werden, wie die gleichen Startpunkte der Kurven erkennen lassen.

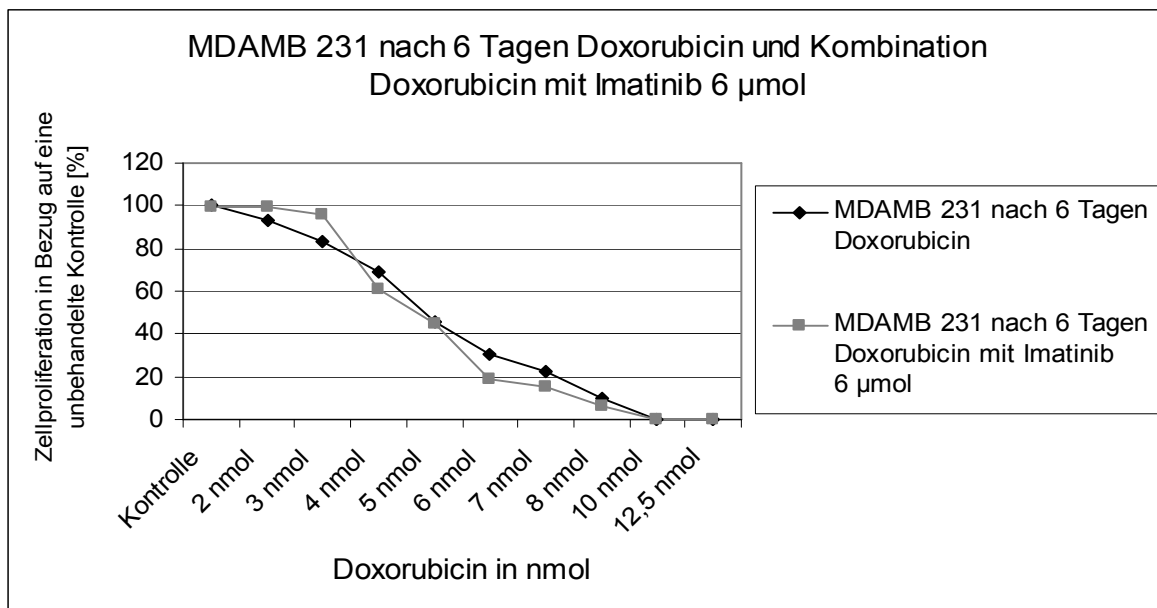


Abbildung 4: Wachstumskurve der MDAMB 231 Zellen unter Inkubation mit steigender Doxorubicin-konzentration und zusätzlicher Applikation von Imatinib in der IC 50 Konzentration von 6 µmol.

Die Paclitaxelwerte für die MDAMB 231 Zelllinie sind ebenfalls geringer als die beschriebenen Doxorubicinwerte. Dieser Versuch wurde mit den Konzentrationen von 0,1nmol-1nmol wiederum in Einzel- und Kombinationsinkubation mit 6 µmol Imatinib durchgeführt. Es wurden 250 Zellen über sechs Tage mit den Medikamenten bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert.

Bei der Auswertung stellt sich sowohl die Paclitaxel-Kurve als auch die Kombinationskurve S-förmig dar. Der Abfall der beiden Kurven lässt sich in Abbildung 5 gut zwischen 0,2 nmol mit 68% und 0,3 nmol mit 20 % ablesen. Eine IC 50 für Paclitaxel und MDAMB 231 lässt sich daher nur ungenau bestimmen.

Einen signifikanten Unterschied zwischen der Mono- und der Kombinationstherapie lässt sich auch hier mit dieser Testmethode nicht feststellen.

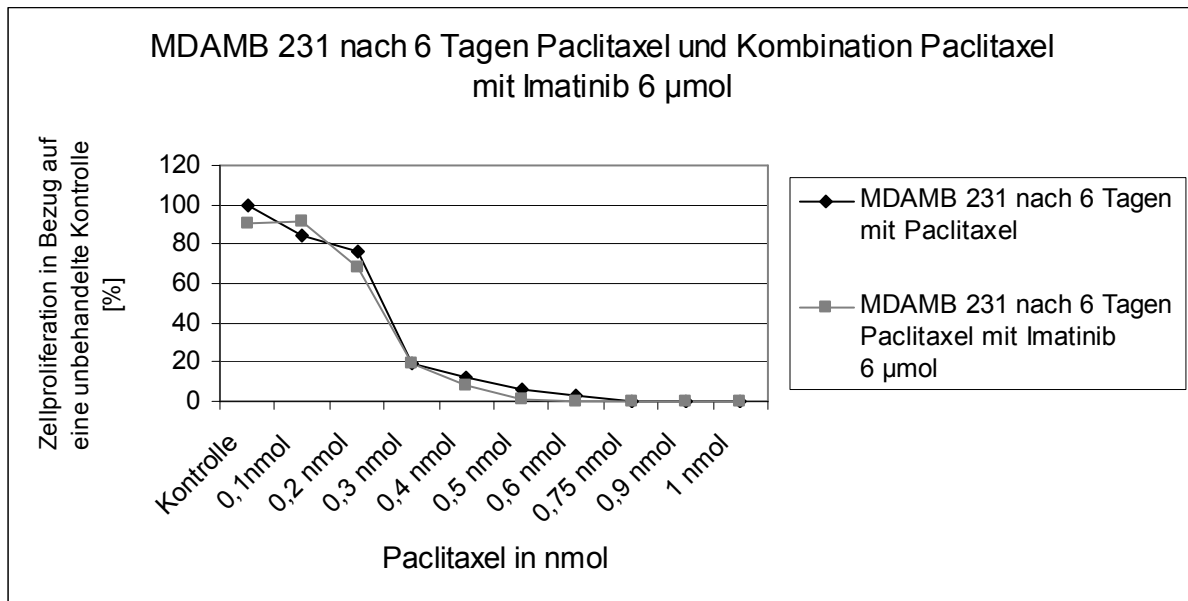


Abbildung 5: Wachstumskurve der MDAMB 231 Zellen unter Inkubation mit steigenden Paclitaxelkonzentrationen und der zusätzlichen Applikation von Imatinib in der IC 50 von 6 µmol

3.1.2 Ergebnisse des MTT-Assay für Nilotinib

Als Tyrosinkinaseinhibitor der zweiten Generation wurde Nilotinib hinsichtlich der Fragestellung untersucht, in welchem Konzentrationsbereich sich die IC 50 für die beiden Mammakarzinomzelllinien MCF7 und MDAMB 231 bewegen.

In Vorversuchen wurde Nilotinib sowohl in dem Standardmedium als auch in der DMSO-Pufferlösung hergestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied der beiden Lösungsmedien in Bezug auf die Zellproliferation festgestellt werden. Aufgrund dieses Resultates wurde Nilotinib in den folgenden Versuchen im Standardmedium gelöst.

Für MCF7 wurden ca. 1500 Zellen sowie für MDAMB 231 250 Zellen verwendet.

Bei der Zelllinie MDAMB 231 konnte auch nach mehrfacher Wiederholung der MTT-Methode kein aussagekräftiges Ergebnis hinsichtlich der IC 50 von Nilotinib erzielt werden. Es wurden bis zu dem Zeitpunkt die Standardversuchsbedingungen, wie bei Imatinib, angewandt: Ein Wechsel des Zytostatika-enthaltenden Mediums erfolgte nach 48 Stunden insgesamt dreimal, um die Auswertung nach einer sechstägigen Inkubation vorzunehmen.

Die Versuchsbedingungen wurden daraufhin mehrmals variiert. Nach zwei Tagen konnte bei der Zellreihe MDAMB 231 folgendes Ergebnis festgestellt werden: Die IC 50 liegt wie in Abbildung 6 ersichtlich ist zwischen 3-4 µmol.

Der Nilotinibkonzentrationsbereich unter 4 µmol spielt klinisch eine wichtige Rolle, aufgrund dessen, dass bei der Behandlung von imatinibresistenten CML-Patienten eine

Plasmahöchstkonzentration von 3,6 μmol bei einer Dosis von 400 mg zweimal täglich festgestellt wurde (Weisberg, E. et al. 2006).

Nach Aussage dieser Studien gilt das Ergebnis für MDAMB 231 als klinisch relevant.

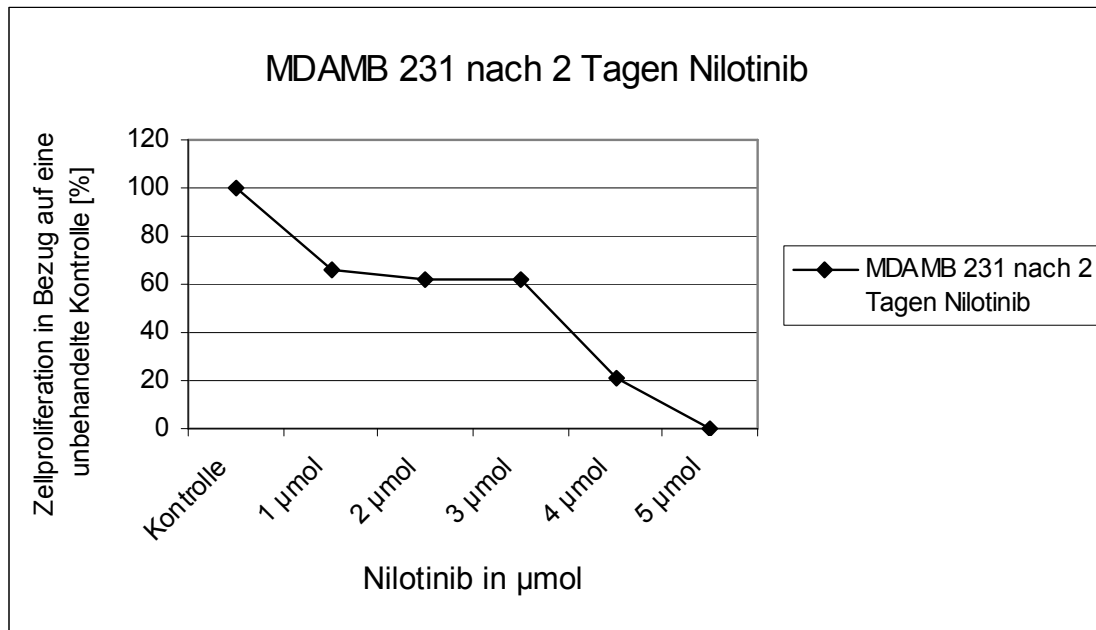


Abbildung 6: Wachstumskurve der MDAMB 231 Zellen unter Inkubation mit steigenden Nilotinib-Konzentrationen über sechs Tage: Das Zellwachstum nimmt bei steigenden Konzentrationen ab.

Auch die Zelllinie MCF7 wurde einer Nilotinibinkubation unterzogen. Die Abbildung 7 zeigt das Ergebnis des Versuchs unter Standardbedingungen:

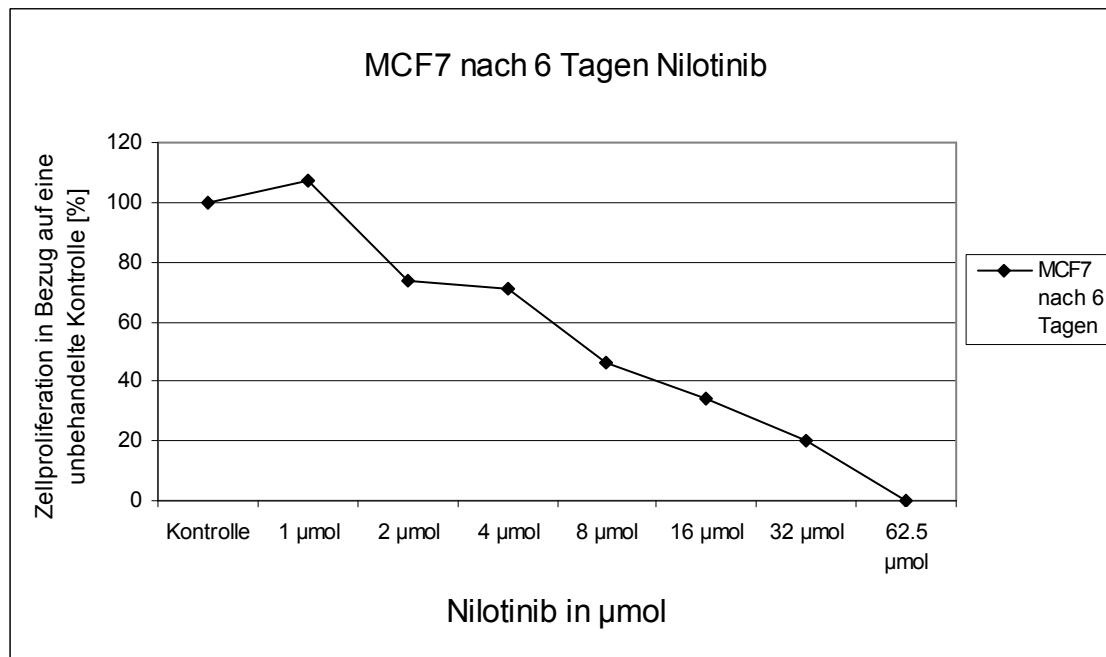


Abbildung 7: Wachstumskurve der MCF7 Zellen unter Inkubation mit ansteigenden Nilotinibkonzentrationen über sechs Tage: Bei ansteigenden Medikamentenkonzentrationen sinkt das Zellwachstum dieser Zelllinie.

Die Wachstumskurve in Abbildung 7 zeigt einen Abfall bei zunehmender Nilotinibkonzentration. Die IC 50-Konzentration, demonstriert in Abbildung 7, liegt ca. bei 8 μmol (46%). Dieser Wert ist für die Behandlung von Patienten im klinischen Alltag zu hoch. Ein Plasmaspiegel von 8 μmol würde zu toxischen Nebenwirkungen wie Thrombozytopenie oder einem Anstieg der Aminotransferasen führen.

Die anschließenden Kombinationsversuchsreihen konzentrierten sich daher auf eine Nilotinibkonzentration von 4 μmol .

Die Zellreihe MCF7 wurde unter Standardversuchsbedingungen mit denselben Paclitaxelkonzentrationen wie zuvor im Imatinibversuch versetzt. Die Kombination dieser Konzentrationen erfolgte daraufhin mit 4 μmol Nilotinib.

Die Abbildung 8 zeigt einen flachen konzentrationsbedingten Abfall der beiden Kurven. Die Ergebnisse der Paclitaxel Kurve fallen jedoch nicht unter 53%.

Die Kurve der Kombinationsinkubation weist ebenfalls einen sehr flachen Verlauf auf. Der Endpunkt bei 2,5 nmol plus 4 μmol Nilotinib beträgt 38%, dies bedeutet einen Unterschied in der Zellproliferation von 15%. Die Abbildung 8 zeigt, dass die Wachstumskurve der Kombinationsinkubation stets unter der Einzeltherapiekurve liegt, dies beinhaltet die Bedeutung eines zusätzlichen Effekts von Nilotinib in diesem Versuch.

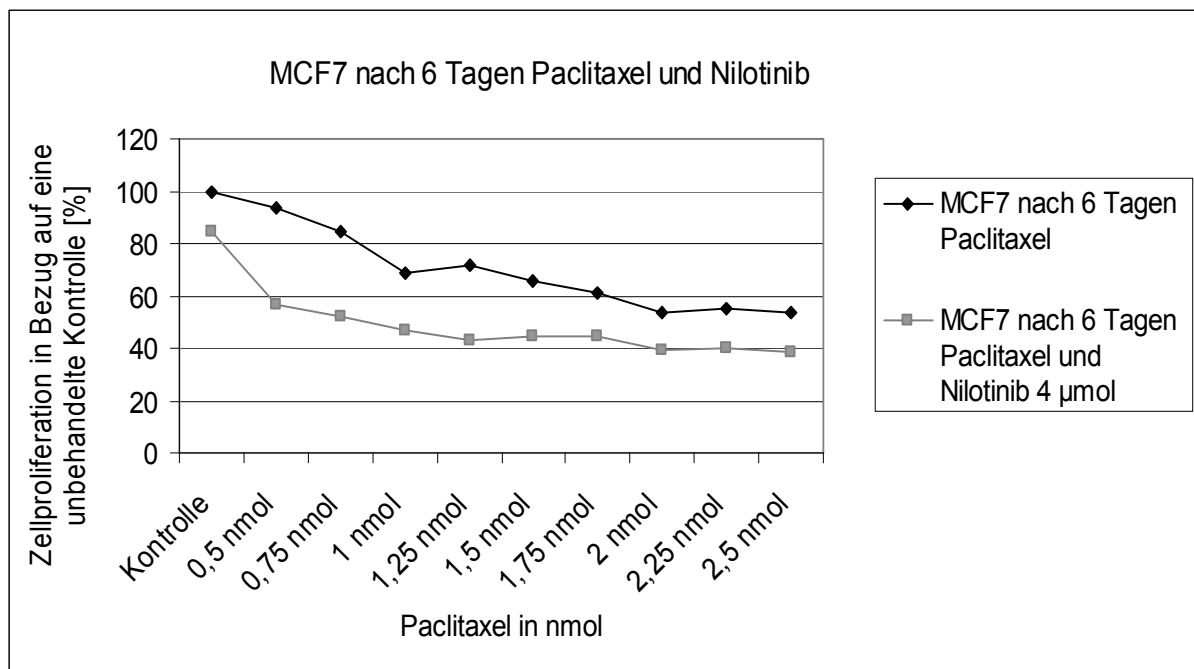


Abbildung 8: Wachstumskurve der MCF7 Zellen unter Inkubation mit steigenden Paclitaxelkonzentrationen und zusätzlicher Applikation von 4 μmol Nilotinib.

3.1.3 Ergebnisse der Zellzählung

Um die Ergebnisse des MTT zu überprüfen, wurde sich einer weiteren Methode bedient: Die manuelle Zellzählung. Die erste Versuchsreihe sollte dabei des generellen Abgleichs, der in der Literatur angegebenen und den von uns erzielten Ergebnisse im MTT bezüglich der IC 50- Konzentration von Imatinib, gelten.

Dafür wurde die Zellreihe MCF7 mit 20.000 Zellen pro μl auf 12-well-Platten ausgebracht und über die Standardinkubationsdauer von sechs Tagen mit Imatinib bis 12 μmol inkubiert.

Die Abbildung 9 zeigt, dass in diesem Versuch die IC 50-Konzentration von Imatinib mit 6-7 μmol bestätigt werden konnte (48%), welches mit der zuvor verwendeten MTT Methode nicht gelungen war. Der Wert bei 8 μmol liegt bei 54%, danach ist ein deutlicher Abfall der Kurve bis zum Endpunkt mit 17,3% bei 12 μmol zu erkennen.

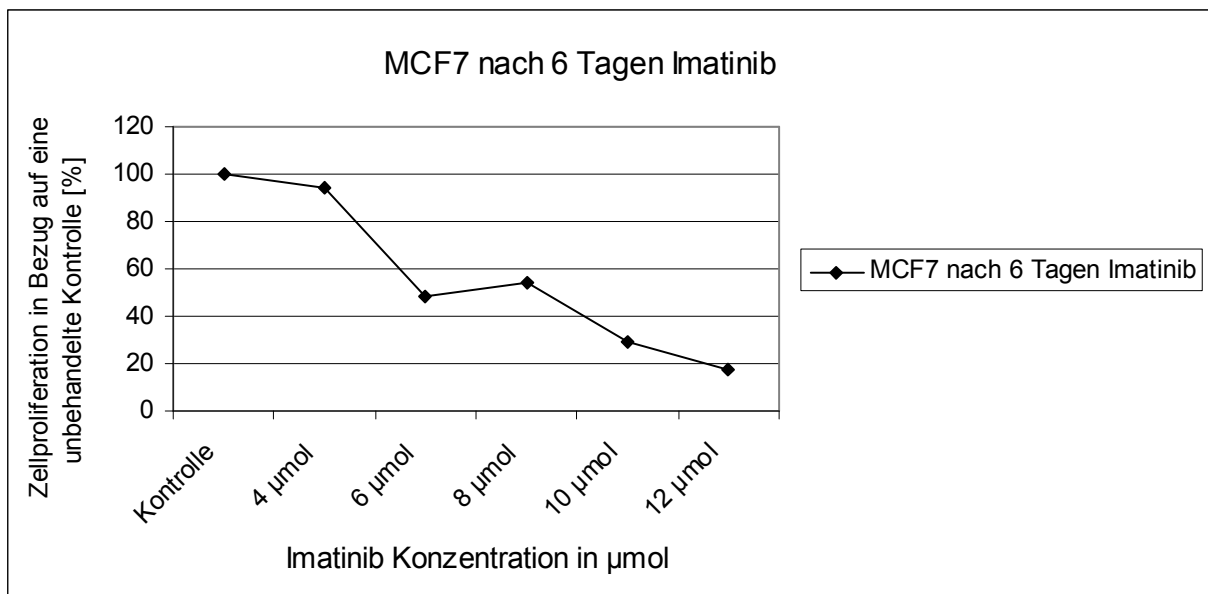


Abbildung 9: Wachstumskurve der MCF7 Zellen unter Inkubation mit ansteigender Imatinibkonzentration über sechs Tage im Zellzählungsversuch. Wachstumsinhibition ist bei steigender Konzentration zu erkennen.

Diese Art der Versuchsauswertung wurde auch für MDAMB 231 durchgeführt, um den Literaturwert von 6 μmol nachzuweisen. Es wurden im Gegensatz zu MCF7 nur 2000 Zellen verwendet.

In Abbildung 10 lässt sich ein schulterförmiger Verlauf der Versuchskurve erkennen.

Nach zunächst geringem Abfall der Zellzahl lässt sich mit ansteigender Konzentration eine zunehmende Verringerung der Zellen verfolgen. Bei 6 μmol liegt der Wert bei 50,1%, damit kann auch bei dieser Darstellung die in der Literatur angegebene IC 50 von Imatinib

bestätigen werden, welches zuvor mit der MTT-Methode, wie bei der Zelllinie MCF7, nicht gelungen war.

Bei 7 μmol liegt der Wert knapp unter 50%, um sich dann der X-Achse zu nähern. Die Zellproliferation bei 10 μmol beträgt 10% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

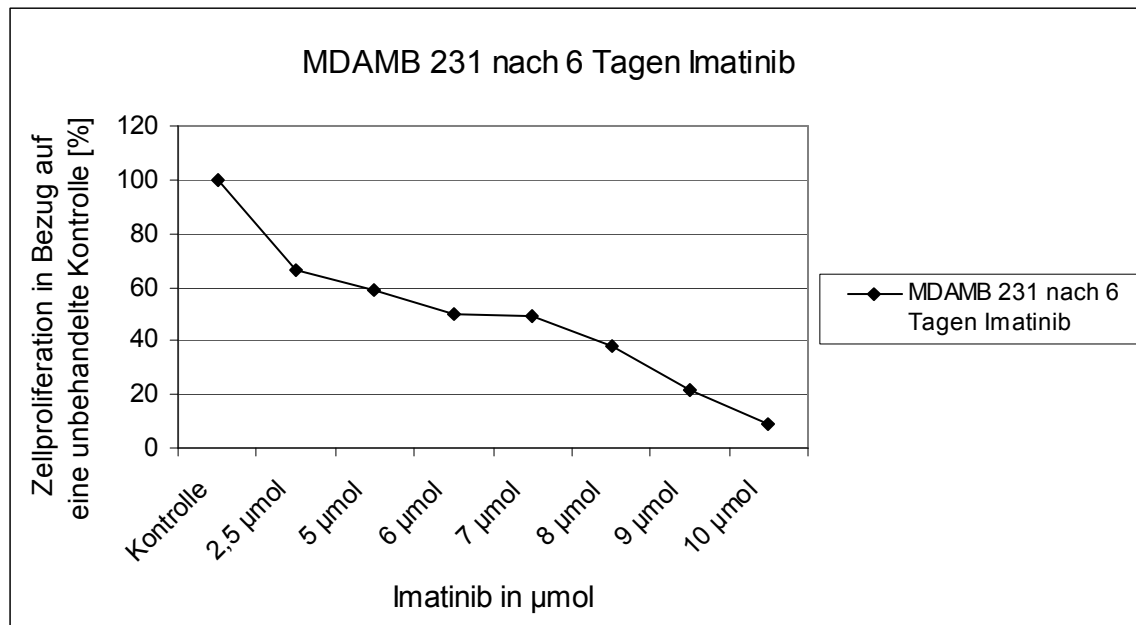


Abbildung 10: Wachstumskurve der MDAMB 231 Zellen unter Inkubation mit ansteigender Imatinibkonzentration über sechs Tage im Zellzählungsversuch. Es ist eine Wachstumsinhibition bei steigender Konzentration zu erkennen.

Auch die Ergebnisse der Kombinationsmedikamente wurden erneut untersucht, um eine geeignete Ausgangsbasis für die folgenden Kombinationsversuche zu haben. Als Beispiel ist hier MCF7 mit Doxorubicin in Abbildung 11 dargestellt. Die im MTT abgelesene IC 50 von 50 nmol kann hier nicht bestätigt werden. Die applizierten Konzentrationen sind nach der Zellauszählung um eine zehner Potenz zu hoch und wurden daher für die folgenden Kombinationsversuche verringert.

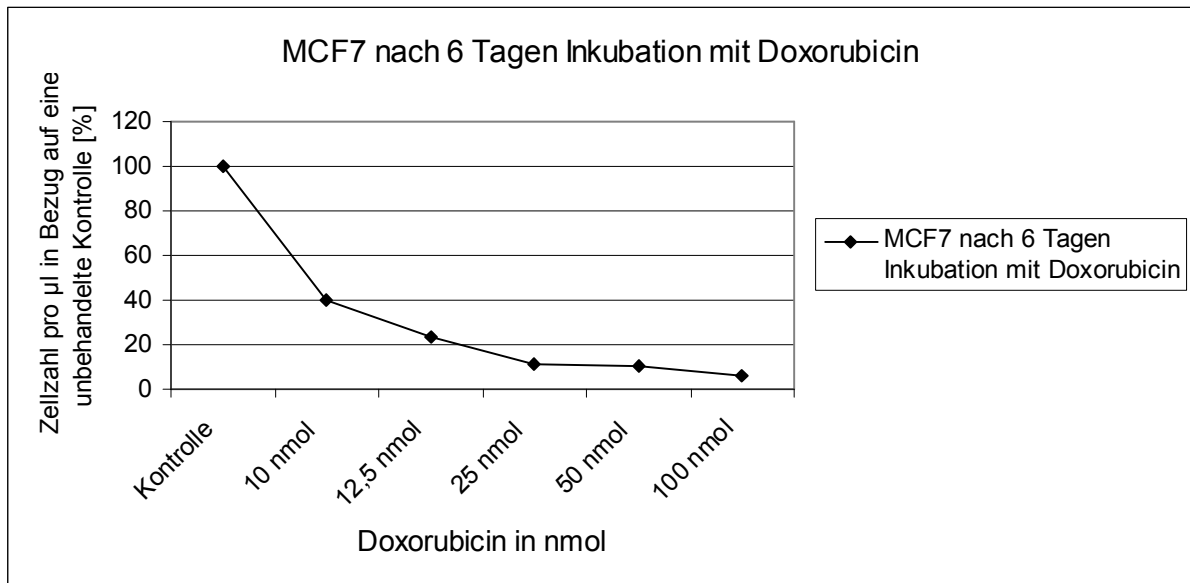


Abbildung 11: (Beispielhaft) Wachstumskurve der MCF7 Zellen unter Inkubation mit ansteigender Doxorubicin Konzentration über sechs Tage im Zellzählungsversuch. Es ist eine Wachstumsinhibition zu erkennen.

Nach den Einzelinkubationen der Medikamente folgten, wie bei der MTT-Methode, die Kombinationsinkubationen mit Imatinib, um der Fragestellung nachzugehen, ob Imatinib einen zusätzlichen inhibitorischen Effekt unter der Behandlung mit Doxorubicin auszuüben vermag. Bei den Kombinationsversuchen konzentrierten wir uns auf Doxorubicin mit Imatinib.

Die Zelllinie MCF7 wurde aufgrund der in den Vorversuchen erzielten Ergebnisse schrittweise mit einer steigenden Doxorubicin Konzentration bis 12,5 nmol versetzt. Die Kurve der Doxorubicin Monotherapie zeigt einen S-förmigen Verlauf mit einer IC 50-Konzentration bei 5 nmol - bei höheren Doxorubicinwerten nähert sich die Kurve der X-Achse asymptotisch an. Der Endpunkt bei 12,5 nmol ergibt eine Proliferationshemmung von 75% in Bezug auf die unbehandelte Zellkontrolle.

Die Kombinationskurve in Abbildung 12 liegt bei allen Doxorubicin Konzentrationen, die zusätzlich 6 µmol Imatinib enthalten, unterhalb der Kurve der Monotherapie. In diesem Versuch konnte die IC 50-Konzentration 6 µmol von Imatinib erneut bestätigt werden, was anhand des Startpunktes der grauen Kurve abgelesen werden kann (50,5%). Dieser Punkt entspricht der Zellprobe, die mit 6 µmol Imatinib behandelt wurde in Bezug auf die unbehandelten Zellen. Der größte Effekt der Kombination zeigt sich hier bei dem Werte von 2,5 nmol: Die Monotherapie zeigt ein Proliferationswert von 85%, die Kombination nur 34%. Bei der IC 50 Konzentration von Doxorubicin mit 5nmol wird unter

Kombinationsbedingungen eine Zellproliferation von nur 27% abgelesen. Ein signifikantes Ergebnis der Kombinationsmedikation im Gegensatz zur Monotherapie ist bei den meisten Konzentrationen, die für das Experiment gewählt wurden, zu erkennen.

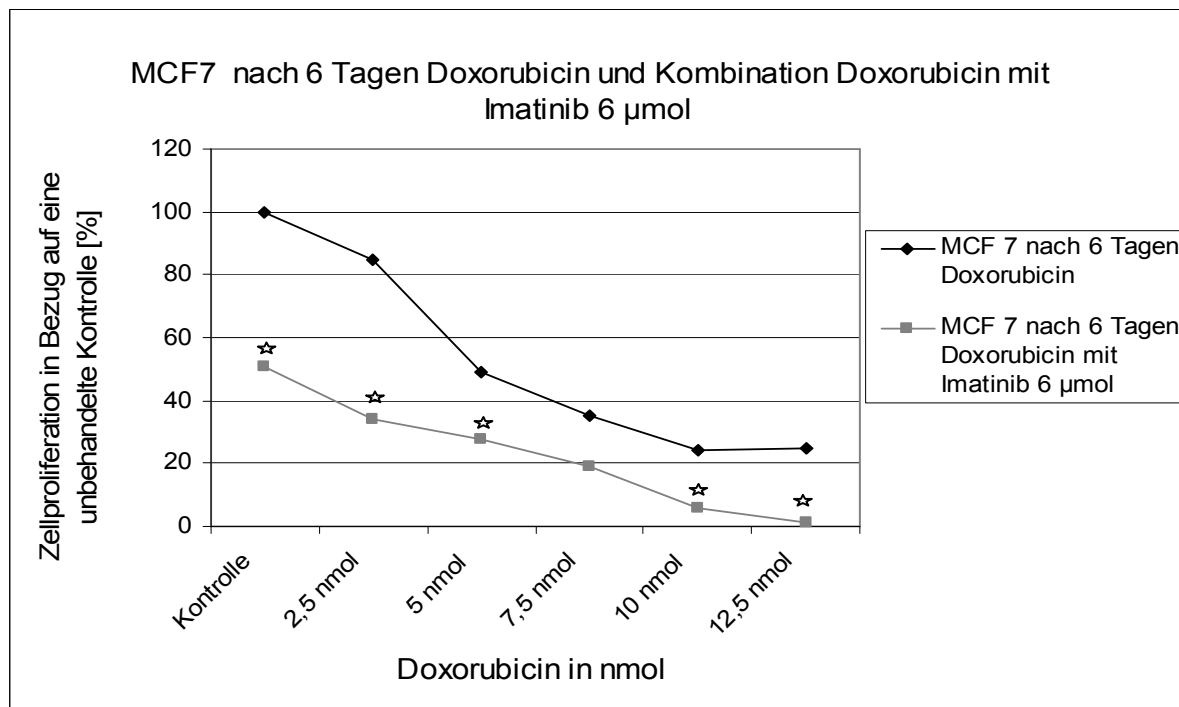


Abbildung 12: Wachstumskurven der MCF7 unter Inkubation mit steigenden Doxorubicin Konzentrationen und der zusätzlichen Applikation vom Imatinib in der IC 50 von 6 µmol; *p-Werte < 0,05.

Für die Zellreihe MDAMB 231 wurde derselbe Versuchsaufbau verwendet, um auch hier die zusätzliche Proliferationsinhibition mit Imatinib bei 6 µmol zu testen.

Für MDAMB 231 wurden 2000 Zellen verwendet und die Doxorubicin Konzentrationen bis insgesamt 2 nmol aufgetragen. Die gewählte Angabe stellte sich in Vorversuchen als eine geeignete maximale Konzentration heraus. Im Vergleich zur zuvor beschriebenen MTT-Methoden liegen die Doxorubicinwerte für MDAMB 231 genau wie bei MCF7 deutlich niedriger.

In Abbildung 13 lässt die Kurve der Monotherapie (schwarz) einen konzentrationsbedingten Abfall bis 16% bei 2 nmol erkennen. Die IC 50-Konzentration von Doxorubicin liegt nach dieser Auswertung bei 1 nmol (56%). In diesem Versuch ist es wie in den Vorversuchen gelungen, die IC 50 von 6 µmol für Imatinib zu bestätigen (47%). Die Kombinationskurve (grau) lässt einen zusätzlichen inhibitorischen Effekt der Kombination der beiden Medikamente erkennen. Der größte Proliferationsunterschied ist bei einer Konzentration von 0,5 nmol zu verzeichnen: Mit einem Monotherapiewert von 80% und einem Kombinationswert von 43% in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. Danach nähern sich beide Kurven der X-Achse an. Bei einer zusätzlichen Applikation von Imatinib wurde die

Zellproliferation bis zu einer Konzentration von 1 nmol - im Gegensatz zur Monotherapie - signifikant gehemmt.

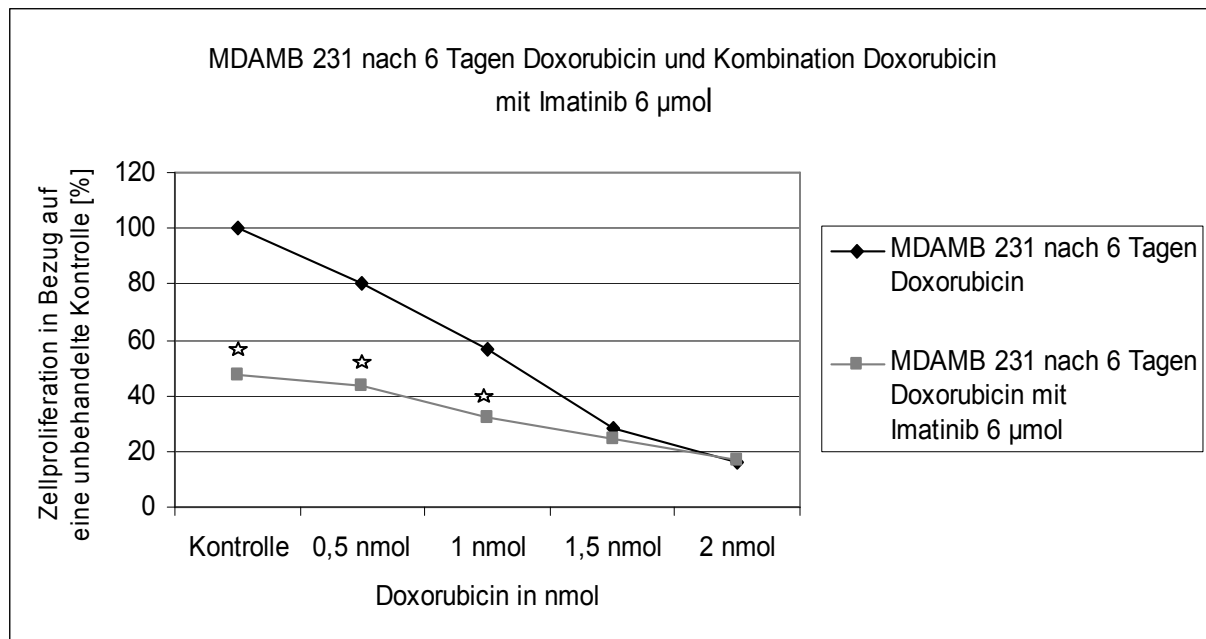


Abbildung 13: Wachstumskurve der MBAMD 231 unter sechstägiger Inkubation mit steigenden Doxorubicin Konzentrationen und der Applikation von Imatinib in der IC 50 von 6 µmol; * p-Werte <0,05.

Die folgenden Kombinationsexperimente wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob Imatinib einen additiven oder einen synergetischen Effekt auf die Behandlung mit dem Zytostatikum Doxorubicin hat.

In dieser Versuchsreihe wurden die MCF7 Zellen und die MDAMB 231 Zellen mit steigenden Konzentrationen sowohl von Imatinib als auch von Doxorubicin als Mono- oder Kombinationstherapie inkubiert (siehe Abbildung 14 und 15). Die Medikamentenkonzentrationen wurden für jede Zelllinie wie folgt appliziert: 0,25 x IC50; 0,5 x IC50; 1 x IC50 und 2 x IC50. Dieser Versuchsaufbau mit zusätzlicher Variation des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib stellt einen Unterschied zu den zuvor durchgeführten Experimenten dar, in denen die Imatinibkonzentration immer dem IC50 Wert von 6 µmol entsprach. Die Standardversuchsbedingungen über sechs Tage wurden angewandt.

In Abbildung 14 zeigt die Zelllinie MCF7 einen deutlichen Abfall der Zellproliferation mit steigenden Medikamentenkonzentrationen. Die Proliferationsinhibition von Imatinib bei den verschiedenen Konzentrationen ist stärker als die von Doxorubicin in der Monotherapie. Die Ergebnisse der Kombinationen 1 x IC50 und 2 x IC50 sind als signifikant zu bewerten ($p < 0,05$).

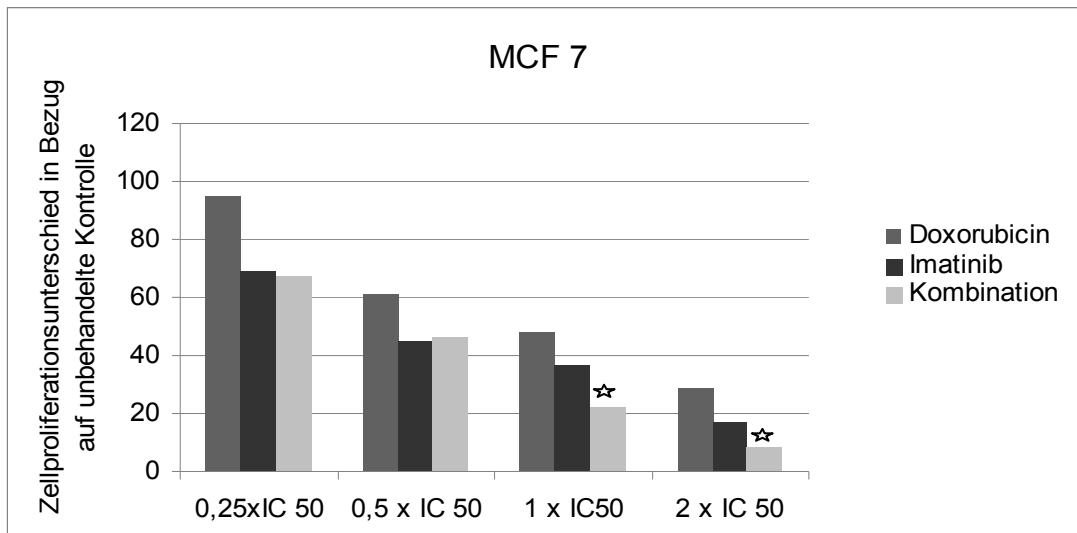


Abbildung 14: Kombination von Imatinib mit Doxorubicin führt zur vermehrten Wachstumsinhibition bei MCF7 nach sechs Tagen Inkubation;* p-Werte < 0,05

Bei der Zelllinie MDAMB 231 ist in Abbildung 15 eine stärkere Inhibition des Monotherapeutikums Doxorubicin zu erkennen im Gegensatz zu Imatinib und zu MCF7. Die Kombinationsergebnisse bei 0,25 x IC50, 1 x IC50 und 2 x IC50 weisen einen signifikanten p-Wert auf (Calculusyn Software).

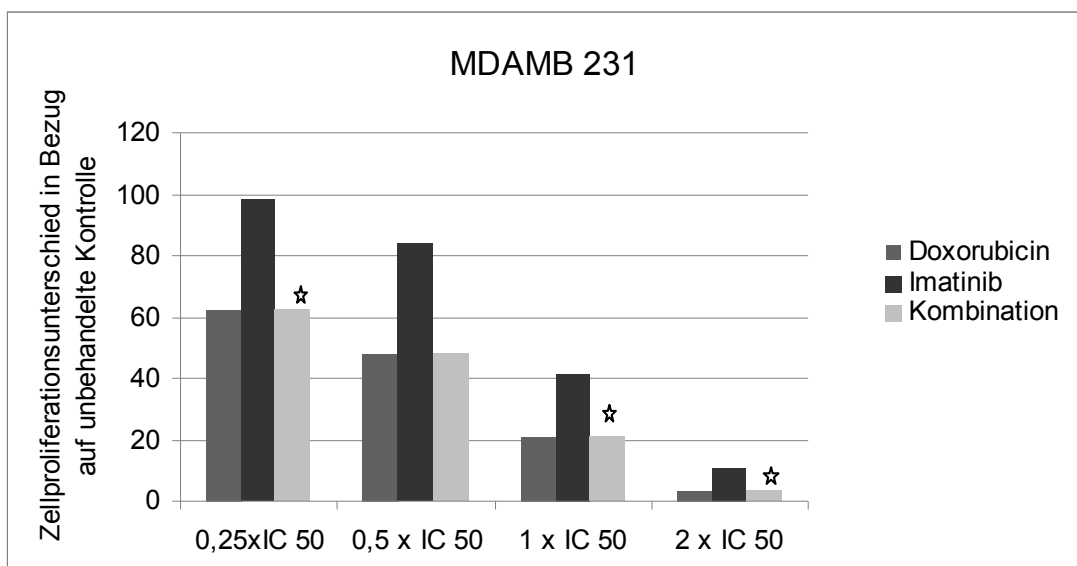


Abbildung 15: Kombination von Imatinib mit Doxorubicin führt zur vermehrten Wachstumsinhibition bei MDAMB 231 nach sechs Tagen Inkubation; * p-Werte < 0,05.

Des Weiteren wurden anhand dieser Versuchsergebnisse die Dosisquotienten gebildet und Kombinationsindizes mit Hilfe der Calculusyn Software berechnet (Tabelle 1). Diese Berechnung ergibt einen additiven Effekt der Zellproliferation von MDAMB 231 bei einem Dosisverhältnis von 1:6000 (Doxorubicin: Imatinib), welches die beiden IC 50-Konzentrationen der Medikamente enthält.

Die Zelllinie MCF7 zeigt einen additiven Effekt der beiden Kombination der beiden Medikamente (1:1200) bei höheren Konzentrationen. Ein antagonistischer Effekt ergibt sich bei Werten unterhalb der IC 50-Werte bei beiden Medikamenten. Bei der Zelllinie MDAMB 231 zeigen beide Therapeutika einen additiven Effekt bei der Inhibition der Zellproliferation.

MDA MB 231						
Drug	Combination Index Values at			Dm (nM)	m	r
	ED 50	ED75	ED90			
Combination (1:6000)	1.11214	1.01224	0.99765	0.39732	1.84658	0.96979
Doxorubicin	N/A	N/A	N/A	0.57999	1.15437	0.97662
Imatinib	N/A	N/A	N/A	5581.5821	2,92342	0.99784

MCF 7						
Drug	Combination Index Values at			Dm (nM)	m	r
	ED 50	ED75	ED90			
Combination (1:1200)	1.32605	1.10981	0.95853	2.03607	1.48647	0.99769
Doxorubicin	N/A	N/A	N/A	4.56443	1.58527	0.96108
Imatinib	N/A	N/A	N/A	7487.20892	1.04304	0.98481

ED 50 (effect dosis 50%), Dm (IC50) calculated, m (measures of sigmoidicity), r(correlation coefficient)

Tabelle 1: Berechnung von Kombinationsindizes für die Mono- und Kombinationsinkubation der Mammakarzinomzelllinien MCF7 und MDAMB 231.

Aus dieser Versuchsreihe kann folgendes Fazit abgeleitet werden: Die Kombination von Imatinib und Doxorubicin führt zu einer gesteigerten Inhibition der Zellproliferation.

3.2 TUNEL-Assay

Der TUNEL-Assay ist eine spezifische Methode, um Zellen, die in Apoptose gehen, nachzuweisen. Hier wurde der TUNEL-Assay angewendet, um zu untersuchen, ob die Zellen, die mit einer Medikamentenkombination von Doxorubicin und dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib eine höhere Apoptoserate aufweisen als unbehandelte Zellen oder Zellen, die nur mit einem Medikament behandelt wurden. In einem weiteren Experiment wurde untersucht inwiefern der Tyrosinkinaseinhibitor Nilotinib in der Lage ist eine apoptotische Wirkung auf die Mammakarzinomzellen auszuüben. Es wurden wieder die Standardzelllinien MCF7 und MDAMB 231 verwendet. Als Zeitintervalle wurden für den TUNEL-Assay mit Imatinib 24 und 48 Stunden gewählt, für den TUNEL-Versuch mit Nilotinib 24 und 72 Stunden.

3.2.1 TUNEL-Assay mit Imatinib

Die Auswertung des Apoptosetests für MDAMB 231 in Abbildung 16 zeigt, dass eine Inkubation mit Imatinib über 24 bzw. 48 Stunden eine 10%ige Apoptoserate der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zur Folge hat. (Bilder siehe Anhang)

Die Monoinkubation mit Doxorubicin weist für diese Zelllinie Apoptoseraten von 18% bzw. 13% nach 24 bzw. 48 Stunden auf. Die Kombinationsinkubation ergibt eine Apoptoserate von 12% und 9% zu den angegebenen Zeitpunkten und konnte die Rate, der zugrunde gehenden Zellen somit nicht erhöhen.

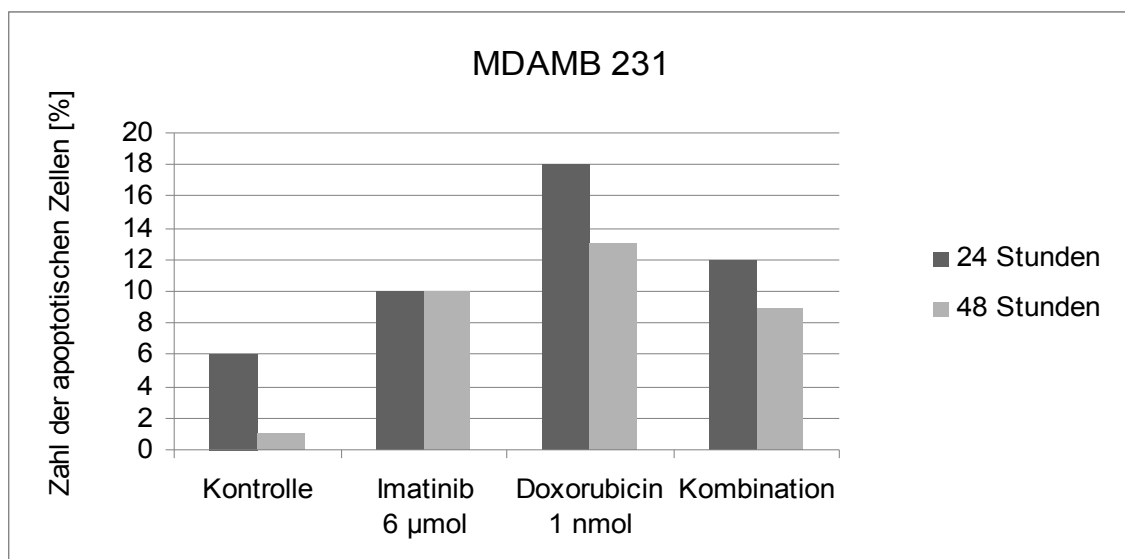


Abbildung 16: Effekt von Imatinib und Doxorubicin auf die Apoptose von MDAMB 231 Zellen nach 24 und 48 Stunden.

Für die Zellreihe MCF7 wurde der TUNEL-Assay mit zwei Doxorubicin Konzentrationen mit 2,5 nmol und 5 nmol (IC 50 nach Vorversuchen) alleine und in Kombination mit Imatinib durchgeführt. Imatinib wurde mit der IC 50-Konzentration 6 µmol angewendet.

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der Auswertung nach 24 Stunden bzw. 48 Stunden für die 2,5 nmol Doxorubicin Konzentration.

Hierbei ist auffällig, dass die Apoptoserate nach 24 Stunden der beiden Monotherapien mit 28% für Imatinib und 33% für Doxorubicin relativ hoch ist. Die Apoptoserate nach der Kombination jedoch nicht über der der Einzelinkubationen liegt mit 18%. Nach 48 Stunden nimmt die Rate der apoptotischen Zellen bei Imatinib mit 6 µmol stark ab und beträgt nur noch 11%. Ebenfalls nach 48 Stunden ist eine Reduktion der Apoptose um 5% im Vergleich zu dem 24 Stunden Ergebnis der Doxorubicin Inkubation zu erkennen. Die Rate der Kombinationsinkubation steigt auf 28% nach 48 Stunden im Vergleich zu 18% bei der 24 Stunden-Inkubation.

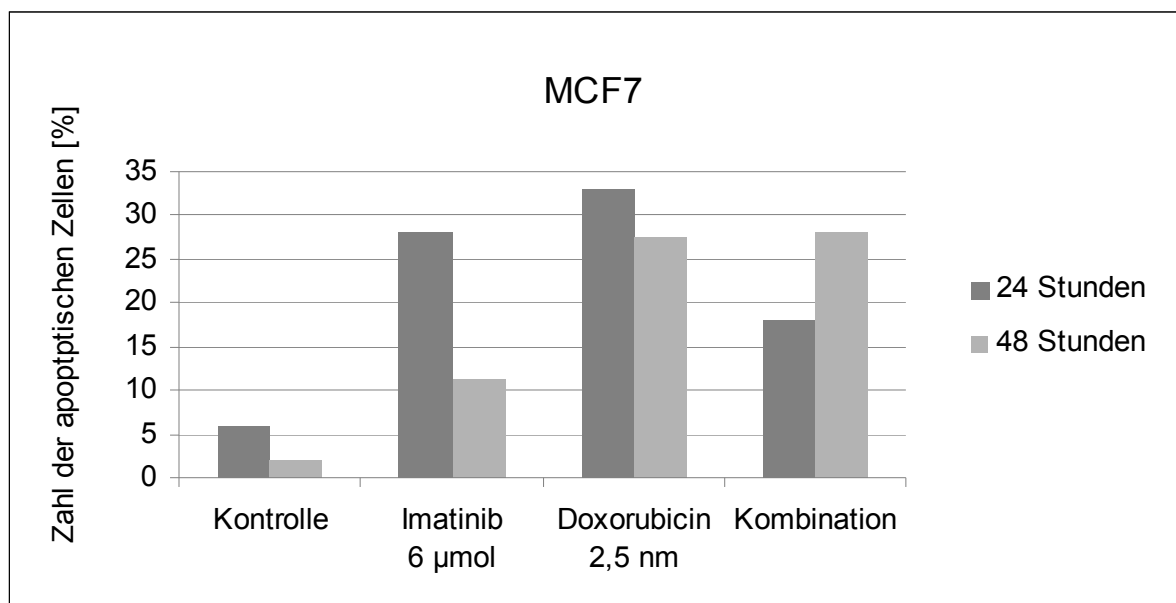


Abbildung 17: Effekt von Imatinib mit 6 µmol und Doxorubicin 2,5 nmol auf die Apoptose von MCF7 Zellen nach Inkubation von 24 und 48 Stunden.

Die Auswertung des zweiten TUNEL-Assays für MCF7 – dieses Mal mit beiden IC 50 Konzentrationen der Medikamente für diese Zelllinie (Doxorubicin mit 5 nmol und Imatinib mit 6 µmol) – ist in Abbildung 18 dargestellt. (Siehe zusätzlich Anhang)

Nach 24 Stunden ist die Apoptoserate der Zellen sowohl für die Monotherapie als auch für die Kombinationstherapie annähernd gleich mit einem Wert von ca. 28%. Nach 48 Stunden zeigt sich ein Absinken der Apoptoserate sowohl für Imatinib mit 6 µmol als auch für Doxorubicin mit 5 nmol auf 15% bzw. 11%. Die Kombination präsentiert einen starken Anstieg der

Apoptoserate in der Kombination auf 34% im Gegensatz zu den Einzelinkubationen und kann damit als signifikant bezeichnet werden ($p < 0,05$).

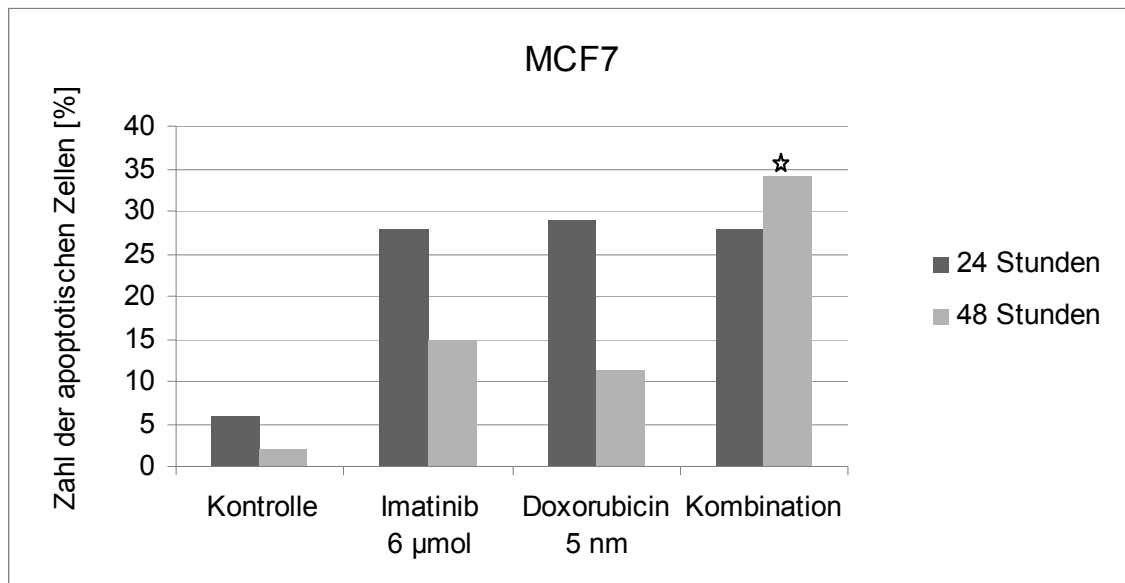


Abbildung 18: Effekt von Imatinib mit 6 µmol und Doxorubicin 5nmol auf die Apoptose von MCF7 Zellen nach Inkubation von 24 und 48 Stunden; * p-Werte < 0,05

Imatinib und Doxorubicin führen zu einem apoptotischen Effekt sowohl in MDAMB 231 als auch in MCF7 Zellen, jedoch kann eine erhöhte Apoptoserate bei der Kombinationsinkubation nur bei der Zelllinie MCF7 festgestellt werden.

3.2.2 TUNEL-Assay mit Nilotinib

Die TUNEL-Methode wurde mit den beiden Standardzelllinien ebenfalls für den Tyrosinkinaseinhibitor Nilotinib durchgeführt, um der Fragestellung nachzugehen in wie weit Nilotinib in der Lage ist die Apoptoserate der Mammakarzinomzellen zu erhöhen. Der Versuchsaufbau folgte wie zuvor im TUNEL-Experiment den Literatur- und Herstellerangaben, nur die Inkubationszeiten variierten in diesem Experiment mit 24 und 72 Stunden.

Die Werte 2 und 4 µmol Nilotinib wurden anhand von Literaturangaben – wie bereits beschrieben - gewählt.

Die Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der Zelllinie MCF7. Nach 24 Stunden ist eine erhöhte Apoptoserate von 9% für 2 µmol und 19% für 4 µmol festzustellen. Nach 72 Stunden wird in der Kontrolle eine Apoptoserate von 7% gemessen. Für die Konzentration 2 µmol bleibt die

Rate mit 9% konstant. Ein starker Anstieg der apoptotischen Zellen kann bei einer Konzentration von 4 μmol - nämlich 32% - verzeichnet werden.

Nilotinib ist in der Lage die Apoptoserate der Zelllinie MCF7 im Gegensatz zur Kontrolle der angegebenen Zeitpunkte signifikant zu steigern.

Im Gegensatz zu Imatinib, bei dem die Apoptoserate des Tyrosinkinaseinhibitors in der Monotherapie bei der zweiten Auswertung geringer war, erhöht sich bei Nilotinib die Rate der apoptotischen Zellen nach längerer Inkubation.

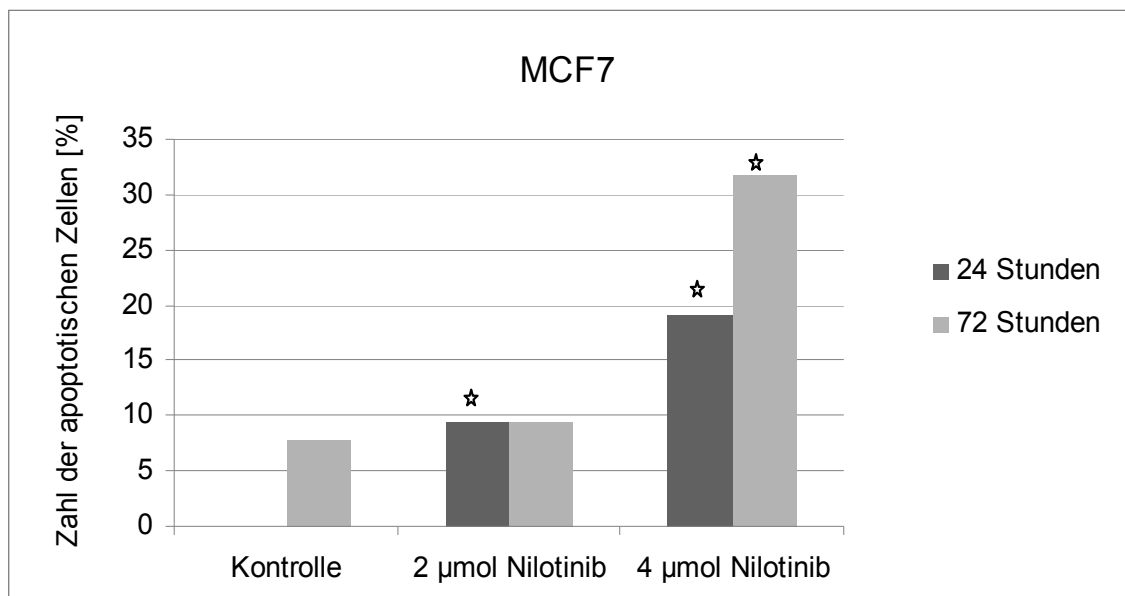


Abbildung 19: Effekt von Nilotinib mit 2 und 4 μmol auf die Apoptose von MCF7 Zellen nach Inkubation von 24 und 72 Stunden; * p- Werte < 0,05.

Die Zellreihe MDAMB 231 zeigte im TUNEL-Assay mit Nilotinib die in Abbildung 20 aufgeführten Ergebnisse. Nach 24-stündiger Inkubation zeigen sich bei der Konzentration 2 μmol und 4 μmol nur geringfügige Unterschiede: Apoptoserate 11%. Gegenüber der Kontrolle, die nach 24 Stunden keine apoptotischen Zellen aufwies, ist die Apoptoserate von 11% bei beiden Konzentrationen als signifikant zu bezeichnen. Die zweite Auswertung ergab für die Kontrolle 12%, für Nilotinib mit 2 μmol 33% und für 4 μmol Nilotinib 31% apoptotische Zellen. Die höhere Konzentration von 4 μmol Nilotinib ist bei dieser Zellreihe nicht in der Lage eine höhere Apoptoserate zu erzielen - verglichen mit der Konzentration 2 μmol . Jedoch ist Nilotinib in der Lage die Apoptoserate in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle um 22% zu erhöhen. Alle Ergebnisse können als signifikant in Bezug auf die Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt gewertet werden.

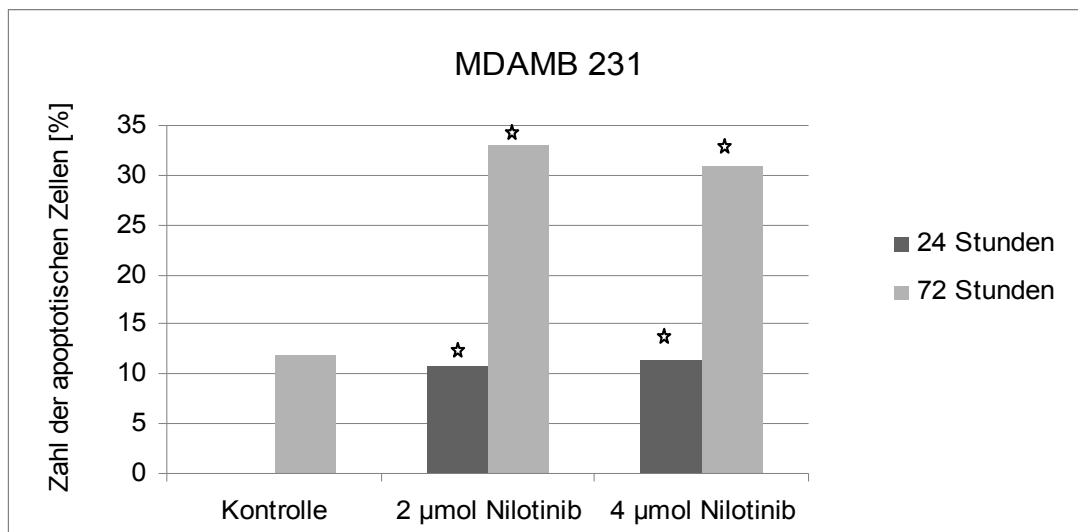


Abbildung 20: Effekt von Nilotinib mit 2 und 4 µmol auf die Apoptose von MDAMB 231 Zellen nach Inkubation von 24 und 72 Stunden; * p-Werte < 0,05.

Nilotinib ist in der Lage die Apoptoserate sowohl in der MCF7 als auch in der MDAMB 231 Zelllinie signifikant zu erhöhen.

Das Fazit der TUNEL-Assays für beide Mammakarzinomzelllinien lautet, dass die beiden Tyrosinkinaseinhibitoren Imatinib und Nilotinib einen positiven Effekt auf die Apoptose-neigung vor allem der MCF7 Zellen haben.

3.3 Migrations-Assay

Der Migrations-Assay wurde durchgeführt, um das wachstumshemmende Potenzial der Medikamente Doxorubicin und Imatinib als Monotherapie und als Kombinationstherapie in Bezug auf eine unbehandelte Probe zu testen.

Die Auswertung erfolgte wie im TUNEL-Assay für Doxorubicin und Imatinib nach 24 und 48 Stunden.

Migration MDAMB 231		
	24 Stunden	48 Stunden
Kontrolle	18%	41%
Doxorubicin	11%	18%
Imatinib	17%	35%
Kombination	18%	31%*

Tabelle 2: Migrationswerte der MDAMB 231 Zellen unter Inkubation von Doxorubicin und Imatinib Einzel und in Kombination nach 24 und 48 Stunden; *p-Werte < 0,05.

Für die Zelllinie MDAMB 231 wurde Doxorubicin in der IC 50-Konzentration von 1 nmol und Imatinib in der IC 50-Konzentration 6 µmol angewendet. Es wurde sowohl die Monotherapie als auch die Kombination der beiden Medikamente untersucht.

Das Diagramm in Abbildung 21 veranschaulicht die Invasion der Zellen in den Migrationsspalt und die mögliche Inhibition durch die Medikamente.

Die Kontrolle repräsentiert eine deutliche Invasion nach 24 Stunden von 18% und nach 48 Stunden von 41% im Vergleich zum Ausgangswert. Doxorubicin mit 1 nmol weist in der Monotherapie das stärkste inhibitorische Potenzial auf: Die Zellen sind nach 24 Stunden 7 % weniger und nach 48 Stunden 23% weniger in den Migrationsspalt immigriert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Imatinib mit 6 µmol zeigt eine nur sehr schwache proliferationshemmende Wirkung von 1% nach 24 Stunden und 6 % nach 48 Stunden.

Die Kombinationswerte, die in der Abbildung aufgeführt sind, stellen nicht das erhoffte Ergebnis eines starken wachstumshemmenden Effektes dar. Nach 24 Stunden weisen die MDAMB 231 Zellen das gleiche Wachstum auf wie die unbehandelte Kontrolle - nach 48 Stunden kann ein geringer Effekt von 10% festgestellt werden.

In diesem Experiment kann ein zusätzlicher Effekt von Imatinib auf die Behandlung mit Doxorubicin nicht nachgewiesen werden.

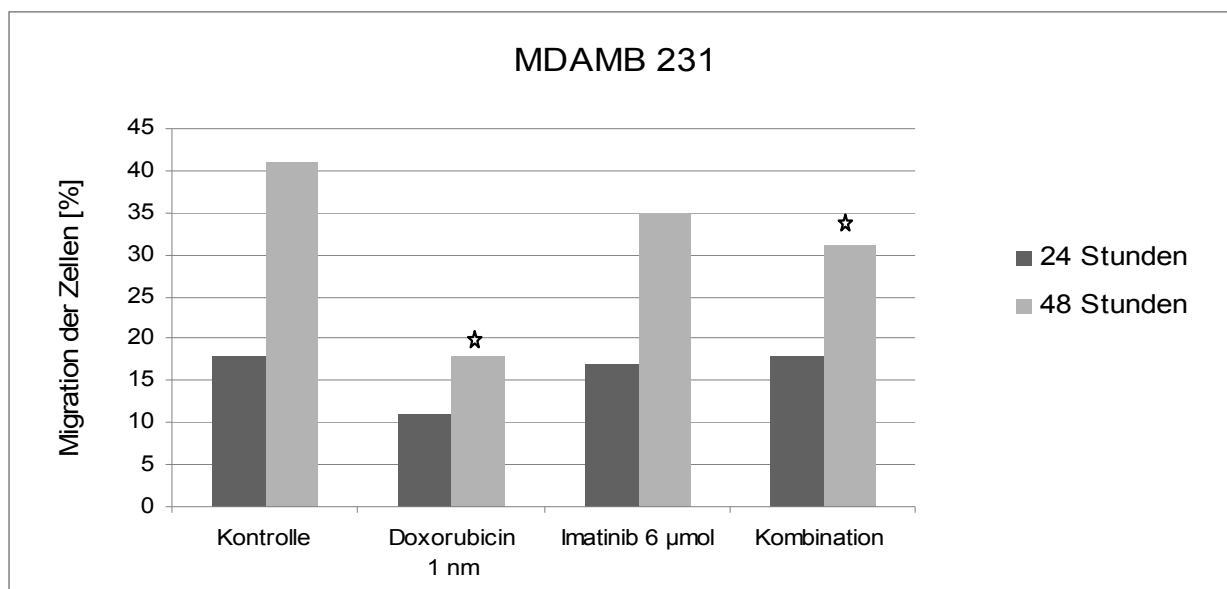


Abbildung 21: Migrationswerte der MDAMB 231 Zellen unter Inkubation von Doxorubicin und Imatinib einzeln und in Kombination nach 24 und 48 Stunden; *p-Werte < 0,05.

Für die hormonrezeptorpositive Zellreihe MCF7 wurde ebenfalls der *in vitro* cell Assay durchgeführt. Tabelle 3 und Abbildung 22 zeigen die nach 24 und 48 Stunden erzielten Messergebnisse.

Migration MCF7		
	24 Stunden	48 Stunden
Kontrolle	3%	24%
Doxorubicin 2,5 nmol	0%	10%
Doxorubicin 5 nmol	13%	18%
Imatinib	12%	23%
Kombination 2,5 nmol	9%	24%
Kombination 5 nmol	20%	28%

Tabelle 3: Migrationswerte der MCF7 Zellen unter Inkubation von Doxorubicin und Imatinib einzeln und in Kombination nach 24 und 48 Stunden.

Die Ergebnisse der Auswertungen lassen ein moderates Wachstum der Zellen in 24 Stunden und eine deutliche Invasion nach 48 Stunden erkennen. Das Wachstum konnte unter der Therapie mit Doxorubicin bei einer Konzentration von 2,5 nmol am Stärksten im Vergleich zu den anderen Werten gehemmt werden. Die Migration wurde hier mit 0% und mit nur 10% gemessen. In der höheren Doxorubicin Konzentration mit 5 nmol, in der ein geringes Wachstum erwartet wird, konnten die Zellen jedoch gar nicht (nach 24 Stunden) bzw. nur um 6% in ihrem Wachstum (nach 48 Stunden) gehemmt werden. Ähnliches konnte für Imatinib mit der IC 50-Konzentration von 6 µmol abgelesen werden: Keine Hemmung des Wachstums nach 24 Stunden. Nach 48 Stunden wurden die Zellen nur um 1% am Wachstum gehindert.

Die Kombinationsmedikationen zeigen in diesem Experiment nicht die erhoffte stärkste Wachstumsinhibition.

Die Kombination Doxorubicin 2,5 nmol plus 6 µmol weist nach 24 Stunden ein stärkeres Wachstum auf als die Kontrolle und nach 48 Stunden manifestiert sich die gleiche Invasionsfähigkeit der Zellen wie in der Kontrolle.

Die Kombination mit dem Doxorubicinwert von 5 nmol plus 6 µmol Imatinib demonstriert im Vergleich zur Kontrolle ein verstärktes Wachstum mit 20% und 28%.

Auch hier konnte keine Wachstumsinhibition der Medikamente detektiert werden.

Der größte inhibitorische Effekt konnte mittels Migrations-Assay für die Monotherapie mit Doxorubicin 2,5 nmol festgestellt werden.

Ein zusätzlicher Effekt des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib konnte mit diesem Versuchsaufbau nicht nachgewiesen werden.

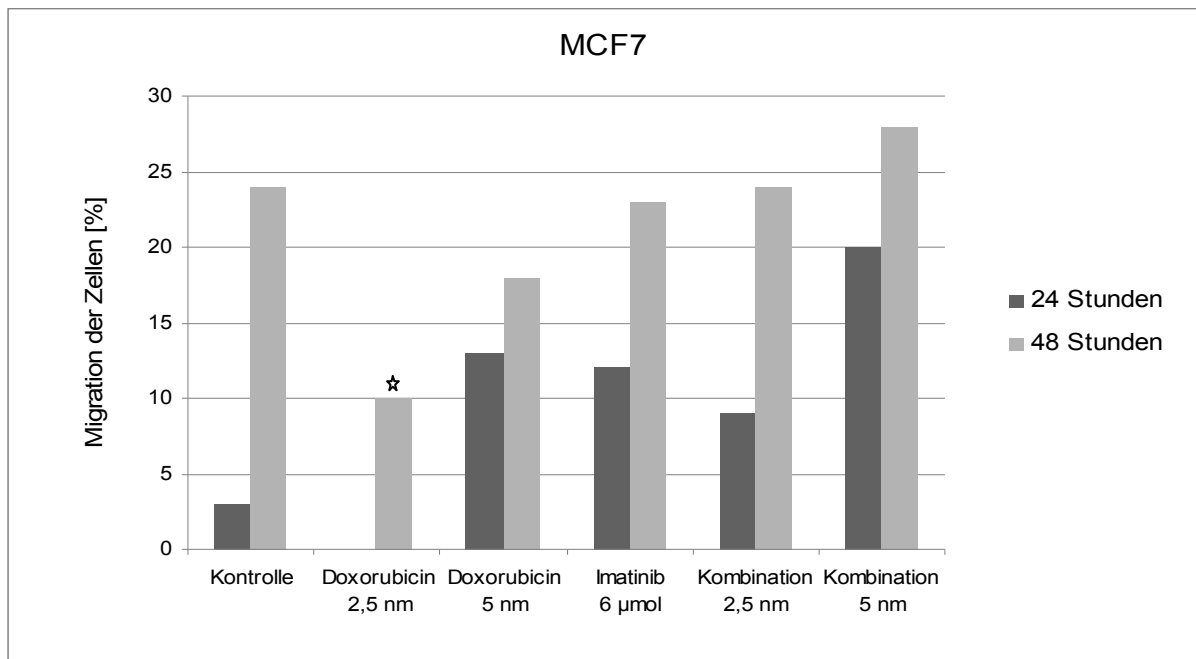


Abbildung 22: Migrationswerte der MCF7 Zellen unter Inkubation von Doxorubicin mit 2,5 nmol und 5 nmol sowie Imatinib mit 6 µmol einzeln und in Kombination über 24 und 48 Stunden; *p-Werte < 0,05.

3.3.1 Migrations-Assay mit dem Liganden PDGF-BB

Um die Effekte des Recombinant-Human-PDGF-BB-Liganden zu testen wurde die Migrationsmethode ein weiteres Mal durchgeführt.

Es wurden wieder die beiden Standard Zelllinien MCF7 mit 450 000 Zellen und MDAMB 231 mit 200 000 Zellen verwendet. Die Medikamentenkonzentrationen wurden für beide Zelllinien identisch gewählt: mit unbehandelten Zellen, Ligandenkonzentration 25 ng/ml, Imatinib 10 µmol und die Kombination von Imatinib mit 10 µmol und Ligand mit 25 ng/ml.

Der Versuch wurde dieses Mal nach 24 Stunden, 48 und 72 Stunden ausgewertet.

Für die MCF7 Zellen konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

Migration MCF7			
	24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden
Kontrolle	28%	71%	100%
Ligand 25 ng/ml	19%	29%	84%
Imatinib 10 µmol	12%	15%*	35%*
Kombination	25%	23%*	41%*

Tabelle 4: Migrationswerte der MCF7 Zellen unter Inkubation von PDGF-BB 25 ng/ml und Imatinib 10 µmol einzeln und in Kombination über 24, 48 und 72 Stunden; * p-Werte < 0,05.

Die unbehandelten Zellen zeigen ein gutes Wachstum in den Migrationsspalt hinein mit 28% nach 24 Stunden und vollkommener Konfluenz nach 72 Stunden. Der Ligand, der als Wachstumsstimulator wirken soll, wurde mit 25 ng/ml aufgetragen. Hier konnte aber im Gegensatz zur Kontrolle nur ein geringes Wachstum der Zellen festgestellt werden.

Unter der Inkubation mit 10 μmol Imatinib ist eine deutliche Wachstumshemmung abzulesen: Nach 24 Stunden von 16%, nach 48 Stunden von 56% und nach 72 Stunden von 65% im Vergleich zur Kontrolle. Die Ergebnisse nach einer Inkubation von 48 und 72 Stunden sind als signifikant zu bewerten ($p < 0,05$). Die Kombinationsergebnisse, bei denen sowohl Imatinib als auch der Ligand appliziert wurden, zeigen nach 24 Stunden das stärkste Wachstum im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen. Danach ist nur noch ein mittleres Wachstum, der Erwartung entsprechend, von 23% nach 48 Stunden und 41% nach 72 Stunden ($p < 0,05$) zu erkennen. (Siehe Anhang)

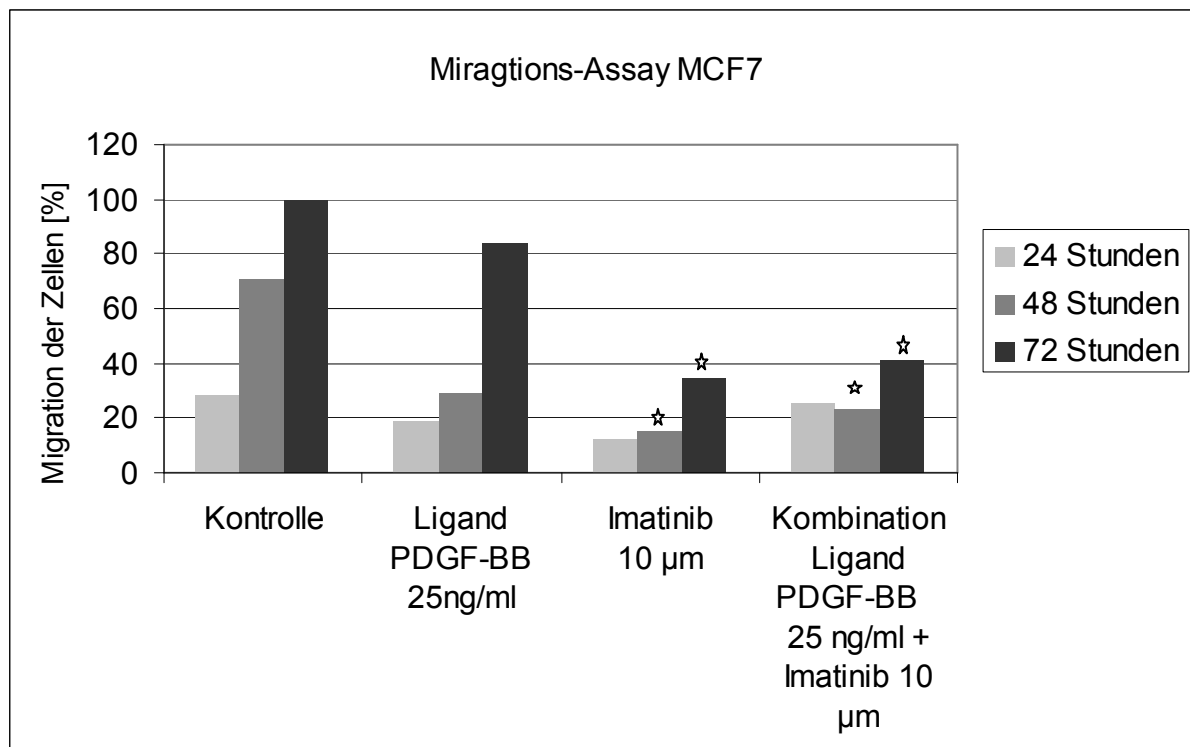


Abbildung 23: Migrationswerte der MCF7 Zellen unter Inkubation von PDGF-BB 25 ng/ml und Imatinib 10 μmol einzeln und in Kombination über 24, 48 und 72 Stunden; * p-Werte < 0,05

Für die Zelllinie MDAMB 231 wurde der Migrationsversuch mit demselben Versuchsaufbau und mit denselben Medikamentenkonzentrationen wie für MCF7 durchgeführt.

Folgende Ergebnisse konnten erzielt werden:

Migration MDAMB 231			
	24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden
Kontrolle	25%	53%	100%
Ligand 25 ng/ml	29%	65%	100%
Imatinib 10 μ mol	26%	29%	74%*
Kombination	34%	50%*	82%*

Tabelle 5: Migrationswerte der MDAMB 231 Zellen unter Inkubation von PDGF-BB 25 ng/ml und Imatinib 10 μ mol einzeln und in Kombination über 24, 48 und 72 Stunden; * p-Werte < 0,05.

Die Kontrolle lässt über die drei Versuchstage ein kontinuierliches Wachstum bis hin zur Konfluenz der Zellen erkennen. Der Ligand, der als Wachstumsstimulator fungieren soll, zeigt bei dieser Zelllinie seinen Effekt, im Gegensatz zu MCF7, in der gesteigerten Proliferation der Zellen - plus 4% bzw. 12% im Vergleich zur Kontrolle. Unter der Imatinib Monotherapie mit 10 μ mol lässt sich nach 48 und 72 Stunden eine deutliche Wachstumseinschränkung von 24% bzw. 26% ($p < 0,05$) erkennen. Bei der Kombination von Imatinib mit 10 μ mol und dem Liganden mit 25 ng/ml lässt sich nach 24 Stunden ein leicht verstärktes Wachstum ablesen. Nach 48 Stunden ist die Proliferation etwas geringer als in der Kontrolle und bei der dritten Auswertung des Versuchs kann ein um 18% ($p < 0,05$) gehemmtes Wachstum der Zellen detektiert werden. Dieses entspricht einem vermehrten Wachstum gegenüber der Monotherapie und einer geringeren Proliferation im Vergleich zur Kontrolle. Damit wurden die erwarteten Ergebnisse für diese Zelllinie bestätigt, welches in Abbildung 24 veranschaulicht ist. (Siehe auch Anhang)

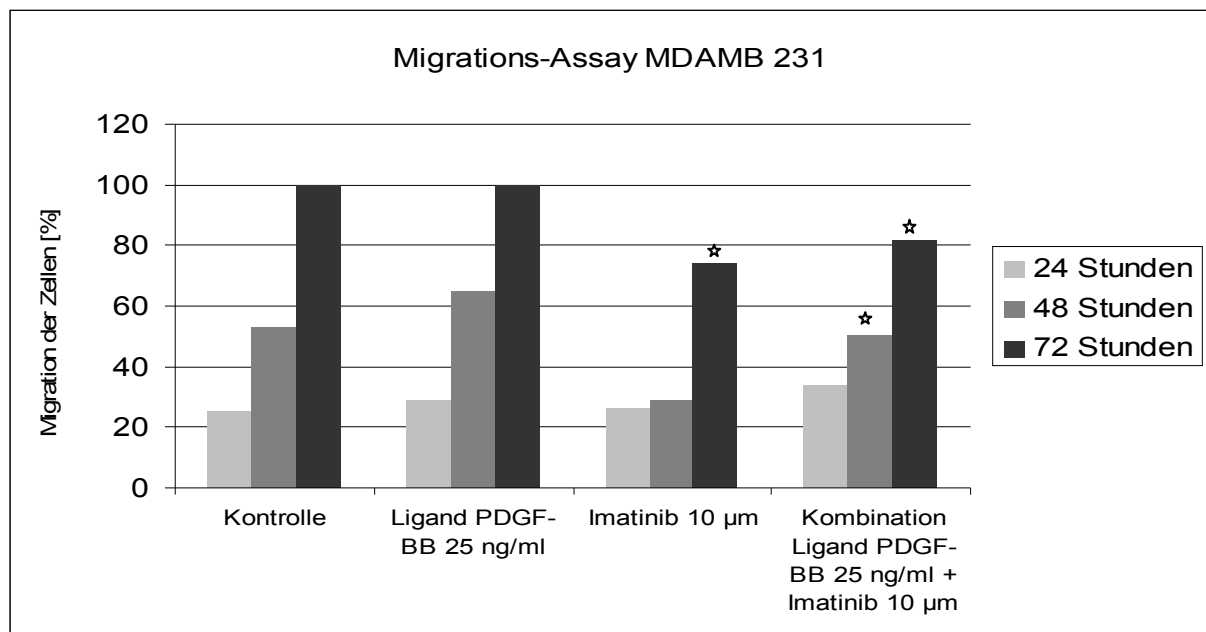


Abbildung 24: Migrationswerte der MDAMB 231 Zellen unter Inkubation von PDGF-BB 25 ng/ml und Imatinib 10 μ mol einzeln und in Kombination über 24, 48 und 72 Stunden; * p-Werte < 0,05

Als Fazit lässt sich konstatieren, dass die MDAMB 231 Zellen eine verstärkte Zellmigration unter PDGF- BB Stimulation im Vergleich zur Kontrolle zeigen. Imatinib besitzt sowohl die Fähigkeit das Zellwachstum zu inhibieren - sowohl ohne als auch mit Ligandenstimulation. Im Gegensatz dazu kann der Ligand PDGF-BB das Zellwachstum für die Zelllinie MCF7 nicht signifikant erhöhen, aber hier ist Imatinib in der Lage die Zellmigration signifikant zu hemmen sowohl nach 48 Stunden als auch nach 72 Stunden. Der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib reduziert die Zellmigration der beiden Zelllinien signifikant - dieser Antimigrationseffekt bleibt unter der Stimulation mit PDGF-BB bestehen.

4. Diskussion

Es werden Tyrosinkinaseinhibitoren, die nur ein molekulares Ziel haben und solche die an mehrere Rezeptoren binden können, unterschieden. Imatinib und Nilotinib zählen zur letzteren Gruppe und ihre molekularen Ziele sind c-kit sowie die Rezeptoren der PDGF-Familie. PDGFR β wird sowohl von der Zelllinie MDAMB 231 als auch von MCF7 exprimiert, während PDGFR α nur bei MDAMB 231 Zellen gefunden wurde. Derweilen waren die MCF7 Zellen positiv für c-kit. Die Liganden PDGF A und B wurden von beiden Zelllinien transkribiert. Diese Expressionsmuster stimmen mit Ergebnissen anderer Studien überein, die eine Expression des Liganden PDGF A, aber nicht die Expression des PDGFR α für MCF7 beschreiben. Durch dieses Expressionsverhalten erscheinen die beiden Zelllinien für die *in vitro* Untersuchungen mit Imatinib und Nilotinib geeignet. Eine Expression von PDGFR α konnte in 40% der duktal invasiven Mammakarzinome gefunden werden und mehr als 80% dieser zeigten auch eine Translation des PDGF A. Eine positive Korrelation zwischen der Rezeptorexpression und der axillären Lymphknotenmetastasierung kann vermutet werden (Carvalho et al. 2005). PDGFR β wird von Endothelzellen des duktales carcinoma *in situ* (Bhardwaj et al. 1996) und vom tumorumliegenden Stroma exprimiert, welches von prognostischer Bedeutung ist (Paulsson et al. 2009). Positive Ergebnisse wurden für mehr als 50% der invasiven Karzinomzellen beschrieben.

Darüber hinaus gilt die autokrine Stimulation von PDGF-Rezeptoren als wichtiger Faktor für die Tumorprogression und Metastasierung (Jechlinger et al. 2006); (Zhu et al. 2006).

Ein schlechtes Gesamtüberleben und ein geringes Ansprechen auf Chemotherapie korrelieren unter anderem mit der Überexpression von PDGF-Rezeptoren (Seymour and Bezwoda 1994).

Die Arbeitsgruppe um Toru Hiraga konnte 2009 feststellen, dass Imatinib die ossäre Metastasierung von Brustkrebs reduzieren kann - durch die Blockade des c-Fms-Signals. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass Imatinib einen protektiven Effekt gegenüber einem durch Chemotherapie verursachten Knochenverlust haben könnte (Hiraga and Nakamura 2009).

Alle genannten Rezeptoren stellen Ziele für Imatinib und Nilotinib dar, weshalb diese Substanzen einen vielversprechenden Therapieansatz gegen die Progression des Mammakarzinoms darstellen könnten.

Mit der TUNEL-Methode sollte ein möglicher additiver apoptotischer Effekt von Imatinib und Doxorubicin ermittelt werden. Die Auswertung erfolgte nach 24 und 48 Stunden.

Die Literaturangaben über den Zeitpunkt der Auswertung variieren: Bei Neuroblastomzellen wird eine starke Apoptoseinduktion durch Imatinib nach 48 Stunden beschrieben (Beppu et al. 2004), während bei Osteosarkomzellen eine Apoptoseneigung erst nach fünftägiger Inkubation gefunden wird (McGary et al. 2002). Bei den verwendeten Mammakarzinomzellen konnte ein Auswertungszeitraum von 24 bis zu 72 Stunden festgestellt werden (Weigel et al. 2009). Durch die unterschiedlichen Zeitangaben hängt die Apoptoseneigung wahrscheinlich von der Geschwindigkeit der Zellproliferation ab.

Bei der Kombination von Imatinib mit Doxorubicin 5 nmol lässt sich für MCF7 nach 48 Stunden eine signifikante Apoptoserate ermitteln ($p < 0,05$). Dieses ist bei den Mammakarzinomzellen MDAMB 231 jedoch nicht der Fall, hier konnte die Kombinationsinkubation die Apoptoserate zum angegebenen Zeitpunkt nicht erhöhen.

Bei der sechstägigen Standardinkubation zeigen jedoch beide Zelllinien sowohl unter Mono- als auch unter Kombinationstherapie eine starke Wachstumsreduktion.

Die Ergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, dass sich der Apoptosezeitpunkt mit der Kombination der Medikamente im Gegensatz zur Einzelinkubation verschiebt. Diese Resultate konnten ebenfalls durch Weigel et al. belegt werden. In dieser Studie konnte des Weiteren nachgewiesen werden, dass die Zelllinie ZR 75-1, die wie MCF7 ebenfalls für beide Rezeptoren c-kit und PDGF β positiv ist, eine erhöhte Apoptoserate im TUNEL-Experiment unter Kombinationsinkubation aufweist. Die Ergebnisse der beiden Zelllinien MCF7 und ZR 75-1 könnten darauf hinweisen, dass die erhöhte Apoptoserate durch die Expression der beiden Rezeptoren, die beide ein Ziel für Imatinib darstellen, zu Stande kommt.

Bei anderen soliden Tumoren, wie dem Ovarialkarzinom, konnte eine Apoptoseneigung durch Imatinib nicht bestätigt werden, sondern nur ein Arrest des Zellzyklus in der G1/G0-Phase (Matei et al. 2004). Hier scheint die Tumorreduktion durch eine erkennbare Apoptoseneigung der Endothelzellen in Tumorblutgefäßen und die darauf folgende Mangelversorgung der Tumorzellen zu Stande zu kommen.

Jedoch sind die genaue Bedeutung der Rezeptorexpression in Bezug auf die Auslösung der Apoptose und der genaue Mechanismus bisher noch weitgehend unbekannt und es bedarf weiterer Forschungsexperimente.

Die TUNEL-Methode wurde mit den beiden Standardzelllinien ebenfalls für den Tyrosinkinaseinhibitor Nilotinib durchgeführt, um der Fragestellung nachzugehen inwieweit Nilotinib in der Lage ist die Apoptoserate der Mammakarzinomzellen zu erhöhen. Die Inkubationszeiten waren in diesem Experiment 24 und 72 Stunden.

Die Konzentrationen von 2 und 4 μmol Nilotinib, die eine klinische Relevanz aufweisen, wurden ausgewählt (Weisberg et al. 2006).

Nilotinib ist in der Lage die Apoptoserate der Zelllinie MCF7 zu steigern. Ein signifikanter Anstieg der apoptotischen Zellen nach 72 Stunden bei einer Konzentration von 4 μmol ist zu verzeichnen – im Gegensatz zu Imatinib, bei dem die Apoptoserate des Tyrosinkinaseinhibitors in der Monotherapie geringer war.

Die Zellreihe MDAMB 231 zeigte im TUNEL-Assay mit Nilotinib eine signifikante Zunahme der Apoptoserate sowohl bei 2 μmol als auch bei 4 μmol . Im TUNEL-Experiment mit Imatinib wurde im Gegensatz dazu nur eine geringere Steigerung der Apoptose detektiert. Das vermehrte Absterben der Zellen unter der Nilotinib Monotherapie im Gegensatz zur Imatinib Monotherapie könnte darauf zurückzuführen sein, dass Nilotinib als Tyrosinkinaseinhibitor der zweiten Generation ein stärkeres Wirkungspotenzial als Imatinib hat. Nilotinib weist gegenüber Imatinib eine höhere Affinität und Selektivität für die ABL Tyrosinkinase auf und hat außerdem eine 20- bis 50-mal höhere inhibitorische Aktivität auf die Kinase in Imatinib-sensitiven CML-Zellen im Vergleich zu Imatinib (Kantarjian et al. 2006).

Das gute Ansprechen auf die Nilotinibtherapie bei den MCF7 Zellen könnte auch wie beschrieben auf die parallele Rezeptorexpression von c-kit und PDGF- β zurückzuführen sein. Dieser Erklärungsansatz kann jedoch nur teilweise für die MDAMB 231 Zellen gelten, denn diese exprimieren den PDGF β und α Rezeptor, wobei die Rolle der PDGF α -Rezeptoren noch nicht eindeutig geklärt werden konnte.

Der Migrations-Assay wurde durchgeführt, um das wachstumshemmende Potenzial der Medikamente Doxorubicin und Imatinib als Monotherapie und als Kombinationstherapie in Bezug auf eine unbehandelte Probe zu testen.

Eine deutliche Invasion der MDAMB 231 Zellen ist sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden im Vergleich zum Ausgangswert zu erkennen. Doxorubicin weist in der Monotherapie das stärkste inhibitorische Potenzial auf. Imatinib in der Monotherapie zeigt nur eine sehr schwache proliferationshemmende Wirkung.

Die Kombinationswerte zeigen nicht das erhoffte Ergebnis eines starken wachstumshemmenden Effektes, welches möglicherweise auf die schwache Wirkung von Imatinib zurückzuführen sein kann. Ein Grund für die schwache Imatinib Wirkung könnte - wie beim TUNEL-Experiment beschrieben - das Expressionsmuster der Rezeptoren der Zelllinie MDAMB 231 sein.

In diesem Experiment kann ein zusätzlicher Effekt von Imatinib auf die Behandlung mit Doxorubicin jedoch nicht nachgewiesen werden.

Der Migrations-Assay wurde für MCF7 mit zwei verschiedenen Doxorubicin Konzentrationen von 2,5 nmol und 5 nmol durchgeführt. Das Wachstum konnte unter der Therapie mit Doxorubicin bei einer Konzentration von 2,5 nmol am Stärksten im Vergleich zu den anderen Werten gehemmt werden. Bei der höheren Doxorubicin Konzentration von 5 nmol, in der ein geringes Wachstum erwartet wird, konnten die Zellen jedoch nicht stärker in ihrem Wachstum gehemmt werden. Für Imatinib konnte ebenfalls keine adäquate Hemmung abgelesen werden. Die Kombinationsmedikationen, von denen in diesem Experiment vermutlich die stärkste Wachstumsinhibition ausgehen sollte, zeigen diese jedoch nicht.

Ein zusätzlicher Effekt des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Erklärung sowie die Interpretation dieser Ergebnisse scheinen schwierig, denn eigentlich hätte die Zellreihe mit der Expression von PDGFR β und c-kit eine verstärkte Hemmung durch die Kombination von Imatinib und Doxorubicin, wie bereits beim TUNEL-Experiment aufgezeigt, ergeben sollen.

MCF7 ist eine Zelllinie, die nur sehr langsam proliferiert. Möglicherweise waren die Inkubationszeiten von 24 Stunden und 48 Stunden zu gering, da bei den Proliferationsversuchen mit einer sechstägigen Inkubation eine deutliche Wachstumsreduktion - vor allem bei der Kombination der beiden Medikamente - zu erkennen ist.

Ein Migrations-Assay wurde ebenfalls mit Hilfe der Ligandenstimulation von PDGF-BB mit einer Konzentration von 25 ng/ml und einer Imatinibkonzentration von 10 μ mol durchgeführt. Der PDGF-BB-Ligand wird von den Tumorzellen selbst exprimiert und kann in steigenden Konzentrationen die Zellproliferation positiv beeinflussen (McGary et al. 2002).

Die im Experiment verwendete Dosis von 25 ng/ml übersteigt die im Serum gefundenen PDGF-BB-Spiegel von 1-2 ng/ml um ein Vielfaches (Bowen-Pope et al. 1989). Die Stimulation durch den Liganden PDGF-BB geschieht meistens auf autokrinem oder parakrinem Weg, welches vermuten lässt, dass die tumornahe Konzentration des Liganden ebenfalls um ein Vielfaches höher ist als die detektierte Konzentration im Serumspiegel.

Eine Inkubation mit dem Liganden PDGF-BB führt zu einem gesteigerten Zellwachstum in allen Mammakarzinomzelllinien und vermag die Zellmigration zu stimulieren. Ähnliche Ergebnisse konnten durch andere Studien bestätigt werden, die gezeigt haben, dass die PDGF-BB-Applikation zu vermehrtem Zellwachstum führt; hingegen kann PDGF AA keinen Effekt auf die Zellen ausüben (McHowat et al. 2001).

Des Weiteren konnte in Ovarial- und Brustkrebszellen eine Inhibition der Phosphorylierung von PDGF-BB induzierten PDGF- β -Rezeptoren nach Imatinib Inkubation nachgewiesen werden (Mundhenke et al. 2008); (Weigel et al. 2009); (Apte et al. 2004).

Die Zellreihe MDAMB 231 zeigt einen starken Proliferationszuwachs unter der Ligandenstimulation. Imatinib besitzt die Fähigkeit das Zellwachstum ohne und mit Ligandenstimulation zu inhibieren. Die Wachstumswerte der Karzinomzellen unter der Kombinationsinkubation mit dem Liganden und Imatinib sind etwas höher als die der Monotherapie mit Imatinib. Dieses ließe sich möglicherweise auf eine kompetitive Hemmung des Rezeptors durch Imatinib zurückführen. Im Gegensatz dazu kann unter der Ligandenstimulation durch PDGF-BB bei MCF7 kein vermehrtes Wachstum aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass das Zellwachstum dieser Karzinomzellen in einem geringeren Ausmaß über den untersuchten Signalweg reguliert wird. Diese Annahme liegt nahe, da die IC 50-Konzentration von Imatinib für MCF7 geringfügig höher ist im Vergleich zu MDAMB 231. Der Effekt einer c-kit Rezeptorblockade lässt sich in dieser Untersuchung nicht genau abschätzen und müsste durch weitere Versuche geklärt werden. Auch die Rolle des physiologisch exprimierten c-kit Liganden SCF der MCF7 Zellen lässt sich nur sehr ungenau klären. Unklar bleibt auch, inwieweit sich der im Standardmedium enthaltene Kälberserumanteil und dessen Wachstumsfaktoren auf das Proliferationsverhalten der Zellen ausgewirkt haben könnten.

Dieses Experiment konnte in Bezug auf die Fragestellung - ob ein Tyrosinkinaseinhibitor die Zellproliferation beeinflusst - die Aussage beitragen, dass Imatinib die Zellmigration der beiden Zelllinien signifikant reduziert und dieser Antimigrationseffekt auch unter der Stimulation mit PDGF-BB bestehen bleibt. Jedoch bleibt unklar, ob es sich bei der Interaktion

zwischen Rezeptor und Ligand, sowie dem Inhibitor, um eine rein kompetitive Hemmung handelt, da wie beschrieben mehrere mögliche Einflusskomponenten, wie andere Tyrosinkinaserzeptoren und deren Liganden, nicht gänzlich ausgeschaltet werden können. Auch sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass Imatinib und der Ligand nicht um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren, sondern Imatinib seine Bindungsstelle intrazellulär an dem Kinaserezeptor hat und der Ligand extrazellulär bindet.

Der Tyrosinkinaseinhibitor der zweiten Generation Nilotinib sollte in dieser Arbeit auf mögliches proliferationshemmendes Verhalten sowie seine pro-apoptischen Effekte untersucht werden.

Die Versuche mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Nilotinib wurden mit Hilfe des MTT-Assays durchgeführt. Um aufgetretene Schwierigkeiten in Bezug auf Inkubationsdauer, Zellzahl und damit verbunden und verwertbare Ergebnisse zu eliminieren, wurden die Versuchsbedingungen mehrmals variiert. Eine mögliche Erklärung für die bei den Versuchen aufgetretenen Probleme könnte die Vermutung sein, dass der MTT-Assay selbst mit dem Tyrosin-kinaseinhibitor interagiert und es zu Verfälschung der Ergebnisse kommt (Sims and Plattner 2009).

Schließlich konnte nach zweitägiger Inkubation bei der Zellreihe MDAMB 231 eine IC 50 von 3 - 4 μmol festgestellt werden. Der Konzentrationsbereich von Nilotinib unter 4 μmol spielt klinisch eine wichtige Rolle, denn bei der Behandlung von Imatinib resistenten CML-Patienten wurde eine Plasmahöchstkonzentration von 3,6 μmol bei einer Dosis von 400 mg zweimal täglich gefunden (Weisberg et al. 2006).

Kantarjian et al. konnten 2006 ebenfalls eine Höchstkonzentration von 3,6 μmol im Plasma bei Patienten, die eine Dosis von 400 mg zweimal am Tag bekommen hatten, diagnostizieren. In dieser Studie konnte ein konstanter Blutspiegel des Tyrosinkinaseinhibitors von 1,0 μmol bei einer Applikation von 400 mg einmal täglich, 1,7 μmol bei zweimaliger Applikation von 400 mg täglich und 2,3 μmol bei zweimal täglicher Dosis von 600 mg festgestellt werden. Bei allen höheren Medikamentendosen wurden toxische Nebenwirkungen beobachtet.

Nach Aussage dieser Studien gilt unser Ergebnis für MDAMB 231 als klinisch relevant und könnte in Zukunft eine Rolle in der Therapie des Mammakarzinoms spielen.

Die Experimente der Zelllinie MCF7 mit Nilotinib zeigten eine IC 50 mit 8 μmol im MTT-Assay, welche keine klinische Relevanz darstellt. Auch die Kombinationsexperimente für

beide Zelllinien konnten keine signifikanten Resultate liefern, welches unter Umständen auch auf die Interaktion des Tyrosinkinaseinhibitors mit dem MTT-Assay zurückzuführen ist.

Imatinib wurde in unseren Experimenten in einer Konzentration von 4-6 μmol angewendet. Die orale Applikation von 25 - 600 mg Imatinib kann zu einem Plasmaspiegel von 0,17 - 5,68 μmol in vivo führen (Druker et al. 2001). Damit gilt die angewendete Konzentration als tolerable Dosis und ist klinisch relevant.

Alle durchgeführten Proliferationsversuche sowohl für die Testung von Imatinib als Monotherapie als auch die Experimente der Kombination von Imatinib mit Standardchemotherapeutika wurden zunächst mittels MTT-Methode untersucht.

In vorangegangenen Studien konnte eine Hemmung des Zellwachstums der Mammakarzinomzellen bei der Konzentration von Imatinib mit 4 - 6 μmol festgestellt werden, welche durch andere Gruppen bestätigt werden konnte (Weigel et al 2009); (Roussidis et al. 2007). Für das Pankreaskarzinom und das medulläre Schilddrüsenkarzinom wurde eine Proliferationshemmung der Zellen erst bei weitaus höheren Imatinibkonzentrationen festgestellt, welches auf die unterschiedliche Rezeptorexpression zurückzuführen sein könnte (Li et al. 2003); (Skinner et al. 2003).

Um die Literaturangaben für Imatinib in der Monotherapie für die Mammakarzinomzelllinien zu bestätigen (Weigel et al 2009), wurde eine sechstägige Inkubation, die sich auch nach unseren Vorversuchen als die optimale Versuchslänge herausstellte, angenommen. In dieser Inkubationsdauer erlangten die Zellen keine Konfluenz, hierbei lag eine IC 50-Konzentration von Imatinib mit 6-7 μmol vor. Sowohl für die Zellreihe MCF7 als auch für die MDAMB 231 Zellreihe wurden jedoch zunächst Ergebnisse einer IC 50 von 15 - 17,5 μmol Imatinib festgestellt. Diese Ergebnisse konnten auch nach mehreren Wiederholungen nicht verbessert werden.

Eine ähnliche Problematik konnte bei der Verwendung von Imatinib mit 6-7 μmol für die Kombinationsinkubationen zusammen mit Doxorubicin und Paclitaxel gesehen werden.

Die Arbeitsgruppe um Sims et al veröffentlichte 2009 die These, dass die MTT-Assays nicht verwendet werden können, um die Effekte von Imatinib an Mammakarzinomzelllinien nachzuweisen. Ihrer These zur Folge beeinträchtigt Imatinib in den Konzentrationen von 1-10 μmol den Test und liefert daher keine aussagekräftigen Ergebnisse. Die Konzentrationen von

1-10 μmol entsprechen genau unserer Zielfragestellung sowie der klinischen Relevanz von Imatinib in vivo (Sims and Plattner 2009); (Druker et al. 2001).

Diese These veranlasste uns die Ergebnisse anhand der manuellen Zellzählung zu überprüfen. Die Versuchsbedingungen mussten in Vorversuchen variiert werden, um schließlich eine Zellzahl von 20.000 Zellen für die Zelllinie MCF7 und eine weitaus geringere Zellzahl von 2000 für die Zelllinie MDAMB 231 über eine Inkubationsdauer von sechs Tagen anzuwenden. Die Ergebnisse der Zellzählung von MCF7 für die IC 50-Konzentration von Imatinib zeigten bei dieser Methode die in der Literatur angegebene Konzentration von 6-7 μmol . Auch für MDAMB 231 konnte durch die Zellzählung die in der Literatur angegebene IC 50-Konzentration von 6 μmol bestätigt werden.

Unsere Ergebnisse unterstützen demnach die These von Sims et al: Der MTT-Assay bei der Forschung am Mammakarzinom liefert bei den Konzentrationen von 1 - 10 μmol keine exakten Ergebnisse.

Um weitere Untersuchungen an der Interaktion von Imatinib an den wachstumsstimulierenden Signalwegen durchzuführen, wurde der Schwerpunkt auf den Rezeptor PDGF- β gelegt, da dieser von beiden Zelllinien exprimiert wird.

Die PDGFR- β -Aktivierung verursacht einen protektiven Effekt gegen das antiproliferative Potential von Chemotherapeutika wie Paclitaxel und Doxorubicin in verschiedenen Krebszellen (Langley et al. 2004); (Blagosklonny and Fojo 1999).

Aus diesem Grund scheint eine Kombination von Imatinib, dem PDGFR- β -Inhibitor und den Standardchemotherapeutika des Mammakarzinoms, wie Doxorubicin, viel versprechend. In vorangegangenen Experimenten durch Weigel et al. (2009) konnte eine signifikante Zellwachstums-inhibition unter der Inkubation von Imatinib, kombiniert mit Vinorelbine, im Gegensatz zur Monotherapie detektiert werden.

In Kombination mit Doxorubicin konnte eine vermehrte Chemosensitivität, aufgrund der PDGFR- β -Inhibition von Imatinib an Sarkomen, nachgewiesen werden (Katayama et al. 2004)

Die Kombination von Standardchemoperapeutika und Imatinib scheint eine zukunftsweisende Therapiemöglichkeit für verschiedene Tumore zu bieten.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Fragestellung in den Vordergrund gestellt, inwieweit der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib in Kombination mit Standardchemotherapeutika in der Lage ist die Zellproliferation zu hemmen und die Apoptose zu induzieren.

Beiden Mammakarzinomzelllinien wurden zunächst sowohl mit Paclitaxel als auch mit Doxorubicin in Kombination mit Imatinib inkubiert, um später den Fokus auf die Kombination von Doxorubicin mit Imatinib zu legen. Doxorubicin wird zurzeit in adjuvanter und palliativer Therapie des Mammakarzinoms verwendet.

Da der MTT-Assay keine verlässlichen Ergebnisse liefern konnte, wurde mit der manuellen Zellzählung für die Kombination von Doxorubicin mit Imatinib in der IC 50-Konzentration ein additiver Effekt festgestellt. Zudem zeigten sich signifikante Ergebnisse bei der Kombination sowohl der IC 50 von Doxorubicin als auch von Imatinib für beide Zelllinien.

Andere Arbeitsgruppen konnten auch für differente solide Tumorzellen Effekte bei der Kombinationstherapie von Imatinib mit Standardtherapeutika feststellen. Dies gelang Apte et al. 2004 mit einer Kombination aus Paclitaxel mit Imatinib, die zu einer signifikanten Reduktion des Tumorzvolumens von Ovarialkarzinomen in Mäusen führte - im Gegensatz zu einer Monotherapie mit Paclitaxel. Unter der Kombinationstherapie von Imatinib mit Doxorubicin und Carboplatin lässt sich beim felines Sarkom eine additive Wachstumsinhibition feststellen (Katayama et al. 2004). Des Weiteren hebt es eine durch PDGF-BB-Applikation ausgelöste Resistenz gegenüber den erwähnten Chemotherapeutika auf. Eine Chemosensibilisierung für eine Taxol-Therapie und ein Anstieg der Apoptoserate konnten für Imatinib an Knochenendothelzellen von Mäusen nachgewiesen werden (Langley et al. 2004). Eine Kombination von Imatinib mit Cisplatin hat einen additiven Effekt auf die Inhibition des Zellwachstums (Yerushalmi et al. 2007).

Die Kombinationsbehandlungen von Imatinib und Vinorelbine zeigen einen additiven Wirkungseffekt bei der *in vitro* Untersuchung an Mammakarzinomzelllinien. Bei diesen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass Imatinib neben dem Potenzial der Regulation des interstitiellen Tumorzvolumensdrucks und der Verstärkung des anti-angiogenitischen Effekts *in vivo*, die Chemosensitivität der Brustkrebszellen *in vitro* verändern kann (Weigel et al 2009).

Diese Variation ist von großer klinischer Relevanz, da klinische Studien entweder mit Imatinib als Monotherapie oder in Kombination mit Docetaxel bei metastasiertem

Mammakarzinom bislang keine signifikanten Ergebnisse auch bei zuvor selektierten Patienten mit PDGFR-Expression der Tumorzellen zeigen konnten (Modi et al. 2005); (Yardley et al. 2009); (Cristofanilli et al. 2008).

Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung in der Zukunft weitere Studien mit Imatinib in Kombination mit anderen Chemotherapeutika zu unternehmen.

Die Hypothese, dass Imatinib in der Lage ist das Tumorzellwachstum *in vitro* zu hemmen, sowohl als IC 50 Konzentration der Monotherapie als auch in Kombination mit Standardchemotherapie wie Doxorubicin, wurde mit den Experimenten dieser Arbeit bestätigt. Die Kombination der beiden Medikamente löst einen additiven Effekt aus. Der Erklärungsansatz für die Imatinib-Wirkung ist die erhöhte Apoptoserate, die vor allem durch die Blockade der Tyrosinkinase PDGFR β ausgelöst wird.

In klinischer Hinsicht sind die in den vorliegenden Versuchsreihen *in vitro* erzielten Ergebnisse für die zukünftige Therapie des Mammakarzinoms vielversprechend. Die Kombination von Doxorubicin und Imatinib könnte in Zukunft eine effektive Therapie mit geringen Nebenwirkungen darstellen.

Die genauere Untersuchung der molekularen Effekte durch Imatinib ist von großer Relevanz, da klinische Studien bisher mit Imatinib als Monotherapie oder in Kombination mit Docetaxel bei metastasiertem Mammakarzinom keine signifikanten Ergebnisse auch bei zuvor selektierten Patienten mit PDGFR-Expression der Tumorzellen zeigen konnten (Modi et al. 2005); (Yardley et al. 2009); (Cristofanilli et al. 2008).

Aus diesem Grund ist es von Bedeutung weitere Studien mit Imatinib in Kombination mit anderen Chemotherapeutika zu unternehmen, wobei die Selektion der Patienten mit PDGFR-Expression im Tumorgewebe wichtig ist.

Für Nilotinib konnte bei den Experimenten mit der Zelllinie MDAMB 231 eine IC 50 von 3-4 μmol detektiert werden. Dieses Ergebnis ist für die onkologische Therapie von klinischem Interesse. Des Weiteren wird die Apoptoserate der Karzinomzellen sowohl von MCF7 als auch von MDAMB 231 bei einer Medikamentendosis von 2-4 μmol gesteigert. Die Anzahl apoptotischer Zellen ist höher als bei Imatinib.

Das durch die dargestellten Experimente erkennbare Wirkungspotential von Nilotinib bedarf weiterer Forschungsarbeiten am Mammakarzinom und an anderen malignen Erkrankungen sowohl in Monotherapie als auch in Kombination mit Chemotherapeutika. Eine zielgerichtete

Erweiterung der Therapiemöglichkeiten um einen wirkungsstarken Tyrosinkinaseinhibitor wäre wünschenswert, nicht nur bei der Behandlung der Brustkrebspatientinnen.

5. Zusammenfassung

Der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib Mesylat ist ein Medikament zur Behandlung der Chronisch myeloischen Leukämie (CML), von gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) sowie anderen malignen Erkrankungen.

Die Wirkung von Imatinib wird durch eine kompetitive und selektive Blockade der ATP-Bindungsstelle spezifischer Tyrosinkinasen, wie z. B. Abl, Bcr-Abl, c-kit und der PDGF-Rezeptor-Familie, vermittelt. Durch diese Blockade wird die Übertragung eines Phosphatrestes auf das Substrat verhindert. Gesunde Zellen werden zwar durch Imatinib beeinflusst, diese besitzen jedoch zusätzliche Signalwege und werden kaum in ihrer Funktion beeinträchtigt. Krebszellen sind jedoch abhängig von der Aktivität von Bcr-Abl und werden in ihrer Teilungs- und Überlebensfähigkeit stark beeinflusst.

In den durchgeführten Untersuchungen sollte der Einfluss von Imatinib auf die Karzinomzellen geprüft werden und ein möglicher additiver Effekt in der Kombination mit Standardchemotherapeutika nachgewiesen werden.

Die Zellproliferationsversuche wurden mittels verschiedenen Methoden mit dem Nachweis durchgeführt, dass Imatinib in der Lage ist das Zellwachstum der Mammakarzinomzellen nachhaltig zu hemmen. In der Kombination von Imatinib mit Doxorubicin kommt es zu einem additiven Effekt der Wachstumshemmung durch Imatinib.

Im TUNEL-Assay konnte nachgewiesen werden, dass Imatinib und Doxorubicin zu einem apoptotischen Effekt sowohl der MDAMB 231 als auch der MCF7 Zellen führen. Eine Kombination der beiden Medikamente zeigt jedoch nur für die Zelllinie MCF7 eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zur Einzelapplikation.

In den Migrations-Assays der beiden Zelllinien konnten für die Einzel- und Kombinationsmedikamentenapplikation keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden. Weitere Tests mit dem Liganden PDGF BB zeigten, dass der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib die Zellmigration der beiden Zelllinien signifikant reduziert und dieser Antimigrationseffekt unter der Stimulation von PDGF BB bestehen bleibt.

Für die Behandlung von CML - Patienten mit einer aufgetretenen Imatinib-Resistenz bzw. - Unverträglichkeit wurde 2007 Nilotinib EU-weit zugelassen. Der neu entwickelte Tyrosinkinaseinhibitor soll nicht nur an Bcr-Abl, sondern auch gegen die bekannten Mutationen 32 und 33 wirksam sein.

In den durchgeführten Proliferationsversuchen konnte eine IC 50 für beide Mammakarzinomzelllinien festgestellt werden; die für MDAMB 231 liegt im klinisch relevanten Bereich von 3 - 4 μmol .

Nilotinib war im TUNEL-Assay in der Lage die Apoptoserate sowohl der MCF7 Zellen als auch der MDAMB 231 Zellen zu erhöhen.

Um die *in vitro* nachgewiesenen Effekte von Imatinib *in vivo* zu verfolgen, sind weitere klinische Studien an Brustkrebspatienten nötig. Eine strenge Selektion der Patienten in Bezug auf die Rezeptorexpression und damit der Ziele für Imatinib ist von großer Bedeutung, um den Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors kombiniert mit Standardchemotherapeutika aufzuzeigen. Abschließend lässt sich aus den erzielten Ergebnissen festhalten, dass Imatinib in Zukunft ein effektives Therapeutikum in Kombination mit anderen Chemotherapeutika darstellen könnte. Daher bleibt Imatinib ein viel versprechendes Medikament in der Therapie des Mammakarzinoms.

Die Studien über Nilotinib belaufen sich bislang auf die Therapie von CML-Patienten. Über die Wirkung auf solide Tumore ist bisher nur sehr wenig bekannt, es wäre von großem Interesse weitere Studien *in vitro* und *in vivo* durchzuführen.

Danksagung

Gerne möchte ich Herrn Professor Dr. med. Dr. hc. Walter Jonat danken, dass ich die Möglichkeit an der Universitätsfrauenklinik Kiel erhalten habe, meine Doktorarbeit zu schreiben.

Meinem Doktorvater Professor Dr. med. Christoph Mundhenke möchte ich für die Unterstützung, die Betreuung und für die gute Zusammenarbeit während meiner Forschungszeit in der Klinik danken.

Die enge Zusammenarbeit mit Dr. med. Marion T. Weigel hat mir wichtige Impulse und Ideen, die ich für meine Arbeit nutzen konnte, beschert. Auch Dir, Marion, möchte ich ganz herzlich für Deine Hilfe danken, die Du sowohl hier in Kiel als auch in London immer angeboten hast.

Der Arbeitsgruppe um Professor Dr. med. Christoph Mundhenke möchte ich meine Anerkennung aussprechen.

Dem Laborteam, vor allem Sigrid Hamann und Frank Rösel, kommt ein ganz besonderer Dank zu, denn ohne ihre Hilfe, ihre Geduld und ihre Mühe hätte ich viele Methoden nicht erlernen können und viele Experimente hätten möglicherweise ein nicht zufriedenstellendes Ergebnis geliefert. Ich danke Euch auch für die Zeit, die Ihr in mich investiert habt und dass Ihr immer erreichbar wart, um mich zu unterstützen.

Ich möchte mich auch für die freundliche Aufnahme im Laborteam, für die Hilfe und für das gute Arbeitsklima, das mich über die Zeit im Labor begleitet hat bedanken.

Einen herzlichen Dank möchte ich auch allen zu kommen lassen, die sich mit viel Mühe und Zeit der Korrektur dieser Arbeit gewidmet haben.

Meiner Familie kommt ebenfalls ein besonderer Dank zu, denn auch Ihre Unterstützung hat mir geholfen sowohl das Studium als auch die Doktorarbeit zu meistern.

Lebenslauf

Vorname Linda
Nachname Dahmke
Geburtsdatum 26. Juni 1986
Geburtsort Bad Segeberg
Familienstand ledig
Familie Eltern : Klaus Dahmke

Leiter der Öffentlichkeitsarbeit für den Bauernverband
Schleswig-Holstein

Gesa Dahmke, geborene Jansen

Sachgebietsleiterin für das Finanzamt Neumünster

Geschwister: Nina Dahmke (27 Jahre)

Ausbildungsdaten:

1992-1996 Herman-Claudius-Schule (Grund- und Hauptschule) in Wasbek
1996-2002 Immanuel-Kant-Schule in Neumünster
2002-2003 Schüleraustauschjahr in den USA
2003-2005 Immanuel-Kant-Schule in Neumünster
2005 Abitur an der Immanuel-Kant-Schule
2005 Ausbildung zur Krankenpflegehelferin beim Deutschen Roten Kreuz
2006 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
2008 Physikum an der Justus-Liebig-Universität Gießen
2008 Wechsel an die Christian-Albrechts- Universität zu Kiel

Berufserfahrung:

2004 ein zweiwöchiges Praktikum in der Kinderklinik des Friedrich - Ebert -
Krankenhauses in Neumünster
ein einmonatiges Pflegepraktikum in der Fachklinik Aukrug-Tönsheide
2005 ein einmonatiges Pflegepraktikum auf der gefäß- und allgemeinchirurgischen Station
des Friedrich - Ebert – Krankenhaus
2005 ein dreiwöchiges Praktikum auf der onkologischen Station des Friedrich - Ebert-
Krankenhauses im Rahmen der Krankenpflegehelferausbildung des Deutschen Roten
Kreuzes

- 2006 ein einmonatiges Pflegepraktikum in der Kinderklinik des Friedrich - Ebert - Krankenhauses
- 2008 Famulatur (vier Wochen) auf der Gynäkologie und Geburtshilfe des Friedrich-Ebert-Krankenhaus in Neumünster
- 2009 Famulatur (zwei Wochen) in der Anästhesie des Universitätskrankenhauses in Kiel
- 2009 Famulatur (zwei Wochen) in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätskrankenhauses Kiel
- 2009 Famulatur (vier Wochen) in der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Regionshospitalet Randers, Dänemark
- 2010 Famulatur (vier Wochen) in der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Freeman Hospital in Newcastle, England
- 2011 Erstes Tertial des praktischen Jahres an der Universitätsklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe in Kiel
- 2011 Zweites Tertial (erste Hälfte) Royal London Hospital, Trauma Team
- 2011 Zweites Tertial (zweite Hälfte) Franziskus Krankenhaus Flensburg, Chirurgie
- 2011 Drittes Tertial des praktischen Jahres Friedrich- Ebert- Krankenhaus Neumünster, Innere
- 2012 Staatsexamen
- 2012 Städtisches Krankenhaus in Kiel, Chirurgie

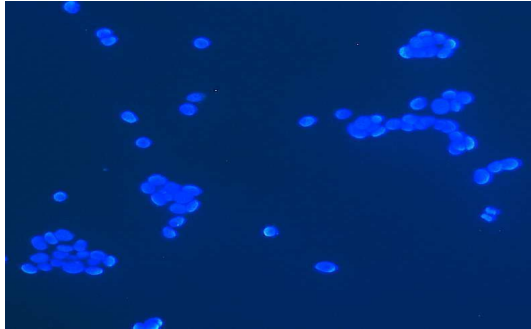
6. Anhang

1. TUNEL-Assay Bilder

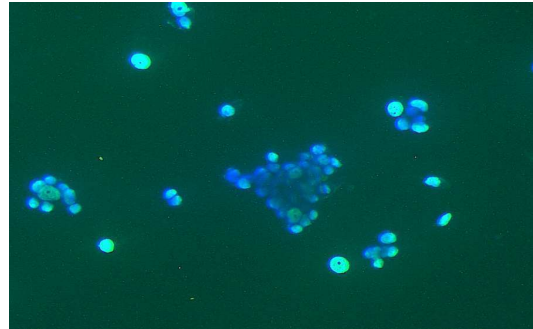
Die Bilder zeigen den Effekt von Imatinib und Doxorubicin auf die Apoptoserate der Mammakarzinomzellen nach 48 Stunden. Die Zellen wurden mit Imatinib, Doxorubicin oder deren Kombination für 24 und 48 Stunden inkubiert. Für jede Probe wurden fünfmal 200-500 Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt und die Apoptoserate in Prozent der Gesamtzellen errechnet. Die apoptotischen Zellen fluoreszieren grün im Gegensatz zu den vitalen Zellen.

MCF7 nach 48 h

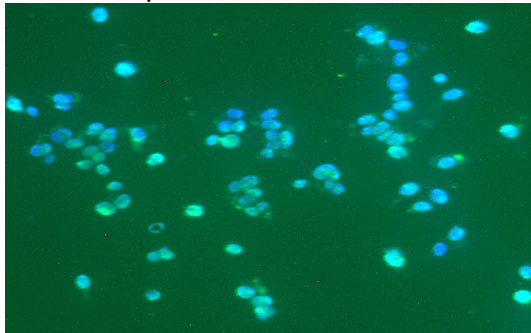
Kontrolle



Doxorubicin 5 nm



Imatinib 6 µmol

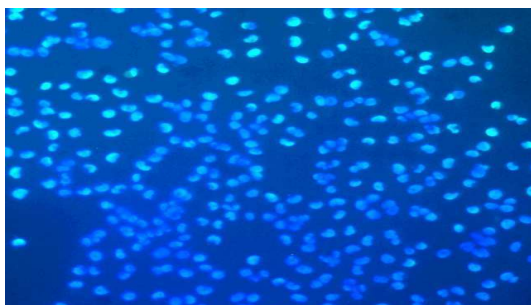


Kombination Imatinib und Doxorubicin

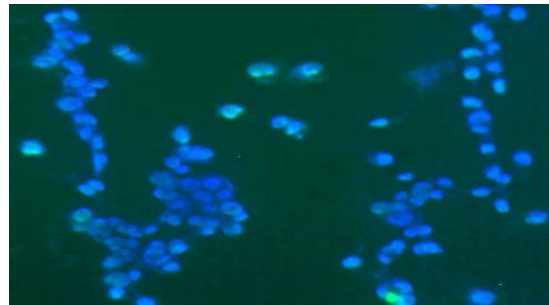


MDAMB 231 nach 48 h

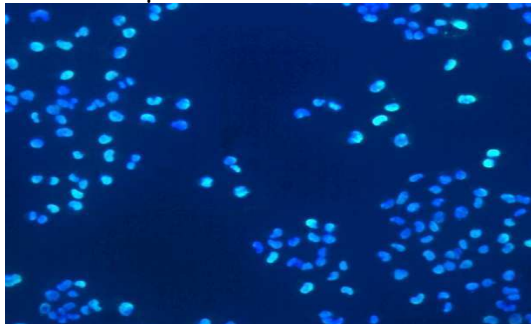
Kontrolle



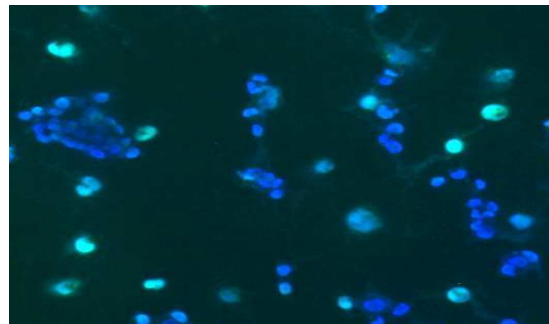
Doxorubicin 1 nm



Imatinib 6 µmol



Kombination Doxorubicin und Imatinib

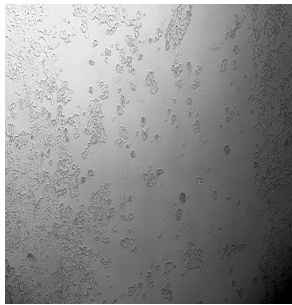


2. Migrations-Assay Bilder

Imatinib hemmt PDGF BB abhängig die Zellmigration in Mammakarzinomzellen. Migrations-Assays wurden für die Brustkrebszelllinien MCF7 und MDAMB 231 durchgeführt. Die Zellen wurden entweder mit Imatinib, PDGF BB oder dessen Kombination bis zu 72 Stunden inkubiert. Die Bilder zeigen die Ergebnisse nach 48 und 72 Stunden.

MCF7

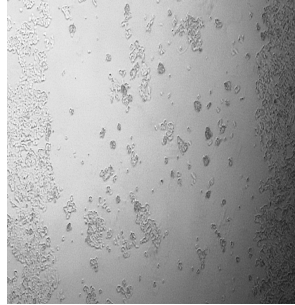
Kontrolle 48 h



Ligand 48h



Imatinib 48 h



Kombi 48 h



Kontrolle 72 h



Ligand 72 h



Imatinib 72 h



Kombination 72h



MDAMB 231

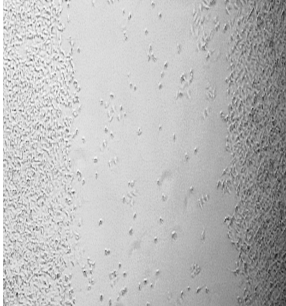
Kontrolle 48 h



Ligand 48 h



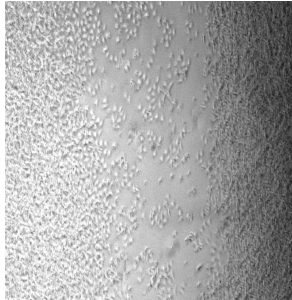
Imatinib 48h



Kombination 48 h



Kontrolle 72 h



Ligand 72 h



Imatinib 72 h



Kombination 72 h



RESEARCH ARTICLE

Open Access

In vitro effects of imatinib mesylate on radiosensitivity and chemosensitivity of breast cancer cells

Marion T Weigel¹, Linda Dahmke¹, Christian Schem¹, Dirk O Bauerschlag^{1,2}, Katrin Weber¹, Peter Niehoff³, Maret Bauer¹, Alexander Strauss¹, Walter Jonat¹, Nicolai Maass^{1,2}, Christoph Mundhenke^{1*}

Abstract

Background: Breast cancer treatment is based on a combination of adjuvant chemotherapy followed by radiotherapy effecting intracellular signal transduction. With the tyrosine kinase inhibitors new targeted drugs are available. Imatinib mesylate is a selective inhibitor of bcr-abl, PRGFR alpha, beta and c-kit. The purpose of this study was to determine whether Imatinib has an influence on the effectiveness of radiotherapy in breast cancer cell lines and if a combination of imatinib with standard chemotherapy could lead to increased cytoreduction.

Methods: Colony-forming tests of MCF 7 and MDA MB 231 were used to study differences in cell proliferation under incubation with imatinib and radiation. Changes in expression and phosphorylation of target receptors were detected using western blot. Cell proliferation, migration and apoptosis assays were performed combining imatinib with doxorubicin.

Results: The combination of imatinib and radiotherapy showed a significantly stronger inhibition of cell proliferation compared to single radiotherapy. Differences in PDGFR expression could not be detected, but receptor phosphorylation was significantly inhibited when treated with imatinib. Combination of imatinib with standard chemotherapy lead to an additive effect on cell growth inhibition compared to single treatment.

Conclusions: Imatinib treatment combined with radiotherapy leads in breast cancer cell lines to a significant benefit which might be influenced through inhibition of PDGFR phosphorylation. Combining imatinib with chemotherapy enhances cytoreductive effects. Further in vivo studies are needed to evaluate the benefit of Imatinib in combination with radiotherapy and chemotherapy on the treatment of breast cancer.

Background

Breast cancer is the most common malignant tumour in women. Albeit further increases in incidence, breast cancer related mortality has been reduced by screening and early detection programs, as well as optimized therapeutic options. Besides surgery, chemotherapy and radiotherapy, targeted therapies including endocrine, small molecule and antibody related therapies have been able to improve patient outcome [1-5].

In early and advanced breast cancer, radiotherapy is a common part of standard therapies. External beam

radiotherapy (50 Gy, fraction dose 1.8 - 2 Gy, delivered over 30 - 35 days) is used for chest wall and total breast irradiation [6,7].

Radiotherapy targets intracellular DNA and causes strand breaks. The ability of tumour cells to repair radiotherapy modulated DNA breaks is limited. Unrepaired DNA breaks commonly lead to apoptosis, necrosis, cell cycle arrest or mitotic inactivity. Radio sensitivity depends on intrinsic factors, defined by genetic determination as well as on extrinsic factors like growth receptor signalling and their chemical or biological modulations [8].

Membrane tyrosine kinases play a key role in cell signalling. Aberrant expression or activation has an impact on breast cancer oncogenesis and progression. Tyrosine

* Correspondence: cmundhenke@hotmail.com

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Breast Center, University of Kiel, Arnold-Heller Strasse 3, 24105 Kiel, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

kinase inhibitors show activities against one or multiple targets and are able to inhibit tumour proliferation and in some cases angiogenesis at the same time [9].

Imatinib mesylate (Glivec®) was originally developed for tailored inhibition of the oncoprotein bcr-abl in chronic myeloid leukaemia (CML) and is today part of CML standard therapies. Besides abl and bcr-abl, imatinib also inhibits the activation of PDGFR α , β and c-kit and is currently used in research and treatment of solid tumours [10-13].

Cell lines from different solid tumours with c-kit and/or PDGFR expression have been tested previously for their response to imatinib. Cell growth of c-kit expressing cell lines of colon and small cell lung cancer could be inhibited in vitro and in vivo [14]. PDGFR activation occurs via an autocrine pathway or by ligands. Activation of PDGFR β enhances chemotaxis, while cell motility is decreased after PDGFR α activation. Inhibition of both subtypes leads to apoptosis. Co-expression of PDGFR β and stimulating ligands can be seen in many malignant lesions [15-19]. Immunohistochemistry revealed a broad PDGFR expression in breast cancer [20,21]. Increased expression of PDGF receptors correlates with an increased risk of distant metastasis, decreased response to chemotherapy and reduced overall survival [22,23]. In murine breast tumours inhibition of activated PDGFR β by imatinib leads to reduction in tumour cell growth [20].

Imatinib has also an antiangiogenic effect and leads to apoptosis in tumour and endothelial cells by blocking PDGF-B signalling pathways [24-28]. In highly angiogenic glioblastomas imatinib showed radiosensitizing activity. Additionally an imatinib related inhibition of PDGFR β activation leads to a decrease in the interstitial pressure of solid tumours. This effect promotes an intracellular up-take of substances like cytotoxic agents [29,30]. Therefore it was suggested to introduce imatinib into clinical research and therapies of solid tumours like breast cancer expressing the specific cellular targets. Expression patterns of tyrosine kinases, relevant for imatinib action, have been described in human breast cancer cell lines previously. It is likely, that imatinib action in solid tumours is related to PDGFR β inhibition [31]. Our hypothesis was that imatinib could contribute to breast cancer therapy by serving as a potential chemo- and radiosensitizer.

Methods

Cell Culture

Human breast cancer cell lines (MCF 7 and MDA MB 231) were obtained from American Type Culture Collection, Rockville, USA. Cells were grown in RPMI 1640 medium containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin at 37°C and 5% CO₂. Their tyrosine kinase

receptor and corresponding ligand expression patterns have been described previously [31].

Ligand dependent proliferation and migration

Cells for proliferation assays were seeded at a density of 10,000 cells/ml on a 96-well plate. After an attaching period of 24 hours, medium was exchanged for medium containing only 1% FCS to reduce effects of included growth factors. Cell lines were incubated either with PDGF BB (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (10, 25, 50, 75 or 100 ng/ml) alone or in combination with imatinib mesylate (IC₅₀ 6 μ M, defined previously [31,32]) (generously provided by Novartis, Basel, Switzerland) which was added before application of PDGF BB. Medium was replaced every 48 hours. After six days of incubation, experiments were terminated using Cell Titer Aqueous One Solution Reagent (Promega) and cell proliferation was measured. For migration assays silicon spacers were inserted into 12-well plates before cells were seeded. At the point of cell confluency, spacers were removed and distances between migration fronts were measured. Cells were incubated with imatinib, PDGF BB (25 ng/ml) or their combination for 72 hours and cell migration was measured every 24 hours using Axio vision software (Zeiss, Germany). Experiments were set up in triplicates and performed three times to confirm results. For statistical analysis student's t-test was carried out and p-values < 0.05 were declared significant.

Cell proliferation combining imatinib mesylate and doxorubicin

Cells were plated on 12-well plates and were allowed to attach for 24 hours. Then, cells were incubated with doxorubicin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in concentrations of 0.25 nM - 12.5 nM and imatinib (1.5 - 12 μ M) alone and in combinations. Replacement of medium was carried out every 48 hours and cell proliferation was determined by trypsinization, trypan blue staining and cell counting after six days. Experiments were set in triplicates and repeated to confirm results. Drug interaction was assessed using the combinatory index, where CI < 1, CI = 1 and CI > 1 indicate synergistic, additive and antagonistic effects. Data analysis was carried out using the CalcuSyn Software (Biosoft, Oxford, UK)[32,33].

Apoptosis analysis

Breast cancer cell lines were seeded on chamber slides (MDA MB 231 20,000 cells/ml, MCF 7 40,000 cells/ml) and after attachment over night, cells were incubated with imatinib (IC₅₀ 6 μ M), doxorubicin (1 nM, 2.5 nM and 5 nM) or the combination of both drugs for 24 and 48 hours. Slides were washed with PBS, cells were fixed

with 4% paraformaldehyde and TUNEL assay was carried out according to manufacturer's protocol. Apoptotic cells were counted in five random fields using fluorescence microscopy and expressed as percentage of total cell number. Student's t-test was used for statistical analyses and p-values < 0.05 were declared significant.

Radiation in vitro

Cells were cultured in T 75 cell culture flasks and seeded at a density of 4,000 (MDA MB 231) and 10,000 (MCF 7) cells/ml. After 24 hours of attaching, cells were incubated with or without imatinib in concentrations of 4 or 6 μ M. Radiation was performed after another 24 hours using a telecobalt source (Theatron 780C, Philips) emitting gamma radiation produced by cobalt 60 with energy of 1.33 MeV. In previous experiments a difference between radiation using cobalt 60 or iridium 192 could not be detected (data not shown). During radiation and transport, cells were stored in a specially designed isolated box guaranteeing a constant temperature of 37°C. A total dose of 10 Gy was applied fractionated in doses of 2 Gy per day on 5 consecutive days. Cells were counted using the trypan blue method 24 hours after each fraction. All experimental points were set-up in triplicates and repeated at least twice to confirm results.

Colony forming test

Colony forming tests were carried out to detect the effect of radiation on cell vitality. 1 g of bactoagar (Becton, Dickinson & Co., Sparks, MD, USA) was boiled in 20 ml pure water and suspended with 20 ml culture medium. Separately 1,000 MDA MB 231 cells/ml and 3,000 MCF 7 cells/ml were added at 37.5°C. Different set-ups were used for each dose level. After polymerization the agar was covered with 2 ml of cell culture medium. Medium changes took place every seven days and after 10 (MDA MB 231) and 21 (MCF 7) days of incubation. Colonies consisting of more than 30 cells were counted. Plating efficiency was calculated by multiplying the number of colonies by 100 and dividing it by the number of cells plated. To determine the surviving fraction the number of colonies of treated cells was divided by the number of colonies of non radiated control cells. Statistical analysis was performed using the student's t-test and p-values < 0.05 were declared significant.

Immunoblotting

To detect the influence of radiation and imatinib co-treatment on receptor activation, cells were lysed in lysis buffer (62.5 mM Tris-HCL (pH 6.8), 2% SDS, 50 mM DTT and 10% glycerol) and proteinase inhibitor was added. Protein determination was carried out using the Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). 30 μ g

of total protein were separated depending on molecular weight in SDS-PAGE. After transfer onto PVDF-membranes, membranes were blocked and incubated with primary antibody. Primary antibodies used were rabbit polyclonal anti-PDGFR β (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), rabbit polyclonal anti-phospho-PDGFR β (Cell Signalling Technology, Danvers, MO, USA) and anti- β -actin (Sigma-Aldrich). After incubation with corresponding secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies, blots were developed using the ECL-system (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

Research reported has been carried out with the agreement of the ethics committee of the University of Kiel, Germany (AZ D 426/10).

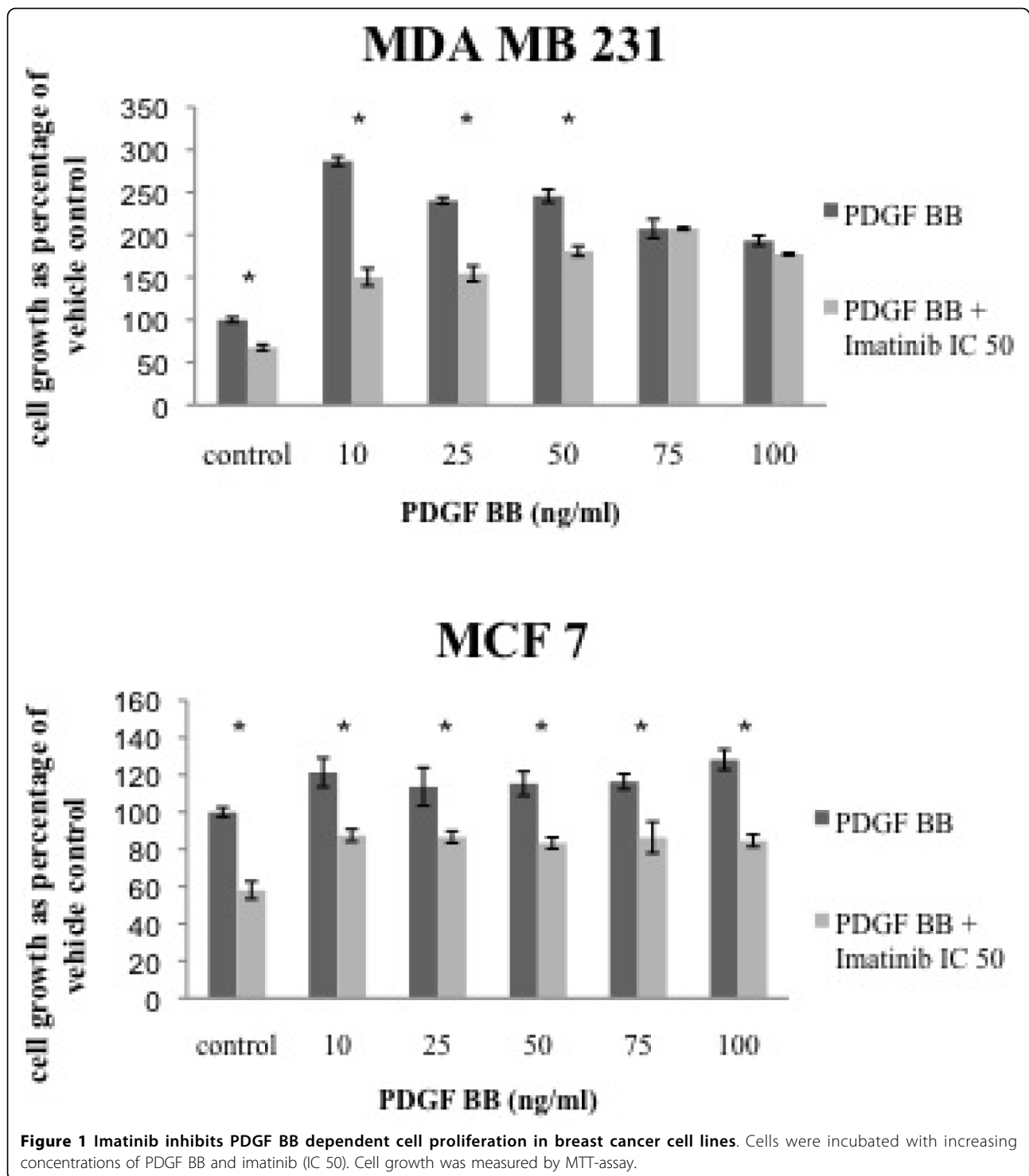
Results

In previous experiments we could determine that the cell lines used express receptors which are known imatinib targets. All cell lines express PDGFR β and abl. MCF 7 cells are positive for c-kit and PDGFR α is expressed by MDA MB 231. Despite their different expression patterns, imatinib has an anti-proliferative effect on both breast cancer cell lines with an IC 50 concentration of 6 μ M [31,34].

Imatinib inhibits PDGF BB dependent cell proliferation and migration

In MDA MB 231 cells stimulation with PDGFR β specific ligand PDGF BB in concentrations of 10 ng/ml leads to an increased cell growth of 186 percent. Higher ligand concentrations are not able to induce incremental cell proliferation (Figure 1). On the other hand imatinib is able to reduce the proliferative effect of PDGF BB. MCF 7 cells react differently on growth factor application. PDGF BB induces a cell growth increase of about 20% among all concentrations used and imatinib is able to reduce cell proliferation by 50%. The cell growth factor PDGF BB increases cell growth in breast cancer cell lines. Response rates to ligand specific signal-transduction vary, but imatinib is able to exert its anti-proliferative effect on all breast cancer cells in spite of PDGF BB stimulation.

MDA MB 231 cells show an increase in cell migration compared to the control upon stimulation with PDGF BB (Figure 2). Imatinib has the ability to inhibit cell migration in the absence of PDGF BB and this effect is also apparent in the presence of growth factor stimulation. In contrast, PDGF BB does not significantly alter cell migration of MCF 7 breast cancer cells, but imatinib reduces their migration significantly at 48 hours and as well at 72 hours of incubation. The tyrosine kinase inhibitor imatinib reduces cell migration of the studied breast cancer cell lines significantly and this anti-migratory effect persists in the presence of PDGF BB stimulation.



Combination of imatinib and doxorubicin leads to enhanced cell growth inhibition

This experiment was set-up to detect if imatinib might be a useful add-on to the cytotoxic drug doxorubicin which is used in different therapeutic settings in breast cancer treatment. Therefore cells were incubated with

increasing concentrations of doxorubicin and imatinib alone or in combination (Figure 3). Dose ratios were applied and combination indices were calculated (Table 1). An additive effect on cell proliferation can be detected in MDA MB 231 cells using a dose ratio of 1:6,000 (doxorubicin:imatinib), which contains the IC50

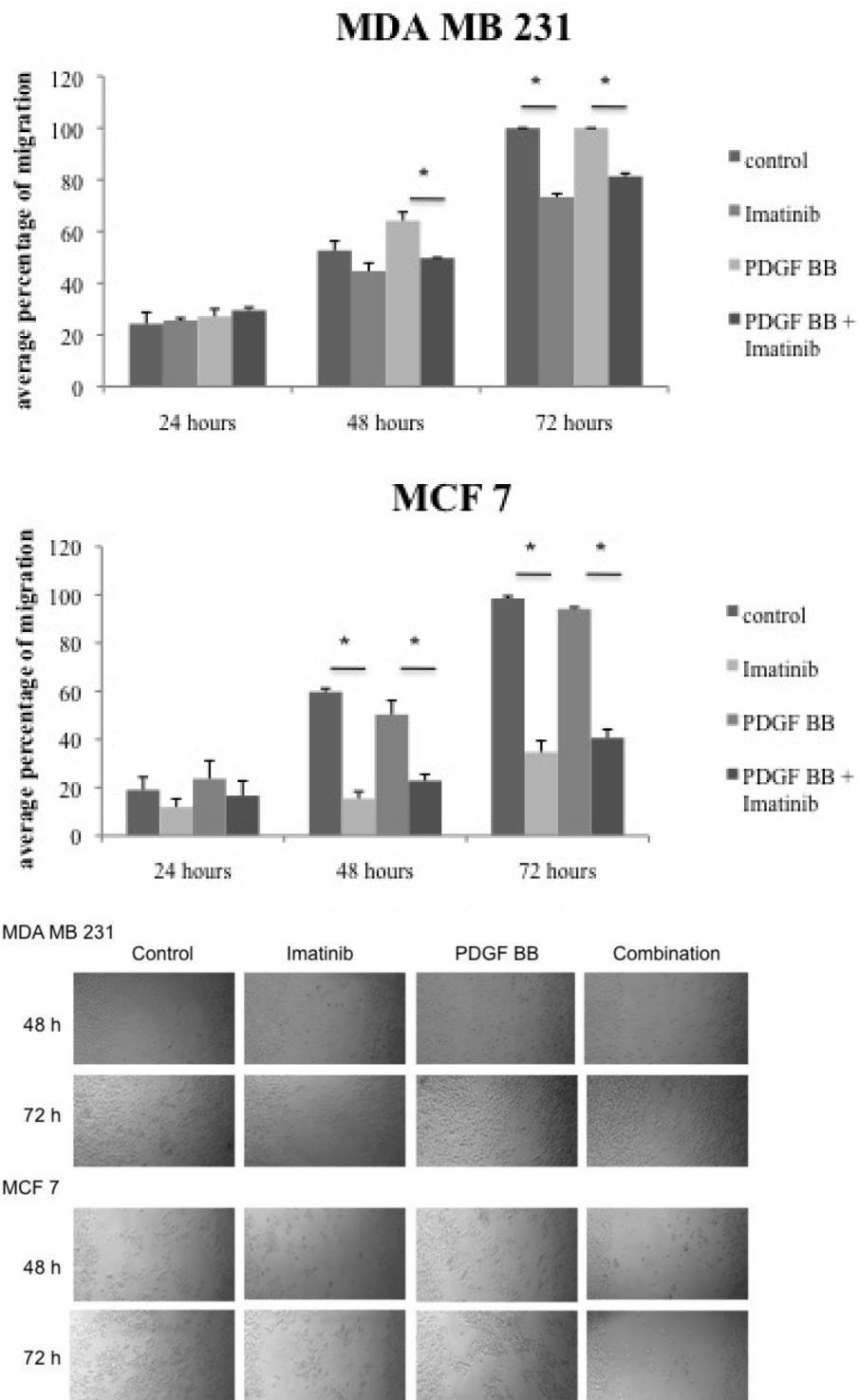
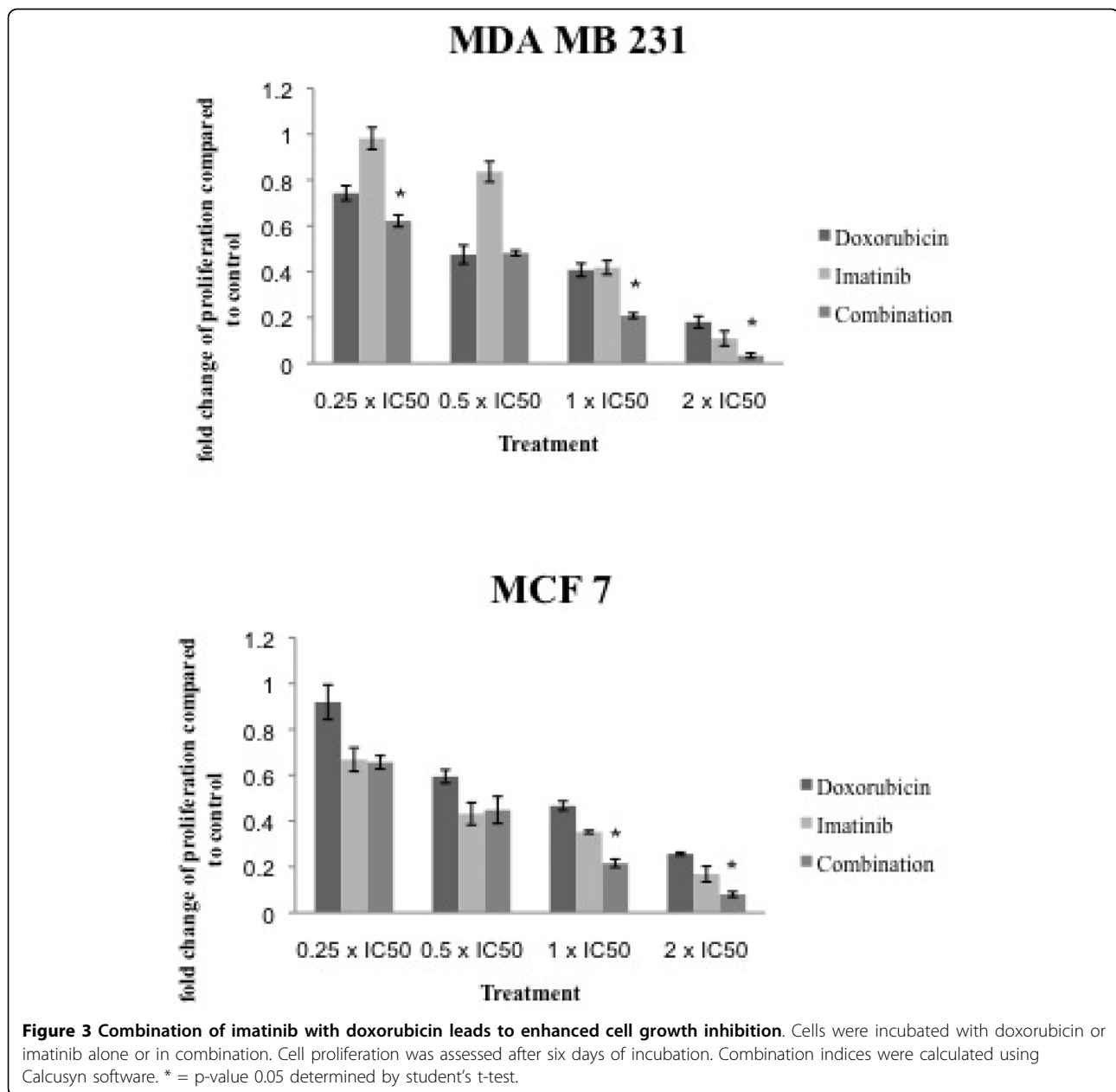


Figure 2 Imatinib inhibits PDGF BB dependent cell migration in breast cancer cells. Migration assays were performed in breast cancer cell lines. Cells were incubated with either imatinib, PDGF BB or their combination for up to 72 hours. Cell migration was measured and student's t-test was performed. * indicates p-values < 0.05. Representative images of cell migration after 48 and 72 hours of incubation are displayed.



of both drugs. Among MCF 7 cells the combination reaches an additive effect in higher dose ranges, whereas the combination of doses lower than the IC50 shows an antagonistic effect. Both therapeutic drugs show an additive effect on cell growth inhibition when combined, which is pronounced in the triple negative MDA MB 231 cell line.

Imatinib's effect on cell apoptosis

To determine whether the combination of imatinib with doxorubicin leads to increased levels of cells undergoing apoptosis, TUNEL assays were carried out. Incubation of MDA MB 231 cells with imatinib induces apoptosis

in 12 and 10% of cells after 24 and 48 hours. Cells incubated with doxorubicin over the same time show an apoptotic rate of 5% and 14%. The combination of both drugs does not increase the level of cells undergoing apoptosis at these specific time points (Figure 4). In contrast, apoptotic rates in the hormone receptor positive MCF 7 cells rise to comparable levels after 24 hours of incubation with either drug alone or their combination. Moreover, after 48 hours the amount of apoptotic cells decreases in imatinib and doxorubicin treated cells (11% and 15%), whereas the combination shows an increase in apoptotic cells to 34%. Imatinib and doxorubicin lead to apoptosis induction in both cell lines, but

Table 1 Combination indices calculated for imatinib and doxorubicin co-incubations in breast cancer cell lines

MDA MB 231						
Drug	Combination Index Values at			Dm (nM)	m	r
	ED 50	ED 75	ED 90			
Combination (1:6000)	1.11214	1.01224	0.99765	0.39732	1.84658	0.96979
Doxorubicin	N/A	N/A	N/A	0.57999	1.15437	0.97662
Imatinib	N/A	N/A	N/A	5581.5821	2.92342	0.99784
MCF 7						
Drug	Combination Index Values at			Dm (nM)	m	r
	ED 50	ED 75	ED 90			
Combination (1:1200)	1.32605	1.10981	0.95853	2.03607	1.48647	0.99769
Doxorubicin	N/A	N/A	N/A	4.56443	1.58527	0.96108
Imatinib	N/A	N/A	N/A	7487.20892	1.04304	0.98481

ED 50 (effect dosis 50%), Dm (IC50) calculated, m (measures of sigmoidicity), r (correlation coefficient)

only in MCF 7 cells a further increase in apoptosis can be detected when drugs are combined.

Effects of radiation on breast cancer cells

To detect the effect of irradiation on breast cancer cell lines, the estrogen receptor (ER) positive cell line MCF 7 and the ER negative cell line MDA MB 231 were selected. Fractionated radiation with 2 Gy per day on 5 following days to reach a total dose of 10 Gy was performed. The surviving fraction of each dose level was determined. Both cell lines show a decrease in the surviving fraction which correlates with the increasing dose levels (Figure 5). The decrease is stronger in the highly proliferative MDA MB 231 cell line.

Combination of imatinib with irradiation reduces breast cancer cell growth

To evaluate if imatinib could enhance the effect of radiation on breast cancer cells, cells received either single radiation, imatinib incubation (IC50) or the combination of both. The surviving fraction was measured after each dose level (Figure 5). Regarding the surviving fractions of MDA MB 231 cells, imatinib is able to reduce the surviving fraction further when combined with irradiation. These effects can also be seen in the lower proliferating cell line MCF 7. Here the combined treatment leads to a decrease of the surviving fraction which is explicitly detectable after application of higher Gy levels. Compared to each single treatment, the combined application of irradiation and imatinib further reduces the number of surviving and colony forming cells.

PDGFR β expression is not effected by irradiation and imatinib

As the PDGF receptor β is expressed by all cell lines we decided to further investigate the modulation of this receptor by imatinib. To detect if changes in PDGFR β

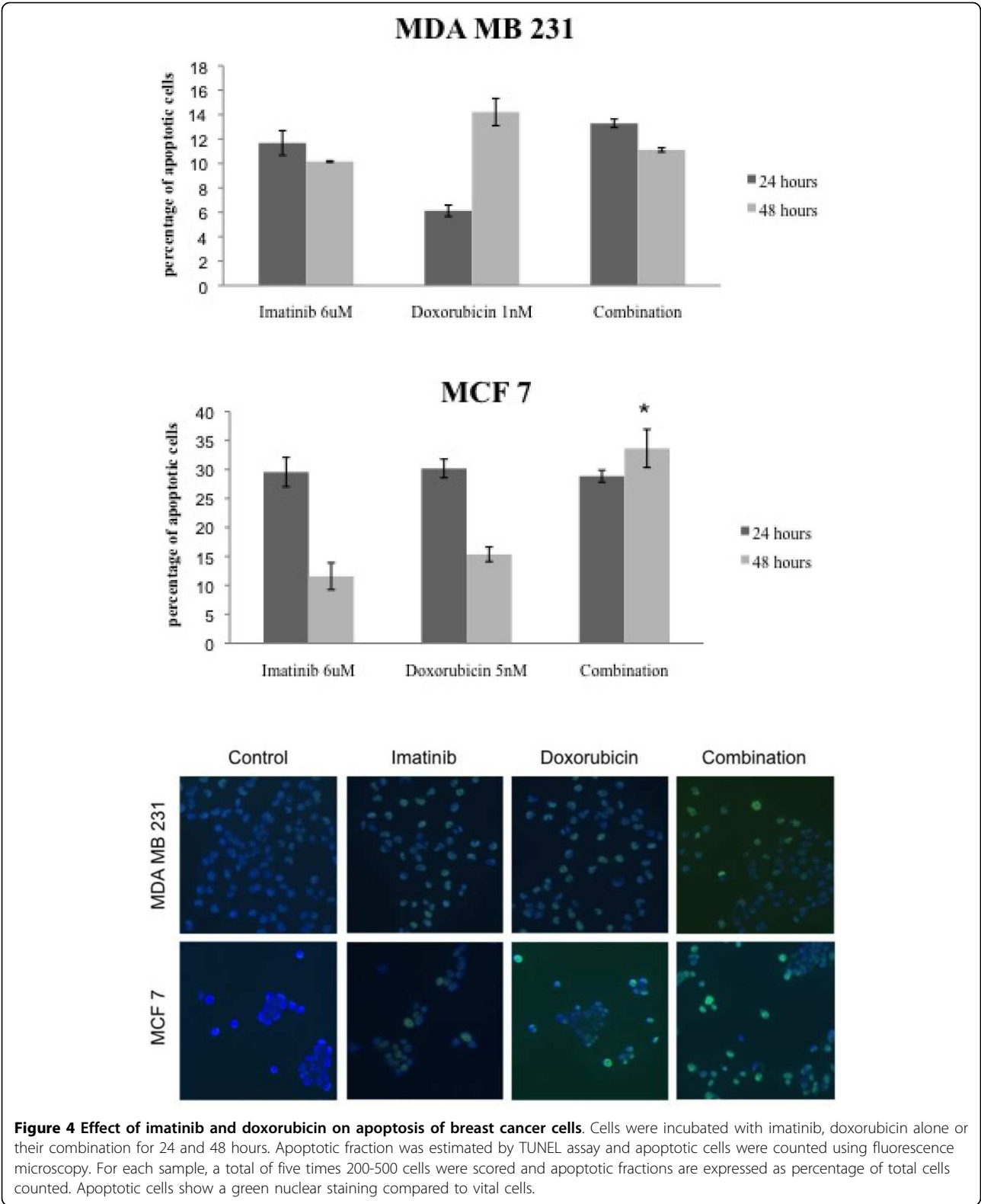
expression occur after imatinib treatment and/or fractionated irradiation, western blot analysis was performed following different treatment modalities. After each treatment option, protein lysates were extracted. As shown in figure 6, the expression of the tyrosine kinase receptor PDGFR β is not modified by the different treatment options in MCF 7 and MDA MB231 breast cancer cell lines.

Imatinib causes PDGFR β inactivation in combination with irradiation

Modulation and inhibition of the PDGFR β signalling pathway by imatinib can be measured by the receptor phosphorylation status. Tests were carried out after single incubation with imatinib and in combination with irradiation. MCF 7 cells show an inhibition of receptor activation when imatinib in a concentration of 6 μ M is combined with irradiation (Figure 7). An effect of single imatinib incubation on receptor phosphorylation could not be detected in this experimental set-up. In contrast to these results imatinib is able to inhibit PDGFR β phosphorylation in MDA MB 231 cells. After incubation with imatinib in concentrations of 4 and 6 μ M receptor activation is blocked. In irradiated breast cancer cells this effect on receptor inactivation is consistent.

Discussion

The aim of this study was to detect which effect the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate has on breast cancer cell lines in vitro when combined with either chemotherapy or irradiation. Further it was examined how imatinib modulates the PDGFR β signalling pathway. For this purpose, expression patterns of imatinib specific target receptors PDGFR α , β , c-kit and their according ligands PDGF A, B and H-SCF-1 were examined. While PDGFR β was detectable among all cell lines, PDGFR α was not expressed by MCF 7 cells in



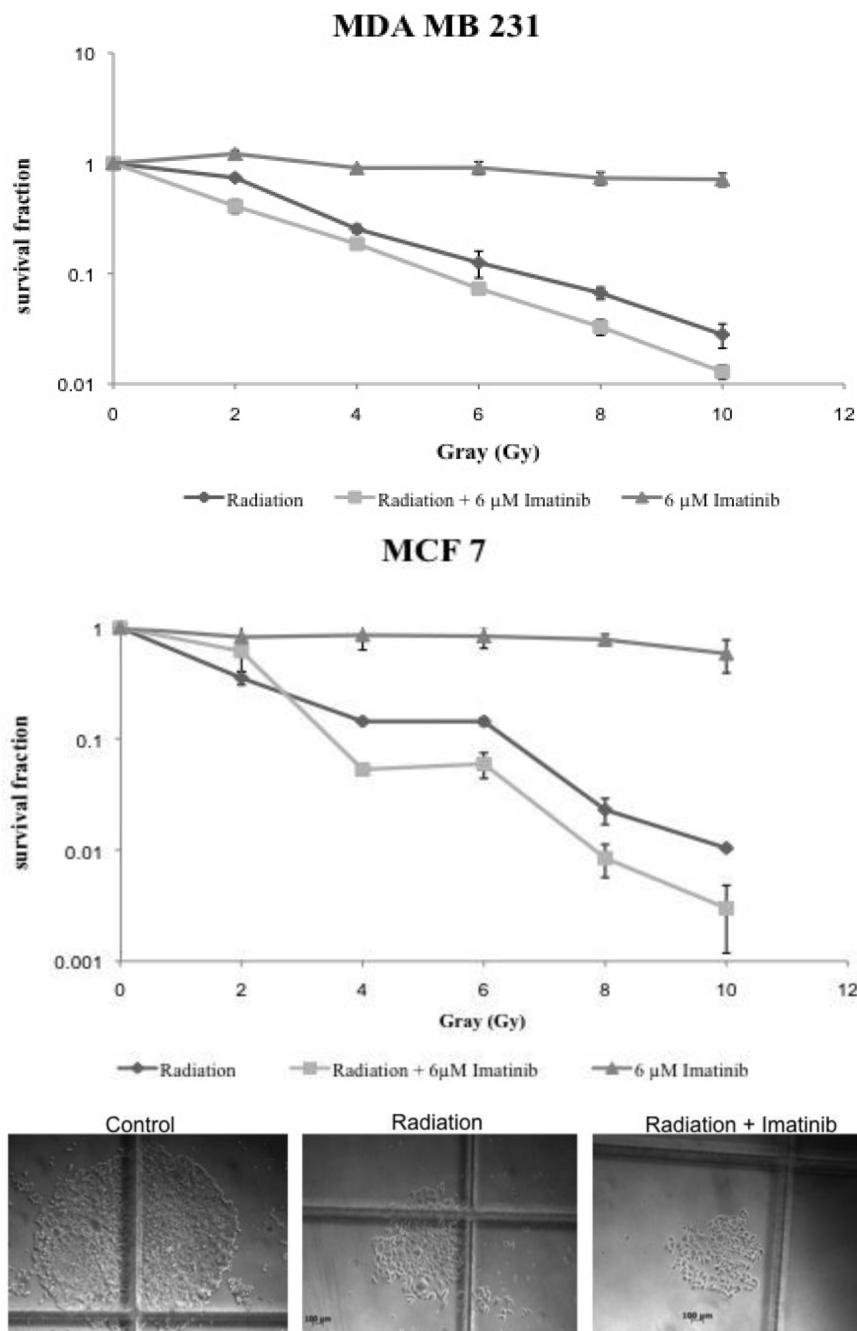


Figure 5 Combination of imatinib with irradiation reduces breast cancer cell growth in vitro. Cells were incubated with imatinib alone, received irradiation of 2 Gy per day for 5 days or the combination of both. Colony-forming tests were performed and the surviving fraction was calculated dividing the number of colonies of treated cells by the number of colonies of non radiated control cells. Representative colonies of MCF 7 cells are shown.

this setting, but they were positive for c-kit. The ligands PDGF A and B were transcribed by both cell lines and H-SCF-1 only by MCF 7. These expression patterns correspond with other studies which describe an expression of the ligand PDGF A but not the PDGFR α receptor by MCF 7 cells [35]. So far only few groups have

performed immunohistochemical analysis in primary breast cancers on PDGFR expression which plays an important role in autocrine and paracrine stimulation of cancer and stromal cells as well as in angiogenesis [13]. An expression of PDGFR α could be detected in 40% of ductal invasive breast cancers and more than 80% of

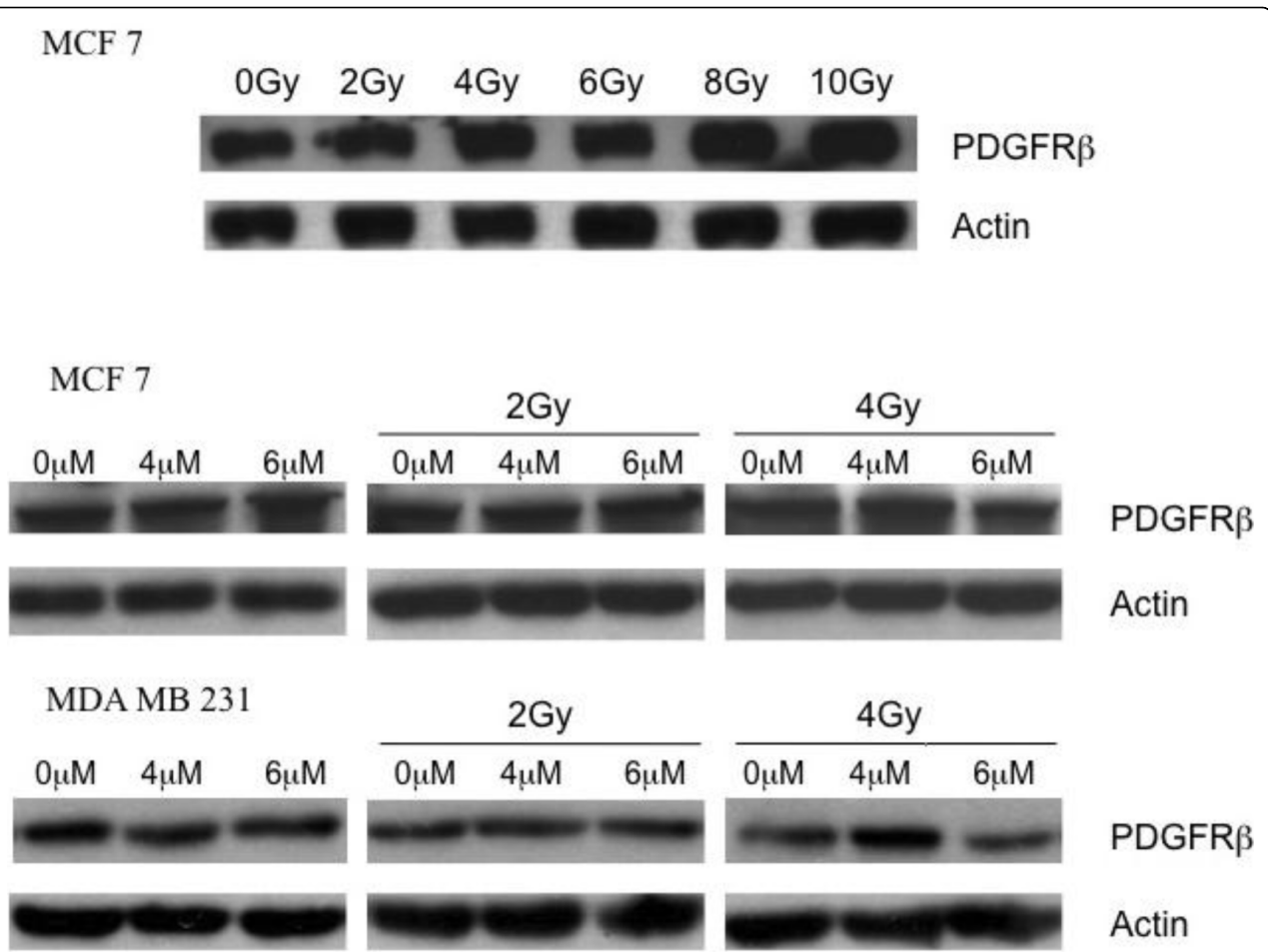


Figure 6 PDGFR β expression is not effected by irradiation and imatinib. Breast cancer cell lines underwent irradiation, incubation with imatinib or the combination of both. Total protein was extracted and western blot was carried out using antibodies against PDGFR β .

these showed also a PDGF A translation. A positive correlation between receptor expression and axillary lymph node metastasis has been suggested [35]. PDGFR β is expressed in endothelial cells of ductal carcinoma in situ [36] and also of prognostic value in peritumoral stroma [37]. Positivity has been reported for over 50% of invasive carcinoma cells.

Furthermore, autocrine stimulation of PDGF receptors is reported as an important factor in tumor progression and metastasis [38,39]. Likewise poor overall survival rates and low response to chemotherapy are correlated with over-expression of PDGF receptors [23]. Therefore by targeting these receptors, imatinib might be able to inhibit local tumour growth and decrease metastatic potential.

In previous studies we were able to determine a cell growth inhibition of imatinib on breast cancer cell lines in clinically relevant concentrations of 4 to 6 μ M which could be confirmed by other groups [31,34]. In other cancer entities such as pancreatic cancer or medullary

cancer of the thyroid gland higher concentrations were needed to cause cell growth inhibition in vitro which might be due to different receptor expression patterns [40,41]. Oral application of 25-600 mg imatinib can lead to plasma levels of about 0.17-5.68 μ M in vivo [42]. Therefore in vivo effects of imatinib in breast cancer patients appear to be reasonable in a tolerable dose.

To further investigate the interaction of imatinib with growth signalling pathways, we have chosen the PDGFR β axis because this receptor is expressed among both cell lines examined. Moreover it is not sure if c-kit activation mediates cell proliferation in breast cancer [14,43]. At least we were not able to detect an increased cell growth through SCF (c-kit ligand) application in previous experiments, whereas incubation with PDGF BB leads to augmented cell growth in all breast cancer cell lines and has the ability to stimulate cell migration. Similar results could be detected by other research groups who could show that PDGF BB application leads to increased cell growth whereas PDGF AA had no

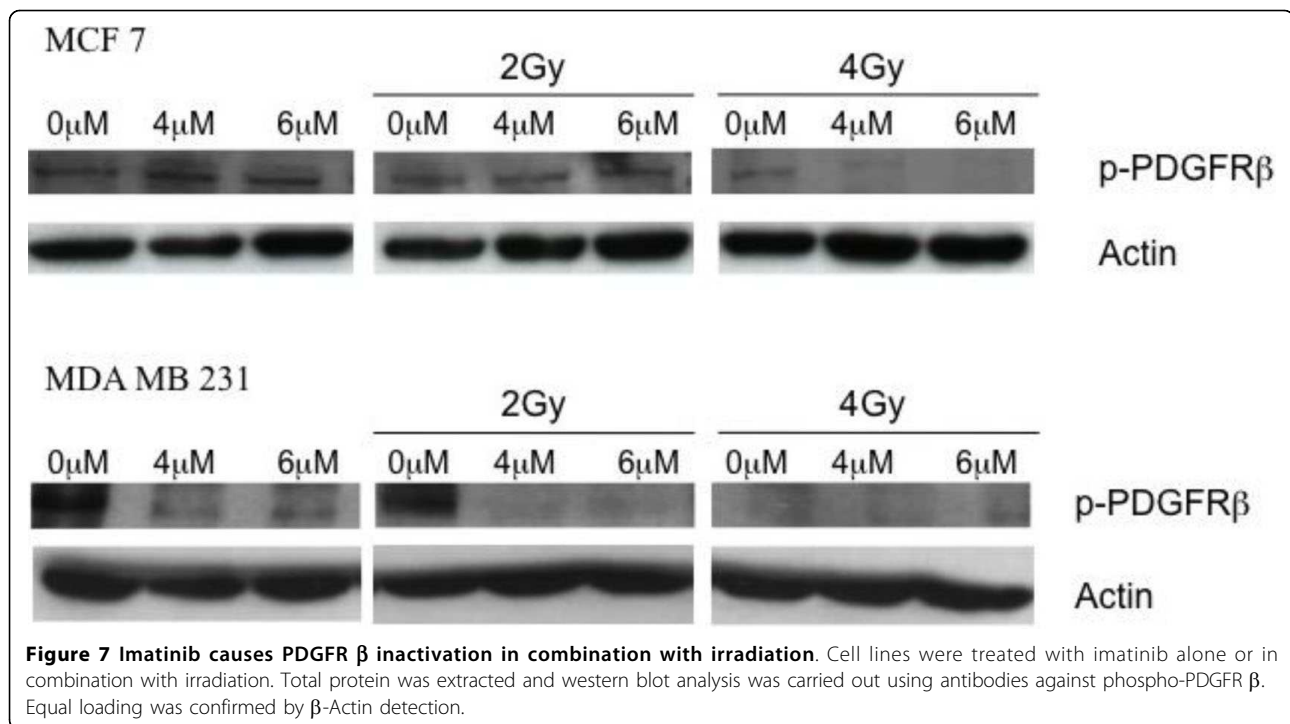


Figure 7 Imatinib causes PDGFR β inactivation in combination with irradiation. Cell lines were treated with imatinib alone or in combination with irradiation. Total protein was extracted and western blot analysis was carried out using antibodies against phospho-PDGFR β . Equal loading was confirmed by β -Actin detection.

effect on cell proliferation [44]. Moreover, in ovarian and breast cancer cell lines an inhibition of PDGF BB generated PDGFR β phosphorylation could be detected after imatinib incubation [19,27,31].

PDGFR β activation is known to cause a protective effect against the antiproliferative potential of chemotherapeutic drugs as paclitaxel and doxorubicin in various cancer entities [28,45]. For this reason, the effect of a combination of imatinib, as a PDGFR β inhibitor, with chemotherapeutic drugs in breast cancer cells appeared to be promising. In previous experiments we could determine a significant cell growth inhibition when imatinib was combined with vinorelbine compared to a single vinorelbine treatment [31]. Moreover a combination of imatinib with cisplatin has an additive effect on cell growth inhibition [46]. In this experimental setting we studied the effect of imatinib in combination with doxorubicin, which is frequently used in the adjuvant and palliative therapy of breast cancer.

In combination with doxorubicin an increase in chemosensitivity due to the potential of imatinib to inhibit PDGFR β could be demonstrated among feline vaccine-associated sarcomas [47]. In this experimental setting we were able to prove that imatinib, despite its potential of decreasing the interstitial pressure in tumours and enhancing anti-angiogenic effects in vivo, is able to alter the chemosensitivity of breast cancer cell lines in vitro. This is of major interest because clinical trials investigating the effect of imatinib either as a monotherapy or

combined with docetaxel in metastasized breast cancer do not show significant results even if patients were selected according to PDGF receptor expression of tumour cells [48-50]. For this reason, it is important to perform further trials combining imatinib with chemotherapeutic drugs. A selection of patients expressing targets for imatinib treatment is of great relevance.

Irradiation is an important component of standard therapy in the adjuvant as well as in the metastasized setting of breast cancer. For this reason, we investigated the effect of irradiation and the combination with imatinib on breast cancer cell lines in vitro. Comparing the two breast cancer cell lines MCF 7 and MDA MB 231, there is some inhomogeneity in the anti-proliferative effect caused by ionizing radiation. MDA MB 231 has a higher mitotic potential and therefore a higher plating efficiency compared to MCF 7. Moreover, the surviving fraction of MDA MB 231 compared to MCF 7 cells according to the radiation doses is diminished in the cell colony forming test. The demonstrated differences in radiosensitivity of both breast cancer cell lines correlate with formerly published results for unfractionated irradiation [51,52]. To investigate the effect of imatinib on radiosensitivity of breast cancer cell lines, cells were incubated with imatinib and a fractionated radiation was applied. Comparing the surviving fractions of cells undergoing radiation only or imatinib incubation only with the combination of both demonstrates that the combination treatment leads to a further decrease in

cell survival in the two cell lines. The decrease is detectable among all dose levels of radiation. These results are similar to other investigations on radiosensitivity modulation through imatinib in different cancer cell lines in vitro [20,53-55]. The effect of a combination of imatinib and radiation was studied in particular in glioblastomas. Incubation with imatinib increases the radiosensitivity in glioblastoma cell lines whereas there is no detectable alteration among fibroblasts [56-58]. The effectivity of this combinatory treatment can not yet fully be explained. A possible explanation might be an inhibition of the PDGF receptor pathway by imatinib, which interacts with the alterations of cell signalling, caused by radiation. By inhibiting the PDGF receptor signalling, there might occur a blockade of cell repair mechanisms which are important in repairing radiation induced damages like double-strand breaks on the DNA level. In PDGFR expressing glioblastoma cells the addition of imatinib to irradiation induced a significant increase of cells undergoing apoptosis. The effect of radiation could be improved through imatinib enhanced apoptosis rates [53].

As well as for chemotherapy, a high interstitial fluid pressure (IFP) is also a prognostic marker for poor response on irradiation [59]. For this reason a diminished IFP due to imatinib mediated PDGFR inhibition could be another mechanism to alter the effects of irradiation. We could show that there is no change in PDGFR β expression when cells were incubated with single imatinib or in combination with radiation. Single irradiation has no effect on receptor activation whereas combination with imatinib leads to an inhibition of receptor phosphorylation in both cell lines. This effect was formerly described in other cancer entities like glioblastomas, ovarian cancer and small cell lung cancer [10,19,60]. According to our results, single radiation does not cause any changes in PDGFR β activity in glioblastoma cells, whereas a direct correlation between imatinib induced inhibition of PDGFR β phosphorylation and increased radiosensitivity was detected [57]. Imatinib is able to modify several different cell signalling pathways and has therefore diverse possibilities in modulating the effects of irradiation. It is certain that inhibition of the PDGFR β pathway plays a decisive role in the enhancement of radiosensitivity in breast cancer cell lines.

Conclusions

Imatinib as a tyrosine kinase inhibitor has the ability to modulate receptor pathways. In our study we could demonstrate that imatinib is able to inhibit the autocrine and paracrine mediated activation of the PDGFR β pathway and therefore to inhibit the PDGF BB induced proliferation as well as migration of breast cancer cell

lines in vitro. In combination with the chemotherapeutic drug doxorubicin, an additive effect on the inhibition of cell proliferation could be detected. If combined with fractionated radiotherapy a decrease in the surviving fraction of breast cancer cells compared to single treatment is caused by imatinib. A possible explanation for this enhanced radio- and chemosensitivity seems to be the imatinib mediated inhibition of the PDGFR β pathway.

Further clinical trials have to be performed to approve these effects on breast cancer in vivo. A strong selection of patients expressing targets for imatinib is required to survey the influence of imatinib in combination with radiation or chemotherapy in breast cancer patients. Overall the results of this study suggest imatinib to be a candidate as an effective add-on in breast cancer related chemo- and radiotherapy. For this reason, imatinib remains a promising drug in the treatment of breast cancer.

Acknowledgements

This study was supported by an unrestricted grant from Novartis Oncology, Germany. We thank our lab technicians Sigrid Haman and Frank Roesel for their extensive practical contribution and their substantial support.

Author details

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Breast Center, University of Kiel, Arnold-Heller Strasse 3, 24105 Kiel, Germany. ²Department of Obstetrics and Gynecology, Breast Center, University of Aachen, Germany. ³Department of Radiotherapy (Radiooncology), University of Kiel, Germany.

Authors' contributions

MTW participated in the design of the study, carried out the drug interaction and apoptosis assays, performed the statistical analysis and drafted the manuscript. LD helped carrying out the drug interaction assays. CS participated in the study design. DOB helped drafting the manuscript. KW carried out the immunoblotting and participated in the irradiation. PN carried out the irradiation and was involved in the study design. MB was involved in the data analysis and helped drafting the manuscript. AS helped to draft the manuscript. WJ was involved in the study design. NM helped to draft the manuscript. CM participated in the study design and its coordination and helped to draft the manuscript. All authors have read and approved the manuscript.

Competing interests

We confirm that all authors fulfil all conditions required for authorship. We also confirm that there is no potential conflict of interest or financial dependence regarding this publication, as described in the Instruction for Authors.

Received: 26 January 2010 Accepted: 9 August 2010

Published: 9 August 2010

References

1. Niehoff P, et al: Breast irradiation with brachytherapy: approved techniques and new concepts. *Minerva Ginecol* 2007, **59**(4):377-86.
2. Vlahovic G, Crawford J: Activation of tyrosine kinases in cancer. *Oncologist* 2003, **8**(6):531-8.
3. Nahta R, Hortobagyi GN, Esteva FJ: Growth factor receptors in breast cancer: potential for therapeutic intervention. *Oncologist* 2003, **8**(1):5-17.
4. Fong TA, et al: SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 1999, **59**(1):99-106.

5. Noble ME, Endicott JA, Johnson LN: Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* 2004, **303**(5665):1800-5.
6. Clarke M, *et al*: Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005, **366**(9503):2087-106.
7. Bartelink H, *et al*: Impact of a higher radiation dose on local control and survival in breast-conserving therapy of early breast cancer: 10-year results of the randomized boost versus no boost EORTC 22881-10882 trial. *J Clin Oncol* 2007, **25**(22):3259-65.
8. Baranowska-Kortylewicz J, *et al*: Effect of platelet-derived growth factor receptor-beta inhibition with STI571 on radioimmunotherapy. *Cancer Res* 2005, **65**(17):7824-31.
9. Mendel DB, *et al*: In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003, **9**(1):327-37.
10. Buchdunger E, *et al*: Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000, **295**(1):139-45.
11. Druker BJ: Imatinib as a paradigm of targeted therapies. *Adv Cancer Res* 2004, **91**:1-30.
12. Heinrich MC, *et al*: Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* 2000, **96**(3):925-32.
13. Pietras RJ: Interactions between estrogen and growth factor receptors in human breast cancers and the tumor-associated vasculature. *Breast J* 2003, **9**(5):361-73.
14. Attoub S, *et al*: The c-kit tyrosine kinase inhibitor STI571 for colorectal cancer therapy. *Cancer Res* 2002, **62**(17):4879-83.
15. Antoniadou HN, *et al*: Malignant epithelial cells in primary human lung carcinomas coexpress in vivo platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor mRNAs and their protein products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, **89**(9):3942-6.
16. Fudge K, Bostwick DG, Stearns ME: Platelet-derived growth factor A and B chains and the alpha and beta receptors in prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* 1996, **29**(5):282-6.
17. Lindmark G, *et al*: Stromal expression of platelet-derived growth factor beta-receptor and platelet-derived growth factor B-chain in colorectal cancer. *Lab Invest* 1993, **69**(6):682-9.
18. Schiffer CA: Signal transduction inhibition: changing paradigms in cancer care. *Semin Oncol* 2001, **28**(5 Suppl 17):34-9.
19. Mundhenke C, *et al*: Novel treatment of ovarian cancer cell lines with Imatinib mesylate combined with Paclitaxel and Carboplatin leads to receptor-mediated antiproliferative effects. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008.
20. Lev DC, *et al*: Inhibition of platelet-derived growth factor receptor signaling restricts the growth of human breast cancer in the bone of nude mice. *Clin Cancer Res* 2005, **11**(1):306-14.
21. de Jong JS, *et al*: Expression of growth factors, growth inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. I: An inventory in search of autocrine and paracrine loops. *J Pathol* 1998, **184**(1):44-52.
22. Ariad S, Seymour L, Bezwoda WR: Platelet-derived growth factor (PDGF) in plasma of breast cancer patients: correlation with stage and rate of progression. *Breast Cancer Res Treat* 1991, **20**(1):11-7.
23. Seymour L, Bezwoda WR: Positive immunostaining for platelet derived growth factor (PDGF) is an adverse prognostic factor in patients with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994, **32**(2):229-33.
24. Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L: Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* 1998, **1378**(1): F79-113.
25. Kennedy SG, *et al*: The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev* 1997, **11**(6):701-13.
26. Uehara H, *et al*: Effects of blocking platelet-derived growth factor-receptor signaling in a mouse model of experimental prostate cancer bone metastases. *J Natl Cancer Inst* 2003, **95**(6):458-70.
27. Apte SM, *et al*: Targeting the platelet-derived growth factor receptor in antivasculature therapy for human ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004, **10**(3):897-908.
28. Langley RR, *et al*: Activation of the platelet-derived growth factor-receptor enhances survival of murine bone endothelial cells. *Cancer Res* 2004, **64**(11):3727-30.
29. Pietras K, *et al*: Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumors. *Cancer Res* 2001, **61**(7):2929-34.
30. Pietras K, *et al*: Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy. *Cancer Res* 2002, **62**(19):5476-84.
31. Weigel MT, *et al*: Combination of imatinib and vinorelbine enhances cell growth inhibition in breast cancer cells via PDGFR beta signalling. *Cancer Lett* 2008.
32. Chou TC: Derivation and properties of Michaelis-Menten type and Hill type equations for reference ligands. *J Theor Biol* 1976, **59**(2):253-76.
33. Chou TC, Talalay P: Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors. *Eur J Biochem* 1981, **115**(1):207-16.
34. Roussidis AE, *et al*: The importance of c-Kit and PDGF receptors as potential targets for molecular therapy in breast cancer. *Curr Med Chem* 2007, **14**(7):735-43.
35. Carvalho I, *et al*: Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha in breast cancer is associated with tumour progression. *Breast Cancer Res* 2005, **7**(5):R788-95.
36. Bhardwaj B, *et al*: Localization of platelet-derived growth factor beta receptor expression in the periepithelial stroma of human breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 1996, **2**(4):773-82.
37. Paulsson J, *et al*: Prognostic significance of stromal platelet-derived growth factor beta-receptor expression in human breast cancer. *Am J Pathol* 2009, **175**(1):334-41.
38. Jechlinger M, *et al*: Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest* 2006, **116**(6):1561-70.
39. Zhu L, *et al*: Possible predictive markers related to micro-metastasis in breast cancer patients. *Oncol Rep* 2006, **15**(5):1217-23.
40. Skinner MA, Safford SD, Freerman AJ: RET tyrosine kinase and medullary thyroid cells are unaffected by clinical doses of STI571. *Anticancer Res* 2003, **23**(5A):3601-6.
41. Li J, *et al*: Effects of STI571 (gleevec) on pancreatic cancer cell growth. *Mol Cancer* 2003, **2**(32).
42. Druker BJ, *et al*: Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001, **344**(14):1031-7.
43. Krystal GW, *et al*: The selective tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits small cell lung cancer growth. *Clin Cancer Res* 2000, **6**(8):3319-26.
44. McHowat J, *et al*: Clinical concentrations of doxorubicin inhibit activity of myocardial membrane-associated, calcium-independent phospholipase A(2). *Cancer Res* 2001, **61**(10):4024-9.
45. Blagosklonny MV, Fojo T: Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review). *Int J Cancer* 1999, **83**(2):151-6.
46. Yerushalmi R, *et al*: Combined antiproliferative activity of imatinib mesylate (STI-571) with radiation or cisplatin in vitro. *Exp Oncol* 2007, **29**(2):126-31.
47. Katayama R, *et al*: Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor activity and increases chemosensitivity in feline vaccine-associated sarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004, **54**(1):25-33.
48. Modi S, *et al*: A phase II trial of imatinib mesylate monotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005, **90**(2):157-63.
49. Cristofanilli M, *et al*: Imatinib mesylate (Gleevec(R)) in advanced breast cancer-expressing C-Kit or PDGFR- β : clinical activity and biological correlations. *Ann Oncol* 2008.
50. Yardley DA, *et al*: Phase II trial of docetaxel plus imatinib mesylate in the treatment of patients with metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2009, **9**(4):237-42.
51. Fertil B, Malaise EP: Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: analysis of 101 published survival curves. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1985, **11**(9):1699-707.
52. Matthews JH, Meeker BE, Chapman JD: Response of human tumor cell lines in vitro to fractionated irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989, **16**(1):133-8.
53. Geng L, *et al*: STI571 (Gleevec) improves tumor growth delay and survival in irradiated mouse models of glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006, **64**(1):263-71.

54. Servidei T, et al: Increased sensitivity to the platelet-derived growth factor (PDGF) receptor inhibitor STI571 in chemoresistant glioma cells is associated with enhanced PDGF-BB-mediated signaling and STI571-induced Akt inactivation. *J Cell Physiol* 2006, **208**(1):220-8.
55. Chung HW, et al: Radiosensitization effect of STI-571 on pancreatic cancer cells in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009, **75**(3):862-9.
56. Russell JS, et al: Gleevec-mediated inhibition of Rad51 expression and enhancement of tumor cell radiosensitivity. *Cancer Res* 2003, **63**(21):7377-83.
57. Holdhoff M, et al: Imatinib mesylate radiosensitizes human glioblastoma cells through inhibition of platelet-derived growth factor receptor. *Blood Cells Mol Dis* 2005, **34**(2):181-5.
58. Oertel S, et al: Human glioblastoma and carcinoma xenograft tumors treated by combined radiation and imatinib (Gleevec). *Strahlenther Onkol* 2006, **182**(7):400-7.
59. Pietras K: Increasing tumor uptake of anticancer drugs with imatinib. *Semin Oncol* 2004, **31**(2 Suppl 6):18-23.
60. Matei D, Chang DD, Jeng MH: Imatinib mesylate (Gleevec) inhibits ovarian cancer cell growth through a mechanism dependent on platelet-derived growth factor receptor alpha and Akt inactivation. *Clin Cancer Res* 2004, **10**(2):681-90.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/412/prepub>

doi:10.1186/1471-2407-10-412

Cite this article as: Weigel et al.: In vitro effects of imatinib mesylate on radiosensitivity and chemosensitivity of breast cancer cells. *BMC Cancer* 2010 **10**:412.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Literaturverzeichnis

- Antoniades, H. N., T. Galanopoulos, J. Neville-Golden and C. J. O'Hara (1992). "Malignant epithelial cells in primary human lung carcinomas coexpress in vivo platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor mRNAs and their protein products." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(9): 3942-6.
- Apte, S. M., D. Fan, J. J. Killion and I. J. Fidler (2004). "Targeting the platelet-derived growth factor receptor in antivasular therapy for human ovarian carcinoma." *Clin Cancer Res* 10(3): 897-908.
- Attoub, S., C. Rivat, S. Rodrigues, S. Van Bocxlaer, M. Bedin, E. Bruyneel, C. Louvet, M. Kornprobst, T. Andre, M. Mareel, J. Mester and C. Gespach (2002). "The c-kit tyrosine kinase inhibitor STI571 for colorectal cancer therapy." *Cancer Res* 62(17): 4879-83.
- Bartsch, V. (2005). "Wirkmechanismus der Taxane." *Pharmazie in unserer Zeit* 34((2)): S. 104-108
- Beppu, K., J. Jaboine, M. S. Merchant, C. L. Mackall and C. J. Thiele (2004). "Effect of imatinib mesylate on neuroblastoma tumorigenesis and vascular endothelial growth factor expression." *J Natl Cancer Inst* 96(1): 46-55.
- Bhardwaj, B., J. Klassen, N. Cossette, E. Sterns, A. Tuck, R. Deeley, S. Sengupta and B. Elliott (1996). "Localization of platelet-derived growth factor beta receptor expression in the periepithelial stroma of human breast carcinoma." *Clin Cancer Res* 2(4): 773-82.
- Blagosklonny, M. V. and T. Fojo (1999). "Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review)." *Int J Cancer* 83(2): 151-6.
- Bowen-Pope, D. F., C. E. Hart and R. A. Seifert (1989). "Sera and conditioned media contain different isoforms of platelet-derived growth factor (PDGF) which bind to different classes of PDGF receptor." *J Biol Chem* 264(5): 2502-8.
- Buchdunger, E., C. L. Cioffi, N. Law, D. Stover, S. Ohno-Jones, B. J. Druker and N. B. Lydon (2000). "Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors." *J Pharmacol Exp Ther* 295(1): 139-45.
- Buchdunger, E., J. Zimmermann, H. Mett, T. Meyer, M. Muller, U. Regenass and N. B. Lydon (1995). "Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(7): 2558-62.
- Carvalho, I., F. Milanezi, A. Martins, R. M. Reis and F. Schmitt (2005). "Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha in breast cancer is associated with tumour progression." *Breast Cancer Res* 7(5): R788-95.
- Cristofanilli, M., P. Morandi, S. Krishnamurthy, J. M. Reuben, B. N. Lee, D. Francis, D. J. Booser, M. C. Green, B. K. Arun, L. Pusztai, A. Lopez, R. Islam, V. Valero and G. N. Hortobagyi (2008). "Imatinib mesylate (Gleevec) in advanced breast cancer-expressing C-Kit or PDGFR-beta: clinical activity and biological correlations." *Ann Oncol* 19(10): 1713-9.
- Deininger, M. W. (2004). "Basic science going clinical: molecularly targeted therapy of chronic myelogenous leukemia." *J Cancer Res Clin Oncol* 130(2): 59-72.
- Demetri, G. D. (2002). "Targeting the molecular pathophysiology of gastrointestinal stromal tumors with imatinib. Mechanisms, successes, and challenges to rational drug development." *Hematol Oncol Clin North Am* 16(5): 1115-24.
- Dirks, R. P. and H. P. Bloemers (1995). "Signals controlling the expression of PDGF." *Mol Biol Rep* 22(1): 1-24.

- Druker, B. J., M. Talpaz, D. J. Resta, B. Peng, E. Buchdunger, J. M. Ford, N. B. Lydon, H. Kantarjian, R. Capdeville, S. Ohno-Jones and C. L. Sawyers (2001). "Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia." *N Engl J Med* 344(14): 1031-7.
- Druker, B. J., S. Tamura, E. Buchdunger, S. Ohno, G. M. Segal, S. Fanning, J. Zimmermann and N. B. Lydon (1996). "Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells." *Nat Med* 2(5): 561-6.
- Fudge, K., D. G. Bostwick and M. E. Stearns (1996). "Platelet-derived growth factor A and B chains and the alpha and beta receptors in prostatic intraepithelial neoplasia." *Prostate* 29(5): 282-6.
- Heinrich, M. C., C. L. Corless, G. D. Demetri, C. D. Blanke, M. von Mehren, H. Joensuu, L. S. McGreevey, C. J. Chen, A. D. Van den Abbeele, B. J. Druker, B. Kiese, B. Eisenberg, P. J. Roberts, S. Singer, C. D. Fletcher, S. Silberman, S. Dimitrijevic and J. A. Fletcher (2003). "Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor." *J Clin Oncol* 21(23): 4342-9.
- Heldin, C. H., A. Ostman and L. Ronnstrand (1998). "Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors." *Biochim Biophys Acta* 1378(1): F79-113.
- Heldin, C. H. and B. Westermark (1999). "Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor." *Physiol Rev* 79(4): 1283-316.
- Hiraga, T. and H. Nakamura (2009). "Imatinib mesylate suppresses bone metastases of breast cancer by inhibiting osteoclasts through the blockade of c-Fms signals." *Int J Cancer* 124(1): 215-22.
- Jechlinger, M., A. Sommer, R. Moriggl, P. Seither, N. Kraut, P. Capodiecci, M. Donovan, C. Cordon-Cardo, H. Beug and S. Grunert (2006). "Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis." *J Clin Invest* 116(6): 1561-70.
- Joensuu, H. and S. Dimitrijevic (2001). "Tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) as an anticancer agent for solid tumours." *Ann Med* 33(7): 451-5.
- Kantarjian, H., F. Giles, L. Wunderle, K. Bhalla, S. O'Brien, B. Wassmann, C. Tanaka, P. Manley, P. Rae, W. Mietlowski, K. Bochinski, A. Hochhaus, J. D. Griffin, D. Hoelzer, M. Albitar, M. Dugan, J. Cortes, L. Alland and O. G. Ottmann (2006). "Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL." *N Engl J Med* 354(24): 2542-51.
- Katayama, R., M. K. Huelsmeyer, A. K. Marr, I. D. Kurzman, D. H. Thamm and D. M. Vail (2004). "Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor activity and increases chemosensitivity in feline vaccine-associated sarcoma." *Cancer Chemother Pharmacol* 54(1): 25-33.
- Krystal, G. W., S. Honsawek, J. Litz and E. Buchdunger (2000). "The selective tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits small cell lung cancer growth." *Clin Cancer Res* 6(8): 3319-26.
- Langley, R. R., D. Fan, R. Z. Tsan, R. Rebhun, J. He, S. J. Kim and I. J. Fidler (2004). "Activation of the platelet-derived growth factor-receptor enhances survival of murine bone endothelial cells." *Cancer Res* 64(11): 3727-30.
- Leistner, E. (2005). "Die Biologie der Taxane." *Pharmazie in unserer Zeit* 34((2)): S. 98–103.
- Li, J., J. Kleeff, J. Guo, L. Fischer, N. Giese, M. W. Buchler and H. Friess (2003). "Effects of STI571 (gleevec) on pancreatic cancer cell growth." *Mol Cancer* 232.
- Li, X. and U. Eriksson (2003). "Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D." *Cytokine Growth Factor Rev* 14(2): 91-8.
- Lindmark, G., C. Sundberg, B. Glimelius, L. Pahlman, K. Rubin and B. Gerdin (1993). "Stromal expression of platelet-derived growth factor beta-receptor and platelet-derived growth factor B-chain in colorectal cancer." *Lab Invest* 69(6): 682-9.
- Manfred Stauber, T. W. (2007). "Duale Reihe: Gynäkologie und Geburtshilfe." 3

- Manley, P. W., P. Drueckes, G. Fendrich, P. Furet, J. Liebetanz, G. Martiny-Baron, J. Mestan, J. Trappe, M. Wartmann and D. Fabbro (2010). "Extended kinase profile and properties of the protein kinase inhibitor nilotinib." *Biochim Biophys Acta* 1804(3): 445-53.
- Matei, D., D. D. Chang and M. H. Jeng (2004). "Imatinib mesylate (Gleevec) inhibits ovarian cancer cell growth through a mechanism dependent on platelet-derived growth factor receptor alpha and Akt inactivation." *Clin Cancer Res* 10(2): 681-90.
- McGary, E. C., K. Weber, L. Mills, M. Doucet, V. Lewis, D. C. Lev, I. J. Fidler and M. Bar-Eli (2002). "Inhibition of platelet-derived growth factor-mediated proliferation of osteosarcoma cells by the novel tyrosine kinase inhibitor STI571." *Clin Cancer Res* 8(11): 3584-91.
- McHowat, J., L. M. Swift, A. Arutunyan and N. Sarvazyan (2001). "Clinical concentrations of doxorubicin inhibit activity of myocardial membrane-associated, calcium-independent phospholipase A(2)." *Cancer Res* 61(10): 4024-9.
- Modi, S., A. D. Seidman, M. Dickler, M. Moasser, G. D'Andrea, M. E. Moynahan, J. Menell, K. S. Panageas, L. K. Tan, L. Norton and C. A. Hudis (2005). "A phase II trial of imatinib mesylate monotherapy in patients with metastatic breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* 90(2): 157-63.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Muller-Tidow, C., S. Diederichs, E. Bulk, T. Pohle, B. Steffen, J. Schwable, S. Plewka, M. Thomas, R. Metzger, P. M. Schneider, C. H. Brandts, W. E. Berdel and H. Serve (2005). "Identification of metastasis-associated receptor tyrosine kinases in non-small cell lung cancer." *Cancer Res* 65(5): 1778-82.
- Mundhenke, C., M. T. Weigel, K. H. Sturner, F. Roesel, I. Meinhold-Heerlein, D. O. Bauerschlag, C. Schem, F. Hilpert, W. Jonat and N. Maass (2008). "Novel treatment of ovarian cancer cell lines with Imatinib mesylate combined with Paclitaxel and Carboplatin leads to receptor-mediated antiproliferative effects." *J Cancer Res Clin Oncol* 134(12): 1397-405.
- O'Brien, S. G., P. Meinhardt, E. Bond, J. Beck, B. Peng, C. Dutreix, G. Mehring, S. Milosavljev, C. Huber, R. Capdeville and T. Fischer (2003). "Effects of imatinib mesylate (STI571, Glivec) on the pharmacokinetics of simvastatin, a cytochrome p450 3A4 substrate, in patients with chronic myeloid leukaemia." *Br J Cancer* 89(10): 1855-9.
- Paulsson, J., T. Sjoblom, P. Micke, F. Ponten, G. Landberg, C. H. Heldin, J. Bergh, D. J. Brennan, K. Jirstrom and A. Ostman (2009). "Prognostic significance of stromal platelet-derived growth factor beta-receptor expression in human breast cancer." *Am J Pathol* 175(1): 334-41.
- Pytel, D., T. Sliwinski, T. Poplawski, D. Ferriola and I. Majsterek (2009). "Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy." *Anticancer Agents Med Chem* 9(1): 66-76.
- Robert-Koch-Institut (2010). "Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010."
- Roussidis, A. E., A. D. Theocharis, G. N. Tzanakakis and N. K. Karamanos (2007). "The importance of c-Kit and PDGF receptors as potential targets for molecular therapy in breast cancer." *Curr Med Chem* 14(7): 735-43.
- Schiffer, C. A. e. a. (2001). "Signal transduction inhibition: changing paradigms in cancer care." *Semin Oncol* 28(5 Suppl 17): 34-9.
- Seymour, L. and W. R. Bezwoda (1994). "Positive immunostaining for platelet derived growth factor (PDGF) is an adverse prognostic factor in patients with advanced breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* 32(2): 229-33.

- Sims, J. T. and R. Plattner (2009). "MTT assays cannot be utilized to study the effects of STI571/Gleevec on the viability of solid tumor cell lines." *Cancer Chemother Pharmacol* 64(3): 629-33.
- Sjoblom, T., A. Shimizu, K. P. O'Brien, K. Pietras, P. Dal Cin, E. Buchdunger, J. P. Dumanski, A. Ostman and C. H. Heldin (2001). "Growth inhibition of dermatofibrosarcoma protuberans tumors by the platelet-derived growth factor receptor antagonist STI571 through induction of apoptosis." *Cancer Res* 61(15): 5778-83.
- Skinner, M. A., S. D. Safford and A. J. Freemerman (2003). "RET tyrosine kinase and medullary thyroid cells are unaffected by clinical doses of STI571." *Anticancer Res* 23(5A): 3601-6.
- Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." *Nat Rev Cancer* 2(7): 489-501.
- Weigel, M. T., I. Meinhold-Heerlein, D. O. Bauerschlag, C. Schem, M. Bauer, W. Jonat, N. Maass and C. Mundhenke (2009). "Combination of imatinib and vinorelbine enhances cell growth inhibition in breast cancer cells via PDGFR beta signalling." *Cancer Lett* 273(1): 70-9.
- Weisberg, E., P. Manley, J. Mestan, S. Cowan-Jacob, A. Ray and J. D. Griffin (2006). "AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL." *Br J Cancer* 94(12): 1765-9.
- Yardley, D. A., H. A. Burris, 3rd, T. Markus, D. R. Spigel, F. A. Greco, M. Mainwaring, D. M. Waterhouse, C. D. Webb and J. D. Hainsworth (2009). "Phase II trial of docetaxal plus imatinib mesylate in the treatment of patients with metastatic breast cancer." *Clin Breast Cancer* 9(4): 237-42.
- Yerushalmi, R., J. Nordenberg, E. Beery, O. Uziel, M. Lahav, D. Luria and E. Fenig (2007). "Combined antiproliferative activity of imatinib mesylate (STI-571) with radiation or cisplatin in vitro." *Exp Oncol* 29(2): 126-31.
- Yoon, S. Y., A. Tefferi and C. Y. Li (2000). "Cellular distribution of platelet-derived growth factor, transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and their receptors in normal bone marrow." *Acta Haematol* 104(4): 151-7.
- Zhu, L., W. T. Loo, C. W. Cheng and L. W. Chow (2006). "Possible predictive markers related to micro-metastasis in breast cancer patients." *Oncol Rep* 15(5): 1217-23.