

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 TYROSINKINASE INHIBITOR  
NILOTINIB AM OVARIALKARZINOM**

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

vorgelegt von

**KATRIN RATH**  
aus Gelsenkirchen  
Kiel 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Mundhenke, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
  2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. C. Schafmayer, Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie
- Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2014

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 16.07.2014

Gez. Priv.-Doz. Dr. C. Schem



# Inhaltsverzeichnis

	Seiten
1. EINLEITUNG.....	7-12
2. MATERIAL UND METHODE.....	13-32
2.1. Material.....	13-17
2.1.1. Zellkultur.....	13
2.1.2. Immunhistochemie.....	13-14
2.1.3. Proliferationsversuche.....	14-15
2.1.4. TUNEL Assays.....	15-16
2.1.5. Planare Migrationsassays.....	16
2.1.6. Geräte.....	17
2.2. Methode.....	17-32
2.2.1. Zelllinien und Zellpflege.....	17
2.2.2. Medikamente.....	18
2.2.3. Immunhistochemischer Rezeptornachweis.....	18-20
2.2.3.1. Versuchsvorbereitung.....	19
2.2.3.2. Versuchsdurchführung.....	19-20
2.2.4. Proliferationsversuche.....	21-27
2.2.4.1. Versuchsablauf.....	21-22
2.2.4.2. Auswertung.....	22-23
2.2.4.3. Monotherapie mit Nilotinib.....	23-24
2.2.4.3.1. Durchführung.....	23-24
2.2.4.3.2. Auswertung und Statistik.....	24
2.2.4.4. Kombinationstherapie.....	24-27
2.2.4.4.1. Durchführung.....	24-26
2.2.4.4.2. Auswertung und Statistik.....	26-27
2.2.5. TUNEL Assays.....	27-30
2.2.5.1. Prinzip des TUNEL Assays.....	27
2.2.5.2. Versuchsplan.....	27-28
2.2.5.3. Versuchsdurchführung.....	28-30
	Seiten

2.2.5.4. Auswertung und Statistik.....	30
2.2.6. Planare Migrationsassays.....	30-32
2.2.6.1. Prinzip der planaren Migrationsassays.....	30-31
2.2.6.2. Versuchsplan.....	31
2.2.6.3. Versuchsdurchführung.....	31-32
2.2.6.4. Auswertung und Statistik.....	32
3. ERGEBNISSE.....	33-63
3.1. Immunhistochemischer Rezeptornachweis.....	33
3.1.1. PDGFR- $\alpha$ .....	33
3.1.2. c-Abl Rezeptor.....	33
3.2. Proliferationsversuche.....	34-51
3.2.1. Monotherapie mit Nilotinib.....	34-38
3.2.1.1 Ergebnisse der MTT-Assays.....	36-38
3.2.2. Kombinationstherapie.....	38-51
3.2.2.1. Kombinationstherapie mit Nilotinib und Carboplatin.....	38-43
3.2.2.2. Kombinationstherapie mit Nilotinib und Paclitaxel.....	43-47
3.2.2.3. Dreierkombinationstherapie mit Nilotinib, Carboplatin.... und Paclitaxel	47-51
3.3. TUNEL Assays.....	51-56
3.3.1. TUNEL Assays mit Nilotinib.....	51-52
3.3.2. TUNEL Assays mit Nilotinib und Carboplatin.....	52-53
3.3.3. TUNEL Assays mit Nilotinib und Paclitaxel.....	54-56
3.4. Planare Migrationsassays.....	56-63
3.4.1. Planare Migrationsassays mit Nilotinib.....	56-60
3.4.2. Planare Migrationsassays mit Nilotinib und Carboplatin.....	60
3.4.3. Planare Migrationsassays mit Nilotinib und Paclitaxel.....	61-63
4. DISKUSSION.....	64-77
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	78-79

	Seiten
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	80-85
7. ANHANG.....	86-88
8. DANKSAGUNG.....	89
9. PUBLIKATION.....	90
10. LEBENSLAUF.....	91

## 1. EINLEITUNG

Krebserkrankungen stellen ein weltweit zentrales Problem dar. Bösartige Tumore sind verantwortlich für 25% aller Todesfälle.

In Deutschland erkranken pro Jahr etwa 9700 Frauen an Ovarialkarzinom. Von 1980 bis 2010 ist die Zahl der jährlich erfassten Erkrankungsfälle stetig angestiegen, besonders in der Altersgruppe der über 70-Jährigen um knapp 40% (Robert Koch Institut 2010). In den Statistiken der Krebssterblichkeit der Frau steht das Ovarialkarzinom an fünfter Stelle, in der Altersklasse der 40 bis 59 Jährigen sogar an Rang vier (Jemal et al. 2010). Unter gynäkologischen Malignomen stellt bösartiger Eierstockkrebs die führende Todesursache dar (Robert Koch Institut 2010).

Die Ursache der hohen Mortalität ist vor allem darin zu sehen, dass die Erkrankung in drei Viertel der Fälle erst in den fortgeschrittenen Tumorstadien Figo III und IV diagnostiziert wird. Problematisch ist, dass bei den meisten Patientinnen kaum charakteristische Frühsymptome auftreten und bisher kein etabliertes Screeningverfahren zur Verfügung steht. Die Prognose der betroffenen Frauen ist allerdings in erster Linie vom Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose abhängig (deutsche Krebsgesellschaft).

Die Therapie des Ovarialkarzinoms besteht in der radikalen chirurgischen Entfernung des Tumors und einer anschließenden Chemotherapie, die nach aktuellem Standard eine Kombinationstherapie von Paclitaxel und Carboplatin darstellt (AGO Ovar, deutsche Krebsgesellschaft). Bei Diagnose der Erkrankung ist die angestrebte Therapie in Form einer kompletten chirurgischen Sanierung im Sinne einer R0-Resektion aufgrund eines bereits ausgedehnten Befundes mit Peritonealkarzinose oft nicht möglich. Ein weiteres Problem im Zusammenhang mit der Behandlung fortgeschrittener Ovarialkarzinome stellt die Tatsache dar, dass insbesondere diese Patientinnen zu Rezidiven neigen, welche dann häufig Resistenzen gegenüber Paclitaxel und Carboplatin zeigen (Bristow et al. 2009). Zurzeit stehen in diesen Fällen nur begrenzte Therapiemöglichkeiten zur Verfügung (Mutch et al. 2007). Zwar konnte das Langzeitüberleben von Patientinnen mit Ovarialkarzinom in den letzten 30 Jahren deutlich verbessert werden, dennoch liegt die 5-Jahresüberlebensrate auch im Jahr 2010 bei nur 47%, für Patientinnen mit progressiver Erkrankung sogar nur bei 37% (Jemal et al. 2010).

Durch das zunehmende Verständnis von Signalkaskaden, die bei der Karzinogenese eine entscheidende Rolle einzunehmen scheinen, hat die Entwicklung neuer Substanzen, die gezielt in die Tumorbiologie eingreifen, zunehmend an Bedeutung gewonnen. Medikamente, die tu-

morassozierte Strukturen, darunter Wachstumsfaktor Rezeptoren wie der vascular epidermal growth factor (VEGF) oder Signalkaskaden wie der PI3K-Akt Signaltransduktionsweg zu hemmen vermögen, können die Effizienz der Standard Chemotherapie erhöhen sowie das Auftreten von Zytostatika Resistenzen hinauszögern (Hayakawa et al. 2000, Cao et al. 2008, Hantel et al. 2010, Jain et al. 2010, Perren et al. 2011, Aghajanian et al. 2012, AGO GYN 8).

### Nilotinib

Einen Angriffspunkt der spezifischen Tumorthherapie stellen Rezeptor-Tyrosinkinasen dar. Dabei handelt es sich um eine Gruppe zellulärer Enzyme, die durch ihre Fähigkeit verschiedene Signaltransduktionsmoleküle zu aktivieren oft entscheidend an der Entstehung, dem Wachstum und der Expansion von bösartigen Tumoren beteiligt sind. Bei der Untersuchung maligner Neoplasien findet man häufig nicht nur eine verstärkte Expression der verschiedenen Rezeptoren, sondern auch ein erhöhtes Aktivitätsniveau. Eine gesteigerte Aktivierung der Tyrosinkinasen kann dabei unterschiedlich begründet sein: Häufig wird die gleichzeitige Coexpression der jeweiligen Liganden beobachtet, welche in der Folge eine parakrine oder autokrine Stimulation bewirken. Außerdem zeigen einige Tumore Rezeptormutationen, die dazu führen, dass der Rezeptor auch ohne das Vorhandensein eines Liganden aktiviert sein kann. In diesem Fall spricht man von einer Autoaktivierung des Rezeptors.

Die weitestgehende Hemmung der Tyrosinkinase Rezeptoren kann zu einer Unterbrechung dieser in Karzinomen verstärkt ablaufenden Signalkaskaden führen und somit Zellproliferation, -differenzierung und Angiogenese der Tumore vermindern (Heldin et al. 1998).

Nilotinib (auch bekannt als Tasisa, AMN107) ist ein solcher Rezeptor-Tyrosinkinase Inhibitor der zweiten Generation. Hervorgegangen ist Nilotinib aus chemischer Modifikation der Vorgängersubstanz Imatinib Mesylat (Glivec, STI571). Imatinib, entdeckt als potenter Inhibitor der Bcr-Abl-Tyrosinkinase, welche eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der chronisch myeloischen Leukämie spielt, erlangte 2002 erstmalig die Zulassung zur Therapie dieser Erkrankung.

Pathognomische Ursache der CML liegt in einer reziproken Translokation zwischen dem langen Arm des Chromosoms 9 und dem des Chromosoms 22, welche bei über 95% der Patienten detektiert wird. Das Genprodukt des so entstandenen Philadelphia Chromosoms ist ein onkogenes Fusionsprotein, die konstitutiv aktivierte Bcr-Abl-Kinase, welche über die Phos-



phorylierung von Tyrosinresten verschiedene Signalkaskaden aktiviert und die Proliferation pluripotenter hämatopoetischer Zellen unkontrolliert steigert (Shtivelman et al. 1985).

Sowohl Imatinib als auch Nilotinib binden an die intrazelluläre ATP Bindungsstelle der inaktiven Bcr-Abl Konformation, verhindern das Anheften von Substrat Adenosintriphosphat und hemmen so die Phosphotransferaseaktivität der Tyrosinkinase. In der Folge wird der Übergang in den aktivierten Zustand verhindert, nachfolgende im Rahmen der Hyperproliferation der Leukämiezellen ablaufende Signalwege können gestoppt werden (Kantarjian et al. 2006, Weisberg et al. 2006, Fava et al. 2008). Neben der beschriebenen Proliferationsinhibition sind zudem beide Substanzen in der Lage über eine Hemmung der Bcr-Abl-Kinase mittels vermehrter Expression des Tumorsuppressor Proteins Bcl-2 interacting mediator (Bim) proapoptotische Wirkung zu entfalten (Aichberger et al. 2005).

Unzureichendes Therapieansprechen sowie Unverträglichkeit des Wirkstoffes Imatinib in einer wachsenden Gruppe von Patienten führte auf der Grundlage verschiedener bekannter Resistenzmechanismen, die ein vermindertes oder fehlendes Ansprechen von Imatinib nach sich ziehen, zur Entwicklung der zweiten Generation der Tyrosinkinase Inhibitoren, zu denen auch Nilotinib zählt.

Durch Ersetzen eines Piperazinrings des Imatinib Moleküls durch einen dreifach fluorierten Imidazolring zeigt Nilotinib eine verbesserte topologische Passung für die ATP Bindungstasche. Die Bindungsaffinität des Moleküls für die Tyrosinkinase Abl wird deutlich erhöht (Deininger 2008). Sowohl in vitro als auch in vivo konnte gezeigt werden, dass die Abl-Kinase des CML Widltyps, verglichen mit der Muttersubstanz, durch Nilotinib 30-fach potenter gehemmt wird. Außerdem zeigt Nilotinib bei 32 von 33 Imatinib resistenten Zelllinien Wirksamkeit (Kantarjian et al. 2006, Weisberg et al. 2006, Fava et al. 2008, Deininger 2008). Neben der besseren Wirksamkeit besitzt Nilotinib zudem ein günstiges Toxizitätsprofil, die für Imatinib typischen therapielimitierenden Nebenwirkungen wie Wasserretention und Gewichtszunahme treten unter Behandlung mit Nilotinib nur selten auf (Rumpold et al. 2009).

Klinisch eingesetzt wird Nilotinib seit Oktober 2007 zur Behandlung Imatinib-resistenter oder -intoleranter Philadelphiachromosom positiver CML in der chronischen und akzelerierten Phase der Erkrankung und ist seit Juni 2010 ebenfalls für den Einsatz neu diagnostizierter CML Patienten, die sich in der chronischen Phase befinden, zugelassen. Grundlage der aktuellen Zulassung stellt hierbei eine Phase III Studie dar, die kürzlich eine höhere hämatologische Ansprechrate nach Gabe von Nilotinib sowie eine geringere Progressionsrate im Vergleich zu

Imatinib bei neu diagnostizierten CP CML Patienten zeigen konnte (Saglio et al. 2010). Des Weiteren belegen Untersuchungen, dass Nilotinib auch im fortgeschrittenen Blastenstadium der Krankheit noch effektiv ist und eine begrenzte Wirksamkeit bei Patienten mit Philadelphia-chromosom positiver ALL aufweist.

Da die Zielstruktur von Nilotinib, die ATP Bindungstasche, eine hochkonservierte Struktur darstellt und neben der zytoplasmatischen Abl-Tyrosinkinase auch Bestandteil membranständiger Rezeptoren ist, bindet Nilotinib mit unterschiedlicher Affinität an weitere Tyrosinkinasen. Zu diesen zählen der Rezeptor für den Stammzellfaktor c-kit sowie die platelet-derived growth factor Rezeptoren (PDGFR)  $\alpha$  und  $\beta$  (Weisberg et al. 2005).

Über die Behandlung der CML hinaus konnte gezeigt werden, dass sich sowohl Nilotinib als auch Imatinib zur Therapie von soliden Tumoren eignen, bei deren Pathogenese einer oder mehrere der oben genannten Rezeptoren eine Rolle spielen.

Bekanntes Beispiel stellen die gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), mesenchymale Tumoren des Magen-Darm-Traktes, dar, deren Ursache in 90% der Fälle in einer gain of function Mutation im Stammzellfaktor Rezeptor c-kit liegt. Resultat ist ein autoaktiver Rezeptor mit permanentem Proliferationsreiz. Bei Patienten, die keine Mutation dieses Rezeptors aufweisen, findet man stattdessen häufig einen konstitutiv aktiven PDGFR-  $\alpha$ , der bei den Tumorzellen selbige nachgeschalteten Signalwege wie auch c-kit aktiviert (Weisberg et al. 2006). Nilotinib ist in der Lage die mutierten Rezeptoren zu inhibieren und zeigt darüber hinaus Wirksamkeit bei Imatinib und Sunitinib Resistenz oder Unverträglichkeit (Montemurro et al. 2009).

Aktuelle Studien zeigten außerdem bei verschiedenen myeloproliferativen Erkrankungen in vitro und in vivo erfolgsversprechende, durch Nilotinib vermittelte Wachstumsinhibition.

Stovers et al. konnten 2005 die Wirksamkeit der Therapie mit Nilotinib gegen die Fusionstyrosinkinasen TEL-platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  (TEL-PDGFR- $\beta$ ) und FIP1-like-1 (FIP1L1)- PDGFR- $\alpha$  belegen, welche für die Entstehung der chronischen myelomonozytären Leukämie und des hypereosinophilen Syndroms verantwortlich sind. Vielversprechende Ergebnisse zeigten sich auch bei der Behandlung der systemischen Mastozytose, eine myeloproliferative Erkrankung die typischerweise mit einer Imatinib-resistenten Mutation im c-kit Rezeptor einhergeht. Nilotinib hingegen konnte in den resistenten Zelllinien in klinisch relevanten Konzentrationen eine effektive Hemmung des Zellwachstums erbringen (von Bubnoff et al. 2005).

Im Hinblick auf das Verständnis einer potentiellen Wirksamkeit von Nilotinib beim Ovarialkarzinom spielt eine entscheidende Rolle, dass die entarteten Zellen, im Gegensatz zu gesundem Ovarialgewebe, zu einem hohen Prozentsatz ebenfalls die Tyrosinkinase c-Abl, c-kit, PDGFR- $\alpha$  und PDGFR- $\beta$  exprimieren. Untersuchungen von Wilczynski et al. zeigten 2005, dass in epithelialen ovariellen Tumoren PDGFR- $\alpha$  in 58% der Fälle, PDGFR- $\beta$  in 29% und c-kit in 33% der untersuchten Gewebeproben vermehrt an der Zelloberfläche anfärbbar waren, während im gesunden Stroma des Ovars keine der genannten Rezeptoren gefunden wurden. Matei et al. konnten 2006 außerdem beobachten, dass in Ovarialkarzinomzelllinien nicht nur die Expression der oben genannten Rezeptor-Tyrosinkinase erhöht ist, sondern ebenso die Bildung der Liganden, welche zur Aktivierung der jeweiligen Rezeptoren führen. Somit sind die malignen Zellen in der Lage ihr eigenes Wachstum durch autokrine und parakrine Rezeptorstimulation selbst zu fördern.

In vitro Untersuchungen konnten außerdem belegen, dass eine übermäßige Expression von c-kit und PDGF Rezeptoren in Ovarialkarzinomzellreihen eine positive Korrelation mit aggressiven Tumorverhalten und niedriger Überlebensrate aufweist (Matei et al. 2004).

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Aktivierung von Tyrosinkinase Rezeptoren und derer nachgeschalteter Signalkaskaden sowohl in der Pathogenese des Ovarialkarzinoms als auch in der Fähigkeit zur Tumorexpansion eine entscheidende Rolle spielen und die Unterbrechung dieser Ketten einen gezielten Therapieansatz darstellen könnte, um eine Progression der Erkrankung zu stoppen.

Ein durch Imatinib vermittelter wachstumseinschränkender Effekt bei PDGFR- $\alpha$  positiven Ovarialkarzinomzelllinien konnte bereits 2004 von Matei et al. nachgewiesen werden. Weiterführende in vitro Untersuchungen an Ovarialkrebszellen zeigten eine deutliche Proliferationsinhibition nach Imatinib Monotherapie sowie nach Kombinationsbehandlungen mit Carboplatin und Paclitaxel. Zudem konnte in den untersuchten Zelllinien ein pro- apoptotischer Einfluss von Imatinib dargelegt werden (Mundhenke et al. 2008). Ergebnisse laufender in vivo Studien, die eine klinische Relevanz von Imatinib in der Therapie des Ovarialkarzinoms aufzeigen, liegen derzeit noch nicht vor.

### Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit galt es präklinisch zu untersuchen, ob Nilotinib in der Lage ist, Einfluss auf das Wachstumsverhalten von Ovarialkarzinomzellen zu nehmen.

In vorausgegangenen Studien dieser Arbeitsgruppe konnte die Wirkung der Vorgängersubstanz Imatinib auf Eierstockkrebszellen gezeigt werden. Nun sollte herausgefunden werden, ob auch für Nilotinib in klinisch relevanten Konzentrationen in der Monotherapie wie auch in der Kombination mit Carboplatin oder Paclitaxel eine rezeptorvermittelte Inhibition des Tumorstwachstums beim Ovarialkarzinom nachweisbar ist. Es galt unter differenzierter Betrachtung zu untersuchen, inwiefern diese Wirkung auf eine Hemmung der Zellproliferation, der Zellmigration und der Induktion von Apoptose zurückzuführen ist. Zu beantworten waren diese Fragestellungen unter Verwendung der Methoden: Proliferationsversuche, Migrations- und TUNEL-Assays.

Zudem sollten die epithelialen Ovarialkarzinomzelllinien mittels immunhistochemischer Färbungen auf die Expression der Tyrosinkinase c-Abl und PDGFR- $\alpha$  geprüft werden, um eventuell vorhandene Angriffsstrukturen für Nilotinib aufzuzeigen.

Besonderere Bedeutung wird in dieser Arbeit der Frage beigemessen, ob sich durch eine Kombinationstherapie von Nilotinib mit den etablierten Zytostatika Carboplatin und Paclitaxel additive oder synergistische Effekte erzielen lassen und sich somit Hinweise ergeben, dass eine solche Kombination Vorteile für die Patientinnen erbringen kann. Zum einen könnte eine durch die Kombinationstherapie ermöglichte Dosisreduktion der einzelnen Komponenten mit einer Minderung der mit der Therapie verbundenen Nebenwirkungen einhergehen und zum Anderen eine mögliche verbesserte Effizienz der Standardchemotherapie die Bildung resistenter Tumorzellen senken.

Kann durch die Behandlung mit dem Tyrosinkinase Inhibitor Nilotinib in vitro eine Wachstumshemmung in Ovarialkarzinomzelllinien sowohl in der Monotherapie als auch in der Kombinationstherapie mit den Standardchemotherapeutika Carboplatin und Paclitaxel erzielt werden und somit eine Therapie bei Patientinnen sinnvoll sein?

## 2. MATERIAL UND METHODE

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Zellkultur

<b>Zelllinien:</b>	
OVCAR3, OVCAR8	National Institutes of Health, Berthesda, MD, USA
SK-OV3	American Type Culture Collection, Mannassas, VA, USA
Falcon-Tubes	Sarstedt, Newton, USA
Fetal bovine serum	Biochrom AG, Berlin
PBS-Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Penicillin und Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Tissue Culture Flask 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Newton, USA
Trypsin/EDTA Solution	Biochrom AG, Berlin
Tryptan blue	Biochrom AG, Berlin
VLE RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin

#### 2.1.2. Immunhistochemie

<b>Zelllinien:</b>	
OVCAR3, OVCAR8	National Institutes of Health, Berthesda, MD, USA
<b>Antikörper:</b>	
polyklonare IgG von Kaninchen	
c-Abl K12: sc-131	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
PDGFR- $\alpha$ C20: sc-338	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Aceton	Merck, Darmstadt
Chamber Slides	LabTec <sup>®</sup> Chamber Slides, Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA
DAB	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark

DAKO Antibody Diluent	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
DAKO ChemMate EnVision Detection Kit	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
DAKO Peroxidase Blocking Reagenz	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Eppendorf-Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fetal bovine serum	Biochrom AG, Berlin
Goat Normalserum	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Milchpulver	Biochrom AG, Berlin
Mayers Häkalaunlösung	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
PBS-Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Penicillin und Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
TRIS-HCl	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA Solution	Biochrom AG, Berlin
VLE RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
Vectastatin ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Xylol	Merck, Darmstadt

### 2.1.3 Proliferationsversuche

<b>Zelllinien:</b>	
OVCAR3, OVCAR8	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
SK-OV3	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA
<b>Medikamente:</b>	
Carboplatin	Sigma Aldrich, München
Nilotinib	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Novartis, Basel, Schweiz
Paclitaxel	Sigma Aldrich, München
<b>Lösungsmittel</b>	
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich, München

Cell Titer Aqueous One Solution Reagent	Promega, Madison, WI, USA
Eppendorf-Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon-Tubes	Sarstedt, Newton, USA
Fetal bovine serum	Biochrom AG, Berlin
Penicillin und Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Tissue Culture Plate 12-well	Sarstedt, Newton, USA
Tissue Culture Plate 96-well	Sarstedt, Newton, USA
Trypsin/EDTA Solution	Biochrom AG, Berlin
Tryptan blue	Biochrom AG, Berlin
VLE RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin

#### 2.1.4 TUNEL Assays

<b>Zelllinien:</b>	
OVCAR3, OVCAR8	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
<b>Medikamente:</b>	
Carboplatin	Sigma Aldrich, München
Nilotinib	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Novartis, Basel, Schweiz
Paclitaxel	Sigma Aldrich, München
BSA	Sigma, Taufkirchen
Chamber Slides	LabTec® Chamber Slides, Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA
DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
DNase I, recombinant, grade I	Biochrom AG, Berlin
Eppendorf-Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon-Tubes	Sarstedt, Newton, USA
Fetal bovine serum	Biochrom AG, Berlin
In Situ Cell Death Detection Kit, POD	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	Biochrom AG, Berlin
Natriumcitrat 0,1%	Biochrom AG, Berlin

Paraformaldehyd 4%	Merck, Darmstadt
PBS-Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Penicillin und Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
TRIS-HCl	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
VLE RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt

#### 2.1.5. Planare Migrationsassays

<b>Zelllinien:</b>	
OVCAR3, OVCAR8	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
<b>Medikamente:</b>	
Carboplatin	Sigma Aldrich, München
Nilotinib	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Novartis, Basel, Schweiz
Paclitaxel	Sigma Aldrich, München
Eppendorf-Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Falcon-Tubes	Sarstedt, Newton, USA
Fetal bovine serum	Biochrom AG, Berlin
PBS-Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Penicillin und Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Silikoneinsätze FlexiPERM	Sarstedt, Newton, USA
Tissue Culture Plate 12-well	Sarstedt, Newton, USA
Trypsin/EDTA Solution	Biochrom AG, Berlin
Tryptan blue	Biochrom AG, Berlin
VLE RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin



### 2.1.6. Geräte

Dynatech MR 5000 Elisa Reader	Dynatech, Guernsey Channel Islands
Forma Scientific CO <sub>2</sub> water jacketed Inkubator Modell 3121S/N 26697-130	Thermo Electron Cooperation, Dreieich
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Zeiss, Jena

### 2.2. Methode

#### 2.2.1. Zelllinien und Zellpflege

Für die in vitro Versuche wurden die Zelllinien des National Institutes of Health (NIH): OVCAR3, OVCAR8 und die Zellreihe SK-OV3 aus der American Type Culture Collection (ATCC) verwendet, welche dem Bestand der Universitätsfrauenklinik Kiel entstammten. Es handelt es sich um humane epitheliale Adenokarzinomzellen des Ovars, die als adhärenente Kultur wachsen und ähnliche Wachstumsgeschwindigkeiten aufweisen.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Gewebekulturflaschen mit einer Fläche von 75cm<sup>2</sup>. Als Nährmedium diente dabei VLE RPMI 1640, das mit 10% fetalem Kälberserum (FSC) sowie 10.000 IU Penicillin und Streptomycin versetzt wurde. Das so hergestellte Medium wurde mindestens zweimal wöchentlich gewechselt. Die Bebrütung der Zellen erfolgte im Kulturschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Bei einer 80-90%igen Konfluenz der Kulturplatten wurden die Zellreihen in geringeren Konzentrationen subkultiviert. So konnte ein weitgehend logarithmisches Wachstum gewährleistet werden. Nach höchstens 20 Passagen wurden die Zellen verworfen, um Verfälschungen der Ergebnisse durch mögliche neu entstandene Mutationen vorzubeugen.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Trypanblau Methode im Zählnetz nach Neubauer.

Mit der Zelllinie SK-OV3 wurden nur Proliferationsversuche mit Nilotinib in der Monotherapie vorgenommen. Es ließ sich keine ausreichende Wirkung im therapeutischen Bereich von Nilotinib erzielen, sodass die weiteren Versuche ausschließlich mit den Zelllinien OVCAR3 und OVCAR8 durchgeführt wurden.

### 2.2.2. Medikamente

Bei den verwendeten Medikamenten handelte es sich um den Tyrosinkinase Inhibitor Nilotinib, mit freundlicher Unterstützung zur Verfügung gestellt von Novartis Pharma (Basel, Schweiz), dem Platinkomplex Carboplatin und dem Taxan Paclitaxel (beide käuflich erworben von Sigma Aldrich München).

Nilotinib, welches in Pulverform vorlag, wurde entsprechend seines spezifischen Gewichts von 529,52g/L eingewogen und in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Um den DMSO Gehalt möglichst gering zu halten, wurde zunächst mittels DMSO Zugabe eine 80mmolare Lösung von Nilotinib erstellt, im Anschluss daran durch Hinzufügen des wie oben beschrieben hergestellten Standardmediums RPMI 1640 eine 10mmolare Stocklösung. Die Lagerung der 10mmolaren Nilotinib Lösung erfolgte in 1,5mL Eppendorf-Tubes im Kühlschrank bei 4°C. Für weitere Verdünnungen wurde Standardmedium verwendet.

Carboplatin und Paclitaxel lagen bereits in gelöster Form vor, Carboplatin als 10mmolare Stocklösung in aqua dest., Paclitaxel in NaCl gelöst in einer Konzentration von 1mmol.

Weitere Verdünnungsstufen wurden ebenfalls durch Zugabe von Standardmedium hergestellt.

### 2.2.3. Immunhistochemischer Rezeptornachweis

Um die Expression für Nilotinib wichtiger Angriffspunkte auf der Zelloberfläche der untersuchten OVCAR3 und OVCAR8 Zellen belegen und die vorhandenen Angaben in der Literatur bestätigen zu können, sollte der immunhistochemische Rezeptornachweis der Tyrosinkinasen c-Abl und PDGFR- $\alpha$  erfolgen.

Zu diesem Zweck wurden die Karzinomzellen auf Objektträger überführt, um anschließend mittels immunhistochemischer Färbemethoden die verschiedenen Rezeptoren sichtbar machen zu können. Der Nachweis beruht auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion, bei welcher die Antikörper an ein Detektionssystem gekoppelt sind, das schließlich das Vorhandensein des Proteins sichtbar macht. Die Reaktionen verlaufen nach folgendem Prinzip: Nach Einsatz des Primärantikörpers, der gegen die gesuchte Tyrosinkinase gerichtet ist, löst der gegen den Primärantikörper gerichtete und an ein Enzym gekoppelte Sekundärantikörper nach Substratzugabe eine Enzym-Substrat Reaktion aus, die schließlich zur Farbentstehung führt. Da mehrere Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden können, entsteht dadurch eine Verstärkung des Signals.

Zur Detektion stehen verschiedene Systeme zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden das DAKO EnVision System für die Färbung der Tyrosinkinase PDGFR- $\alpha$

und die Avidin-Biotin Methode zur Darstellung der zytoplasmatischen Abl-Tyrosinkinase verwendet.

Bei der Avidin-Biotin Methode wird neben Einsatz eines biotinmarkierten Sekundärantikörpers eine Lösung mit dem Namen ABC-System hinzugegeben, die Avidin und biotinylierte Peroxidase enthält. Aufgrund der hohen Affinität von Avidin zu Biotin bilden die beiden Komponenten einen Komplex und binden außerdem an den biotinmarkierten Sekundärantikörper.

Beim DAKO EnVision System handelt es sich im Gegensatz zur Avidin-Biotin Methode um ein zweistufiges Färbeverfahren, bei der ein Dextranpolymer eingesetzt wird, an das mehrere (bis zu zehn) Moleküle des Sekundärantikörpers und zusätzlich durchschnittlich 70 Moleküle der Meerrettichperoxidase gebunden sind.

Die Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper Bindung erfolgt bei beiden verwendeten Methoden durch Zugabe von 3,3-Diaminobezidin-Tetrahydrochlorid (DAB) und Wasserstoffperoxid. Das vorher fast farblose Chromogen wird dabei mittels Enzymreaktion zu einem braunen Endprodukt oxidiert.

#### 2.2.3.1. Versuchsvorbereitung

Vor der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen galt es Nativpräparate der einzelnen Zelllinien zu erstellen.

Dazu wurden die Ovarialkarzinomzellen aus den Kulturschalen auf chamber slides mit jeweils zwei Kammern überführt. Die Zellen wurden mit 5mL Trypsin-EDTA vom Boden der Flaschen gelöst und nach Stoppen der Reaktion mit 10mL Standardmedium bei 1350 RPM für 10 Minuten zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde nach Absaugen des Überstandes mit 5mL Medium verdünnt und die Zellzahl nach Anfärben mit Trypanblau mittels Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ermittelt. Anschließend wurden die Zellen auf die mit Medium befüllten chamber slides ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C im Kulturschrank bebrütet. Die Zellmenge jeder Kammer der zweier chamber slides betrug dabei 50000.

#### 2.2.3.2. Versuchsdurchführung

Die vorbereiteten chamber slides wurden nach zunächst zweimaligen Waschen mit PBS mit 100%igen Aceton fixiert. Nach 10-minütiger Inkubation erfolgte ein Waschschrift mit Waschpuffer mit folgendem Rezept: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl 50mM, NaCl 0,15M. Im Anschluss daran wurden die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet. Als nächster Schritt erfolgte die Inkubation der Zellen mit der DAKO Peroxidase Blocking Rea-

genz für 20 Minuten, um eine Anfärbung der endogenen Peroxidase zu vermeiden. Um weitere unspezifische Hintergrundfärbungen zu reduzieren, wurde nach erneutem Waschen mit Waschpuffer Normalserum für 30 Minuten auf die Zellen aufgetragen. Das Serum bindet an stark geladene Kollagen- und Bindegewebelemente, an welche auch der sekundäre Antikörper binden und zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Im Anschluss wurden die Objektträger nicht gewaschen.

Die folgenden beiden Schritte umfassten das Auftragen des Primär- und des Sekundärantikörpers.

Um ein optimales Ergebnis zu erlangen, wurden die verwendeten Primärantikörper gerichtet gegen PDGFR- $\alpha$  und c-Abl in verschiedenen Verdünnungsstufen auf die Objektträger aufgetragen. Die Verdünnung erfolgte bei Verwendung des DAKO enVision Systems mit der DAKO Antibody Diluent, bei Verwendung der Avidin-Biotin Methode mit in PBS gelösten 2% igen Milchpulver.

Die vorbehandelten Objektträger wurden in einer feuchten Kammer mit der jeweiligen Antikörperlösung für die Dauer von 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde ein weiterer Waschgang durchgeführt und daraufhin die sekundären Antikörper auf die Proben aufgetragen. Die EnVision Lösung, die sowohl sekundären Antikörper als auch Enzym enthält, wurde für 30 Minuten auf die Präparate aufgetragen. Zur Sichtbarmachung der Tyrosinkinase c-Abl mussten die Objektträger zunächst für 30 Minuten mit dem biotinylierten Sekundärantikörper beimpft werden und anschließend für weitere 30 Minuten mit dem ABC Kit, welches die Enzymlösung enthält. Die Inkubationen erfolgten in feuchten Kammern bei Raumtemperatur.

Um gebundene Antikörper sichtbar zu machen, wurde nach einem Waschgang eine Substrat-Chromogen-Lösung auf die Präparate aufgetragen. Die Lösung enthielt den Farbstoff 3,3-Diaminobezidin-Tetrahydrochlorid (DAB) und Wasserstoffperoxid. Die Peroxidase reagiert mit Wasserstoffperoxid unter Zerfall zu Wasser und Sauerstoff, die dazu benötigten Elektronen stellt DAB zur Verfügung und wird dabei selbst oxidiert. Diese Oxidation spiegelt sich in der Ausfällung eines braunen Reaktionsproduktes wider. Nach einer Einwirkzeit von 3 Minuten wurde die Reaktion durch Waschen mit Leitungswasser gestoppt. Im nächsten Schritt erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayers Hämalaunlösung und anschließendem Spülen der Objektträger mit Leitungswasser für 30 Minuten. Abschließend wurden die Präparate nach Entwässerung in einer Alkohol-Xylol Reihe zur Konservierung mit Deckgläsern versehen.

#### 2.2.4. Proliferationsversuche

Um der Fragestellung nachzugehen, inwieweit durch die Behandlung mit Nilotinib das Zellwachstum gehemmt werden kann, wurden Proliferationsversuche an den Zelllinien OVCAR3, OVCAR8 und SK-OV3 durchgeführt. Nilotinib wurde als Monotherapie und auch als Kombinationspartner mit den gängigen Standardchemotherapeutika der Ovarialkarzinomtherapie Carboplatin und Paclitaxel getestet.

##### 2.2.4.1. Versuchsablauf

Der Versuchsaufbau und –ablauf sowohl der Experimente der Monotherapie als auch derjenigen der Kombinationstherapie war weitestgehend identisch.

Die Versuchsvorbereitung bestand zunächst in der Aufbereitung der zu untersuchenden Zellreihen: Um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen, wurden sie zunächst für 10 Minuten mit 5mL Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde beendet durch die Zugabe von 10mL Standardnährmedium. Anschließend wurde das Gemisch in Falcon Tubes überführt und bei 20°C und 1350 Umdrehungen für 10 Minuten zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde mit Standardmedium auf 5mL verdünnt und die Zelldichte nach Resuspension mittels Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Anschließend wurden die zu untersuchenden Zellen auf Kulturplatten ausgesät, wir verwendeten dafür 12-well-Plates. Die einzelnen Wells wurden mit je 1mL Nährmedium befüllt, die Zellmenge pro Well lag bei allen Untersuchungen zwischen 10000 und 15000 Zellen (10 Zellen/ $\mu$ L). Die Auswahl der Zellzahl erfolgte dabei so, dass die unbehandelten Kontrollzellen zu Versuchsende eine 90% ige Konfluenz auf den Kulturplatten zeigten.

Zum Anwachsen wurden die beimpften Mikrottestplatten zunächst für 24 Stunden im Kulturschrank bei 37°C bebrütet. Anschließend erfolgte die Zugabe der Medikamente. Bei jedem Versuch wurden verschiedene Konzentrationsstufen der Einzelsubstanz oder der Medikamentenkombinationen verwendet, wobei jede Konzentrationsstufe dreifach aufgetragen wurde. Dazu wurde das Medium in jedem Well abgesaugt und durch je 1mL der entsprechenden Medikamentendosierung ersetzt.

Die Inkubationszeit der Substanzen betrug bei allen Versuchen sechs Tage. Diese Zeitspanne erwies sich bei allen Zelllinien als gut geeignet.

Zur internen Kontrolle wurde bei jedem Versuch ein Nullwert eingestellt, der das Wachstumsverhalten der Zelllinien ohne Medikamentenzusatz aber unter gleichen Bedingungen repräsentierte. Da die Medikamente in Nährmedium verdünnt wurden, wurde als Kontrolle jeweils ein dreifacher Ansatz mit je 1mL dieses Nährmediums erstellt.

Bei der Analyse der Ergebnisse diente der Wert der Kontrolle als Bezugsgröße.

Die Auswertung der 12-well-Plates erfolgte nach sechstägiger Medikamenteninkubation, wobei der Tag der Medikamentenzugabe dem Tag null entsprach. Innerhalb dieser sechs Tage wurde das Medikament zweimal, am zweiten und vierten Tag, abgesaugt und neu aufgetragen, beziehungsweise Nährmedium in den Kontrollwells gewechselt.

#### 2.2.4.2. Auswertung

Die Auswertung erfolgte durch Zellzählung unter dem Lichtmikroskop. Dafür wurde das Medikament abgesaugt und die Zellen mit jeweils 400µL Trypsin-EDTA von ihrer Oberfläche abgelöst. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mittels Zugabe von je 800µL Standardmedium beendet, das Suspendat aus den Wells in 1,5mL Eppendorf-Tubes überführt und anschließend die Zellzählung unter Berücksichtigung apoptotischer Zellen mit Hilfe der Trypanblau Methode unter Benutzung der Neubauer Zählkammer durchgeführt. Aus den Werten der Ansätze mit gleicher Konzentrationsstufe wurde das arithmetische Mittel berechnet.

Bei den Untersuchungen wurde die manuelle Zellzählung der Auswertung durch den oft gebräuchlichen MTT-Test vorgezogen. Bei dem MTT-Assay handelt es sich um einen Zytotoxizitätstest, bei dem die Zellaktivität auf dem Boden der Reduktion des gelben, wasserlöslichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids (MTT) in ein violettes, wasserunlösliches Formazan bestimmt wird.

Eine von Sims und Plattner 2009 veröffentlichte Studie zeigte, dass im Rahmen der Behandlung mit Tyrosinkinase Inhibitoren die Auswertung von Proliferationsversuchen mittels MTT-Tests keine verlässlichen Ergebnisse liefert. Zur Überprüfung dieser These wurden für die Monotherapie mit Nilotinib analog zur manuellen Zellzählung MTT-Assays mit den Zelllinien OVCAR3, OVCAR8 und SK-OV3 durchgeführt.

Anstelle der 12-well-Plates wurden für die Versuche der MTT-Testung Mikrottestplatten mit 96-wells verwendet, die einzelnen Vertiefungen wurden mit je 100µL unterschiedlich verdünnter Nilotinib Lösungen befüllt. Ansonsten entsprach der Versuchsaufbau und -ablauf dem der übrigen Proliferationsversuche. Nach sechstägiger Medikamenteninkubation und zweimaligen Mediumwechsel erfolgte die Bestimmung der Proliferationsrate mittels des CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assays und dem ELISA-Reader Dynatech MR5000 Microplate Reader. Dazu wurden zunächst die aufgetragenen Nilotinib Lösungen jedes Wells durch 100µL Standardmedium ohne Medikamentenzusatz ersetzt. Zusätzlich wurden in jede Vertiefung 20µL der CellTiter Aqueous One Solution Reagent gegeben, die

ein Tetrazoliumsalz enthält, welches in Anwesenheit von NADH und NADPH zu Formazan reduziert wird, einem Farbstoff, dessen Menge durch Absorptionsmessung bei 490nm photometrisch bestimmt werden kann. Zu diesem Zweck wurden die Ovarialkarzinomzellen eine Stunde bei 37°C im Zellkulturschrank inkubiert und anschließend die Absorption mit Hilfe des ELISA Readers bei 490nm bestimmt. Da NADH und NADPH in metabolisch aktiven Zellen entsteht, verhält sich die Menge des gebildeten Formazans und somit die gemessene Absorption proportional zur Anzahl vitaler Zellen.

Die ermittelte Anzahl vitaler Zellen der nur mit Standardmedium beimpften Kontrollen wurde als 100% Marke gewählt und die Ergebnisse der jeweiligen Medikamenteninkubationen dazu in Bezug gesetzt. Auf diese Weise konnte man den Therapieerfolg durch Vergleich der behandelten und unbehandelten Zellen darstellen.

Entsprechend konnte ebenfalls der Erfolg der Kombinationstherapien ermittelt werden. Dazu wurde jeweils der Effekt der Monotherapie mit dem der Kombinationstherapie verglichen, um mögliche Wirkverstärkungen aufzudecken.

Um den Erfolg der Arzneimittelwirkung weiter quantifizieren zu können, wurden so genannte „Inhibiting Concentration“ (IC)-Werte festgesetzt. Für die Behandlungen mit Nilotinib, Carboplatin und Paclitaxel wurden jeweils die IC50-Werte für die Zelllinien OVCAR3 und OVCAR8 bestimmt. Nach der Food and Drug Administration (FDA) ist die IC50 einer Substanz definiert als die Konzentration, bei der eine 50%ige Inhibition der Zellproliferation in vitro erreicht wird. Im Rahmen dieser Arbeit bedeutet dies, dass ein spezieller IC-Wert als die Medikamentenkonzentration anzusehen ist unter dessen Therapie das Zellwachstum um einen gewissen Prozentsatz im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe gesenkt werden kann.

#### 2.2.4.3. Monotherapie mit Nilotinib

##### 2.2.4.3.1 Durchführung

In den Versuchen wurden die Zellreihen OVCAR3, OVCAR8 und SK-OV 3 mit dem Tyrosinkinase Inhibitor Nilotinib behandelt. Der untersuchte Konzentrationsbereich lag dabei zwischen 1µM und 4,5µM. Es wurden außerdem Vorversuche durchgeführt, in denen geringere Konzentrationen als 1µM getestet wurden, diese zeigten allerdings keine nachweisbare Wirksamkeit von Nilotinib.

Durch Verdünnung mit Standardmedium wurden aus der 10mmolaren Stocklösung von Nilotinib Lösungen mit folgender Konzentration erstellt: 1µM, 1,5 µM, 2 µM, 2,5 µM, 3 µM, 3,5 µM, 4 µM, 4,5µM.

Versuchsaufbau und –ablauf erfolgte anschließend wie in 2.2.4.1. beschrieben.

#### 2.2.4.3.2. Auswertung und Statistik

Die Bestimmung der Zellproliferation erfolgte mittels Zellzählung und MTT-Assay wie in 2.2.4.2. beschrieben. Die Ergebnisse der MTT-Testungen wurden anschließend der mittels Zellzählung erlangten Werte gegenübergestellt.

Zur Signifikanztestung wurde für die Zellzählungen sowie MTT-Testungen der zweiseitige t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt, wobei p-Werte kleiner als 0.05 als statistisch signifikant angesehen wurden.

#### 2.2.4.4. Kombinationstherapie

##### 2.2.4.4.1. Durchführung

Zu diesem Zweck wurden nur die Zelllinien OVCAR3 und OVCAR8 untersucht, da sich für SK-OV3 in den Versuchen mit Nilotinib keine ausreichende Wirkung im therapeutischen Bereich des Medikamentes erzielen ließ.

In den Kombinationsversuchen wurde die Wirkung von Nilotinib in Verbindung mit den in der Ovarialkarzinomtherapie standardmäßig eingesetzten Zytostatika Carboplatin und Paclitaxel untersucht. Dazu wurden Proliferationsassays mit Zweifachkombinationen bestehend aus Nilotinib plus Carboplatin und Nilotinib plus Paclitaxel und die Dreifachkombination mit Nilotinib, Carboplatin und Paclitaxel durchgeführt.

In den Versuchsansätzen der Zweierkombinationen wurde für Nilotinib eine feste Konzentration von 2µM eingestellt, während die des Kombinationspartners variierte. Die gewählte Konzentration von 2µM zeigte in beiden Zellreihen in den zuvor durchgeführten Monotherapien eine signifikante Proliferationsinhibition. Der jeweilige Kombinationspartner wurde der Nilotinib Lösung in steigender Dosierung hinzugefügt. Die Konzentrationen, die dazu gewählt wurden, wurden vorab in Vorversuchen als Monotherapie getestet, um den für die Kombinationsversuche relevanten Bereich festlegen und die in der Literatur angegebene IC50 bestätigen zu können. Auf dem Boden dieser Ergebnisse wurden für OVCAR3 die Carbopla-



tin Konzentrationen 2 $\mu$ M, 4 $\mu$ M, 6 $\mu$ M, 8 $\mu$ M und 10 $\mu$ M, für OVCAR8 1 $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 4 $\mu$ M und 5 $\mu$ M ausgewählt. Für Paclitaxel wurde ein Konzentrationsbereich von 1 bis 3 nM festgelegt, dafür wurden in 0,5nM Abständen für OVCAR3 und OVCAR8 die Verdünnungen 1nM, 1,5nM, 2nM, 2,5nM und 3nM hergestellt.

Für jede Konzentrationsstufe von Carboplatin/Paclitaxel wurde eine Kombinationslösung, welche 2 $\mu$ M Nilotinib und die entsprechenden Carboplatin/Paclitaxel Verdünnung enthält, erstellt und eine Lösung, in der nur das Zytostatikum als Monosubstanz verdünnt wurde. Durch dieses Vorgehen konnten später die Ergebnisse der Kombinationstherapie mit denen der Monotherapie des jeweiligen Medikamentes verglichen werden.

Neben einem Triplet nur mit Nährmedium beimpfter Kontrollen diente den Kombinationsinkubationen außerdem eine 2 $\mu$ molare Nilotinib Lösung als Bezugsgröße.

Die Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend 2.2.4.1.

Für die Versuche der Dreierkombinationstherapie wurden Lösungen erstellt, die Carboplatin, Paclitaxel und Nilotinib enthielten.

Übereinstimmend mit den Versuchsprotokollen der Zweierkombinationen wurden die Zellreihen OVCAR3 und OVCAR8 verwendet und die Nilotinib Konzentration auf 2 $\mu$ M festgesetzt. Um eine Kombinationslösung herzustellen in der Carboplatin und Paclitaxel zu gleichen Anteilen wirksam sind, wurden Vorversuche in Form von Zweierkombinationen durchgeführt. Dabei wurden jeweils verschiedene Konzentrationsstufen von Carboplatin und Paclitaxel miteinander kombiniert. Als sinnvoll erwies sich für OVCAR3 eine Carboplatin Verdünnung auf 4 $\mu$ M, für OVCAR8 auf 2,5 $\mu$ M sowie für beide Zellreihen eine Paclitaxel Konzentration von 0,75nM.

Es wurden sowohl Lösungen in den oben genannten Konzentrationen der jeweiligen Einzelsubstanzen, der Zweierkombination Carboplatin und Paclitaxel sowie der Dreierkombination hergestellt und aufgetragen. Durch diesen Versuchsaufbau konnte die Effektivität der Dreierkombination verglichen mit derer der Zweierkombinationstherapie beurteilt werden.

Die Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend wie in 2.2.4.1. beschrieben.

Um zu untersuchen, ob die Zweierkombination von Nilotinib und Carboplatin oder Paclitaxel sowie die Dreierkombination einen additiven oder synergistischen Effekt zeigt, wurden Versuche mit Konzentrationsstufen in speziellen Kombinationssmustern durchgeführt.

In den durchgeführten Zweierkombinationen entsprachen die dazu verwendeten Konzentrationen 1/8 IC50, 1/4 IC50, 1/2 IC50, 1\* IC50, 2\* IC50 der jeweiligen Substanzen. Für die Zellreihen OVCAR3 und OVCAR8 ergaben sich dadurch folgende Dosierungen:

OVCAR3: Nilotinib: 0,375 $\mu$ M, 0,75 $\mu$ M, 1,5 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 6 $\mu$ M  
Carboplatin: 0,625 $\mu$ M, 1,25 $\mu$ M, 2,5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M  
Paclitaxel: 0,25nM, 0,5nM, 1nM, 2nM, 4nM

OVCAR8: Nilotinib: 0,3125 $\mu$ M, 0,625 $\mu$ M, 1,25 $\mu$ M, 2,5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M  
Carboplatin: 0,375 $\mu$ M, 0,75 $\mu$ M, 1,5 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 6 $\mu$ M  
Paclitaxel: 0,25nM, 0,5nM, 1nM, 2nM, 4nM

Die entsprechenden Konzentrationen wurden als Monotherapie aufgetragen und in identischen Konzentrationen miteinander kombiniert. So wurden Proliferationsversuche mit Nilotinib und Carboplatin sowie Nilotinib und Paclitaxel wie in 2.2.4.1. beschrieben durchgeführt. Für die Dreierkombinationstherapie mit Nilotinib, Carboplatin und Paclitaxel wurde folgendes Konzentrationsmuster der jeweiligen Medikamente gewählt: 1/16 IC50, 1/8 IC50, 1/4 IC50, 1/2 IC50, 1\*IC50. Die daraus resultierenden Verdünnungsstufen lauteten:

OVCAR3: Nilotinib: 0,1875 $\mu$ M, 0,375 $\mu$ M, 0,75 $\mu$ M, 1,5 $\mu$ M, 3 $\mu$ M  
Carboplatin: 0,3125 $\mu$ M, 0,625 $\mu$ M, 1,25 $\mu$ M, 2,5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M  
Paclitaxel: 0,125nM, 0,25nM, 0,5nM, 1nM, 2nM

OVCAR8: Nilotinib: 0,15625 $\mu$ M, 0,3125 $\mu$ M, 0,625 $\mu$ M, 1,25 $\mu$ M, 2,5 $\mu$ M  
Carboplatin: 0,1875 $\mu$ M, 0,375 $\mu$ M, 0,75 $\mu$ M, 1,5 $\mu$ M, 3 $\mu$ M  
Paclitaxel: 0,125nM, 0,25nM, 0,5nM, 1nM, 2nM

Aufgetragen wurde Nilotinib als Monotherapie, die Zweierkombination mit Carboplatin und Paclitaxel sowie die Dreierkombination mit den genannten Substanzen.

#### 2.2.4.4.2. Auswertung und Statistik

Die Auswertung erfolgte nach sechstägiger Inkubation mittels Zellzählung gemäß 2.2.4.2. Der Testung des Signifikanzniveaus diente wie auch in der Monotherapie der zweiseitige t-Test für unverbundene Stichproben.

Die Beurteilung eines eventuell vorhandenen additiven oder synergistischen Effektes erfolgte mittels Auswertung durch die Computer Software Calcsyn. Die berechneten Kombinationsindizes wurden folgendermaßen interpretiert: Bei einem Kombinationsindex  $< 1$  liegen synergistische Effekte vor, beträgt der Wert 1 handelt es sich um einen additiven Effekt. Kombinationsindizes  $> 1$  lassen Rückschlüsse auf antagonistische Effekte zu.

### 2.2.5. TUNEL Assays

Die TUNEL Methode ist ein Verfahren, das der Darstellung und Quantifizierung von Zellkernen apoptotischer Zellen dient.

#### 2.2.5.1. Prinzip des TUNEL Assays

Die Fragmentierung der nukleären DNA durch Endonukleasen gilt als ein Schlüsselereignis während der Apoptose. Die daraus resultierenden Strangbrüche zeigen freie Hydroxylgruppen, welche mittels TUNEL Assay durch fluoreszierende Nukleotide gebunden und so identifiziert werden können. Die Polymerisation der markierten Nukleotide an die freien 3'-OH Enden wird dabei durch die terminale Deoxynucleotidyltransferase (TdT) katalysiert, die wie auch die DNA Polymerase in der Lage ist Nukleotide miteinander zu verknüpfen. Anschließend können die markierten Stellen der beschädigten DNA unter Benutzung eines Fluoreszenzmikroskops bei einer Extinktionswellenlänge von 450- 500nm als grüne Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

Im Vergleich zu anderen apoptosespezifischen Nachweisverfahren bietet die TUNEL Methode die Vorteile, dass sie einfach und schnell durchführbar ist und eine hohe Sensitivität aufweist.

#### 2.2.5.2. Versuchsplan

Durch den Einsatz von TUNEL Assays sollte untersucht werden, inwiefern Nilotinib in der Lage ist in Ovarialkarzinomzelllinien eine Apoptoseinduktion herbeizuführen und folglich herzuleiten ob eine Überführung der Zellen in Apoptose ein relevanter Wirkmechanismus von Nilotinib darstellt. Geprüft wurde der Effekt von Nilotinib in der Monotherapie und in der Kombination mit Carboplatin oder Paclitaxel. Bei den untersuchten Zellreihen handelte es sich um OVCAR3 und OVCAR8. Die Inkubationszeit der Medikamente betrug 24 und 48 Stunden. Jeweils nach Ablauf dieser Zeit wurden die TUNEL Reaktionen an den zuvor fixierten Objektträgern nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und anschließend die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie vorgenommen.

Gemäß veröffentlichter Studien sowie dem Wachstumsverhalten der untersuchten Zellen wurde vermutet, dass innerhalb von 48 Stunden der größte Anteil der sensiblen Zellen apoptotische Veränderungen in Form von DNA-Strangbrüchen zeigt und daher das oben genannte Zeitintervall für die Medikamenteninkubation gewählt (Beppu et al. 2004, Weigel et al. 2008).

Zusätzlich zu den mit Medikament therapierten Zellen wurden bei jedem Versuch Objektträger unbehandelter Zellen angefertigt, welche ebenfalls in den TUNEL Assay mit einbezogen wurden. Die Apoptoserate dieser Zellen diente bei der Auswertung als Bezugsgröße.

Bei der Durchführung der TUNEL Assays war zu beachten, dass bei jedem Versuch neben den zu untersuchenden Objektträgern jeweils zwei negativ-Kontrollen und eine positiv-Kontrolle mitgeführt werden mussten.

Der positiv-Kontrolle wurde während der Untersuchung DNase zugesetzt, die dazu führt, dass in den Zellkernen Strangbrüche der DNA gebildet werden, welche im Verlauf durch die markierten Nukleotide angefärbt werden.

Den negativ-Kontrollen fehlte die Applikation der Enzymlösung, sodass die Verknüpfung der Nukleotide und somit die Fluoreszenz ausbleibt.

#### 2.2.5.3. Versuchsdurchführung

Zunächst wurden die zu 80% konfluenten Zellkulturen auf chamber slides mit jeweils zwei Kammern ausgesät. Die einzelnen Kammern wurden mit 1,2mL Standardmedium befüllt und mit einer Zelldichte von 50000 Zellen pro Kammer beimpft. Anschließend wurden die Zellen für einen Tag im Zellkulturschrank bei 37°C bebrütet, damit sie sich am Boden der chamber slides absetzen und in die Proliferationsphase übergehen konnten.

Nach 24 Stunden erfolgte die Medikamentenzugabe. Dazu wurde das Nährmedium in den Kammern der chamber slides abgesaugt und durch die entsprechende Medikamentenkonzentration ersetzt.

Es wurden zwei Versuchsreihen mit jeweils unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen durchgeführt. Die Dosierung von Nilotinib variierte bei diesen Versuchen zwischen 2 und 4µM. Die erste Versuchsreihe untersuchte dabei den Effekt von 2µM Nilotinib in der Monotherapie und in Kombination mit Carboplatin, während in einem zweiten Ansatz die Wirkung von 4 µM Nilotinib alleine und in Kombination mit Paclitaxel getestet wurde. Zur Interpretation der Kombinationsbehandlung wurden Carboplatin und Paclitaxel sowohl kombiniert mit Nilotinib als auch als Einzelbehandlung auf die Wells aufgetragen.

Die verwendeten Konzentrationen im Einzelnen lauteten:

OVCAR3: Nilotinib 2 $\mu$ M, Carboplatin 2 $\mu$ M, Carboplatin 4 $\mu$ M, Nilotinib 2 $\mu$ M + Carboplatin 2 $\mu$ M, Nilotinib 2 $\mu$ M + Carboplatin 4 $\mu$ M;  
Nilotinib 4 $\mu$ M, Paclitaxel 1,5nM, Nilotinib 4 $\mu$ M + Paclitaxel 1,5nM

OVCAR8: Nilotinib 2 $\mu$ M, Carboplatin 1 $\mu$ M, Nilotinib 2 $\mu$ M + Carboplatin 1 $\mu$ M;  
Nilotinib 4 $\mu$ M, Paclitaxel 1,5nM, Nilotinib 4 $\mu$ M + Paclitaxel 1,5nM

Bei den Versuchen wurde jede Konzentrationsstufe zweifach, das heißt in jeweils beide Kammern eines chamber slides, aufgetragen.

Der erste TUNEL Assay wurde anschließend nach einer Inkubationszeit der Medikamente von 24 Stunden, der zweite nach 48 Stunden durchgeführt:

In einem ersten Schritt wurden die chamber slides getrocknet und fixiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und jede Kammer dreimal mit PBS gewaschen. Nun wurden die Objektträger für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für eine weitere Stunde in 4%igen Paraformaldehyd fixiert. Daraufhin wurde nach dreimaligem Waschen mit PBS eine Blockierungslösung bestehend aus 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für die Dauer von 10 Minuten aufgetragen. Anschließend folgte nach einem weiteren Waschschriff mit PBS die Permeabilisierung der Zellmembranen mittels Triton X-100 gelöst in 0,1% Natiumcitrat. Die Objektträger wurden zu diesem Zweck für 2 Minuten auf Eis mit der Permeabilisierungslösung inkubiert und anschließend erneut dreimal mit PBS gewaschen.

Als nächster Schritt wurde der TUNEL Reaction Mix bestehend aus Label Solution und Enzymlösung entsprechend der Anleitung des Herstellers vorbereitet.

Vor Auftragen des TUNEL Reaction Mix wurde die mitgeführte positiv-Kontrolle einer 10-minütigen Inkubation mit DNase I ausgesetzt, um oben genannte Strangbrüche in den Zellen zu erzeugen. Die dazu verwendete DNase wurde mit einer 50mmolaren TRIS-HCl, 10mmolaren MgCl<sub>2</sub> Lösung mit BSA Zusatz verdünnt und so in einer feuchten Kammer auf die Objektträger aufgetragen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die positiv-Kontrollen dreimal mit PBS gewaschen.

Nun konnte die TUNEL Reaktion durchgeführt werden. Dazu wurden die Objektträger pro Kammer mit je 50 $\mu$ L des TUNEL Reaction Mix beimpft. Ausnahme stellten die negativ-

Kontrollen dar, welche nur mit Label Solution behandelt wurden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für eine Stunde im Dunkeln.

Abschließend wurden die Objektträger unter lichtarmen Bedingungen dreimal mit PBS gewaschen, mit DAPI gegengefärbt und eingedeckelt.

#### 2.2.5.4. Auswertung und Statistik

Die Auswertung erfolgte bei allen TUNEL Assays nach dem gleichen Prinzip:

Die einzelnen Objektträger wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Extinktionswellenlänge von 450- 500nm unter 100-facher Vergrößerung untersucht. Apoptotische Zellen sollten sich dabei als grüne Fluoreszenz darstellen lassen. Durch die Kernfärbung mittels DAPI waren die Zellkerne blau sichtbar, sodass auch die vitalen Zellen erfasst werden konnten. Pro Ansatz wurden drei zufällig ausgewählte Gesichtsfelder ausgewertet, indem die Gesamtzahl der dort sichtbaren Zellen und die derer, die sich in Apoptose befinden, ermittelt wurden. Aus den erhaltenen Werten wurde der mittlere prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen bestimmt.

Im Anschluss konnten die durch Medikamenteninkubation erreichten Apoptoseraten errechnet werden. Als Vergleichswert dienten jeweils die unbehandelten Zellen sowie bei Kombinationstherapien die jeweiligen Monotherapien.

Zur Testung des Signifikanzniveaus wurde wie bei den zuvor durchgeführten Versuchen der zweiseitige t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Werte unter 0.05 wurden dabei als statistisch signifikant betrachtet.

#### 2.2.6. Planare Migrationsassays

Mit Hilfe von Migrationsassays kann die Chemokinese von adhären Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli untersucht werden.

##### 2.2.6.1. Prinzip des planaren Migrationsassays

Für den Assay werden Kulturplatten verwendet, in deren Mitte ein Silikonmäuerchen luftdicht aufgesetzt wurde. Die zu untersuchenden Zellen werden auf die so vorbereiteten Platten ausgesät. Dabei sollte die Zellzahl ausreichend hoch gewählt werden, dass die Zellen nach einer Bebrütung von 24 Stunden eine konfluente Kultur geformt haben. Anschließend werden die Silikonmauern entfernt. Da diese eine Barriere für das Zellwachstum dargestellt haben, ist die darunter liegende Fläche frei von Zellen. Auf diese Weise sind zwei aufeinander zugerichtete Migrationsfronten entstanden, wobei die Migrationsfront durch eine imaginäre Linie zwi-

schen den vordersten Zellen definiert ist. Anschließend kann der zu untersuchende Stimulus zum Beispiel das Medikament zugesetzt und die Platten erneut bebrütet werden. Die Zellen migrieren mit der Zeit in die freie Fläche, der Abstand der Fronten zueinander verkleinert sich. Dieser kann gemessen, mit dem Ausgangswert und mit der Migrationsleistung von un-behandelten Zellen verglichen werden.

#### 2.2.6.2. Versuchsplan

Die planaren Migrationsassays wurden an den Zellreihen OVCAR3 und OVCAR8 durchgeführt. Dabei galt es herauszufinden inwiefern sich das Migrationsverhalten durch Nilotinib Inkubation beeinflussen lässt. Entsprechend der Proliferationsversuche wurde der Effekt von Nilotinib in der Monotherapie als auch in der Kombination mit Carboplatin oder Paclitaxel untersucht.

Gemessen wurde zunächst zu Versuchsbeginn der Abstand der beiden Migrationsfronten zueinander bevor die Zellen die Möglichkeit hatten in die freie Fläche hineinzumigrieren und im Verlauf die Migrationsleistung der behandelten Zellen und unbehandelten Kontrollen nach 24, 48 und 72 Stunden Medikamenten- beziehungsweise Nährmediuminkubation.

#### 2.2.6.3. Versuchsdurchführung

Zunächst wurden die für den Versuch benötigten 12-well-Plates vorbereitet: Die Silikoneinsätze wurden so geschnitten, dass Mauern mit einem möglichst glatten Rand und einer passenden Größe für die Platten entstanden. Um vor einer Kontamination mit Keimen und Dreck zu schützen, wurden die Silikonmäuerchen nach Angaben des Herstellers in aqua dest. gereinigt, in 90%igen Ethanol sterilisiert und unter Einstrahlung von UV-Licht getrocknet. Anschließend konnten sie unter sterilen Bedingungen auf die 12-well-Plates aufgesetzt werden. Dabei war darauf zu achten, dass die Mäuerchen fest und ohne Lufteinschlüsse auf der Oberfläche haften. Jedes der so vorbereiteten Wells wurde nun mit 1mL Standardnährmedium befüllt.

Im nächsten Schritt wurden die zu untersuchenden Zellen analog der Proliferationsversuche wie in 2.2.4.1. beschrieben aufbereitet, die Platten mit 300000 Zellen pro Well beimpft und für 24 Stunden im Zellkulturschrank bei 37°C bebrütet.

Eine Zellzahl von 300000 Zellen erwies sich als sinnvoll für den weiteren Versuchsablauf: Die Zellen bildeten nach 24 Stunden einen dichten aber nicht „überwucherten“ Zellrasen.

Nach Ablauf eines Tages wurden die Silikonmauern vorsichtig entfernt, das Medium abgesaugt und die Platten zweimal mit PBS gewaschen. Es sollte an beiden Seiten ein sauberer

Zellrand entstanden sein, der unter dem Lichtmikroskop gut sichtbar ist. Anschließend wurde der Abstand der Migrationsfronten der Kontrollwells ausgemessen und so der Ausgangswert für die Migration bestimmt. Dazu wurde der Abstand zwischen den Grenzen an drei Stellen gemessen: mittig, rechts und links der freien Fläche.

Als nächster Schritt erfolgte die Medikamenteninkubation. Entsprechend der durchgeführten TUNEL Assays wurden für die Migrationsassays die gleichen Konzentrationsstufen und – Kombinationen gewählt. Diese sind ausführlich in 2.2.5.3. dargestellt.

Die inkubierten Zellen wurden erneut im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Auswertungen fanden nach weiteren 24, 48 und 72 Stunden statt.

#### 2.2.6.4. Auswertung und Statistik

Die erste Auswertung der Migrationsassays erfolgte nach 24-stündiger Medikamenteninkubation, weitere folgten nach 48 und 72 Stunden.

Um abgeschwemmte Zellbestandteile zu entfernen, wurde vor Messbeginn das Medium aspiriert, die Wells zweimal mit PBS gewaschen und anschließend erneut Medikamentenverdünung hinzugegeben.

Entsprechend der Ausmessung zu Versuchsbeginn wurde nun für jedes Well der Abstand der Migrationsfronten zueinander an drei verschiedenen Stellen bestimmt. Gemessen wurde dabei der Abstand der Grenzen in µm.

Da die Zellen während der Bebrütungszeit zum Teil in die freie Fläche hineingewandert sind, entstanden dadurch unregelmäßig begrenzte Zellränder. Die Migrationsfront wurde in dem Fall definiert durch imaginäre Linien zwischen den vordersten Zellen dieser Ränder.

Von den gemessenen Werten einer Konzentrationsstufe wurde schließlich das arithmetische Mittel errechnet.

Der Messwert der Kontrollwells diente bei der Auswertung zur Bestimmung der Migrationsleistung als Bezugsgröße. Angegeben wurde die Migrationsleistung dabei als Anteil der migrierten Zellen in Prozent. So konnte die Migrationsleistung für jede Konzentrationsstufe errechnet und mit derer der mitgeführten unbehandelten Zellen verglichen werden. Im Fall der Kombinationstherapien diente die jeweils durchgeführte Monotherapie als Vergleichspartner. Das Signifikanzniveau wurde analog der Proliferationsversuche mittels zweiseitigen t-Test getestet und p-Werte unter 0.05 als statistisch signifikant betrachtet.



### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Immunhistochemischer Rezeptornachweis

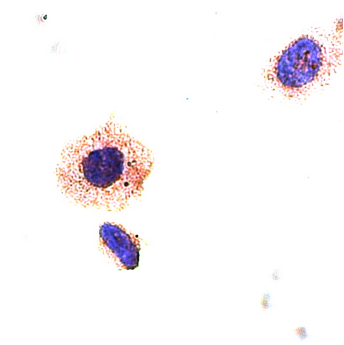
##### 3.1.1. PDGFR- $\alpha$

Die Abbildungen 1a und b zeigen den immunhistochemischen Befund des Rezeptorstatus für PDGFR- $\alpha$  bei den Zelllinien OVCAR3 und OVCAR8. Im Bereich des Zytoplasmas ist eine deutliche Braunfärbung zu erkennen, somit sind beide untersuchten Zellreihen als PDGFR-  $\alpha$  positiv zu werten.

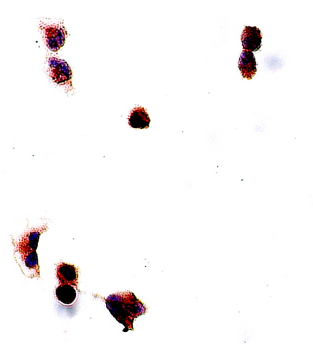
##### 3.1.2. c-Abl Rezeptor

Die bräunliche Anfärbung des Zytoplasmas lässt die Anwesenheit der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Abl bei den beiden Zelllinien OVCAR3 und OVCAR8 erkennen. OVCAR3 zeigt dabei eine schwächere Braunfärbung als OVCAR8, verglichen mit den negativen Kontrollen aber doch einen deutlich positiven Rezeptorstatus (vgl. Abb. 1c-e)

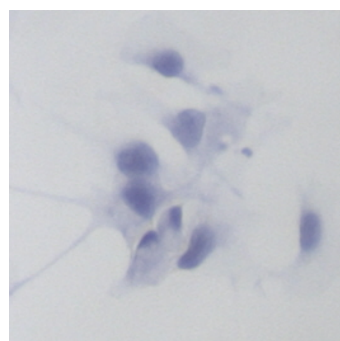
*Abbildungen 1a-e: Dargestellt sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der Tyrosinkinase Rezeptoren PDGFR- $\alpha$  und c-Abl bei den Zelllinien OVCAR3 und OVCAR8*



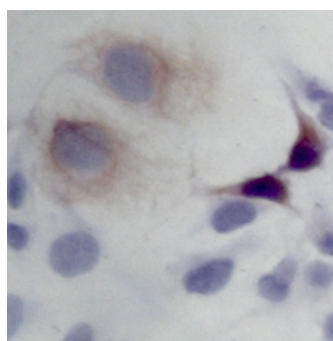
a) OVCAR3: PDGFR-  $\alpha$



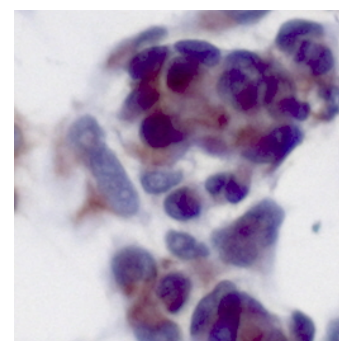
b) OVCAR8: PDGFR-  $\alpha$



c) OVCAR3: c-Abl  
negativ-Kontrolle



d) OVCAR3: c-Abl



e) OVCAR8: c-Abl

## 3.2. Proliferationsversuche

### 3.2.1. Monotherapie mit Nilotinib

Bei diesem Versuch sollte der wachstumshemmende Effekt von Nilotinib in vitro an den Zelllinien OVCAR3, OVCAR8 und SK-OV3 untersucht werden.

Die Ergebnisse der Proliferationsassays, die mittels manueller Zellzählung ausgewertet wurden, sind in den Abbildungen 2-4 dargestellt.

Bei Betrachtung der einzelnen Zellreihen zeigen die Versuche deutliche Unterschiede hinsichtlich der Nilotinib Aktivität. Während in den Zelllinien OVCAR3 und OVCAR8 eine signifikante Proliferationseinschränkung im therapeutischen Bereich von Nilotinib gezeigt werden kann, findet man bei SK-OV3 erst ab einer Konzentration von  $4,5\mu\text{M}$  einen signifikant messbaren Effekt auf das Wachstumsverhalten der Zellen.

Betrachtet man die Wachstumskurven der OVCAR3 und OVCAR8 Zellen lässt sich ein annähernd S-förmiger Verlauf erkennen (vgl. Abb. 2 und 3). Unter Inkubation mit geringen Nilotinib Dosierungen bis  $2\mu\text{M}$  vermindert sich das Wachstum der Zellen zunächst nur gering. Im Konzentrationsbereich von 2 bis  $3\mu\text{M}$  zeigt sich schließlich ein starker proliferationseinschränkender Effekt, die Kurve fällt nahezu linear ab. Bei Verwendung höherer Konzentrationen oberhalb von  $3\mu\text{M}$  flachen die Wachstumskurven beider Zelllinien schließlich wieder ab, das heißt die Wachstumshemmung nimmt durch weiter steigende Dosierungen nur noch geringfügig zu. Sowohl für OVCAR3 als auch für OVCAR8 kann die Proliferationsrate mit der jeweils verwendeten Höchstkonzentration von  $4\mu\text{M}$  beziehungsweise  $3,5\mu\text{M}$  nicht unter die 20% Marke gesenkt werden. Die  $\text{IC}_{50}$  liegt in beiden Fällen im proportionalen Bereich, für OVCAR8 beträgt sie  $2,5\mu\text{M}$ , für OVCAR3  $3\mu\text{M}$ .

Für die Zelllinie SK-OV3 kann keine Wirksamkeit von Nilotinib auf das Wachstum der Zellen im therapeutischen Bereich des Medikamentes ( $1,7$  bis  $3,6\mu\text{M}$ , Kantarjian et al. 2006) belegt werden. Abbildung 4 zeigt, dass bis zu einer Dosissteigerung auf  $4\mu\text{M}$  der Tyrosinkinase Inhibitor das Wachstum der Zellen nicht zu hemmen vermag. Ab einer Nilotinib Konzentration von  $4\mu\text{M}$  ist eine Reduktion der Zellproliferation nachzuweisen, welche allerdings nicht signifikant ist. Die weitere Erhöhung der Dosis auf  $4,5\mu\text{M}$  führt zu einer signifikanten Wachstumshemmung der Zellen auf 32%. Nilotinib Konzentrationen oberhalb von  $4\mu\text{M}$  liegen allerdings außerhalb des klinisch relevanten Bereiches.

Die Ergebnisse der Proliferationsversuche zeigen, dass die untersuchten Zelllinien OVCAR3 und OVCAR8 sensibler auf eine Behandlung mit dem Tyrosinkinase Inhibitor Nilotinib

Abbildung 2-4: Wachstumskurven der Zelllinien unter Inkubation mit steigenden Nilotinib Konzentrationen über 6 Tage: Nilotinib Monotherapie

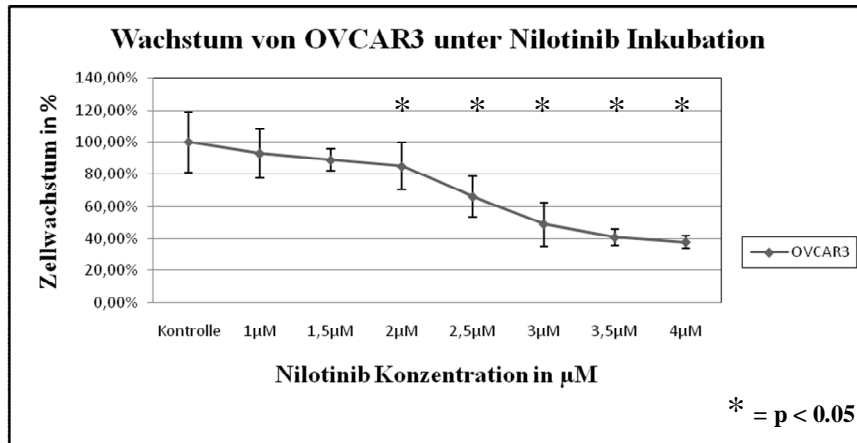


Abbildung 2: Wachstumskurve der OVCAR3 Zellen unter Inkubation mit steigenden Nilotinib Konzentrationen über 6 Tage; es ist ein Absinken des Zellwachstums bei Erhöhung der Nilotinib Dosis zu erkennen

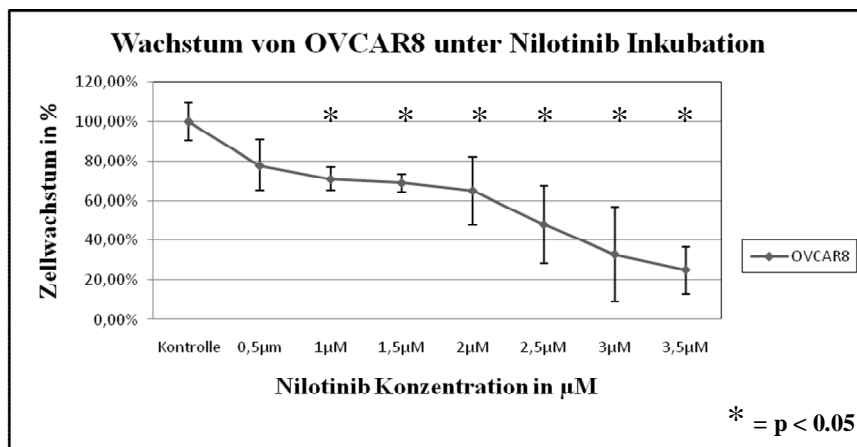


Abbildung 3: Wachstumskurve der OVCAR8 Zellen unter Inkubation mit steigenden Nilotinib Konzentrationen über 6 Tage; mit zunehmender Nilotinib Konzentration sinkt das Zellwachstum

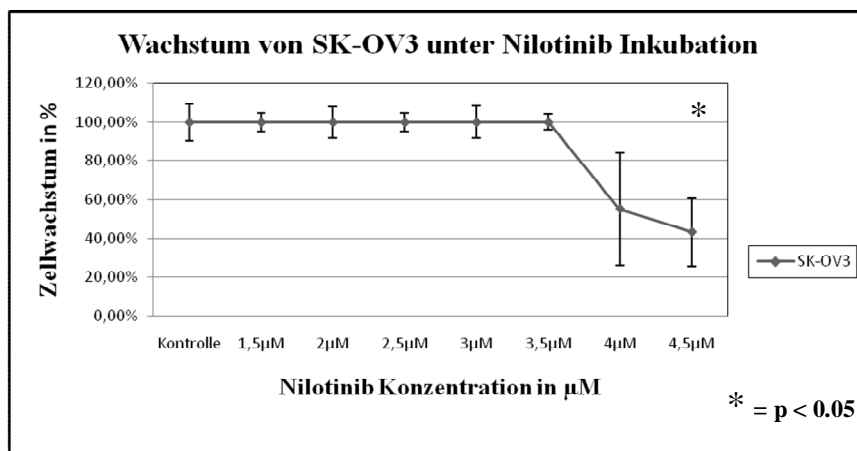


Abbildung 4: Wachstumskurve der SK-OV3 Zellen unter Inkubation mit steigenden Nilotinib Dosierungen über 6 Tage; die Zellen zeigen erst ab einer Nilotinib Konzentration von 4,5 $\mu\text{M}$  eine signifikante Proliferationshemmung

reagieren als die Zellreihe SK-OV3. Die detektierten IC50 Werte liegen im therapeutischen Bereich und betragen 2,5 $\mu$ M für OVCAR8 sowie 3 $\mu$ M für die Zellreihe OVCAR3.

### 3.2.1.1 Ergebnisse der MTT-Assays

Bei diesen Versuchen sollte untersucht werden, inwiefern die bei Proliferationsversuchen regelmäßig angewendete MTT Methode in den hier durchgeführten Versuchen exakte Ergebnisse liefert. Die Relevanz des zukünftigen Einsatzes für Untersuchungen mit dem Tyrosinkinase Inhibitor Nilotinib kann demnach abgeschätzt werden. Dazu wurden die Proliferationsraten der mit Nilotinib therapierten Zelllinien OVCAR3, OVCAR8 und SK-OV3 ebenfalls nach dem Prinzip der MTT Farbreaktion bestimmt. Die Ergebnisse beider Auswerteverfahren konnten im Anschluss miteinander verglichen und der Einsatz von MTT-Testungen bei Versuchen mit Tyrosinkinase Inhibitoren bewertet werden.

In den Abbildungen 5 bis 7 sind die Ergebnisse der drei untersuchten Zellreihen jeweils gegenüberstellt.

Betrachtet man die Behandlungen der Zelllinie OVCAR3 ist zu sehen, dass die beiden Kurven bis zu einer Nilotinib Konzentration von 2 $\mu$ M annähernd parallel verlaufen, also vergleichbare Ergebnisse liefern (vgl. Abb. 5). Allerdings führt die Inkubation der Zellen mit einer 4 $\mu$ molaren Nilotinib Lösung zu einer Abnahme des Zellwachstums auf 42%, während die Auswertung mittels MTT-Test nur eine Wachstumsinhibition auf 60% zeigt. Eine um knapp 20% höhere Proliferationsrate würde eine signifikant geringere Wirksamkeit von Nilotinib im Konzentrationsbereich 4 $\mu$ M bei Verwendung der MTT Methode bedeuten.

Ähnliche Ergebnisse zeigt der Vergleich der unterschiedlich ausgewerteten SK-OV3 Zellen. Bis zu einer Dosierung von 2 $\mu$ M kann bei beiden Verfahren keine Wachstumsinhibition der Zellen durch die Nilotinib Behandlung beobachtet werden (vgl. Abb. 7). Während bei einer Erhöhung der Konzentration des Tyrosinkinase Inhibitors auf 4 $\mu$ M eine Einschränkung der Proliferation auf 55% der unbehandelten Zellen nachzuweisen ist, beträgt die Proliferationsrate der durch den MTT-Test ausgewerteten Zellen bei gleicher Konzentration noch 97%. Unter Verwendung der MTT Methode ist demnach nahezu kein Effekt auf das Wachstumsverhalten der Zellen durch Nilotinib zu erzielen.

Der Methodenvergleich therapierter OVCAR8 Zellen zeigt nicht einheitliche Ergebnisse: Bei Verwendung von Nilotinib Konzentrationen unterhalb von 2 $\mu$ M deuten die durch die MTT Methode ermittelten Wachstumsraten übereinstimmend mit den Zelllinien OVCAR3 und SK-OV3 auf eine zu niedrig ermittelte Effektivität von Nilotinib hin. Im Gegensatz dazu zeigen die Auswertungen bei einer Nilotinib Verdünnung auf 2 $\mu$ M eine signifikant höhere Wirksam-

Abbildung 5-7: Wachstumskurven der Zelllinien unter Inkubation mit steigenden Nilotinib Konzentrationen über 6 Tage; Vergleich: MTT-Test und Zellzählung

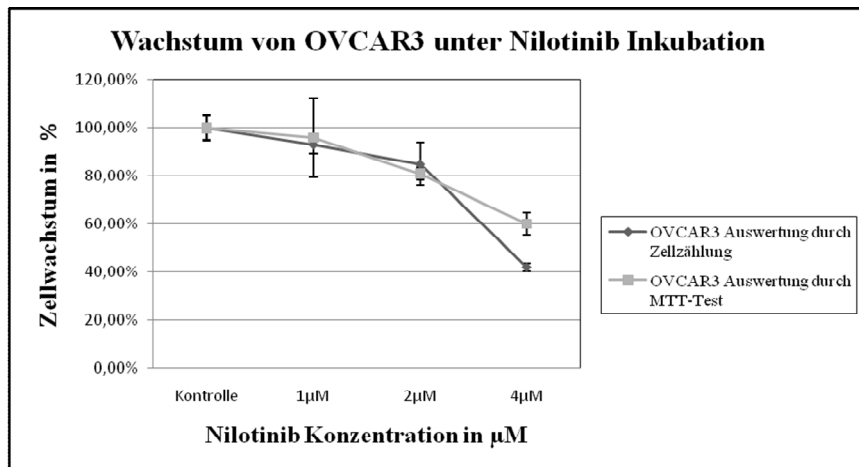


Abbildung 5: Wachstumskurven der OVCAR3 Zellen; Unterschiedliche Ergebnisse ergeben sich bei einer Nilotinib Konzentration oberhalb von  $2\mu\text{M}$

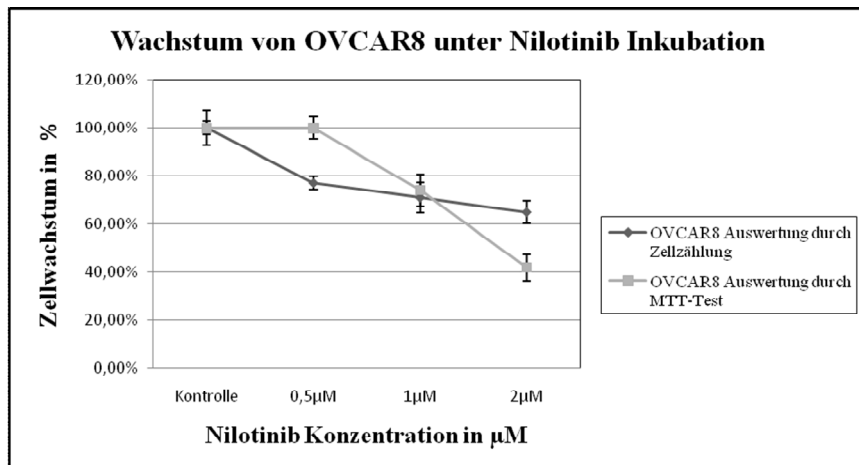


Abbildung 6: Wachstumskurven der OVAR8 Zellen; die beiden Auswerteverfahren zeigen voneinander abweichende Kurvenverläufe

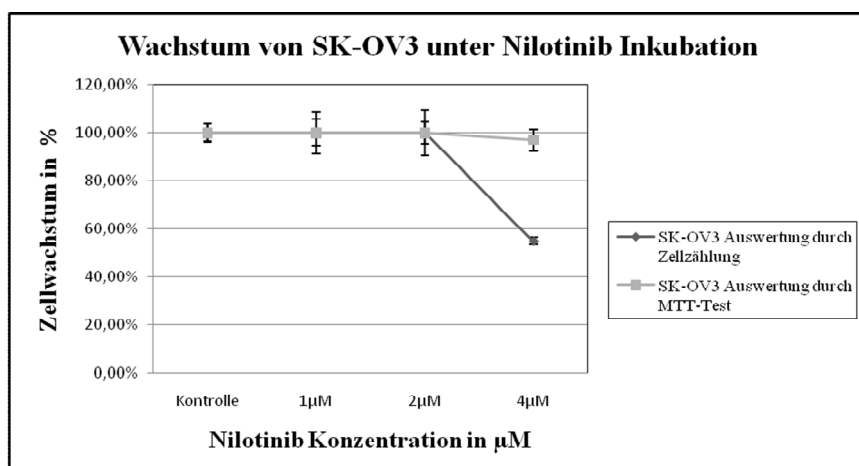


Abbildung 7: Wachstumskurven der SK-OV3 Zellen; bei Verwendung einer  $4\mu\text{molaren}$  Nilotinib Konzentration weichen die Ergebnisse stark voneinander ab

keit von Nilotinib verglichen mit den durch die Zellzählung erlangten Ergebnissen (vgl. Abb. 6): Während in der Gruppe der manuell ausgezählten Zellen eine Einschränkung des Zellwachstums auf 65% des Kontrollwertes beobachtet wird, sinkt die Proliferationsrate der mittels MTT-Test ausgewerteten Zellen auf 42%.

Zusammenfassend kann durch den Vergleich der beiden Auswertemethoden gezeigt werden, dass die MTT Testungen zum Teil vergleichbare Ergebnisse mit denen der manuell ausgewerteten Versuche ergeben, besonders aber im höher dosierten Bereich ab 2 $\mu$ M Nilotinib tendenziell falsch hohe Proliferationsraten geliefert werden. Diese Beobachtung gilt für die Zelllinien OVCAR3 und SK-OV3. Somit zeigt der MTT-Assay eine geringere Wirksamkeit des Tyrosinkinase Inhibitors Nilotinib. Für die Zelllinie OVCAR8 ergeben die Ergebnisse der MTT Testungen abweichende Ergebnisse in nahezu allen untersuchten Dosierungen. Insgesamt liefert das Auswerteverfahren keine verlässlichen Ergebnisse bei allen drei untersuchten Zelllinien.

### 3.2.2. Kombinationstherapie

#### 3.2.2.1. Kombinationstherapie mit Nilotinib und Carboplatin

In diesem Versuchsabschnitt wurde das Wachstumsverhalten der Ovarialkarzinomzellen OVCAR3 und OVCAR8 unter Kombinationsinkubation von Nilotinib und Carboplatin untersucht. Das Medikament Carboplatin wurde als Einzelsubstanz verabreicht sowie in der Kombination mit 2 $\mu$ M Nilotinib. Ein möglicher zusätzlicher Effekt durch Nilotinib Zugabe kann so detektiert werden.

Behandlung mit einer 2 $\mu$ molaren Nilotinib Lösung wurde als Kontrollwert für die Kombinationsinkubation gewählt und stellt den Ausgangspunkt der Wachstumskurven der Kombinationstherapien dar. Die Zellreihe OVCAR3 zeigt nach Inkubation eine Hemmung der Zellproliferation um 15%, demnach auf 85% des Bezugswertes, OVCAR8 eine Wachstumsinhibition auf 65%.

Darüber hinaus wurden zuvor für beide Zelllinien die IC<sub>50</sub> Konzentrationen für Carboplatin ermittelt, um geeignete Dosierungen für die folgenden Kombinationsbehandlungen festlegen zu können. Die Auswertungen ergaben dabei eine IC<sub>50</sub> von 3 $\mu$ M für die Zellreihe OVCAR8 und 5 $\mu$ M Carboplatin für OVCAR3 Zellen.

Ein gesondert durchgeführter Versuch diente dem Nachweis möglicher synergistischer Effekte, siehe auch Tabelle 1.

Die Ergebnisse der Kombinationsversuche sind in den Abbildungen 8 bis 11 dargestellt.

Abbildung 8 und 9: Wachstumskurven der Zelllinien unter sechstägiger Inkubation mit steigenden Carboplatin Konzentrationen sowie der zusätzlichen Applikation von 2µM Nilotinib; die zwei Wachstumskurven zeigen die Ergebnisse der Carboplatin Monotherapie und der Zweierkombination mit Nilotinib; Ausgangspunkt der Kombination: 2µM Nilotinib

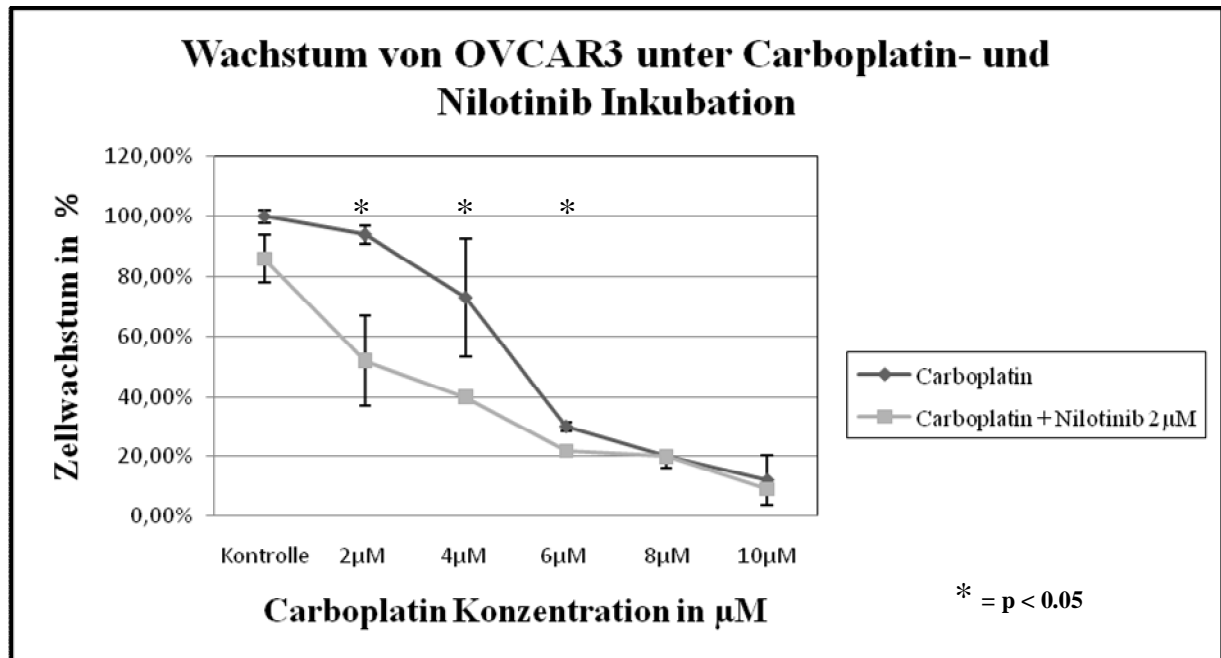


Abbildung 8: Wachstumskurven der OVCAR3 Zellen unter Carboplatin Monotherapie und Kombinationstherapie mit Nilotinib; die Kombination zeigt den größten Effekt bei Einsatz niedriger Carboplatin Konzentrationen zwischen 2 und 4µM

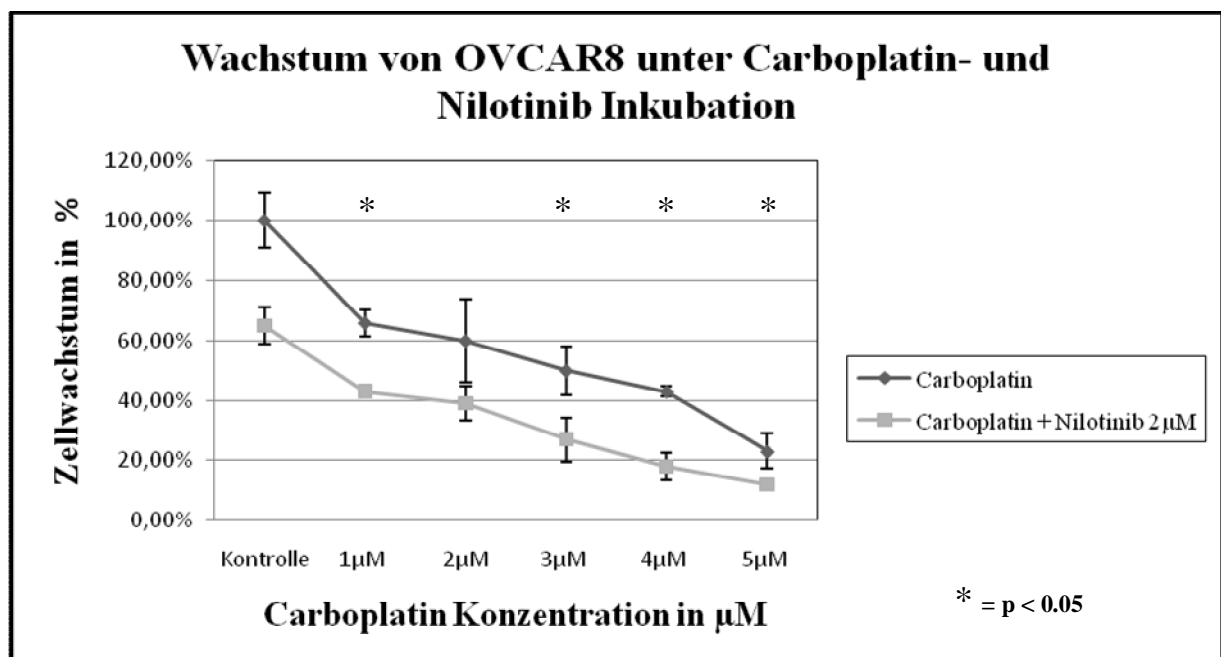


Abbildung 9: Wachstumskurven der OVCAR8 Zellen unter Carboplatin Monotherapie und Kombinationstherapie mit Nilotinib; Die Kombination erbringt eine signifikante zusätzliche Einschränkung der Zellproliferation

Abbildung 10 und 11: Wachstumskurven der Zellreihen unter sechstägiger Nilotinib-, Carboplatin-, sowie Kombinationsinkubation; Versuchsaufbau zur Detektion synergistischer Effekte

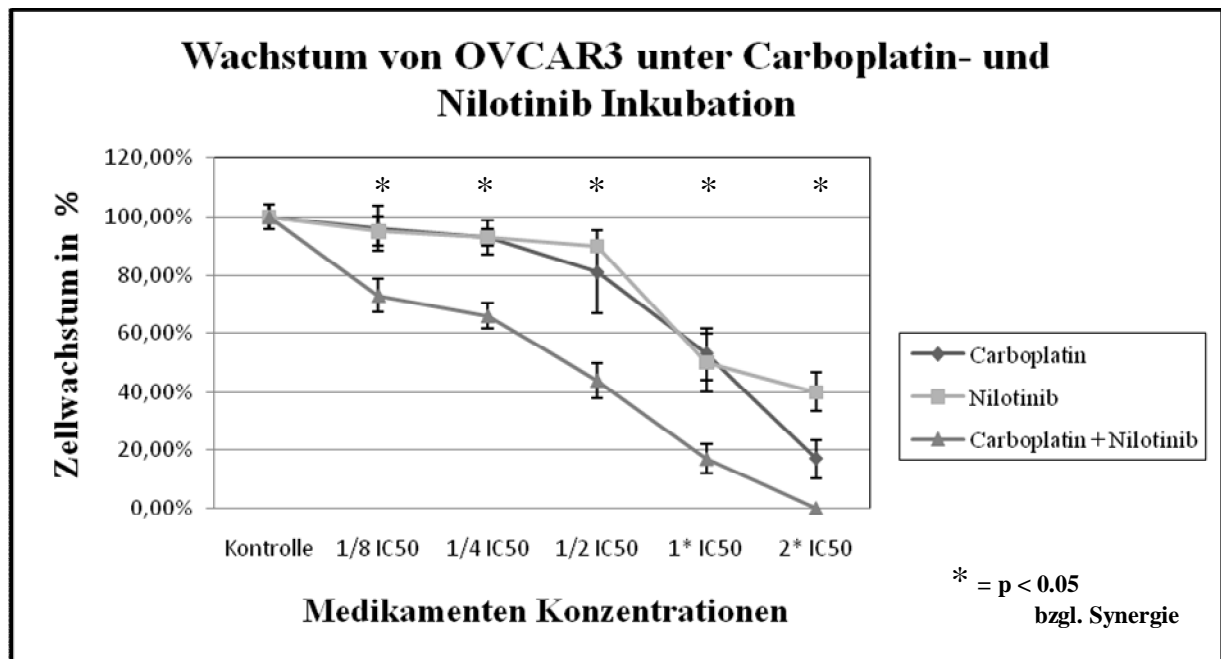


Abbildung 10: Wachstumskurven der OVCAR3 Zellen unter Carboplatin und Nilotinib Monotherapie sowie Kombinationstherapie; synergistische Effekte können in allen untersuchten Konzentrationsbereichen nachgewiesen werden

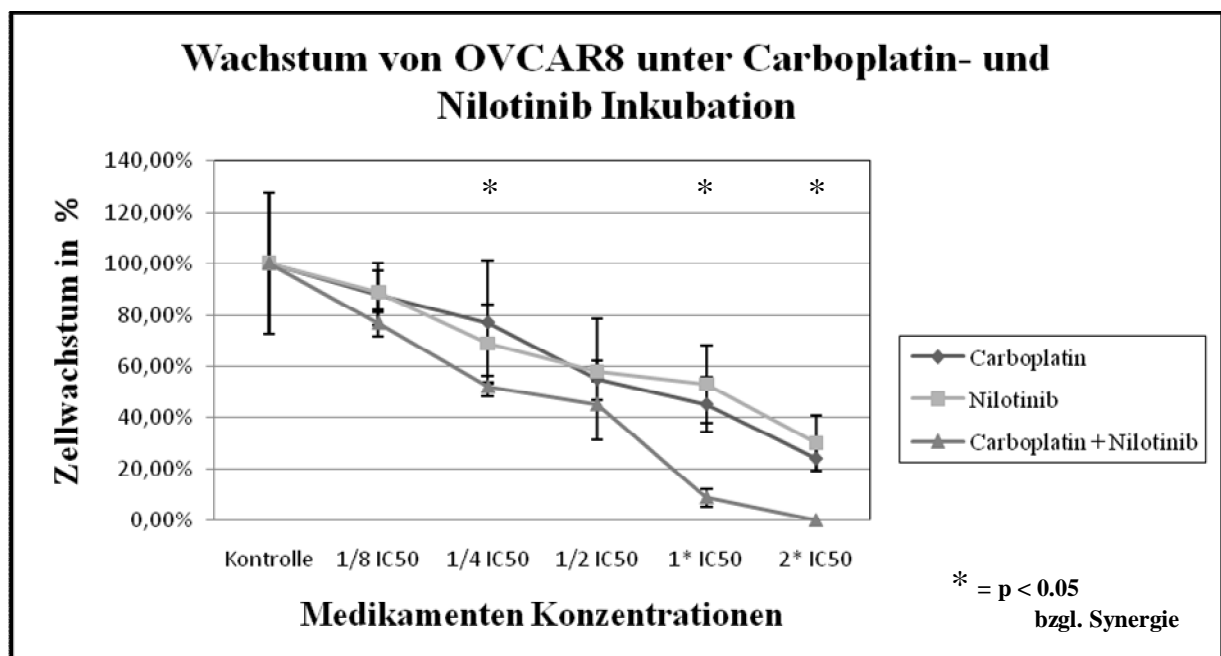


Abbildung 11: Wachstumskurven der OVCAR8 Zellen unter Carboplatin und Nilotinib Monotherapie sowie Kombinationstherapie; die Kombination von Nilotinib und Carboplatin zeigt einen synergistischen Effekt



### OVCAR3

Drug	Combination Index Values at					
	ED50	ED75	ED90	Dm( $\mu$ M)	m	r
Combination (1:1.6)	0.50700	0.44139	0.38732	0.91727	1.93731	0.93611
Nilotinib	N/A	N/A	N/A	4.47556	1.33976	0.94642
Carboplatin	N/A	N/A	N/A	4.85889	1.73036	0.98552

### OVCAR8

Drug	Combination Index Values at					
	ED50	ED75	ED90	Dm( $\mu$ M)	m	r
Combination (1:1.2)	0.72077	0.42810	0.25612	0.70241	2.01985	0.96161
Nilotinib	N/A	N/A	N/A	2.11471	0.94584	0.96544
Carboplatin	N/A	N/A	N/A	2.16893	1.11076	0.99396

*Tabelle 1: berechnete Kombinationsindizes mittels CalcuSyn der OVCAR3 und OVCAR8 Zellen unter Carboplatin und Nilotinib Monotherapie sowie Kombinationstherapie; ED50 (effect dosis 50%), Dm (IC50) calculated, m (measures of sigmoidicity), r (correlation coefficient)*

Abbildung 8 zeigt unter anderem die Wachstumskurve der mit Carboplatin in der Monotherapie behandelten OVCAR3 Zellen im Konzentrationsbereich von 2 bis 10 $\mu$ M. Bei Carboplatin Dosierungen zwischen 2 und 6 $\mu$ M kann ein zur Medikamentenapplikation proportionaler Abfall der Zellproliferation beobachtet werden. Die zuvor ermittelte IC50 von 5 $\mu$ M liegt innerhalb dieses Konzentrationsbereichs. Die Erhöhung der Carboplatin Konzentration auf 8 und 10 $\mu$ M führt zu einer weiteren Abnahme des Zellwachstums auf bis zu 12% des Bezugswertes. Werden die Zellen der Kombination von Nilotinib und Carboplatin ausgesetzt, bewirkt die zusätzliche Applikation von 2 $\mu$ M Nilotinib in nahezu allen untersuchten Konzentrationsstufen eine weitere Wachstumsinhibition. Ein signifikanter Effekt der Kombinationstherapie zeigt sich bei Verwendung von Carboplatin Konzentrationen zwischen 2 und 6 $\mu$ M ( $p < 0.05$ ): Die Kombination von 2 $\mu$ M Carboplatin mit 2 $\mu$ M Nilotinib erbringt eine zusätzliche Senkung des Tumorzellwachstums von 42%. Nach sechstägiger Kombinationsinkubation kann die Proliferationsrate von 94% auf 52% gesenkt werden. Bei Verwendung einer 4 $\mu$ molaren Carboplatin Konzentration vermag die Kombination mit 2 $\mu$ M Nilotinib die Zellproliferation um 33% mehr zu hemmen als die Behandlung mit Carboplatin in der Monotherapie. Der Anteil vitaler Zellen wird in diesem Fall von 73% auf 40% des Bezugswertes gesenkt. Wird die Carboplatin

Konzentration auf  $6\mu\text{M}$  erhöht zeigt die Kombinationstherapie ebenfalls eine verstärkte Inhibition des Zellwachstums im Vergleich zur alleinigen Carboplatin Inkubation. Der Anteil proliferierender Zellen wird durch die Medikamentenkombination auf 22% gesenkt, 8 Prozentpunkte mehr im Vergleich zur Carboplatin Monotherapie. Durch weitere Erhöhung der Carboplatin Dosierungen lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Mono- und Kombinationstherapie feststellen. Abbildung 10 sowie Tabelle 1 zeigen außerdem, dass es sich bei der Kombinationstherapie von Nilotinib und Carboplatin um synergistische Reaktionen handelt. Der wirkungsverstärkende Effekt lässt sich dabei in allen untersuchten Konzentrationsstufen beobachten: Steigende Carboplatin Konzentrationen von  $0.625$  bis  $10\mu\text{M}$  kombiniert mit Nilotinib Dosierungen zwischen  $0.375$  und  $6\mu\text{M}$  bewirken eine signifikant stärkere Wachstumsinhibition verglichen mit der Therapie der jeweiligen Einzelsubstanzen ( $p < 0.05$ ). Carboplatin Behandlung als Einzelsubstanz der Zelllinie OVCAR8 zeigt einen nahezu linearen Abfall der Zellproliferation bei steigenden Konzentrationen von  $1$  bis  $5\mu\text{M}$ . Nach sechstägiger Bebrütung mit einer  $3\mu\text{molaren}$  Carboplatin Dosierung kann der Anteil vitaler Zellen verglichen mit einer unbehandelten Kontrollgruppe auf 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) gesenkt werden. Bei der verwendeten Höchstdosis von  $5\mu\text{M}$  beobachtet man eine Einschränkung der Zellproliferation auf 23%.

Die Kombinationsinkubationen mit Nilotinib zeigen mit Ausnahme der Konzentrationsstufe  $2\mu\text{M}$  Carboplatin bei allen verwendeten Dosierungen statistisch signifikante Verringerungen des Zellwachstums im Vergleich zu den Behandlungen mit den jeweiligen Einzelsubstanzen ( $p < 0.05$ ). Durch den Zusatz des Tyrosinkinase Inhibitors beobachtet man Abnahmen der Proliferationsraten zwischen 11 und 25 Prozentpunkten je nach verwendeter Konzentrationsstufe (vgl. Abb. 9). Besonders deutlich ist der durch Nilotinib zusätzlich erreichbare Effekt in einer Kombination mit  $4\mu\text{M}$  Carboplatin zu erkennen: Hier vermag die Kombination verglichen mit der Carboplatin Monotherapie die Zellproliferation um mehr als die Hälfte (58%) zu verringern. Das Tumorzellwachstum kann von 43 auf nur 18% gesenkt werden. Ein synergistischer Effekt der Kombination Nilotinib und Carboplatin ist für die Zellreihe OVCAR8 ebenfalls beobachtbar: Statistisch signifikant ist dieser in den Dosierungen  $1/4 \text{IC}_{50}$ ,  $1 \cdot \text{IC}_{50}$  sowie  $2 \cdot \text{IC}_{50}$  der verwendeten Substanzen, entsprechend der Nilotinib Konzentrationen  $0,625$ ,  $2,5$  und  $5\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ , vgl. Abb. 11, Tab. 1).

Die untersuchten Zellreihen OVCAR3 und OVCAR8 zeigen gutes Ansprechen auf eine Kombinationsbehandlung mit einer  $2\mu\text{molaren}$  Nilotinib Lösung und variierenden Carboplatin Konzentrationen. Vor allem um und unterhalb des Konzentrationsbereich der beschriebe-

nen IC50 Werte von Carboplatin zeigt die Medikamentenkombination eine statistisch signifikant verstärkte Inhibition der Zellproliferation verglichen mit derer, die durch die Monotherapie erreicht werden kann ( $p < 0.05$ ). Für beide Zellreihen kann für die Zweierkombination Nilotinib-Carboplatin ein signifikant synergistischer Effekt belegt werden ( $p < 0.05$ ).

#### 3.2.2.2. Kombinationstherapie mit Nilotinib und Paclitaxel

Bei dieser Versuchsreihe wurde das Verhalten der Tumorzelllinien OVCAR3 und OVCAR8 unter Einfluss einer Zweifachkombinationstherapie mit Nilotinib und Paclitaxel untersucht.

Zuerst wurden beide Zellreihen einer Behandlung mit Paclitaxel als Monotherapie ausgesetzt und so die zellspezifischen IC50 Werte für Paclitaxel bestimmt, die für OVCAR3 und OVCAR8 bei 2nM lagen. Die Ergebnisse der Kombinationstherapien, deren Grundlage entsprechend der Versuche mit Carboplatin eine 2µmolare Nilotinib Lösung zugesetzt mit variierenden Paclitaxel darstellte, sind in den Abbildungen 12 und 13 aufgezeigt. Die Abbildungen 14 und 15 sowie Tabelle 2 zeigen außerdem die Ergebnisse hinsichtlich potenzieller synergistischer Effekte.

Die Wachstumskurve der OVCAR3 Zellen zeigt unter Inkubation mit steigenden Paclitaxel Konzentrationen einen S-förmigen Verlauf (vgl. Abb. 12). Im Konzentrationsbereich von 1,5 bis 2nM lässt sich ein steiler Abfall der Wachstumskurve beobachten, während bei der Verwendung von Medikamentenverdünnungen unterhalb von 1,5nM und oberhalb von 2nM die Kurve einen flacheren Verlauf zeigt. Die bestimmte IC50 von 2nM liegt noch im linear verlaufenden Teil der Kurve. Die maximal erreichte Proliferationseinschränkung nach sechstägiger Inkubation mit 3nM Paclitaxel beträgt 20%.

Für die Zelllinie OVCAR3 können signifikant synergistische Reaktionen in allen untersuchten Konzentrationsbereichen zwischen 1/8 der IC50 von Nilotinib und Paclitaxel und der doppelten IC50 nachgewiesen werden ( $p < 0.05$ , vgl. Abb. 14 und Tab. 2). Der untersuchte Konzentrationsbereich von Nilotinib liegt hier zwischen 0,375 und 6µM. Obwohl die Wachstumskurve der kombinierten Inkubation von 2µM Nilotinib und variierenden Paclitaxel Konzentrationen (1 bis 3nM) therapierter OVCAR3 Zellen bis zu einer Paclitaxel Dosis von 2,5nM zu jedem Zeitpunkt unter derer der Einzeltherapie liegt, lässt sich hier kein im Vergleich zur Monotherapie statistisch signifikanter Effekt nachweisen.

Die Wachstumskurve der mit steigenden Paclitaxel Konzentrationen inkubierten OVCAR8 Zellen zeigt vergleichbar der oben beschriebenen Zellreihe OVCAR3 einen annähernd S-förmigen Verlauf, mit einem linear abfallendem Bereich zwischen 1 und 2nM (vgl. Abb. 13). Nach einer Inkubation mit 2nM Paclitaxel kann das Zellwachstum um 50% gehemmt werden.

Abbildungen 12 und 13: Wachstumskurven der Zelllinien unter sechstägiger Inkubation mit steigenden Paclitaxel Konzentrationen sowie der zusätzlichen Applikation von 2 $\mu$ M Nilotinib; die zwei Wachstumskurven zeigen die Ergebnisse der Paclitaxel Monotherapie und der Zweierkombination mit Nilotinib; Ausgangspunkt der Kombination: 2 $\mu$ M Nilotinib

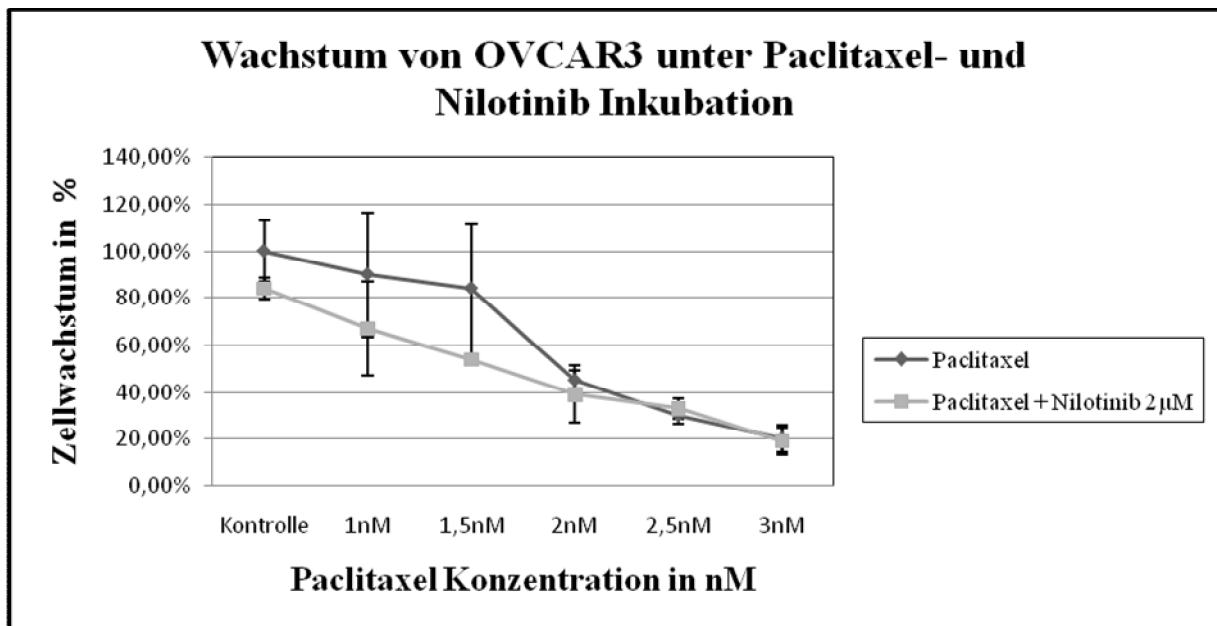


Abbildung 12: Wachstumskurven der OVCAR3 Zellen unter Paclitaxel Monotherapie und Kombinationstherapie mit Nilotinib; Die Kombination zeigt keinen signifikanten Effekt der Kombinationstherapie

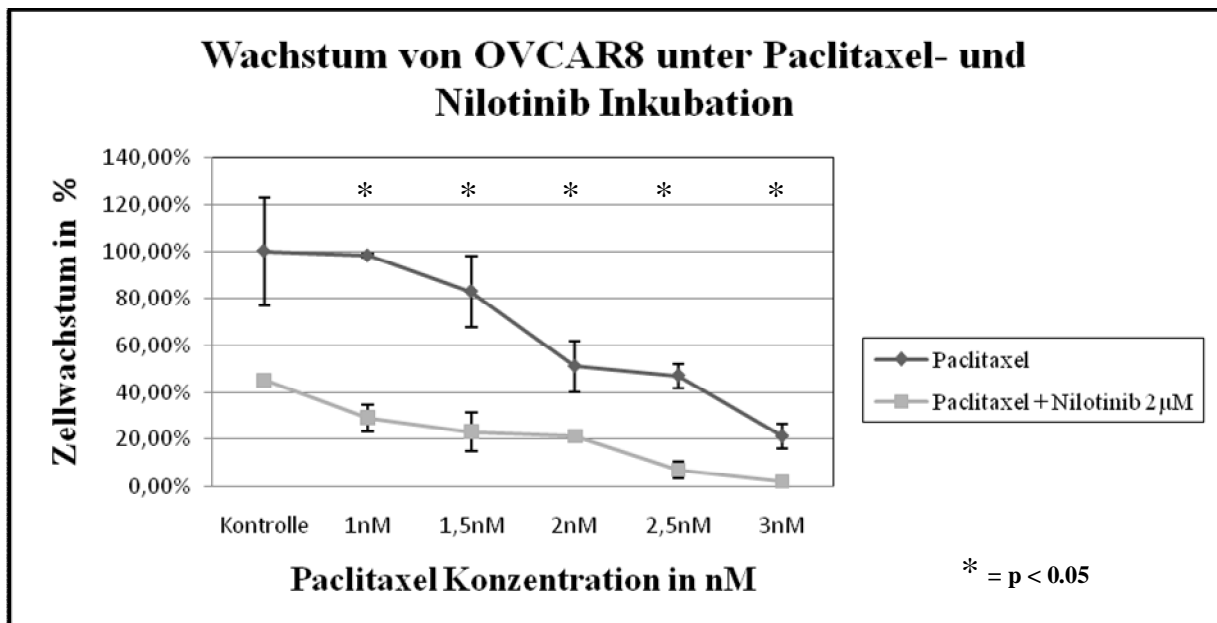


Abbildung 13: Wachstumskurven der OVCAR8 Zellen unter Paclitaxel Monotherapie und Kombinationstherapie mit Nilotinib; Signifikant hemmender Effekt der Kombinationstherapie mit Paclitaxel und Nilotinib

Abbildung 14 und 15: Wachstumskurven der Zelllinien unter sechstägiger Nilotinib-, Paclitaxel-, sowie Kombinationsinkubation; Versuchsaufbau zur Detektion synergistischer Effekte

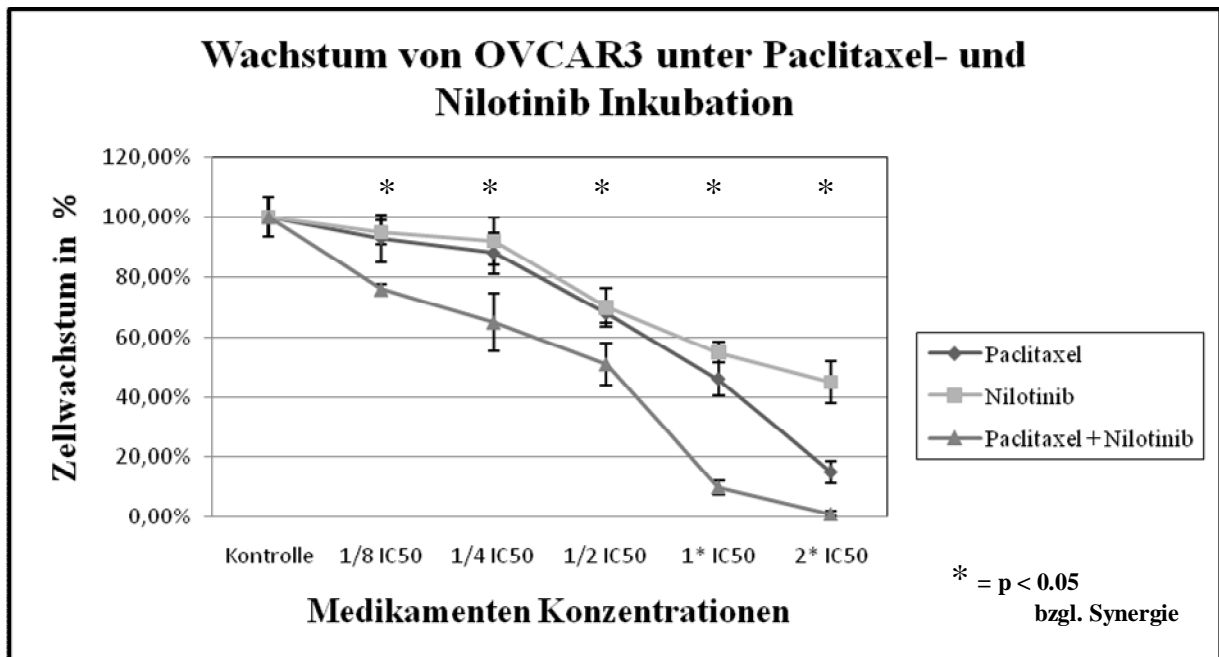


Abbildung14: Wachstumskurven der OVCAR3 Zellen unter Paclitaxel und Nilotinib Monotherapie sowie Kombinationstherapie; synergistische Effekte der Kombination in allen untersuchten Konzentrationsstufen

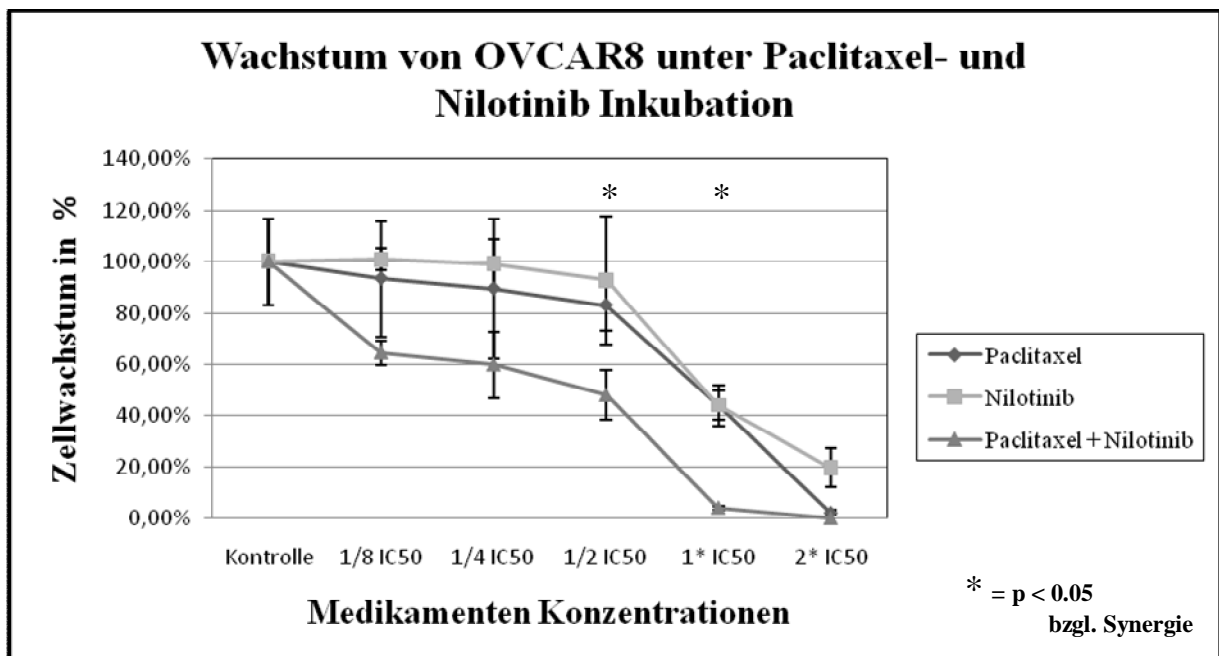


Abbildung15: Wachstumskurven der OVCAR8 Zellen unter Paclitaxel und Nilotinib Monotherapie sowie Kombinationstherapie; signifikant synergistische Reaktionen der Kombinationstherapie bei den Dosierungen 1/2 IC50 und 1\* IC50

### OVCAR3

Drug	Combination Index Values at					
	ED50	ED75	ED90	Dm( $\mu$ M)	m	r
Combination (1:0.0006)	0.64097	0.50680	0.40372	0.92591	2.06477	0.95001
Nilotinib	N/A	N/A	N/A	4.13052	1.23089	0.97481
Paclitaxel	N/A	N/A	N/A	0.00156	1.55744	0.98963

### OVCAR8

Drug	Combination Index Values at					
	ED50	ED75	ED90	Dm( $\mu$ M)	m	r
Combination (1:0.0008)	0.75815	0.92361	1.12562	0.75794	1.62148	0.82536
Nilotinib	N/A	N/A	N/A	2.88838	2.42360	0.96510
Paclitaxel	N/A	N/A	N/A	0.00122	2.22109	0.91618

*Tabelle 2: berechnete Kombinationsindizes mittels CalcuSyn der OVCAR3 und OVCAR8 Zellen unter Paclitaxel und Nilotinib Monotherapie sowie Kombinationstherapie; ED50 (effect dosis 50%), Dm (IC50) calculated, m (measures of sigmoidicity), r (correlation coefficient)*

Der Endpunkt liegt bei einer verwendeten Konzentration von 3nM bei einem Anteil vitaler Zellen von 21%.

Die Kurve der Kombinationsinkubation mit Nilotinib verläuft deutlich unter derer der Paclitaxel Monotherapie. Im Gegensatz zur Zelllinie OVCAR3 liegen statistisch signifikante zusätzliche Effekte hinsichtlich der Wachstumsinhibition durch Nilotinib Zugabe in allen dargestellten Paclitaxel Dosierungen von 1 bis 3nM vor ( $p < 0.05$ ). Besonders eindrucksvoll ist der anti-proliferative Effekt der Kombinationsinkubation bei Verwendung der niedrigsten Paclitaxel Konzentration von 1nM: Während die alleinige Behandlung der Zellen mit 1nM Paclitaxel praktisch keinen Effekt auf das Tumorzellwachstum ausübt, kann durch die zusätzliche Gabe von 2 $\mu$ M Nilotinib die Proliferationsrate von 98% auf 29% gesenkt werden. Auch eine Erhöhung der Paclitaxel Konzentration auf 1,5nM führt zu einer ausgeprägten Verstärkung der Wachstumsinhibition durch Applikation der Zweierkombination mit dem Tyrosinkinase Inhibitor: Aus der Zugabe von 2 $\mu$ M Nilotinib zu 1,5nM Paclitaxel resultiert eine Reduktion der Proliferation um 60% im Vergleich zur Monotherapie mit Paclitaxel, von 83% auf 23%. Die Kombinationsinkubation mit den Paclitaxel Dosierungen 2nM, 2,5nM und 3nM ist ebenfalls wirksam und verringert die bereits durch die Monotherapie erreichte Senkung des Tumorzellwachstums um einen weiteren signifikanten Anteil. Der zusätzliche inhibitorische

Effekt liegt dabei zwischen 20 und 40%. Die höchste verwendete Paclitaxel Dosierung (3nM) führt in Kombination mit Nilotinib zu einer Abnahme der Proliferationsrate von 21 auf nur noch 2% vitaler Zellen. Die Therapie von OVCAR8 mit Nilotinib und Paclitaxel zeigt ebenfalls synergistische Effekte: Bei Kombination von 1,25 $\mu$ M Nilotinib mit 1nM Paclitaxel (jeweils 1/2 IC<sub>50</sub>) sowie nach Inkubation mit der jeweiligen IC<sub>50</sub> von 2,5 $\mu$ M und 2nM kann eine signifikante Wirkungsverstärkung im Vergleich zur Behandlung mit den Einzelsubstanzen nachgewiesen werden ( $p < 0.05$ , vgl. Abb.15 und Tab.2).

Die Kombinationstherapie von Nilotinib und Paclitaxel lässt in beiden untersuchten Zellreihen den Rückschluss auf signifikant synergistische Reaktionen zu ( $p < 0.05$ ). Die Zellreihe OVCAR8 zeigt nach Bebrütung mit Paclitaxel Dosierungen von 1 bis 3nM in allen untersuchten Konzentrationsstufen einen signifikant gesteigerten anti-proliferativen Effekt durch die Kombination mit 2 $\mu$ M Nilotinib verglichen mit der alleinigen Paclitaxel Inkubation ( $p < 0.05$ ). Durch Kombination mit der verwendeten Paclitaxel Höchstdosis lässt sich das Zellwachstum sogar vollständig auf nahezu 0% hemmen.

### 3.2.2.3. Dreierkombinationstherapie mit Nilotinib, Carboplatin und Paclitaxel

In dieser Versuchsreihe wurde die beim Ovarialkarzinom standardmäßig eingesetzte Polychemotherapie aus Carboplatin und Paclitaxel mit einer 2 $\mu$ molaren Nilotinib Lösung kombiniert, um zusätzliche wachstumsinhibitorische Effekte durch den Tyrosinkinase Inhibitor aufzeigen zu können. Ausgangspunkte stellten die jeweiligen Monotherapien der genannten Medikamente dar. Die Konzentrationen für Paclitaxel und Carboplatin wurden so gewählt, dass die Tumorzellen durch die Behandlung mit der Zweierkombination zu 50% in ihrem Wachstum gehemmt werden. Daraus ergaben sich folgende Carboplatin/Paclitaxel Konzentrationen: Für die Zelllinie OVCAR3 wurde eine Carboplatin Dosierung von 4 $\mu$ M sowie eine 0,75nmolare Paclitaxel Lösung verwendet, für OVCAR8 Carboplatin in einer Konzentration von 2,5 $\mu$ M sowie Paclitaxel ebenfalls als 0,75nmolare Verdünnung. Der Dreierkombination wurde übereinstimmend mit den vorherigen Versuchen eine 2 $\mu$ molare Nilotinib Lösung hinzugefügt. Die Abbildungen 16 und 17 zeigen die Ergebnisse für die Zelllinien OVCAR3 und OVCAR8. Analog der Zweierkombinationen wurde auch für die Dreierkombination eine Versuchsreihe zur Aufdeckung synergistischer Wirkungen der Medikamente durchgeführt, deren Ergebnisse den Abbildungen 18, 19 und der Tabelle 3 zu entnehmen sind.

Abbildung 16 und 17: Wachstumsverhalten der Tumorzellen unter Monotherapie mit Nilotinib, Carboplatin und Paclitaxel, der Zweierkombination aus Carboplatin und Paclitaxel und der Dreierkombination aus Nilotinib, Carboplatin und Paclitaxel über sechs Tage

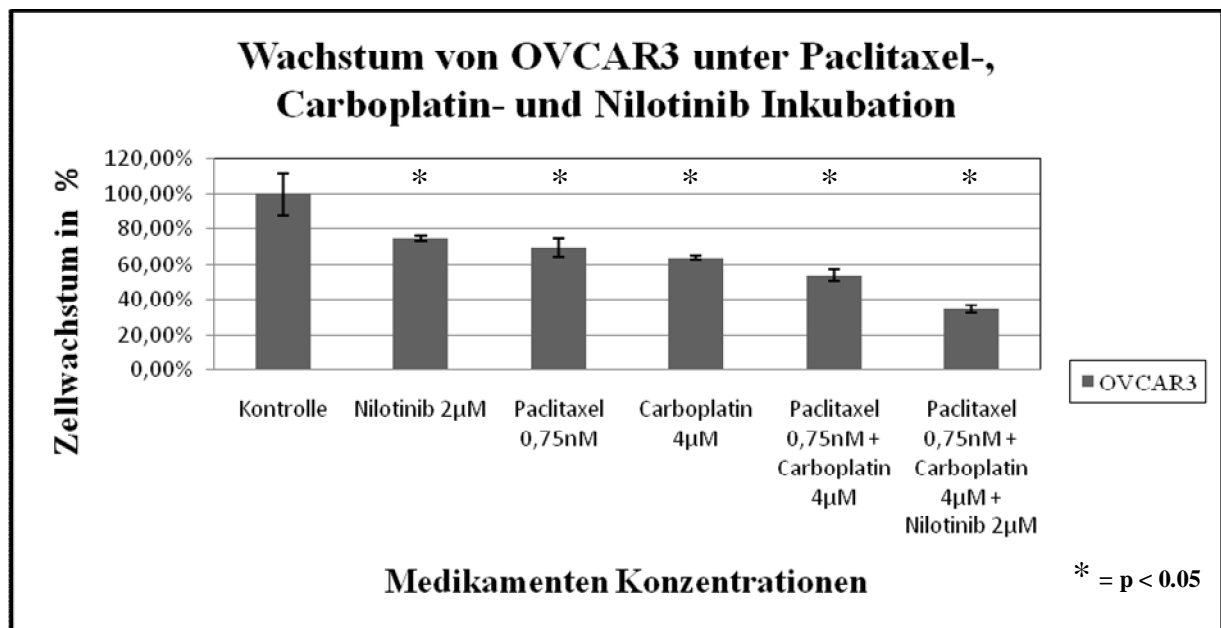


Abbildung 16: Zellwachstum von OVCAR3 unter Mono-, Zweifach-, und Dreifachtherapie; die Dreierkombination zeigt im Vergleich zur Zweifachbehandlung ohne Nilotinib einen signifikanten Abfall der Proliferationsrate durch den Zusatz des Tyrosinkinase Inhibitors

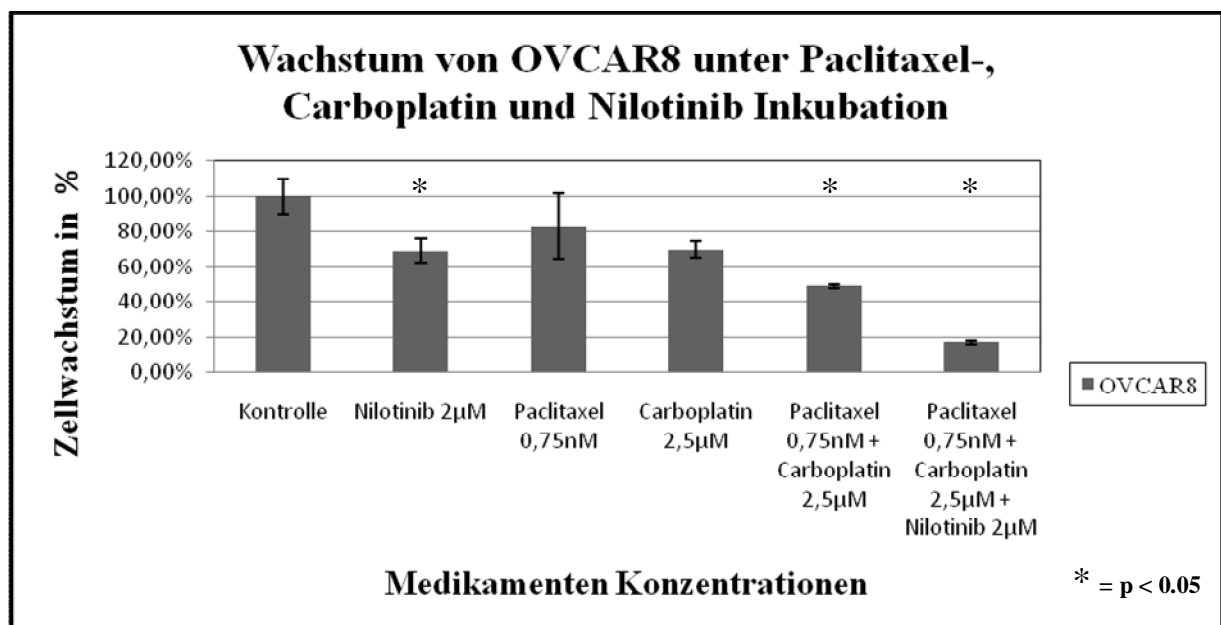


Abbildung 17: Zellwachstum von OVCAR8 unter Mono-, Zweifach-, und Dreifachtherapie; die Dreierkombination mit Nilotinib zeigt einen signifikanten Effekt bezüglich der Inhibition des Zellwachstums



Abbildung 18 und 19: Wachstumskurven der Zelllinien unter sechstägiger Nilotinib-, Carboplatin-, Paclitaxel-, sowie Kombinationsinkubation; Versuchsaufbau zur Detektion synergistischer Effekte

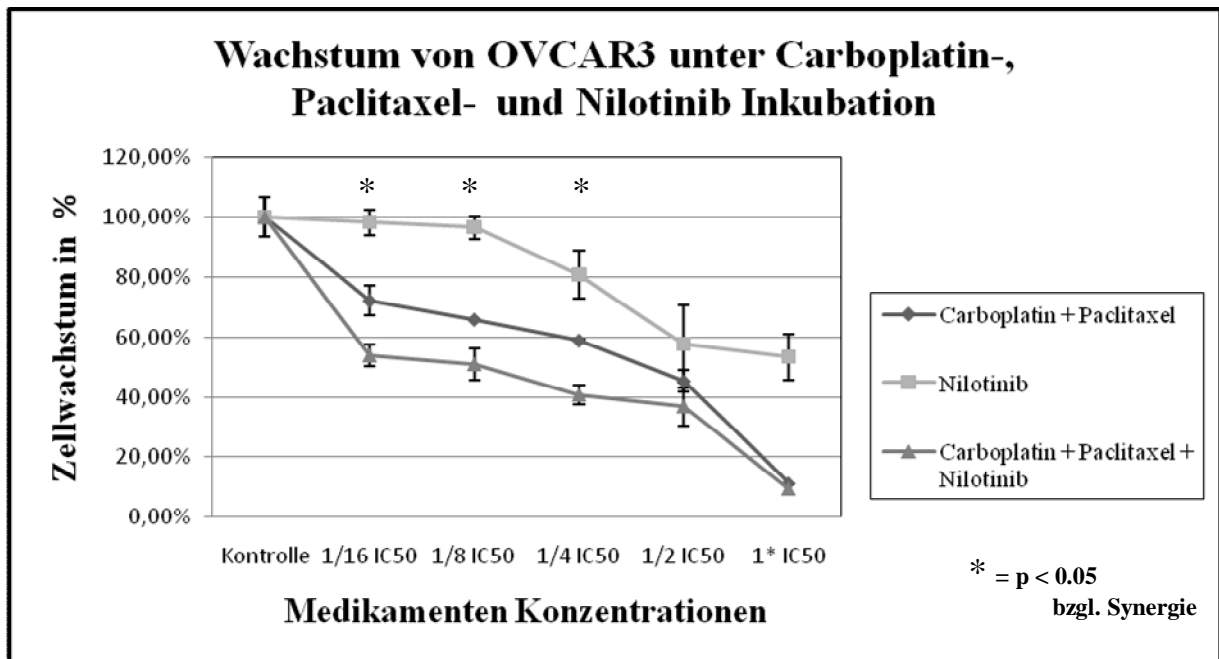


Abbildung 18: Wachstumskurven der OVCAR3 Zellen unter Carboplatin, Paclitaxel und Nilotinib Monotherapie sowie Kombinationstherapie; es liegen synergistische Reaktionen vor

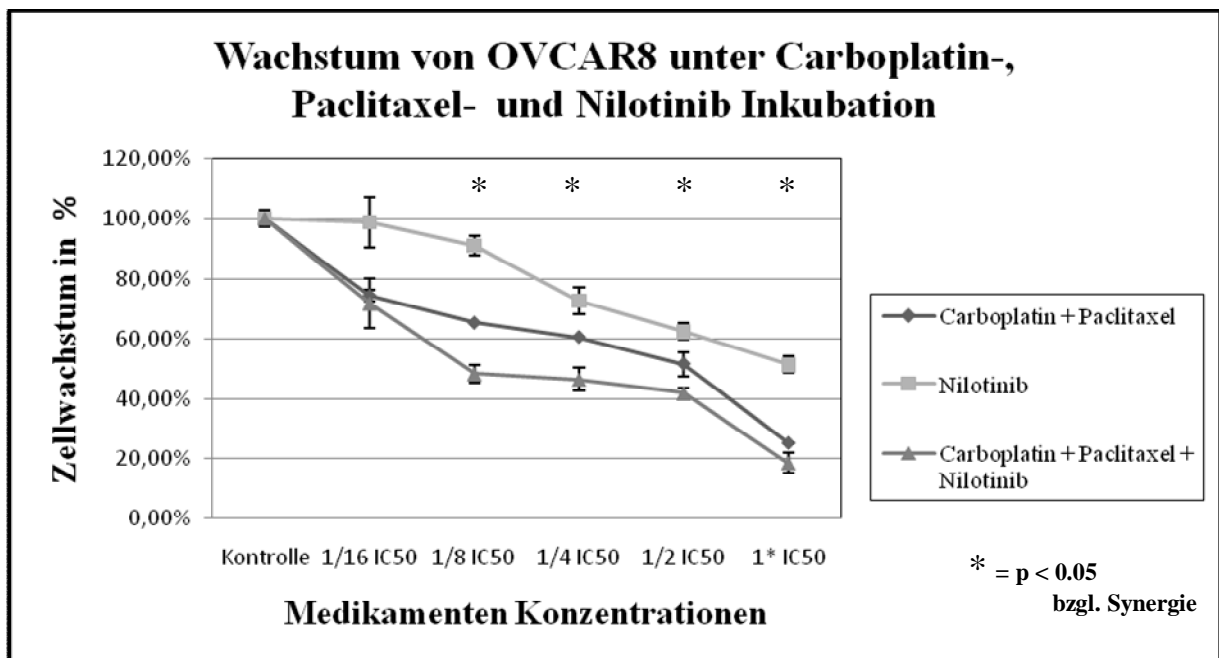


Abbildung 19: Wachstumskurven der OVCAR8 Zellen unter Carboplatin, Paclitaxel und Nilotinib Monotherapie sowie Kombinationstherapie; ein synergistischer Effekt ist ab einer Kombinationsinkubation mit der jeweiligen 1/8 IC50 zu beobachten

### OVCAR3

Drug	Combination Index Values at					
	ED50	ED75	ED90	Dm( $\mu$ M)	m	r
Combination (1:1.6:0.0006)	0.36333	0.71699	1.41551	0.35223	0.79639	0.87451
Nilotinib	N/A	N/A	N/A	2.52658	1.53161	0.96273
Carboplatin	N/A	N/A	N/A	5.88252	1.54051	0.99323
Paclitaxel	N/A	N/A	N/A	0.00165	1.63657	0.98407

### OVCAR8

Drug	Combination Index Values at					
	ED50	ED75	ED90	Dm( $\mu$ M)	m	r
Combination (1:1.2:0.0008)	0.72184	1.63992	3.72651	0.46559	0.72592	0.93397
Nilotinib	N/A	N/A	N/A	1.82058	1.57749	0.94192
Carboplatin	N/A	N/A	N/A	1.98783	1.62465	0.94667
Paclitaxel	N/A	N/A	N/A	0.00201	1.53988	0.96604

*Tabelle 3: berechnete Kombinationsindizes mittels CalcuSyn der OVAR3 und OVCAR8 Zellen unter Carboplatin, Paclitaxel und Nilotinib Monotherapie sowie Kombinationstherapie; ED50 (effect dosis 50%), Dm (IC50) calculated, m (measures of sigmoidicity), r (correlation coefficient)*

Die Untersuchungen ergeben für beide Zellreihen eine signifikant erhöhte Wachstumsinhibition durch die zusätzliche Behandlung der Tumorzellen mit Nilotinib verglichen mit der Zweierkombination bestehend aus Carboplatin und Paclitaxel ( $p < 0.05$ ). Die Proliferationsrate der OVCAR3 Zellen wird durch die Dreifachinkubation gegenüber der Zweiertherapie ohne Nilotinib von 54% auf 35% gesenkt (vgl. Abb. 16).

Die Versuche der Zellreihe OVCAR8 zeigen einen noch deutlicheren Effekt durch die zusätzliche Applikation von Nilotinib zur Zweierkombination (vgl. Abb. 17): Die alleinige Therapie mit  $2,5\mu\text{M}$  Carboplatin und  $0,75\text{nM}$  Paclitaxel führt zu einer Minderung der Zellproliferation auf 49% der unbehandelten Bezugskultur. Durch die Zugabe von  $2\mu\text{M}$  Nilotinib können die vitalen Zellen um 32% Prozentpunkte mehr verringert werden, es wird eine Inhibition auf 17% des nicht therapierten Vergleichsansatzes erreicht.

Die Dreierkombinationstherapie zeigt bei beiden Zellreihen signifikant synergistische Wirkungen durch die Zugabe des Tyrosinkinase Inhibitors. Für die Zelllinie OVCAR3 ergeben sich signifikant synergistische Reaktionen bei Kombination der Dosierungsstufen  $1/16$  IC<sub>50</sub>,  $1/8$  IC<sub>50</sub> sowie  $1/4$  IC<sub>50</sub> der jeweiligen Medikamente ( $p < 0.05$ , vgl. Abb. 18 sowie Tab. 3).

Bei den verwendeten Nilotinib Konzentrationen handelt es sich um Werte zwischen 0,1875 und 0,75 $\mu$ M. In OVCAR8 inkubierten Zellen lassen sich signifikant synergistische Reaktionen in den Kombinationen 1/8 IC50, 1/4 IC50, 1/2 IC50 sowie 1\* IC50 beobachten, entsprechend der Nilotinib Konzentrationen 0,3125, 0,625, 1,25 und 2,5 $\mu$ M ( $p < 0.05$ , vgl. Abb. 19 und Tab. 3).

### 3.3. TUNEL Assays

#### 3.3.1. TUNEL Assays mit Nilotinib

Nach Behandlung mit Nilotinib Konzentrationen von 2 und 4 $\mu$ M wurden TUNEL Assays an den Zelllinien OVCAR3 und OVCAR8 durchgeführt, um den Einfluss von Nilotinib auf die Apoptoserate der Zellen darzustellen (vgl. Abb. 20, 21, 22 und 23).

Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Apoptoseinduktion nach Nilotinib Therapie in den Konzentrationsstufen 2 und 4 $\mu$ M sowohl für OVCAR3 als auch für OVCAR8 ( $p < 0.05$ ).

Während nur mit Standardmedium beimpfte OVCAR3 Zellen lediglich einen Anteil apoptotischer Zellen zwischen 1 und 2% aufweisen, führt die Inkubation mit einer 2 $\mu$ molaren Nilotinib Lösung nach 24 Stunden zu einem Anstieg der Apoptoserate auf 6% sowie zu einer signifikanten Zunahme auf 10% nach Ablauf von 48 Stunden. Durch eine Steigerung der Nilotinib Dosis auf 4 $\mu$ M beobachtet man einen signifikanten Zuwachs apoptotischer Zellen auf einen Anteil von 30% nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und auf 37% nach 48-stündiger Bebrütung. Hierbei handelt es sich um eine relative Effektivitätssteigerung um weitaus mehr als 100% durch Verdoppelung der Nilotinib Konzentration.

Ähnliche Ergebnisse liefern die an OVCAR8 Zellen durchgeführten TUNEL Assays. Der Anteil untergegangener Zellen in der Kontrollgruppe beträgt hier zwischen 1 und 4%. Behandlung mit 2 $\mu$ M Nilotinib führt nach genannten Inkubationszeiten zu signifikanten Erhöhungen der Apoptoseraten auf 16 beziehungsweise 18%. Bebrütung der Zellen mit einer 4 $\mu$ molaren Lösung des Tyrosinkinase Hemmers zeigen ebenfalls einen zusätzlich signifikanten pro-apoptotischen Effekt verglichen mit der niedriger dosierten Nilotinib Therapie: Der Anteil apoptotischer Zellen beträgt 30% nach 24-stündiger- und 34% nach 48- stündiger Medikamenteninkubation.

Bei beiden untersuchten Zelllinien kann ein pro-apoptotischer Effekt durch die Nilotinib Monotherapie erzielt werden: Dabei lässt sich ein deutlicher Anstieg der Apoptoseraten bereits nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden beobachten. Die Verlängerung der Einwirkzeit des

Tyrosinkinase Inhibitors auf 48 Stunden zeigt nur einen geringen zusätzlichen Effekt. Schon bei der Verwendung einer Nilotinib Dosis von 2 $\mu$ M wird bei beiden untersuchten Zelllinien eine signifikante Apoptoseinduktion erreicht. Durch Behandlung mit einer 4 $\mu$ molaren Lösung des Tyrosinkinase Inhibitors können im Mittel 30% der vorhandenen Zellen in Apoptose überführt werden, verglichen mit einem mittleren Apoptoseanteil von 2% in den unbehandelten Kontrollgruppen.

### 3.3.2. TUNEL Assays mit Nilotinib und Carboplatin

Die Ergebnisse der durchgeführten TUNEL Assays nach Mono- und Kombinationsbehandlung mit Nilotinib und Carboplatin der Zellreihen OVCAR3 und OVCAR8 sind den Abbildungen 20 und 21 zu entnehmen.

Sowohl die Inkubation beider Zellreihen mit zellspezifischen Carboplatin Konzentrationen in der Monotherapie als auch in der Kombinationstherapie mit 2 $\mu$ M Nilotinib zeigen signifikante Anhebungen der Apoptoseraten gemessen an denen der ohne Medikament bebrüteten Kontrollen. Mitgeführte unbehandelte Zellen weisen die bereits oben erwähnten Apoptoseraten auf.

Therapie der Zellreihe OVCAR3 mit Carboplatin Konzentrationen von 2 $\mu$ M bewirkt nach 24-stündiger Inkubation einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate auf 21% ( $p < 0.05$ ). Nach Behandlung mit einer 4 $\mu$ molaren Carboplatin Lösung steigt dieser Wert auf 33% an, das geforderte Signifikanzniveau wird allerdings nicht erreicht. Eine Verlängerung der Inkubationszeiten führt ebenfalls nicht zu statistisch signifikanten Ergebnissen.

Die Kombinationstherapie bestehend aus 2 $\mu$ M Nilotinib und 4 $\mu$ M Carboplatin zeigt nach einer Bebrütungszeit von 48 Stunden einen signifikant zusätzlichen Effekt bezüglich der Apoptoseinduktion auf 56% verglichen mit derer erreicht durch die jeweiligen Einzelsubstanzen ( $p < 0.05$ ).

Die Inkubation der Zelllinie OVCAR8 mit einer 1 $\mu$ molaren Carboplatin Konzentration in der Monotherapie zeigt einen signifikant pro-apoptotischen Effekt verglichen mit Zellen, die keiner Medikamentenbehandlung ausgesetzt waren: Entsprechend der beschriebenen Inkubationszeiten werden Apoptoseraten von 34 und 30% gemessen.

Die Kombination mit Nilotinib präsentiert nach 24-stündiger Bebrütung einen signifikanten Anstieg untergegangener Zellen um weitere sechs Prozentpunkte auf 40% ( $p < 0.05$ ).

Sowohl in der Carboplatin Monotherapie also auch in der Kombinationstherapie ist die Bereitschaft der Zellen in Apoptose überzugehen durch die Verlängerung der Inkubationszeit von 24 auf 48 Stunden nicht steigerbar.

Abbildung 20 und 21: Apoptoseraten der Zelllinien unter Inkubation mit Nilotinib und Carboplatin sowie Kombinationsinkubation nach 24 und 48 Stunden; Dargestellt ist der Anteil apoptotischer Zellen in % bezogen auf die Gesamtzellzahl

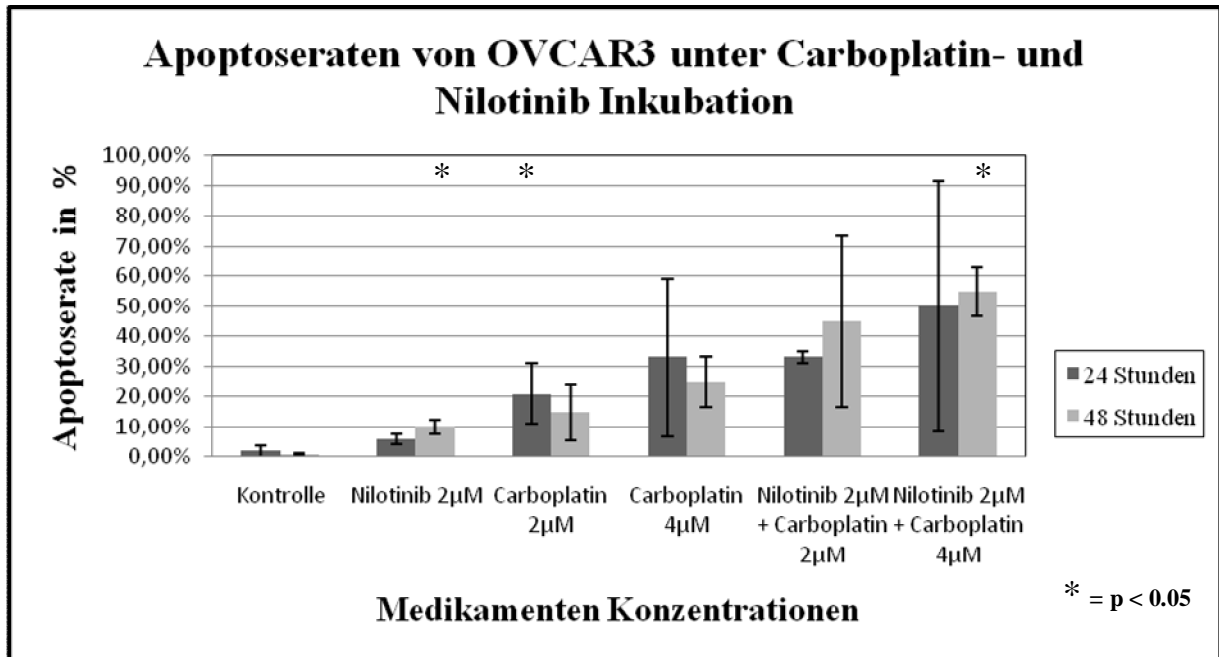


Abbildung 20: Apoptoseraten der OVCAR3 Zellen; die Kombinationstherapie von Nilotinib und Carboplatin zeigt bei Verwendung einer 4µmolaren Carboplatin Lösung einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate verglichen der Einzelinkubationen

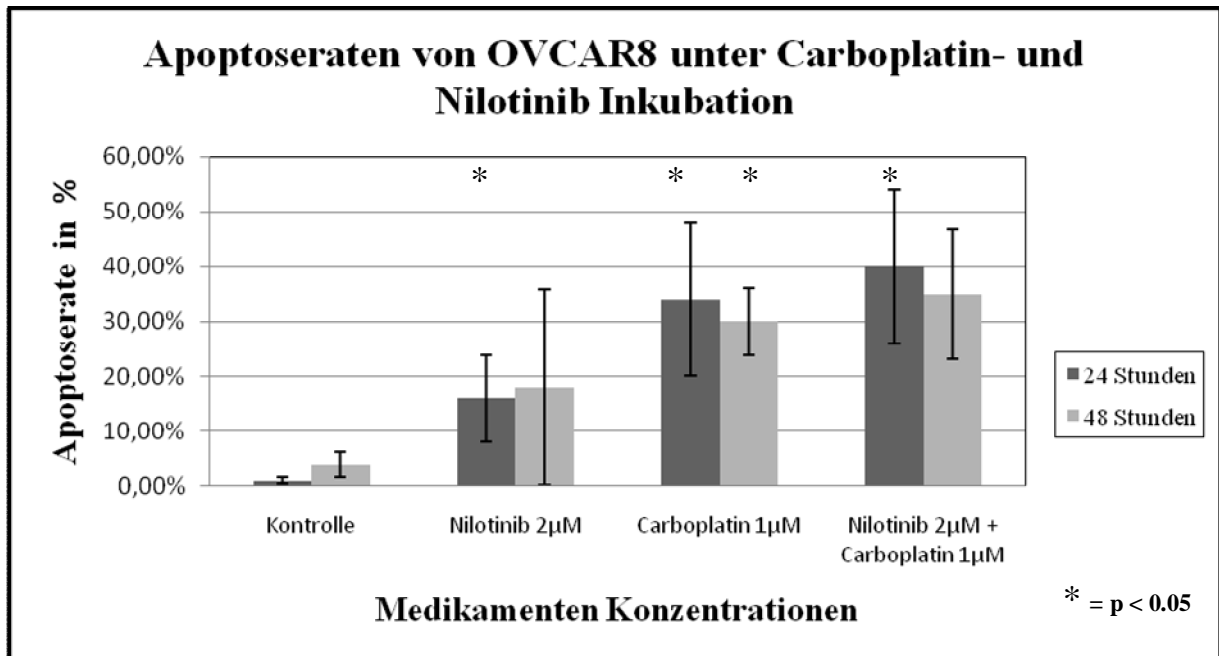


Abbildung 21: Apoptoseraten der OVCAR8 Zellen; sowohl die Monotherapien als auch die Kombinationsbehandlung führt zu einer erhöhten Induktion der Apoptose in den Tumorzellen verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe

Abbildung 22 und 23: Apoptoseraten der Zelllinien unter Inkubation mit Nilotinib und Paclitaxel sowie Kombinationsinkubation nach 24 und 48 Stunden; Dargestellt ist der Anteil apoptotischer Zellen in % bezogen auf die Gesamtzellzahl

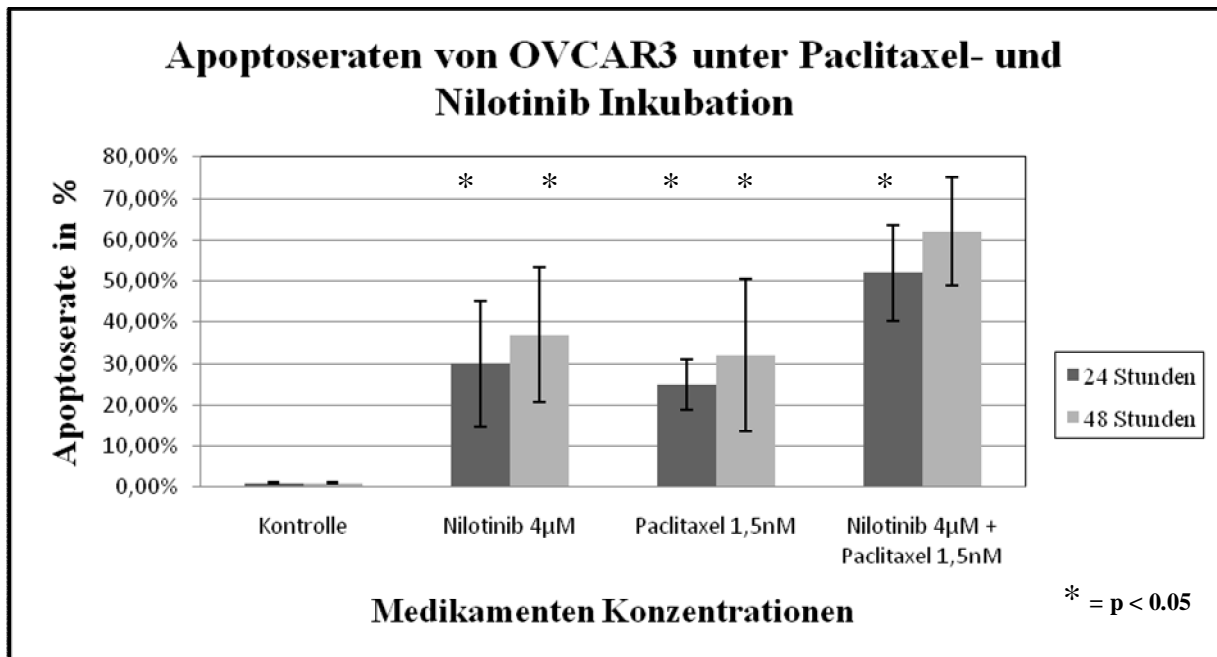


Abbildung 22: Apoptoseraten der OVCAR3 Zellen; Die Behandlung mit Nilotinib in der Monotherapie und ebenso in der Kombination mit Paclitaxel zeigt einen signifikanten Anstieg der Rate apoptotischer Zellen

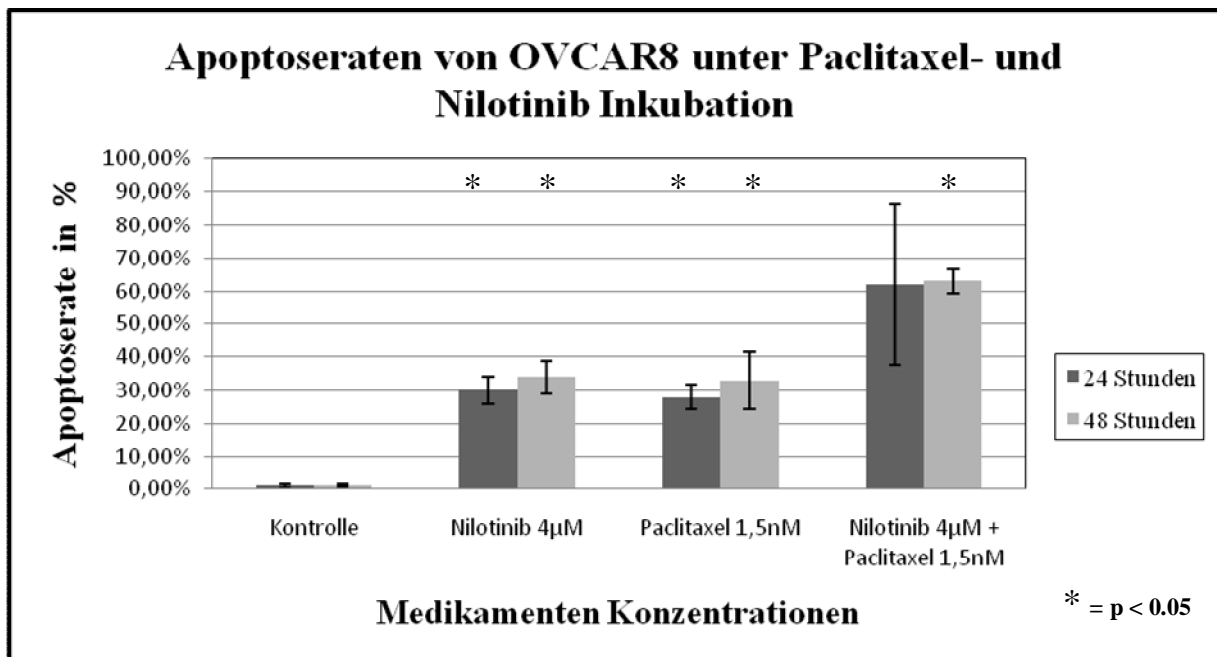


Abbildung 23: Apoptoserate der OVCAR8 Zellen; Nilotinib vermag in den Tumorzellen Apoptose zu induzieren; die Kombination mit Paclitaxel zeigt einen im Vergleich der Monotherapie signifikant pro-apoptotischen Effekt nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden

### 3.3.3. TUNEL Assays mit Nilotinib und Paclitaxel

Die Abbildungen 22 und 23 zeigen die Ergebnisse der TUNEL Assays, die an den Zellreihen OVCAR3 und OVCAR8 durchgeführt wurden und die Behandlung mit 4 $\mu$ M Nilotinib, 1,5nM Paclitaxel und die Kombination beider Substanzen in diesen Konzentrationsstufen miteinschlossen. Die Ergebnisse der Inkubation mit 4 $\mu$ M Nilotinib wurden bereits in 3.3.1. beschrieben.

Die Monotherapie mit 1,5nM Paclitaxel induziert bei OVCAR3 untersuchten Zellen den physiologischen Zelluntergang: nach 24-stündiger Medikamenteninkubation liegt die Apoptoserate bei 25% und steigt nach weiterer Bebrütungszeit für einen Tag auf 32% an. Verglichen mit den unbehandelten Kontrollgruppen, die die bereits oben erwähnten Raten untergegangener Zellen aufweisen, handelt es sich um einen signifikant pro-apoptotischen Effekt.

Die Kombination mit Nilotinib zeigt einen weiteren Anstieg der Apoptoseraten auf 52% (24 Stunden) und 62% (48 Stunden). Verglichen mit den erzielten Ergebnissen der Monotherapien ist der 24 Stunden Wert der Kombination statistisch signifikant ( $p < 0.05$ ).

Ähnliche Ergebnisse präsentieren die Auswertungen inkubierter OVCAR8 Zellen. Paclitaxel in der Monotherapie vermag den Anteil untergegangener Zellen nach Ablauf von 24 Stunden auf 28% der Gesamtzellzahl beziehungsweise auf 33% nach 48 Stunden zu erhöhen.

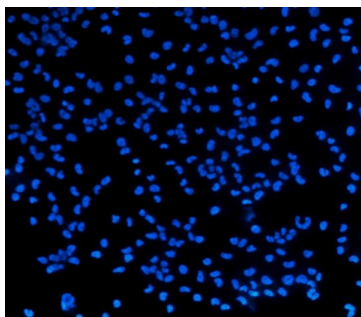
Durch Zugabe von Nilotinib ergibt sich ein bezüglich der Apoptoseinduktion zusätzlicher Wirkungseffekt: Die Apoptoserate steigt deutlich an auf Werte von 62 und 63%. Die Kombinationstherapie vermag somit verglichen mit der Paclitaxel Monotherapie den Anteil apoptotischer Zellen um weitere 30% zu steigern. Statistisch signifikant ist der beobachtete Effekt hier nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden ( $p < 0.05$ ).

Zusammenfassend können die TUNEL Assays zeigen, dass der Tyrosinkinase Inhibitor Nilotinib in der Lage ist in den Tumorzellen OVCAR3 und OVCAR8 die Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe signifikant zu erhöhen ( $p < 0.05$ ). Bei beiden untersuchten Zelllinien kann ein pro-apoptotischer Effekt durch die Nilotinib Monotherapie erzielt werden: Dabei lässt sich ein Anstieg der Apoptoseraten bereits nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden beobachten. Bei Verwendung einer 2 $\mu$ molaren Nilotinib Lösung reagieren die OVCAR8 Zellen sensibler auf die Behandlung, die Apoptoserate reicht nach 48 Stunden bis an knapp 20%, während die der Zelllinie OVCAR3 nur bis auf 10% ansteigt. Durch Behandlung mit einer 4 $\mu$ molaren Lösung des Tyrosinkinase Inhibitors können

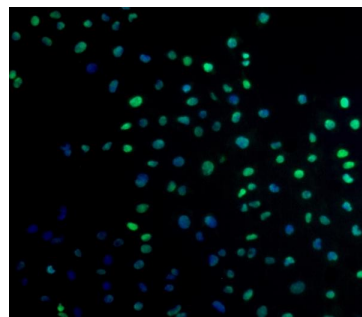
im Mittel 30% der vorhandenen Zellen in Apoptose überführt werden, verglichen mit einem mittleren Apoptoseanteil von 2% in den unbehandelten Kontrollgruppen.

Ebenso kann durch die Kombinationsinkubationen mit Carboplatin und Paclitaxel gezeigt werden, dass sich die Medikamente in Kombination hinsichtlich eines pro-apoptotischen Effektes in ihrer Wirkung verstärken. Die untersuchte Apoptoserate der kombiniert behandelten OVCAR3 und OVCAR8 Zellen liegt zu jedem Auswertzeitpunkt deutlich über derer, die durch die Monotherapien erzielt werden kann. Der Anteil apoptotischer Zellen kann hier auf bis zu zwei Drittel des Gesamtzellanteils angehoben werden.

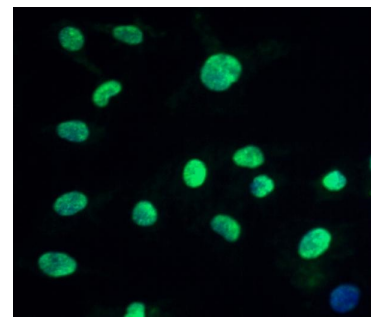
Abbildung 24a-f: TUNEL Assays als Nachweis der Apoptose; dargestellt sind Fotos der untersuchten Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop



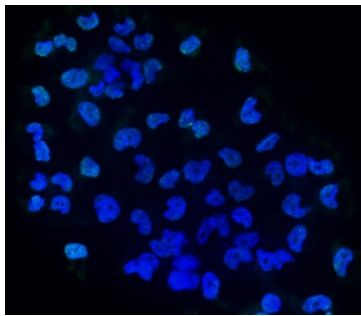
a) OVCAR3: unbehandelt



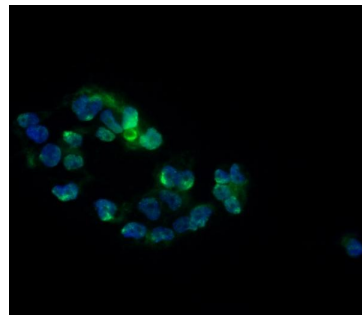
b) OVCAR3: Kombination Nilotinib- Paclitaxel



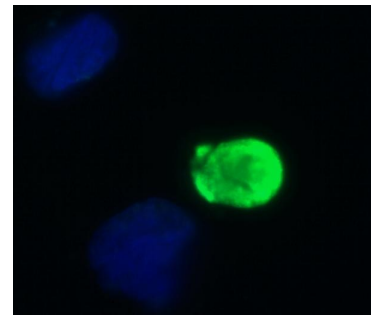
c) OVCAR3: Kombination Nilotinib- Paclitaxel



d) OVCAR8:unbehandelt



e) OVCAR8: Monotherapie Nilotinib



f) OVCAR3: Kombination Nilotinib- Carboplatin

### 3.4. Planare Migrationsassays

#### 3.4.1. Planare Migrationsassays mit Nilotinib

Um den Einfluss des Tyrosinkinase Inhibitors Nilotinib auf das Migrationsverhalten der Zelllinien OVCAR3 und OVCAR8 beschreiben zu können, wurde die Migrationsleistung der ge-



nannten Zellen nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation bestimmt. Entsprechend der durchgeführten TUNEL Assays wurden Nilotinib Lösungen in den Konzentrationen 2 und 4 $\mu$ M verwendet. Als Bezugswert wurden nur mit Standardnährmedium beimpfte Kontrollgruppen herangezogen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 25, 26, 27 und 28 dargestellt.

Die Migrationsleistung der unbehandelten OVCAR3 Zellen steigt innerhalb des untersuchten Zeitraums von 22% nach 24-stündiger Bebrütung auf 47% nach 48 Stunden bis auf 57% nach einer Bebrütungszeit von 72 Stunden an (vgl. Abb. 25). Bezugswert und Ausgangspunkt dieser Ergebnisse stellt dabei die Migrationsfront nach Entfernen der Silikonmüerchen dar, die einer Migration der Zellen von 0% entspricht. Inkubation mit einer 2 $\mu$ molaren Nilotinib Lösung zeigt einen deutlichen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Zellen: Der Anteil migrierter Zellen kann durch die Behandlung zu allen Messzeitpunkten signifikant um 15 bis 20 Prozentpunkte erniedrigt werden ( $p < 0.05$ ) und liegt nach 72 Stunden bei nur 41%, 16 Prozentpunkte unterhalb des Kontrollwertes. Nach 24-stündiger Nilotinib Inkubation kann die Migrationsleistung sogar auf ein Drittel derer der unbehandelten Zellen gesenkt werden, von 22 auf 7%. Bei Erhöhung der Nilotinib Dosis von 2 auf 4 $\mu$ M kann nach einer Bebrütungszeit von 48 und 72 Stunden ebenfalls ein signifikant migrationshemmender Effekt durch den Tyrosinkinase Inhibitor gezeigt werden, welcher allerdings nicht ausgeprägter ausfällt verglichen mit der niedrig dosierten Behandlung (vgl. Abb. 27).

Nilotinibs' Potential Einfluss auf die Migrationsgeschwindigkeit der Tumorzellen auszuüben kann ebenfalls durch die Versuche der Zelllinie OVCAR8 bekräftigt werden. Die Inkubation mit dem Tyrosinkinase Inhibitor zeigt im Vergleich zur unbehandelten Kultur eine Abnahme der Migrationsleistung nach 24, 48 und 72 Stunden Bebrütung (vgl. Abb. 26). Am stärksten ausgeprägt ist der auf die Zellmigration von OVCAR8 Zellen hemmende Effekt durch Nilotinib nach 72-stündiger Inkubation: Verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe, die eine Migrationsleistung von 63% zeigt, führt die Therapie mit einer 2 $\mu$ molaren Nilotinib Lösung zu einem signifikanten Abfall der Migration um 11 Prozentpunkte auf einen Wert von 52% ( $p < 0.05$ ).

Die Inkubation von OVCAR8 mit einer 4 $\mu$ molaren Nilotinib Lösung zeigt eine signifikante Wirksamkeit des Tyrosinkinase Inhibitors zu allen drei Messzeitpunkten ( $p < 0.05$ ) (vgl. Abb. 28). Nach 24-stündiger Medikamenteninkubation liegt ein nur vergleichsweise geringer Effekt auf die Migrationshemmung vor: Hier vermag die Therapie mit dem Tyrosinkinase Inhibitor den Anteil migrierter Zellen nur um 3% von 11 auf 8% zu hemmen. Nach Ablauf von 48 und 72 Stunden kann die Migrationsleistung der Zellen hingegen in beiden Fällen nahezu um

Abbildung 25 und 26: Migrationsverhalten der Tumorzellen nach 24-, 48-, 72-stündiger Nilotinib-, Carboplatin- sowie Kombinationsinkubation; dargestellt ist der Anteil migrierter Zellen in % verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe

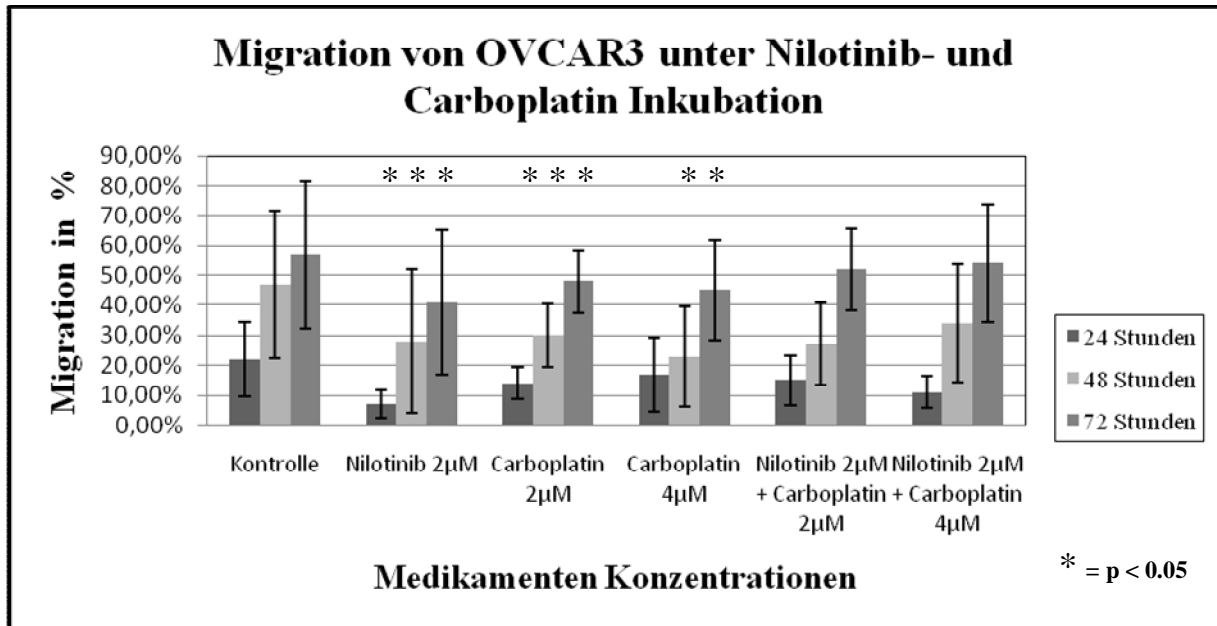


Abbildung 25: Migrationsverhalten der OVCAR3 Zellen; Nilotinib Behandlung vermindert die Migrationsleistung der Zellen zu allen Messzeitpunkten

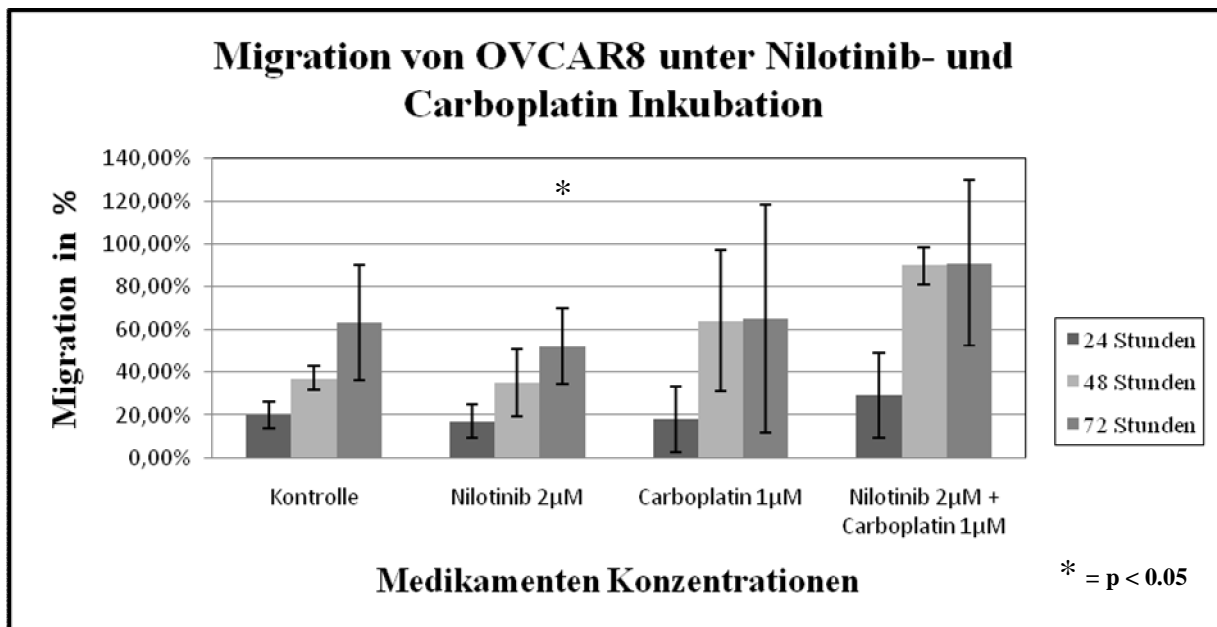


Abbildung 26: Migrationsverhalten der OVCAR8 Zellen; nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden ist ein signifikant migrationshemmender Effekt durch Nilotinib Therapie messbar

Abbildung 27 und 28: Migrationsverhalten der Tumorzellen nach 24-, 48-, 72- stündiger Nilotinib-, Paclitaxel- sowie Kombinationsinkubation; dargestellt ist der Anteil migrierter Zellen in % verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe

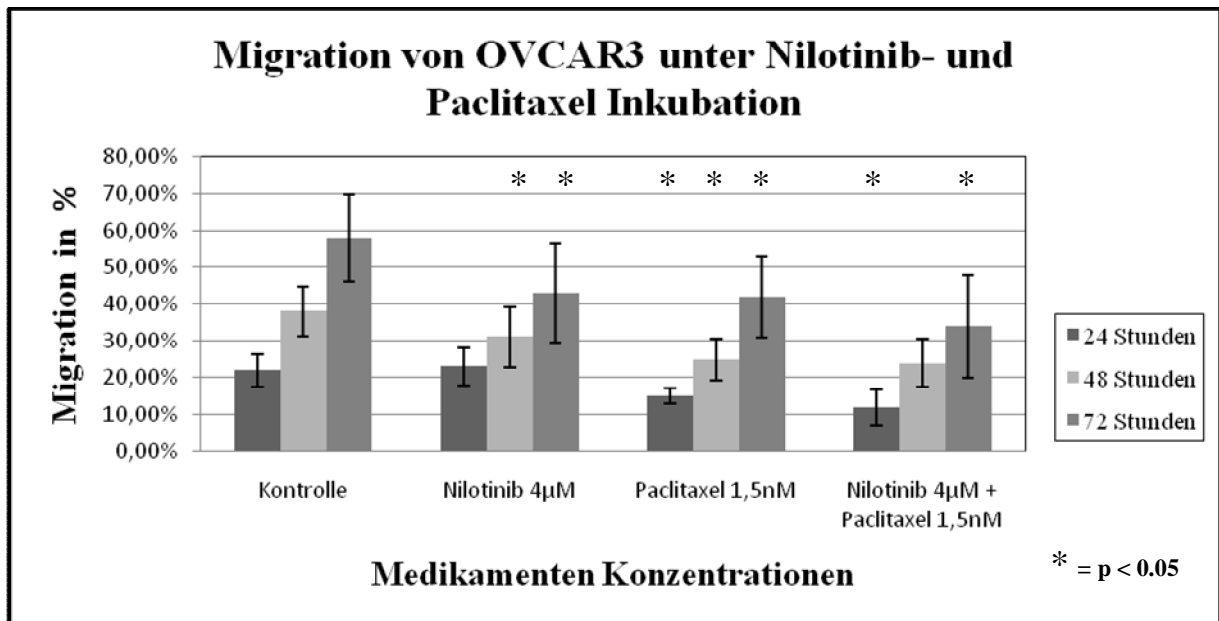


Abbildung 27: Migrationsverhalten der OVCAR3 Zellen; die Zweierkombination zeigt signifikante Effekte auf das Migrationsverhalten verglichen mit den jeweiligen Monotherapien

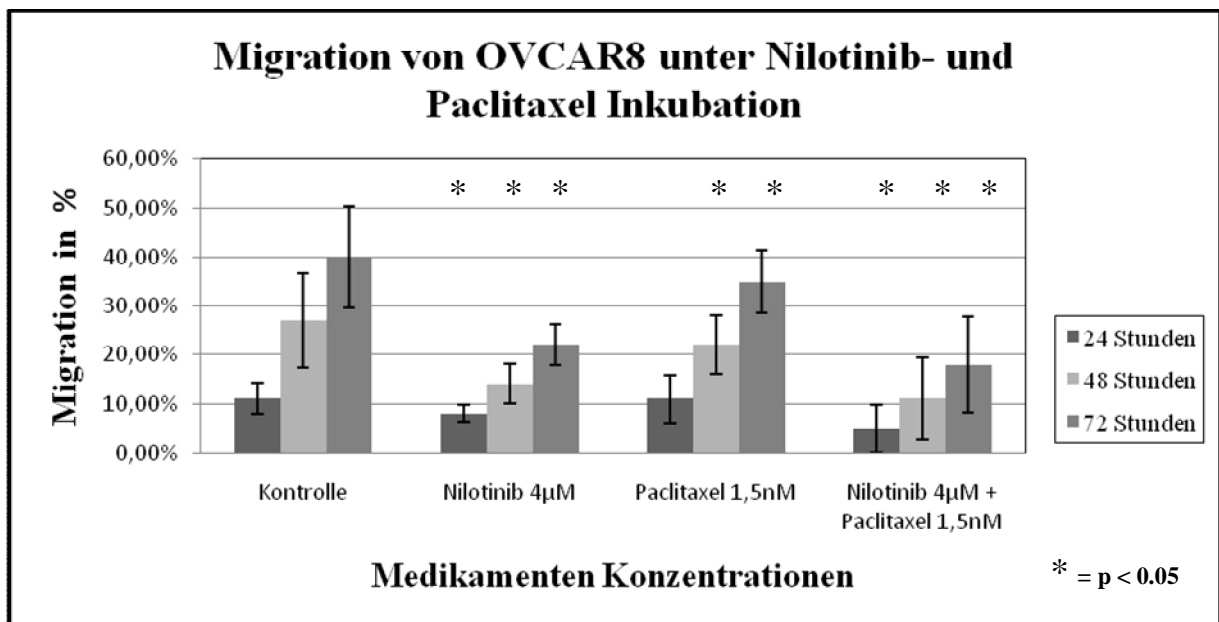


Abbildung 28: Migrationsverhalten der OVCAR8 Zellen; sowohl Mono- als auch Zweierkombinations-therapie führt zu einer signifikanten Einschränkung der Zellmigration

50% gesenkt werden, von 27 auf 14% beziehungsweise von 40 auf 22%. Diese Beobachtungen entsprechen verglichen mit der 2µmolaren Nilotinib Therapie einer zusätzlichen Inhibition der Zellmigration um 43% (nach 48 Stunden) und 28% (nach 72 Stunden). Demnach ist durch die Verdoppelung der Nilotinib Konzentration eine signifikante Steigerung der Wirkung zu verzeichnen.

#### 3.4.2. Planare Migrationsassays mit Nilotinib und Carboplatin

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss von Nilotinib in Kombination mit Carboplatin auf das Migrationsverhalten der Ovarialkarzinomzellen OVCAR3 und OVCAR8 untersucht. Die Ergebnisse nach 24-, 48- und 72-stündiger Medikamenteninkubation sind den Abbildungen 25 und 26 zu entnehmen.

Die durchgeführte Monotherapie mit zellspezifischen Konzentrationen von Carboplatin zeigt bei Inkubation der OVCAR3 Zellen einen signifikanten migrationshemmenden Effekt nach 24, 48 und 72 Stunden Bebrütungszeit ( $p < 0.05$ ) (vgl. Abb. 25). Dabei lässt sich die Migrationsleistung bei Verdoppelung der Carboplatin Dosis von 2 auf 4µM besonders nach Ablauf von 48 Stunden noch deutlich weiter senken: Der Anteil migrierter OVCAR3 Zellen kann hier um 24% von 47 auf 23% erniedrigt werden. Verglichen mit der Nilotinib Monotherapie ist der durch Carboplatin Behandlung erzielte migrationshemmende Effekt insgesamt allerdings zu allen Messzeitpunkten deutlich schwächer ausgeprägt.

In Kombination mit 2µM Nilotinib kann sowohl bei der Verwendung einer 2 sowie einer 4µmolaren Carboplatin Lösung zu keinem Auswertzeitpunkt ein zusätzlicher Effekt bezüglich der Migrationsinhibition verglichen mit der Wirksamkeit nach Inkubation der Zellen mit den Einzelsubstanzen erzielt werden. Der Anteil migrierter Zellen liegt zu allen Messzeitpunkten unter dem der unbehandelten Kontrollgruppe, allerdings nicht unterhalb der Werte, die durch die Nilotinib Monotherapie erzielt wurden.

Für die Zelllinie OVCAR8 lässt sich folgendes feststellen: Weder durch die Behandlung mit 1µM Carboplatin noch durch die Kombination von Nilotinib und Carboplatin kann eine Hemmung der Ausbreitung der Tumorzellen beobachtet werden (vgl. Abb. 26). Die gemessenen Werte liegen hier größtenteils sogar über denen, welche die unbehandelten Kontrollgruppen zeigen.

Ein migrationshemmender Effekt für Carboplatin in der Monotherapie oder in der Kombination mit Nilotinib kann somit für die Zellreihe OVCAR8 nicht gezeigt werden.

### 3.4.3. Planare Migrationsassays mit Nilotinib und Paclitaxel

Weiter sollte herausgefunden werden welchen Einfluss die Kombinationsinkubation von Nilotinib und Paclitaxel auf das Migrationsverhalten der untersuchten Zellen ausübt. Die Ergebnisse der Migrationsassays für die Kombination mit 4 $\mu$ M Nilotinib und 1,5nM Paclitaxel sowie die jeweiligen Monotherapien zeigen die Abbildungen 27 und 28.

Sowohl die Paclitaxel Monotherapie als auch die Kombinationsbehandlung mit Nilotinib zeigt bei den Zelllinien OVCAR3 und OVCAR8 einen deutlichen Abfall der Migrationsleistung verglichen mit derer der unbehandelten Kontrollkulturen.

Bei OVCAR3 beimpften Zellen bewirkt die Inkubation mit einer 1,5nmolaren Paclitaxel Lösung nach Ablauf eines Tages bereits eine signifikante Migrationshemmung um 7% von 22 auf 15% ( $p < 0.05$ , vgl. Abb. 27). Die weitere Medikamenteninkubation führt zu einer noch deutlicheren Abnahme der Migrationsleistung verglichen mit derer der unbehandelten Kontrollgruppe: Nach 48-stündiger Bebrütung kann die Tumorausbreitung um ein Drittel vermindert werden von 38 auf 25%, nach Ablauf von 72 Stunden wird ein Abfall von 58 auf 42% beobachtet.

Die Kombinationstherapie mit Nilotinib ist außerdem in der Lage die beschriebene Migrationsinhibition noch zu verstärken. Ein signifikant zusätzlicher Effekt bezüglich der Migrationsinhibition verglichen mit der Wirksamkeit nach Inkubation der Zellen mit den Einzelsubstanzen kann nach einer Bebrütungszeit von 24 und 72 Stunden beobachtet werden ( $p < 0.05$ ): Verglichen mit der Paclitaxel Monotherapie kann der Anteil migrierter Zellen in der Kombination nach 24 Stunden um weitere 3 Prozentpunkte gesenkt werden auf 12% des Bezugswertes. Nach Ablauf von 72 Stunden zeigt sich sogar eine weitere Abnahme der Migrationsleistung um 8% auf 34% des Bezugswertes. Verglichen mit den nur mit Standardmedium beimpften Zellen wird hier eine Hemmung der Zellmigration um 41% erreicht.

Der zusätzliche Nutzen bezüglich einer Hemmung der Tumorausbreitung durch Kombination der beiden Substanzen Nilotinib und Paclitaxel ist anhand der Untersuchungen der Zelllinie OVCAR8 noch deutlicher zu sehen. Während die alleinige Inkubation mit 1,5nM Paclitaxel ebenfalls gute Ergebnisse liefert und zu den späteren Auswertezeitpunkten nach 48 und 72 Stunden eine signifikant erniedrigte Migrationsleistung verglichen mit unbehandelten Zellen zeigt, wird bei Kombination mit einer 4 $\mu$ molaren Nilotinib Lösung ein signifikanter Zugewinn an Wirksamkeit zu allen untersuchten Messzeitpunkten beobachtet ( $p < 0.05$ ). Nach Ablauf von 24 und 48 Stunden kann der Anteil migrierter Tumorzellen im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Paclitaxel durch den Zusatz des Tyrosinkinase Inhibitors halbiert werden, von 11% auf 5% nach 24-stündiger Inkubation sowie von 22 auf 11% nach Ablauf

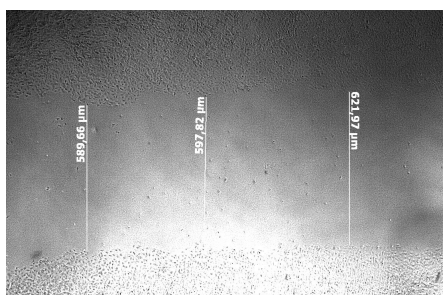
von 48 Stunden. Auch nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden ist eine deutliche Reduktion der Migrationsleistung von 35 auf 18% verglichen mit der durchgeführten Paclitaxel Monotherapie zu beobachten. Gemessen an Zellen, die keiner Medikamenteninkubation ausgesetzt waren, lässt sich sowohl nach 24-, 48- als auch nach 72-stündiger Bebrütung die Rate migrierter Zellen signifikant um mehr als 50% verringern.

Insgesamt belegen die durchgeführten Migrationsassays bei den Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR3 und OVCAR8 einen signifikant migrationshemmenden Effekt für den Tyrosinkinase Inhibitor Nilotinib in vitro, sowohl für eine Konzentration von 2 $\mu$ M als auch für 4 $\mu$ M ( $p < 0.05$ ). Im Vergleich zu den ebenfalls durchgeführten Monotherapien mit den etablierten Zytostatika Carboplatin und Paclitaxel zeigt der Tyrosinkinase Inhibitor in der Verwendung als Einzelsubstanz von den drei Medikamenten den größten migrationshemmenden Effekt.

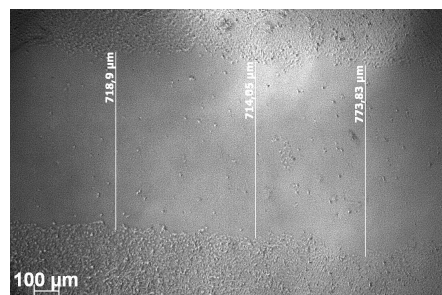
In Kombination mit dem Zytostatikum Paclitaxel kann durch Behandlung mit einer 4 $\mu$ molaren Nilotinib Lösung außerdem bei beiden untersuchten Zelllinien die Zellmigration weiter gesenkt werden als es die jeweiligen Monotherapien ermöglichen. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen beobachtet man eine Abnahme der Migrationsleistung um bis zu 60%.

Die Kombination von 2 $\mu$ M Nilotinib mit zellspezifischen Carboplatin Konzentrationen zeigt keine bessere Wirksamkeit hinsichtlich der Hemmung der Migrationsleistung.

*Abbildungen 29a und b: ausgemessene Migrationsfronten der OVCAR8 Zellen nach 48-stündiger Bebrütungszeit; die unbehandelten Kontrollzellen sind weiter in die freie Fläche migriert als die mit 2 $\mu$ M Nilotinib therapierten Tumorzellen*

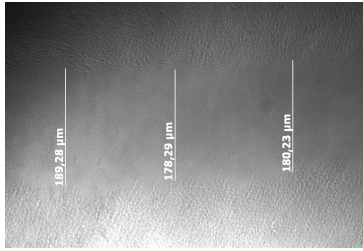


a) OVCAR8: unbehandelt

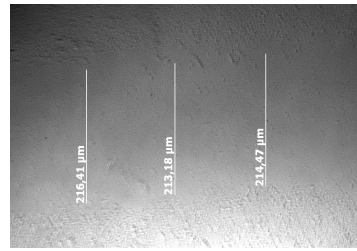


b) OVCAR8: Monotherapie Nilotinib

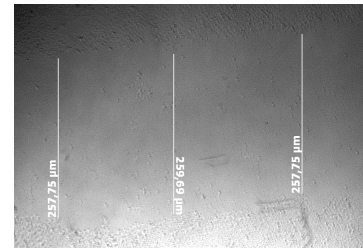
Abbildungen 30a, b und c: ausgemessene Migrationsfronten der Zelllinie OVCAR3 nach 48-stündiger Inkubationszeit mit Standardmedium, mit Nilotinib in der Monotherapie und in der Kombination mit Paclitaxel; die Zweierkombination zeigt einen zusätzlichen migrationshemmenden Effekt



a) OVCAR3: unbehandelt



b) OVCAR3: Monotherapie Nilotinib



c) OVCAR3: Kombination Nilotinib - Paclitaxel

## 4. DISKUSSION

Zu Beginn dieser Arbeit galt es zu untersuchen, ob Ovarialkarzinomzellen bekannte Angriffsstrukturen für Nilotinib bieten und somit potentiell einer anti-proliferativen Therapie durch den Tyrosinkinase Inhibitor zugänglich wären. Nilotinib, ein selektiver Tyrosinkinase Inhibitor der zweiten Generation (sowie Nachfolger Imatinibs), entfaltet seine wachstumseinschränkende Wirkung über die Hemmung spezifischer Tyrosinkinasen. Dabei handelt es sich um die zytoplasmatische Tyrosinkinase Abl, sowie die membranständigen Rezeptorfamilien c-kit, PDGFR- $\alpha$  und PDGFR- $\beta$ .

Die durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen beschränkten sich auf die Untersuchung der Rezeptoren c-Abl und PDGFR- $\alpha$ . Für die beiden epithelialen Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR3 und OVCAR8 kann dabei ein positiver Rezeptorstatus für c-Abl sowie für PDGFR- $\alpha$  gezeigt werden. Diese Expressionsmuster stimmen mit den Ergebnissen anderer Studien überein. Mundhenke et al. konnten 2008 zudem mittels PCR sowie immunhistochemischer Methoden für beide Zellreihen die Expression des Rezeptors PDGFR- $\beta$  belegen. Die Zelllinie OVCAR3 zeigte bei diesen Untersuchungen ebenfalls einen positiven Rezeptorstatus für die Tyrosinkinase c-kit.

Für die Ovarialkarzinomzellreihe SK-OV3 liegt eine positive Rezeptorexpression für die Tyrosinkinasen c-Abl, PDGFR- $\beta$  und c-kit vor. Verschiedene Untersuchungen konnten allerdings die Abwesenheit des Rezeptors PDGFR- $\alpha$  belegen (Matei et al. 2004, Mundhenke et al. 2008).

Somit erscheinen die Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR3, OVCAR8 und SK-OV3 durch die verschiedenen Expressionsmuster mit Rezeptor-Tyrosinkinasen für die in vitro Versuche mit Nilotinib geeignet.

Da vorangegangene Studien sowie die hier durchgeführten Versuche besonders PDGFR- $\alpha$  vermittelten Prozessen eine entscheidende Bedeutung in der Pathogenese und Tumorprogression des Ovarialkarzinoms sowie der Nilotinib vermittelten zytoreduktiven Wirkung beimesen, seien die Grundlagen der PDGF Rezeptor Familie sowie solche der zytoplasmatischen Abl-Kinase, zu welcher Nilotinib die höchste Affinität aufweist, im Folgenden kurz dargestellt.

Bei den platelet-derived growth factor receptors (PDGFR) handelt es sich um eine Gruppe membranständiger Tyrosinkinase Rezeptoren. Man unterscheidet die jeweils aus zwei Untereinheiten bestehenden Isoformen PDGFR- $\alpha$  und PDGFR- $\beta$  (Heldin et al. 1998). Rezep-



toraktivierung erfolgt nach Bindung spezifischer Liganden: Platelet-derived growth factor AA, AB, BB, sowie CC oder DD. Zu beachten ist, dass PDGFR- $\alpha$  durch Bindung aller vier erstgenannten Isoformen aktiviert werden kann, bei PDGFR- $\beta$  eine Signalweiterleitung jedoch nur nach Stimulierung durch PDGF BB oder DD stattfindet (Bergsten et al. 2001). Schlüsselereignis des Aktivierungsprozesses stellt die Rezeptordimerisierung mit anschließender Autophosphorylierung von Tyrosinresten und anderer Proteine dar. In der Folge werden nachgeschaltete Signalkaskaden mit Beteiligung unterschiedlicher Effektormoleküle in Gang gesetzt.

Physiologisch exprimiert vor allem im Bindegewebe auf der Zelloberfläche von Fibroblasten, außerdem von glatten Muskelzellen sowie Endothelzellen von Kapillaren und Neuronen, nehmen die PDGF Rezeptor-Tyrosinkinase als Wachstumsstimulator eine wichtige Rolle zu einem während der Embryonalentwicklung, zum anderen in der Zellzyklusregulation ein. Dabei üben sie einen steigernden Effekt auf die Zellproliferation, Zelldifferenzierung sowie Angiogenese aus. Während der DNA Synthese sind sie entscheidend an der Organisation der Mikrotubuli beteiligt und sind somit wichtige Faktoren für die Mitoserate (Thyberg 1984, Yoon et al. 2000). Darüber hinaus besitzt PDGF über nachgeschaltete Signalkaskaden eine indirekte anti-apoptotische Wirkung. Beobachtet wurde außerdem ein Einfluss der PDGF Rezeptoren auf die Zellbeweglichkeit, im Sinne einer Migrationsförderung. Des Weiteren führt die Rezeptoraktivierung zu einer gesteigerten Thrombozytenaggregation, zu einer Regulation des Tonus von Blutgefäßen und Stimulierung der Wundheilung (Rönstrand et al. 2001, Heldin et al. 1998).

Als Ursache für zahlreiche Krankheitsbilder unter anderem verschiedener maligner Prozesse konnte eine pathologische Expression von PDGF Rezeptoren gezeigt werden: Das Glioblastom (Hermanson et al. 1992), das Neuroblastom (Matsui et al. 1993), das Bronchialkarzinom (Antoniades et al. 1992), das kolorektale Karzinom (Lindmark et al. 1993), das Mammakarzinom (Seymour et al. 1993), das Prostatakarzinom (Doloff et al. 2007), Sarkome verschiedener Lokalisation zum Beispiel das Osteosarkom (Kubo et al. 2008) sowie Sarkome des Uterus (Codell et al. 2007) und für diese Arbeit von besonderem Interesse das Ovarialkarzinom (Wilczynski et al. 2005, Matei et al. 2006, Chu et al. 2008).

Für die in soliden Tumoren ebenfalls detektierte erhöhte Aktivität der PDGF Rezeptoren wird vor allem eine parakrine und/oder autokrine Aktivierung verantwortlich gemacht (Liu et al. 2011). Eine gesteigerte Kinaseaktivität kann in selteneren Fällen ebenso durch eine Autoaktivierung des Rezeptors bei vorliegenden Mutationen erreicht werden. Eine derartige Pathophysiologie liegt den konstitutiv aktiven c-kit oder PDGFR- $\alpha$  Tyrosinkinase in gastrointestinalen

Stromatumoren (GIST) in der Mehrheit der Fälle zu Grunde. Relevante Rezeptormutationen beim Ovarialkarzinom konnten nicht gefunden werden. Hier liegt vor allem eine gesteigerte PDGFR Aktivität vermittelt durch parakrine und autokrine Aktivierung vor (Matei et al. 2006).

Eine gesteigerte Stimulation der PDGF Rezeptoren in Tumorgewebe stellt einen wichtigen Faktor für schnelles und aggressives Tumorwachstum dar: PDGF Rezeptoraktivierung führt zu einer erhöhten Teilungsrate mit folglich beschleunigtem Wachstum der Tumormasse. Durch Induktion der Angiogenese können neue, den Tumor versorgende Blutgefäße entstehen, sodass dieser sich unter zunehmender Proliferation sowie Förderung der Migration weiter ausbreiten kann. Die Hemmung der Apoptose stellt dabei einen zusätzlichen wichtigen Überlebensfaktor dar.

Die Tyrosinkinase Abl zählt zur Gruppe der Abl-Kinasen, zu denen außerdem noch die Abl-related Gene (Arg) gehören. Es handelt sich um eine zytoplasmatische Tyrosinkinase, welche im Gegensatz zu den Rezeptoren der PDGFR Familie keine extrazelluläre Domäne besitzt. Die grundlegenden Mechanismen der Kinaseaktivierung im Sinne einer Autophosphorylierung sowie Funktionen im Zellzyklus entsprechen im Wesentlichen denen der beschriebenen membranständigen Tyrosinkinasen. Zu beachten ist, dass die c-Abl Kinaseaktivität in gesundem Gewebe einer an die physiologischen Gegebenheiten angepassten Regulation unterliegt (Nagar et al. 2003). Bei dem Krankheitsbild der chronisch myeloischen Leukämie werden diese Regulationsmechanismen ausgeschaltet, durch Fusion der Protoonkogene Bcr und Abl entsteht das onkogene Fusionsprotein Bcr-Abl, welches konstitutiv aktiv ist (Shtivelman et al. 1985). Ob eine gesteigerte Expression und Aktivität von c-Abl auch in der Pathogenese solider Tumoren eine entscheidende Rolle spielt, ist in vielen Fällen noch unklar. 2006 konnten Srinivasan et al. einen positiven Zusammenhang zwischen konstitutiv aktiver Abl-Tyrosinkinase und Tumorprogression beim Mammakarzinom feststellen. Erhöhte Aktivität von c-Abl wurde außerdem beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom gefunden. Ursächlich scheint hier eine Fehlregulation durch Deletion des Tumorsuppressor Gens FUS1 zu sein, in dessen Folge die Hemmung der Abl-Tyrosinkinase ausbleibt (Lin et al. 2007). Untersuchungen an Geweben von Ovarialkarzinomen konnten eine signifikant erhöhte Expression der c-Abl-Tyrosinkinase bei malignen Eierstockkrebszellen verglichen mit gutartigen Ovarialtumoren zeigen. Hier wurde eine positive Korrelation zwischen Expression der Abl-Tyrosinkinase und des Tumorsuppressor Proteins p73, welches unter bestimmten Bedingungen ebenso in der Lage ist Apoptose zu hemmen, gefunden. Eine erhöhte Expression des Proteins p73 konnte

bereits in anderen soliden Malignomen wie dem Bronchialkarzinom, dem kolorektalem Karzinom und dem Blasenkarzinom nachgewiesen werden. (Niyazi et al. 2003). Die Gruppe um C. Mundhenke et al. konnte 2008 ebenfalls die Expression der Abl-Tyrosinkinase an fünf Ovarialkarzinomzelllinien zeigen. Der genaue Pathomechanismus einer erhöhten c-Abl Aktivität beim Ovarialkarzinom und dessen prognostische Relevanz ist noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Bei Betrachtung des Wirkprofils von Nilotinib fällt die im Vergleich zu Imatinib deutlich höhere Affinität für Abl bei ansonsten ähnlichem Einfluss auf membranständige Tyrosinkinasen auf: Der Tyrosinkinase Inhibitor der zweiten Generation vermag diese mit einer 30-fach höheren Effizienz zu hemmen. c-Abl als potentielle Angriffsstruktur für Nilotinib beim Ovarialkarzinom könnte somit eine bessere Wirksamkeit zur Vorgängersubstanz Imatinib zumindest teilweise erklären.

Die durchgeführten Monotherapien mit Nilotinib zeigen nach sechstägiger Inkubation eine signifikante Proliferationseinschränkung der untersuchten epithelialen Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR3 und OVCAR8 ( $p < 0.05$ ). Mit zunehmender Dosierung kann dabei ein annähernd linearer Abfall des Zellwachstums erzielt werden. Die eingesetzten Nilotinib Konzentrationen wurden dabei so gewählt, dass sie im therapeutischen Bereich des Medikamentes (1,7 bis 3,6 $\mu$ M) liegen. Die untersuchte IC<sub>50</sub> liegt für OVCAR3 bei 3 $\mu$ M, für OVCAR8 bei 2,5 $\mu$ M.

In einer 2006 veröffentlichten Phase I Studie, welche pharmakologische Eigenschaften von Nilotinib in vivo untersuchte und CML-Patienten mit Imatinib Resistenz oder Unverträglichkeit einschloss, konnte eine Plasmahöchstkonzentration von 3,6 $\mu$ M bei einer Nilotinib Gabe von 400mg zweimal täglich erreicht werden. Außerdem wurde nach oraler Einnahme von 400mg einmal täglich ein konstanter Blutspiegel von 1 $\mu$ M gemessen, nach zweimaliger Applikation von 1,7 $\mu$ M sowie eine mittlere Plasmakonzentrationen von 2,3 $\mu$ M nach Gabe von 600mg Nilotinib zweimal täglich (Kantarjian et al. 2006). Die zweimalige Einnahme von je 600mg pro Tag zeigte sich insgesamt als gut verträglich. Da bei Verwendung höherer Dosierungen vermehrt toxische Nebenwirkungen auftraten, wurde die Höchstdosis auf 600mg zweimal täglich festgelegt. Daher ist nur ein Konzentrationsbereich von Nilotinib unter 4 $\mu$ M von klinischer Relevanz. Laut dieser Ergebnisse liegen die beobachteten IC<sub>50</sub> Werte der Ovarialkarzinomzellen im klinisch relevanten Bereich von Nilotinib.

Im Gegensatz dazu zeigen mit Nilotinib behandelte SK-OV3 Zellen erst ab einer Konzentration von  $4,5\mu\text{M}$  einen signifikant messbaren Effekt auf das Wachstumsverhalten. Die Wirksamkeit von Nilotinib im klinisch relevanten Bereich kann somit bei dieser Zellreihe nicht belegt werden.

Die Zelllinien OVCAR3 und OVCAR8, bei welchen eine Proliferationsinhibition von Nilotinib im therapeutischen Bereich belegt werden kann, exprimieren im Vergleich zu den ohne messbaren Erfolg therapierten SK-OV3 Zellen die Tyrosinkinase PDGFR- $\alpha$ . Übereinstimmend mit den hier vorliegenden Ergebnissen konnte in vormals durchgeführten Studien die Vorgängersubstanz Imatinib in der Monotherapie ebenfalls keine Wachstumseinschränkung in SK-OV3 inkubierten Zellen erzielen, während eine Hemmung der Zellproliferation in den Zelllinien OVCAR3 und OVCAR8 im therapeutischen Bereich von Imatinib zu beobachten war (Matei et al. 2004, Mundhenke et al. 2008). Dabei konnte belegt werden, dass die Behandlung mit dem Tyrosinkinase Inhibitor zu einer verminderten Phosphorylierung von PDGFR- $\alpha$  mit folgender Rezeptorinaktivierung führt. Das Expressionsmuster des Rezeptors blieb dabei durch die Therapie unbeeinflusst. Untersuchungen derselben Forschungsgruppe zeigten außerdem eine in Ovarialkarzinomzellen erhöhte Expression des den Rezeptor aktivierenden Liganden PDGF. Dabei wurden vor allem Subtypen vermehrt detektiert, die zu einer Stimulation von PDGFR- $\alpha$  führen, nicht jedoch den Rezeptor PDGFR- $\beta$  aktivieren (Matei et al. 2006). Weitere Studien konnten nachweisen, dass eine erhöhte PDGFR- $\alpha$  Rezeptorexpression beim Ovarialkarzinom mit schlechter histologischer Differenzierung, fortgeschrittenem Tumorstadium und schlechter Prognose einhergeht. (Henriksen et al. 1993). Sowohl in gesundem Stroma des Ovars als auch in benignen Tumoren wurden deutlich niedrigere Expressionsraten für PDGFR- $\alpha$  gefunden.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass im Rahmen der Tumorzellproliferation des Ovarialkarzinoms besonders einer PDGF-PDGFR- $\alpha$  vermittelten parakrinen und autokrinen Rezeptorstimulation eine wichtige Bedeutung zuzukommen ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche können zeigen, dass Nilotinib auf dieser Ebene einzugreifen vermag und in der Lage ist die Zellproliferation von PDGFR- $\alpha$  positiven Ovarialkarzinomzelllinien so zu hemmen. Nilotinib scheint dabei potenter als die Vorgängersubstanz Imatinib: Im Vergleich zu den Ergebnissen Imatinib therapierter Ovarialkarzinomzellen werden zum Erreichen des IC<sub>50</sub> Wertes deutlich niedrigere Dosierungen von Nilotinib benötigt.

Eine PDGFR vermittelte Hemmung der Zellproliferation in vitro konnte für die Vorgängersubstanz Imatinib bereits in Geweben verschiedener solider Tumore belegt werden. Viel-

versprechende Ergebnisse lieferten dabei unter anderem Untersuchungen an Zelllinien von Glioblastomen (Kilic et al. 2000) und Mammakarzinomen (Weigel et al. 2009).

Ammoun et al. konnten 2011 eine durch Nilotinib Therapie erzielte PDGFR Inhibition mit in Folge Proliferationseinschränkung von Tumorzellen bei der Neurofibromatose Typ 2, einer erblichen Tumorerkrankung mit dem charakteristischen Auftreten gutartiger Hirntumore, zeigen. Hier wurde ebenfalls eine im Vergleich zu Imatinib bessere Wirksamkeit für Nilotinib in geringeren Dosierungen bestätigt.

Nilotinib als spezifische Krebstherapie bei anderen soliden Tumoren ist bisher wenig untersucht und bedarf weiterer in vitro sowie in vivo Experimente.

Das Nicht Ansprechen der Nilotinib Therapie bei SK-OV3 könnte somit in Zusammenhang mit der fehlenden Expression der PDGFR- $\alpha$  Tyrosinkinase stehen. Obwohl die Zelllinie eine positive Expression für die Tyrosinkinasen c-Abl, PDGFR- $\beta$  sowie c-kit aufweist, ist eine signifikante Hemmung der Zellproliferation durch den Tyrosinkinase Inhibitor nicht zu erreichen. Im Kontrast dazu konnte in verschiedenen soliden Tumoren, bei denen eine autokrine Aktivierung des vermehrt exprimierten Rezeptors c-kit beobachtet wurde, nach Imatinibtherapie eine deutliche Proliferationseinschränkung in vitro gezeigt werden. Dazu zählten unter anderem das kolorektale Karzinom (Attoub et al. 2002), das kleinzellige Bronchialkarzinom (Krystal et al. 2000) sowie das Ewing Sarkom (Gonzalez et al. 2004). Auch wurde c-kit als relevanter Marker für das Ovarialkarzinom bereits in vorangegangenen Studien kontrovers diskutiert. Obwohl erhöhte Expressionsraten der Tyrosinkinase c-kit in Geweben von Ovarialkarzinomen vielfach belegt werden konnten, zeigten Singer et al. 2003 mittels PCR, dass es sich bei den von ihnen untersuchten Rezeptoren vor allem um einen c-kit Wildtyp handelte, welcher ebenfalls in gesundem Gewebe zu finden ist.

Im Zusammenhang mit den hier dargestellten Ergebnissen scheint die Inhibition c-kit vermittelter Signalwege in der Therapie des Ovarialkarzinoms mittels Tyrosinkinase Inhibitoren weniger bedeutend. Unterstützt wird diese These durch die Beobachtung, dass die ebenfalls c-kit positive Zellreihe OVCAR3 ein schlechteres Ansprechen auf eine Nilotinib Therapie zeigt als c-kit negative OVCAR8 Zellen.

Die hier durchgeführten Versuche mit dem Tyrosinkinase Inhibitor Nilotinib können übereinstimmend mit den Ergebnissen einer von Sims und Plattner 2009 veröffentlichten Studie außerdem zeigen, dass die Auswertung der Proliferationsversuche mittels des häufig gebräuchlichen MTT-Tests keine verlässlichen Ergebnisse liefert. Zum Vergleich wurden die Nilotinib

inkubierten Ovarialkarzinomzellreihen OVCAR3, OVCAR8 und SK-OV3 nach Medikamentenbehandlung zum einen mittels MTT-Testung, zum anderen mittels manueller Zellzählung ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen, dass die mittels MTT-Assay ausgewerteten Proliferationsversuche zum Teil vergleichbare Ergebnisse mit denen der manuell ausgewerteten Proben ergeben, besonders aber im klinisch relevanten Bereich ab  $2\mu\text{M}$  Nilotinib tendenziell falsch hohe Proliferationsraten geliefert werden. In den Untersuchungen von Sims und Plattner konnte gezeigt werden, dass der Tyrosinkinase Inhibitor Imatinib selbst mit dem MTT-Assay interagiert und es so zu Verfälschung der Ergebnisse kommt. Sowohl Imatinib als auch Nilotinib scheinen demnach für diese Methode nicht geeignet. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die hier durchgeführten Proliferationsversuche mit Nilotinib in der Mono- und Kombinationstherapie mittels manueller Zellzählung ausgewertet.

Für eine klinische Anwendbarkeit von Nilotinib ist besonders die Frage von Interesse, ob die Kombination des Tyrosinkinase Inhibitors mit Carboplatin und Paclitaxel eine sinnvolle Option in der Behandlung des Ovarialkarzinoms darstellt. Bei erkrankten Patientinnen sind die Zytostatika Carboplatin und Paclitaxel derzeit medikamentöse Standardtherapie und wurden daher für die durchgeführten Kombinationsversuche ausgewählt.

Sowohl in der Kombination mit Carboplatin als auch mit Paclitaxel kann durch Zusatz von  $2\mu\text{M}$  Nilotinib eine signifikant zusätzliche Proliferationsinhibition *in vitro* im Vergleich zur Einzelapplikation der genannten Substanzen erreicht werden ( $p < 0.05$ ).

Die durchgeführten Versuche mit dem Platinkomplex zeigen für OVCAR3 und OVCAR8 inkubierte Zellen dabei besonders bei Verwendung von Carboplatin Konzentrationen um und unterhalb der beschriebenen  $\text{IC}_{50}$  Werte einen Zuwachs der Proliferationshemmung: Je nach Dosierung schwankt diese zwischen 8 und 42%. Übereinstimmend dazu kann besonders in diesem Konzentrationsbereich ein signifikant synergistischer Effekt der Kombinationstherapie für beide Zelllinien belegt werden ( $p < 0.05$ ).

In den Kombinationsinkubationen mit  $2\mu\text{M}$  Nilotinib und steigenden Paclitaxel Konzentrationen können für die Zelllinie OVCAR8 für alle verwendeten Paclitaxel Dosen signifikant zusätzliche anti-proliferative Effekte durch Zugabe des Tyrosinkinase Inhibitors beobachtet werden. Dass sich für die Zellreihe OVCAR3 kein statistisch signifikanter Effekt nachweisen lässt, scheint schwer zu erklären. Da die Wachstumskurve der Kombinationsinkubation in den klinisch relevanten Dosierungen von Paclitaxel bis  $2,5\text{nM}$  unter derer der Einzeltherapiekurve liegt, ist eine zu kleine Stichprobengröße anzunehmen. Unterstützend belegen die Untersuchungen, dass die Kombination von Nilotinib und Paclitaxel sehr wohl einen signifikant sy-

nergistischen anti-proliferativen Effekt bei Behandlung von OVCAR8 als auch von OVCAR3 zeigen ( $p < 0.05$ ).

Da der klinische Standard für die primäre Therapie des Ovarialkarzinoms aus der Kombinationschemotherapie von Carboplatin und Paclitaxel besteht, wurden ebenfalls Proliferationsversuche in der Dreierkombination mit Nilotinib und den genannten Substanzen durchgeführt. Hier zeigt sich eine Effektivität des Tyrosinkinase Inhibitors in dieser Medikamentenkonstellation für beide untersuchten Zellreihen: Die Dreierkombination zeigt signifikant synergistische Reaktionen im Bezug auf die Wirksamkeit der Einzelsubstanzen ( $p < 0.05$ ), besonders bei Therapie im niedrigen Konzentrationsbereich (1/16 und 1/8 der jeweiligen IC50 Werte). Verglichen mit der Zweierkombination bestehend aus Carboplatin und Paclitaxel ergeben die Untersuchungen eine signifikant erhöhte Wachstumsinhibition durch die zusätzliche Behandlung der Tumorzellen mit Nilotinib ( $p < 0.05$ ). Der Anteil vitaler OVCAR3 Zellen kann dabei durch den Zusatz des Tyrosinkinase Inhibitors um weitere 19 Prozentpunktpunkte, der der inkubierten OVCAR8 Zellen sogar um zusätzliche 32% gesenkt werden.

Sowohl für Therapien als Zweierkombinationen als auch für die Dreifachkombination Nilotinib/Carboplatin/Paclitaxel können signifikant synergistische Wirkungen bezüglich der Proliferationshemmung belegt werden. Übereinstimmend mit den hier beobachteten Ergebnissen konnten Mundhenke et al. 2008 synergistische Reaktionen für die Kombinationstherapien mit Carboplatin, Paclitaxel und dem Tyrosinkinase Inhibitor Imatinib bei inkubierten OVCAR3 und OVCAR8 Zellen sowie drei weiteren Ovarialkarzinomzelllinien nachweisen. Auf die Durchführung der Kombinationsversuche an SK-OV3 wurde aufgrund fehlenden Ansprechens der Nilotinib Monotherapie verzichtet. Eine mögliche Wirkungsverstärkung in der Kombination mit Carboplatin und Paclitaxel kann nicht ausgeschlossen werden und bleibt somit weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Eine auf molekularer Ebene entscheidende Bedeutung für das Verständnis von Wirkung und Resistenzmechanismen der Chemotherapeutika Carboplatin und Paclitaxel kommt dem Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Akt Signaltransduktionsweg zu. Da sich verschiedene Aspekte der im Rahmen der durchgeführten Kombinationsversuche von uns beobachteten synergistischen anti-proliferativen Effekte durch den Zusatz des Tyrosinkinase Inhibitors Nilotinib anhand Veränderungen innerhalb dieses biologischen Modells verdeutlichen und erklären lassen, sei es im Folgenden kurz dargestellt:

Eine dem PI3K-Akt Signalweg zugeschriebene Hauptfunktion ist es das Überleben der Zelle durch Einleitung von anti-apoptotischen Prozessen zu sichern. Die Serin/Threoninkinase Akt, auch bekannt unter dem Namen Proteinkinase B, ist dabei in der Lage über Phosphorylierung von Proteinen direkt sowie indirekt Einfluss auf das Apoptoseverhalten von Zellen zu nehmen. Zu einer direkten Hemmung des programmierten Zelltods beispielsweise nach Stimulation von Akt kommt es durch Inhibition des pro-apoptotischen Proteins BAD, ein Mitglied der Bcl-2 Familie, welches die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium und auf diesem Weg die Apoptoseinduktion fördert. Durch Phosphorylierung des Proteins wird eine Translokation von BAD an die mitochondriale Membran verhindert und so ein anti-apoptotischer Effekt erreicht (del Peso et al. 1997). Indirekt ist Akt befähigt Apoptosevorgänge über eine Regulation der Transkription zu hemmen: Phosphorylierung der Forkhead Transkriptionsfaktoren inhibiert die Transkription pro-apoptotischer Gene wie FasL, IGFBP-1 und Bim (Datta et al. 1999). Weitere für das Zellüberleben wichtige Proteine, die durch aktiviertes Akt in ihrer Aktivität modifiziert werden, sind unter anderem die Caspase 9 Kinasen (Cardone et al. 1998), die wachstumshemmende Glykogensynthasekinase 3 (Cross et al. 1995) sowie der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B (Ozes et al. 1999).

Darüber hinaus fördert aktiviertes Akt durch Induktion von Zellzyklusproteinen die Zellproliferation und nimmt stimulierenden Einfluss auf die Gefäßneubildung (Manning et al. 2007).

Aktivierung des Akt Signalweges ist durch verschiedene zelluläre Stimuli zu erreichen. Unter anderem sind Wachstumsfaktoren mittels Rezeptorstimulation von c-Abl, PDGFR- $\alpha$ , - $\beta$  und c-kit in der Lage den initialen Schritt, eine Konformationsänderung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), zu bewirken. PI3K generiert die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-phosphat (PIP3), einem second messenger, welcher die Wanderung der Akt-Kinase an die Zellmembran initiiert, wo selbige durch Phosphorylierung schließlich aktiviert wird (Osaki et al. 2004).

Eine gesteigerte PI3K-Akt Aktivität in malignen Tumoren scheint eine wichtige Überlebensstrategie der Tumorzellen darzustellen. Während diese zumal durch Überaktivierung auf Rezeptorebene erklärbar ist, konnten überdies in verschiedenen soliden Tumoren auf Ebene des nachgeschalteten Signalweges konstitutiv aktive Akt-Kinasen beobachtet werden: Dabei treten zum einen gesteigerte Amplifikationen relevanter Gene für PI3K und Akt, zum anderen Mutationen in für den Signalweg regulierenden Komponenten auf. Beispielsweise führen Mutationen oder vollständiges Fehlen der Phosphatase PTEN, einem Tumorsuppressor Protein, welches normalerweise dem PI3K-Akt Signaltransduktionsweg entgegenwirkt, zu einer ab-



norm gesteigerten Aktivität von Akt (Cantley et al. 1999). Bellacosa et al. konnten 1995 eine erhöhte Amplifikation der Gene von Akt beim Ovarialkarzinom sowie eine damit einhergehende Aggressivität des Tumors belegen. Die Hemmung des Akt Signalweges als therapeutischer Angriffspunkt scheint somit von großem Interesse. Untersuchungen von Matei et al. zeigten 2004 eine komplette Inaktivierung von Akt nach Behandlung mit dem Tyrosinkinase Inhibitor Imatinib in klinisch relevanten Konzentrationen bis 5 $\mu$ M bei Ovarialkarzinomzellen. Eine gesteigerte Aktivität des Akt Signalweges zeigte sich als häufiges Phänomen Carboplatin- und Paclitaxel resistenter Zelllinien: Mechanismus scheint hierbei die Verhinderung der Apoptoseinduktion trotz Medikamentenbedingter DNA Schädigung darzustellen. Eine durch Überexpression von Akt bedingte Resistenz beim Ovarialkarzinom ist sowohl gegenüber Carboplatin als auch Paclitaxel beschrieben worden: Nach Behandlung mit Carboplatin konnte eine Steigerung der Aktivität von Akt in Ovarialkarzinomzelllinien beobachtet sowie ein gesteigerter zytotoxischer Effekt des Chemotherapeutikums infolge Hemmung der Akt/PI3K Kaskade belegt werden (Hayakawa et al. 2000, Westfall et al. 2005). Ähnliche Studienergebnisse liegen für Paclitaxel resistente Ovarialkarzinomzellreihen vor: Inhibierung des Akt Signalweges durch Gabe von Wortmannin führte zu einer Sensitivierung resistenter Zellen gegenüber Paclitaxel (Mabuchi et al. 2002). Page et al. konnten hier für die Resistenzentwicklung gegenüber Paclitaxel eine durch Akt verstärkte Inhibition des pro-apoptischen Proteins BAD verantwortlich machen, welches der durch Paclitaxel induzierten Cytochrom c Freisetzung entgegen wirkt und auf diese Weise die Induktion des programmierten Zelltodes verhindert.

Auf dem Boden dieses Wissens können mit Bezug auf die dargestellten Ergebnisse die synergistischen anti-proliferativen Effekte der Kombinationstherapien mit Nilotinib auf molekularer Ebene verstanden werden. Akt Stimulierung als Ergebnis ligandenabhängiger Aktivierung von Tyrosinkinasen kann mittels Therapie mit dem Tyrosinkinase Inhibitor verhindert und somit eine Wirkverstärkung von Carboplatin und Paclitaxel erreicht werden. Da Nilotinib den Mechanismen einer Resistenzentwicklung von Carboplatin und Paclitaxel entgegenwirkt, scheint ebenso eine Verlängerung der Wirkdauer durch Hinauszögern der Bildung von resistenten Zellen möglich.

Weitere molekularbiologisch orientierte Studien belegen, dass die Inhibition der PDGF Rezeptoren eine Stabilisierung der Mikrotubuli zur Folge hat, ein Mechanismus, der auch entscheidend an der Paclitaxel bedingten Hemmung der DNA Synthese beteiligt ist (Thyberg 1984).

Für die Kombination von Imatinib und Paclitaxel konnte beim Ovarialkarzinom im Tierexperiment bereits gezeigt werden, dass eine PDGFR- $\alpha$  bedingte Hemmung des Akt Signalweges zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber Paclitaxel führt: Während die alleinige Paclitaxel Inkubation keinen oder nur einen gering messbaren Effekt auf die Tumormasse hatte, wurde eine signifikante Abnahme dieser nach Kombinationsbehandlung mit dem Tyrosinkinase Inhibitor beobachtet. Besondere Bedeutung wurden hier anti-vaskulären Mechanismen im Sinne einer Apoptoseinduktion in Tumor assoziierten endothelialen Zellen mit folglich Mangelversorgung des Tumorbettes beigemessen (Apte et al. 2004).

Eine additive Wirkung von Imatinib und Carboplatin, welche auf eine verminderte Phosphorylierung der Proteinkinase Akt zurückzuführen ist, konnte des Weiteren beim Ewing Sarkom sowie Mammakarzinom beobachtet werden (Yerushalmi et al. 2007).

Bei den in den Kombinationsversuchen verwendeten Dosierungen handelt es sich um klinisch relevante Konzentrationsbereiche, die in vivo gut verträglich sind. Durch den Zusatz von Nilotinib Dosen unterhalb der beschriebenen IC50 Werte kann bei Senkung der üblich verwendeten Carboplatin und Paclitaxel Konzentrationen eine effektive Proliferationseinschränkung der Tumorzellen erreicht werden, vergleichbar wie mit hochdosierter Carboplatin- und Paclitaxel Inkubation. Schlussfolgernd könnten durch den klinischen Einsatz von Nilotinib die herkömmlichen Chemotherapeutika in ihrer Dosierung reduziert und somit eine Minderung der mit dieser Therapie verbundenen Nebenwirkungen ermöglicht werden. Eine tatsächlich klinische Relevanz sollte in weiterführenden in vivo Untersuchungen überprüft werden.

Die Ergebnisse der mittels TUNEL Assays erlangten Apoptoseuntersuchungen belegen die Vermutung, dass Nilotinib durch Hemmung der genannten Zielrezeptoren in der Lage ist in Tumorzellen den programmierten Zelltod auszulösen: Eine signifikante Apoptoseinduktion ist dabei bereits nach 24-stündiger Medikamenteninkubation in klinisch relevanter Konzentration (bis 4 $\mu$ M) in den Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR3 und OVCAR8 zu beobachten ( $p < 0.05$ ). Ähnliche Ergebnisse innerhalb der hier beschriebenen Inkubationszeit konnten in vorausgegangen Studien für Imatinib unter anderem beim Neuroblastom (Beppu et al. 2004), Ewing Sarkom (Merchant et al. 2002) sowie beim Mammakarzinom (Weigel et al. 2009) beschrieben werden.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Proliferationsversuche kann nach Kombinationstherapie mit Carboplatin oder Paclitaxel ein zusätzlicher pro-apoptotischer Effekt durch Zugabe von Nilotinib beobachtet werden. Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 Stunden führt

nur zu einem leichten weiteren Anstieg, zum Teil sogar Abfall der Apoptoseraten in den Versuchen. Apoptoseinduktion durch Nilotinib in den hier untersuchten Zelllinien scheint somit ein frühes vor allem innerhalb der ersten 24 Stunden ablaufendes Geschehen darzustellen, während die Proliferationsversuche einen besonders signifikanten Effekt auf die Wachstumshemmung nach sechstägiger Bebrütung nachweisen.

Zytoreduktive Effekte von Nilotinib scheinen somit zum einen auf eine gesteigerte Apoptose der Zellen, zum anderen auf anti-proliferative Mechanismen zurückzuführen zu sein.

Als Erklärungsansatz der durch Nilotinib herbeigeführten Apoptoseinduktion in Ovarialkarzinomzellen kann erneut der beschriebene Akt Signaltransduktionsweg herangezogen werden. In Nilotinib inkubierten hämatologisch entarteten Zellen konnte dabei die mittels Bcr-Abl Inhibition bedingte Akkumulation des pro-apoptotischen Proteins Bim als entscheidender Faktor für die Einleitung des programmierten Zelltodes belegt werden (Belloc et al. 2007). Gleichzeitig zeigten selbige Untersuchungen, dass die Zellproliferation durch erhöhte Expression von Bim unbeeinflusst bleibt. Somit scheinen pro-apoptotische und anti-proliferative Effekte durch eine Nilotinib bedingte Hemmung der Tyrosinkinase Rezeptoren auf zum Teil unterschiedlichen Mechanismen zu beruhen. Die beschriebene Diskrepanz zwischen früher Detektion der Apoptose und deutlich später auftretendem maximalen Effekt bezüglich Proliferationsinhibition könnte so erklärbar sein. Es bedarf weiterer Forschungsexperimente zur Untersuchung der dafür verantwortlichen unterschiedlichen Strukturen.

Im Rahmen der hier durchgeführten planaren Migrationsassays kann außerdem ein signifikant migrationshemmender Effekt von Nilotinib auf die Ovarialkarzinomzellreihen OVCAR3 und OVCAR8 nach 24-, 48- und 72-stündiger Medikamenteninkubation belegt werden ( $p < 0.05$ ). Im Vergleich zu den ebenfalls durchgeführten Monotherapien mit den etablierten Zytostatika Carboplatin und Paclitaxel zeigt der Tyrosinkinase Inhibitor in der Verwendung als Einzelsubstanz von den drei Medikamenten den größten inhibitorischen Einfluss auf die Migration. Eine Hemmung der Zellbewegung konnte 2011 ebenfalls nach gleicher Inkubationszeit für die Vorgängersubstanz Imatinib beim Colonkarzinom gezeigt werden. Die beobachtete Migrationsinhibition wurde hier auf Imatinib vermittelte Veränderungen des Aktin Zytoskeletts, unter anderem eine verminderte Fähigkeit der Aktin Polymerisation sowie dem Auftreten von filamentären Aktin Aggregaten, zurückgeführt (Popow-Woźniak et al. 2011).

Die Zweierkombinationen Nilotinib/Carboplatin und Nilotinib/Paclitaxel zeigen uneinheitliche Ergebnisse: Während in Kombination mit dem Zytostatikum Paclitaxel die 4  $\mu$ molare Nilotinib Behandlung in beiden untersuchten Zellreihen zu einer verglichen mit den Einzelinku-

bationen verstärkten Migrationshemmung führt, zeigt die Therapie mit Carboplatin und dem Tyrosinkinase Inhibitor keinen zusätzlichen migrationsinhibitorischen Effekt. Die Interpretation der Ergebnisse scheint schwierig und ist eventuell auf die unterschiedlichen Wirkprofile der beiden Zytostatika zurückzuführen. Hier bedarf es weiterführender Untersuchungen.

Der positive Einfluss von PDGF auf die Zellmotilität wurde bereits vielfach beschrieben: Eine beim metastasierten Medulloblastom detektierte erhöhte Aktivität PDGF Rezeptor-abhängiger Signalkaskaden konnte durch die Therapie mit Imatinib gehemmt und infolge dessen eine messbare Migrationseinschränkung herbeigeführt werden (Abouantoun et al. 2009). In vitro Untersuchungen beim Mammakarzinom zeigten eine gesteigerte Migrationsleistung der Zelllinien nach Stimulation mit PDGF sowie eine signifikante Inhibition der Zellmigration nach bis zu 72-stündiger Inkubation der Zellen mit Imatinib (Weigel et al. 2010). Auch beim Ovarialkarzinom ist ein positiver Zusammenhang zwischen PDGF-Rezeptorexpression und fortgeschrittenem Tumorstadium beschrieben, sodass Nilotinib mittels einer Hemmung der Zellmigration, welche auf zellulärer Ebene als Voraussetzung für die Metastasierung angesehen werden kann, eine Ausbreitung der Tumorzellen zu vermindern vermag.

Die in dieser Arbeit durchgeführten in vitro Versuche können die vermutete zytoreduktive Wirksamkeit des Tyrosinkinase Inhibitors Nilotinib beim Ovarialkarzinom bestätigen. Die Hypothese, dass Nilotinib in klinisch relevanten Konzentrationen in der Lage ist sowohl in der Monotherapie als auch in Kombination mit Carboplatin oder Paclitaxel eine rezeptorvermittelte Inhibition des Tumorwachstums hervorzurufen, ist mit den hier durchgeführten Untersuchungen bestätigt worden. Die Kombinationsversuche zeigen dabei signifikante synergistische Effekte. Die durch Nilotinib Behandlung erzielten Effekte beim Ovarialkarzinom beruhen auf anti-proliferativen sowie pro-apoptotischen Mechanismen, welche nach derzeitigen Stand vor allem durch Blockade von PDGFR- $\alpha$  und derer nachgeschalteter Signalkaskaden, insbesondere des PI3K-Akt Weges, ausgelöst werden. Wir können außerdem zeigen, dass die für die Tumordinvasion und Metastasenbildung maßgebliche Voraussetzung, die Fähigkeit zur Zellmigration, in Nilotinib behandelten Ovarialkarzinomzellen gehemmt wird.

Eine therapeutische Relevanz beim Ovarialkarzinom scheint anhand der hier durchgeführten in vitro Versuche für Nilotinib besonders in Kombination mit den etablierten Chemotherapeutika vielversprechend und sollte durch in vivo Untersuchungen weiter geklärt werden.

Klinisch zeigt Nilotinib bei einer Einnahme von maximal 600mg zweimal täglich ein günstiges Nebenwirkungsprofil. Zudem profitieren die Patienten von der oralen Applikationsform

als Tablette. In der Kombinationstherapie ist eine Reduzierung der Dosierungen von Carboplatin und Paclitaxel durch den Einsatz von Nilotinib laut den erbrachten Ergebnissen denkbar und könnte mit einer Minderung zytotoxischer Nebenwirkungen einhergehen. Des Weiteren könnte eine Kombinationsbehandlung mit Nilotinib der gefürchteten Resistenzentwicklung gegenüber den genannten Medikamenten mittels beschriebener Mechanismen entgegenwirken.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Nilotinib (Tasigna, AMN107), ein selektiver Tyrosinkinase Inhibitor der zweiten Generation sowie Nachfolger Imatinibs, entfaltet seine wachstumseinschränkende Wirkung über die Hemmung spezifischer Tyrosinkinasen. Hierzu zählen: c-Abl, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$  und c-kit. Klinische Anwendung findet das Medikament in der Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie. Bei diesem Krankheitsbild wird ein anti-proliferativer Effekt mittels einer im Vergleich zu Imatinib 30-fach potenteren Inhibition des onkogenen Fusionsproteins Bcr-Abl erzielt.

Wir und vorausgegangene Studien können zeigen, dass Ovarialkarzinomzellen auf ihrer Zelloberfläche Rezeptor-Tyrosinkinasen exprimieren und somit potentiell einer anti-proliferativen Therapie durch Nilotinib zugänglich sind.

Alle untersuchten Zelllinien exprimieren c-Abl und PDGFR- $\beta$ . PDGFR- $\alpha$  werden lediglich bei OVCAR3 und OVCAR8 gefunden, die Expression des c-kit Rezeptors kann nur für OVCAR3 und SK-OV3 gezeigt werden.

Ziel dieser Arbeit war präklinisch den Einfluss von Nilotinib auf das Wachstumsverhalten von Ovarialkarzinomzellen zu untersuchen. Besondere Bedeutung wurde dabei der Frage beigemessen, ob in der Kombination mit den etablierten Chemotherapeutika Carboplatin und Paclitaxel synergistische Effekte erzielt werden können.

In der Monotherapie mit Nilotinib kann nach sechstägiger Inkubation bei den PDGFR- $\alpha$  positiven Zelllinien eine signifikante Inhibition der Zellproliferation im therapeutischen Bereich des Medikamentes erreicht werden. Die Zweierkombinationstherapien sowie die klinisch relevante Dreierkombination mit Nilotinib, Carboplatin und Paclitaxel zeigen signifikant synergistische Effekte durch den Zusatz des Tyrosinkinase Inhibitors.

Die durchgeführten TUNEL Assays belegen, dass Nilotinib in den Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR3 und OVCAR8 innerhalb von 48 Stunden Apoptose induziert. Übereinstimmend mit den Proliferationsversuchen kann nach Kombinationstherapie mit Carboplatin oder Paclitaxel ein zusätzlicher pro-apoptotischer Effekt durch Zugabe von Nilotinib beobachtet werden.

Die Ergebnisse der planaren Migrationsassays zeigen einen signifikant migrationshemmenden Effekt von Nilotinib auf die PDGFR- $\alpha$  exprimierenden Zellen OVCAR3 und OVCAR8.

Auf molekularer Ebene lässt sich die durch Nilotinib vermittelte Proliferationsinhibition vor allem durch eine Hemmung des Rezeptors PDGFR- $\alpha$  erklären. Der beschriebene Synergismus mit Carboplatin und Paclitaxel beruht auf einer Wirkverstärkung der Medikamente mittels Inhibition des nachgeschalteten PI3K-Akt Signaltransduktionsweges: Verschiedene Proteine, welche die Wirkung der Chemotherapeutika abschwächen, werden nach Nilotinib Gabe vermindert exprimiert.

Da die Sicherung des Überlebens der Zelle als eines der Hauptaufgaben des Akt Signalweges angesehen wird, kann eine durch Nilotinib vermittelte Apoptoseinduktion ebenso über eine PDGFR- $\alpha$  bedingte Inhibition des Akt Signalweges erläutert werden

Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen in vitro Effekte von Nilotinib beim Ovarialkarzinom sollten in klinischen Studien weiter untersucht werden. Besonders im Hinblick auf die zurzeit begrenzten Therapiemöglichkeiten bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Krebsstadium könnte Nilotinib bei positivem Rezeptorstatus eine erweiterte Therapieoption vor allem in Kombination mit einer Polychemotherapie Carboplatin/Paclitaxel beim Ovarialkarzinom darstellen.

## LITERATURVERZEICHNIS

Abouantoun TJ, MacDonald TJ. (2009). "Imatinib blocks migration and invasion of medulloblastoma cells by concurrently inhibiting activation of platelet-derived growth factor receptor and transactivation of epidermal growth factor receptor." *Mol Cancer Ther.* 8(5):1137-47. Epub 2009 May 5.

Aghajanian C, Blank SV, Goff BA, Judson PL, Teneriello MG, Husain A, Sovak MA, Yi J, Nycum LR. (2012). "OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer." *J Clin Oncol.* 30(17):2039-45. Epub 2012 Apr 23.

AGO Ovar, Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie e.V. sowie deutsche Krebsgesellschaft (2011) "S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren, Stand Juni 2011."

AGO GYN 8, eine Studie der Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie, Phase II Protokoll (2011). "Wirksamkeit, Verträglichkeit und Sicherheit von Temsirolimus beim platinrefraktären Ovarialkarzinom und beim fortgeschrittenen oder rezidivierten Endometriumkarzinom."

Ammoun S, Schmid MC, Triner J, Manley P, Hanemann CO. (2011). "Nilotinib alone or in combination with selumetinib is a drug candidate for neurofibromatosis type 2." *Neuro Oncol.* 13(7):759-66.

Antoniades HN, Galanopoulos T, Neville-Golden J, O'Hara CJ. (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 SM, Fan D, Killion JJ, Fidler IJ. (2004). "Targeting the platelet-derived growth factor receptor in antivascular therapy for human ovarian carcinoma." *Clin Cancer Res.* 10(3):897-908.

Aichberger K, Mayerhofer M, Krauth M (2005). "Low-level expression of proapoptotic Bcl-2-interacting mediator in leukemic cells in patients with chronic myeloid leukemia: role of BCR/ABL, characterization of underlying signaling pathways, and reexpression by novel pharmacologic compounds." *Cancer Res.* 65(20):9436-44.

Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare DA, Wan M, Dubeau L, Scambia G, Masciullo V, Ferrandina G, Benedetti Panici P, Mancuso S, Neri G, Testa JR. (1995). "Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas." *Int J Cancer.* 64(4):280-5.

Belloc F, Moreau-Gaudry F, Uhalde M, Cazalis L, Jeanneteau M, Lacombe F, Praloran V, Mahon FX. (2007). "Imatinib and nilotinib induce apoptosis of chronic myeloid leukemia cells through a Bim-dependant pathway modulated by cytokines." *Cancer Biol Ther.* 6(6):912-9. Epub 2007 Mar 5.



Beppu K, Jaboine J, Merchant MS, Mackall CL, Thiele CJ. (2004). "Effect of imatinib mesylate on neuroblastoma tumorigenesis and vascular endothelial growth factor expression." *J Natl Cancer Inst.* 96(1):46-55.

Bergsten E, Uutela M, Li X, Pietras K, Ostman A, Heldin CH, Alitalo K, Eriksson U. (2001). "PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor." *Nat Cell Biol.* 3(5):512-6.

Bristow RE, Puri I, Chi DS. (2009). "Cytoreductive surgery for recurrent ovarian cancer: a meta-analysis." *Gynecol Oncol.* 112(1):265-74. Epub 2008 Oct 19.

Cantley LC, Neel BG. (1999). "New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(8):4240-5.

Cao C, Lu S, Sowa A, Kivlin R, Amaral A, Chu W, Yang H, Di W, Wan Y. (2008). "Priming with EGFR tyrosine kinase inhibitor and EGF sensitizes ovarian cancer cells to respond to chemotherapeutical drugs." *Cancer Lett.* 266(2):249-62. Epub 2008 Apr 8.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." *Science.* 282(5392):1318-21.

Caudell JJ, Deavers MT, Slomovitz BM, Lu KH, Broaddus RR, Gershenson DM, Ramondetta LM. (2007). "Imatinib mesylate (gleevec)--targeted kinases are expressed in uterine sarcomas." *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 13(2):167-70.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." *Nature.* 378(6559):785-9.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. (1999). "Cellular survival: a play in three Akts." *Genes Dev.* 13(22):2905-27.

Deininger MW. (2008). "Nilotinib." *Clin Cancer Res.* 14(13):4027-31.

Del Peso L, González-García M, Page C, Herrera R, Nuñez G. (1997). "Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt." *Science.* 278(5338):687-9.

Dolloff NG, Russell MR, Loizos N, Fatatis A. (2007). "Human bone marrow activates the Akt pathway in metastatic prostate cells through transactivation of the alpha-platelet-derived growth factor receptor." *Cancer Res.* 67(2):555-62.

Fava C, Kantarjian H, Cortes J, Jabbour E. (2008). "Development and targeted use of nilotinib in chronic myeloid leukemia." *Drug Des Devel Ther.* 2:233-43.

Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Kanda Y, Hisamoto K, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Kanzaki T, Murata Y. (2000). "Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin." *Cancer Res.* 60(21):5988-94.

Hantel C, Lewrick F, Schneider S, Zwermann O, Perren A, Reincke M, Süss R, Beuschlein F. (2010). "Anti insulin-like growth factor I receptor immunoliposomes: a single formulation

combining two anticancer treatments with enhanced therapeutic efficiency.” *J Clin Endocrinol Metab.* 95(2):943-52. Epub 2009 Dec 1.

Heldin CH, Ostman A, Rönstrand L. (1998). “Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors.” *Biochim Biophys Acta.* 1378(1):F79-113.

Henriksen R, Funa K, Wilander E, Bäckström T, Ridderheim M, Oberg K. (1993).” Expression and prognostic significance of platelet-derived growth factor and its receptors in epithelial ovarian neoplasms.” *Cancer Res.* 53(19):4550-4.

Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermarck B, Nistér M. (1992). “Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops.” *Cancer Res.* 52(11):3213-9.

Jain D, Patel N, Shelton M, Basu A, Roque R, Siede W. (2010). “Enhancement of cisplatin sensitivity by NSC109268 in budding yeast and human cancer cells is associated with inhibition of S-phase progression.” *Cancer Chemother Pharmacol.* 66(5):945-52. Epub 2010 Jan 26.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. (2010). “Cancer statistics, 2010.” *CA Cancer J Clin.* 61(2):133-4.

Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, Bhalla K, O'Brien S, Wassmann B, Tanaka C, Manley P, Rae P, Mietlowski W, Bochinski K, Hochhaus A, Griffin JD, Hoelzer D, Albitar M, Dugan M, Cortes J, Alland L, Ottmann OG. (2006). “Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL.” *N Engl J Med.* 354(24):2542-51.

Kilic T, Alberta JA, Zdunek PR, Acar M, Iannarelli P, O'Reilly T, Buchdunger E, Black PM, Stiles CD. (2000). “Intracranial inhibition of platelet-derived growth factor-mediated glioblastoma cell growth by an orally active kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class.” *Cancer Res.* 60(18):5143-50.

Kubo T, Piperdi S, Rosenblum J, Antonescu CR, Chen W, Kim HS, Huvos AG, Sowers R, Meyers PA, Healey JH, Gorlick R. (2008). “Platelet-derived growth factor receptor as a prognostic marker and a therapeutic target for imatinib mesylate therapy in osteosarcoma.” *Cancer.* 112(10):2119-29.

Lin J, Sun T, Ji L, Deng W, Roth J, Minna J, Arlinghaus R. (2007). “Oncogenic activation of c-Abl in non-small cell lung cancer cells lacking FUS1 expression: inhibition of c-Abl by the tumor suppressor gene product Fus1.” *Oncogene.* 26(49):6989-96. Epub 2007 May 7.

Lindmark G, Sundberg C, Glimelius B, Pahlman L, Rubin K, Gerdin B. (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.

Mabuchi S, Ohmichi M, Kimura A, Hisamoto K, Hayakawa J, Nishio Y, Adachi K, Takahashi K, Arimoto-Ishida E, Nakatsuji Y, Tasaka K, Murata Y. (2002). “Inhibition of phosphorylation of BAD and Raf-1 by Akt sensitizes human ovarian cancer cells to paclitaxel.” *J Biol Chem.* 277(36):33490-500. Epub 2002 Jun 26.

Manning BD, Cantley LC. (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." *Cell*. 129(7):1261-74.

Matei D, Chang DD, Jeng MH (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.

Matei D, Emerson RE, Lai YC, Baldrige LA, Rao J, Yiannoutsos C, Donner DD. (2006). "Autocrine activation of PDGFRalpha promotes the progression of ovarian cancer." *Oncogene*. 25(14):2060-9.

Matsui T, Sano K, Tsukamoto T, Ito M, Takaishi T, Nakata H, Nakamura H, Chihara K. (1993). "Human neuroblastoma cells express alpha and beta platelet-derived growth factor receptors coupling with neurotrophic and chemotactic signaling." *J Clin Invest*. 92(3):1153-60.

Merchant MS, Woo CW, Mackall CL, Thiele CJ. (2002). "Potential use of imatinib in Ewing's Sarcoma: evidence for in vitro and in vivo activity." *J Natl Cancer Inst*. 94(22):1673-9.

Montemurro M, Schöffski P, Reichardt P, Gelderblom H, Schütte J, Hartmann JT, von Moos R, Seddon B, Joensuu H, Wendtner CM, Weber E, Grünwald V, Roth A, Leyvraz S. (2009). "Nilotinib in the treatment of advanced gastrointestinal stromal tumours resistant to both imatinib and sunitinib." *Eur J Cancer*. 45(13):2293-7. Epub 2009 May 19.

Mundhenke C, Weigel MT, Sturmer KH, Roesel F, Meinhold-Heerlein I, Bauerschlag DO, Schem C, Hilpert F, Jonat W, Maass N. (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.

Mutch DG, Orlando M, Goss T, Teneriello MG, Gordon AN, McMeekin SD, Wang Y, Scribner DR Jr, Marciniack M, Naumann RW, Secord AA. (2007). "Randomized phase III trial of gemcitabine compared with pegylated liposomal doxorubicin in patients with platinum-resistant ovarian cancer." *J Clin Oncol*. 25(19):2811-8.

Nagar B, Hantschel O, Young MA, Scheffzek K, Veach D, Bornmann W, Clarkson B, Superiti-Furga G, Kuriyan J. (2003). "Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase." *Cell*. 112(6):859-71.

Niyazi M, Ghazizadeh M, Konishi H, Kawanami O, Sugisaki Y, Araki T. (2003). "Expression of p73 and c-Abl proteins in human ovarian carcinomas." *J Nihon Med Sch*. 70(3):234-42.

Osaki M, Oshimura M, Ito H. (2004). "PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer." *Apoptosis*. 9(6):667-76.

Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. (1999). "NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase." *Nature*. 401(6748):82-5.

Page C, Lin HJ, Jin Y, Castle VP, Nunez G, Huang M, Lin J. (2000). "Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis." *Anticancer Res*. 20(1A):407-16.

Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, Carey MS, Beale P, Cervantes A, Kurzeder C, du Bois A, Sehouli J, Kimmig R, Stähle A, Collinson F, Essapen S, Gourley C, Lortholary A, Selle F, Mirza MR, Leminen A, Plante M, Stark D, Qian W, Parmar MK, Oza AM; ICON7 Investigators. (2011). "A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer." *N Engl J Med.* 365(26):2484-96.

Popow-Woźniak A, Woźniakowska A, Kaczmarek L, Malicka-Błaszkiwicz M, Nowak D. (2011). "Apoptotic effect of imatinib on human colon adenocarcinoma cells: influence on actin cytoskeleton organization and cell migration." *Eur J Pharmacol.* 667(1-3):66-73. Epub 2011 May 30.

Robert-Koch-Institut (2010). "Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010."

Rumpold H, Gastl G, Dominik Wolf D. (2009). "Arzneimittelprofil Nilotinib, Juli 2009." *Medizin Medien Austria.*

Rönstrand L, Heldin CH. (2001). "Mechanisms of platelet-derived growth factor-induced chemotaxis." *Int J Cancer.* 91(6):757-62.

Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, Pasquini R, Clark RE, Hochhaus A, Hughes TP, Gallagher N, Hoenekopp A, Dong M, Haque A, Larson RA, Kantarjian HM; ENESTnd Investigators. (2010). "Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia." *N Engl J Med.* 362(24):2251-9. Epub 2010 Jun 5.

Seymour L, Dajee D, Bezwoda WR. (1993). "Tissue platelet derived-growth factor (PDGF) predicts for shortened survival and treatment failure in advanced breast cancer." *Breast Cancer Res Treat.* 26(3):247-52.

Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. (1985). "Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia." *Nature.* 315(6020):550-4.

Srinivasan D, Plattner R. (2006). "Activation of Abl tyrosine kinases promotes invasion of aggressive breast cancer cells." *Cancer Res.* 66(11):5648-55.

Stover EH, Chen J, Lee BH, Cools J, McDowell E, Adelsperger J, Cullen D, Coburn A, Moore SA, Okabe R, Fabbro D, Manley PW, Griffin JD, Gilliland DG. (2005). "The small molecule tyrosine kinase inhibitor AMN107 inhibits TEL-PDGFRbeta and FIP1L1-PDGFRalpha in vitro and in vivo." *Blood.* 106(9):3206-13. Epub 2005 Jul 19.

Thyberg J. (1984). "The microtubular cytoskeleton and the initiation of DNA synthesis." *Exp Cell Res.* 155(1):1-8.

von Bubnoff N, Gorantla SH, Kancha RK, Lordick F, Peschel C, Duyster J. (2005). "The systemic mastocytosis-specific activating cKit mutation D816V can be inhibited by the tyrosine kinase inhibitor AMN107." *Leukemia.* 19(9):1670-1.

Weigel MT, Meinhold-Heerlein I, Bauerschlag DO, Schem C, Bauer M, Jonat W, Maass N, Mundhenke C. (2009). "Combination of imatinib and vinorelbine enhances cell growth inhibi-

tion in breast cancer cells via PDGFR beta signalling.” *Cancer Lett.* 273(1):70-9. Epub 2008 Sep 21.

Weigel MT, Dahmke L, Schem C, Bauerschlag DO, Weber K, Niehoff P, Bauer M, Strauss A, Jonat W, Maass N, Mundhenke C. (2010). “In vitro effects of imatinib mesylate on radiosensitivity and chemosensitivity of breast cancer cells.” *BMC Cancer.* 10:412.

Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, Brügger J, Cowan-Jacob SW, Ray A, Huntly B, Fabbro D, Fendrich G, Hall-Meyers E, Kung AL, Mestan J, Daley GQ, Callahan L, Catley L, Cavazza C, Azam M, Neuberg D, Wright RD, Gilliland DG, Griffin JD. (2005). “Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl.” *Cancer Cell.* 7(2):129-41.

Weisberg E, Manley P, Mestan J, Cowan-Jacob S, Ray A, Griffin JD. (2006). “AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL.” *Br J Cancer.* 94(12):1765-9. Epub 2006 May 23.

Weisberg E, Wright RD, Jiang J, Ray A, Moreno D, Manley PW, Fabbro D, Hall-Meyers E, Catley L, Podar K, Kung AL, Griffin JD. (2006). “Effects of PKC412, nilotinib, and imatinib against GIST-associated PDGFRA mutants with differential imatinib sensitivity.” *Gastroenterology.* 131(6):1734-42. Epub 2006 Sep 20.

Westfall SD, Skinner MK. (2005). “Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase sensitizes ovarian cancer cells to carboplatin and allows adjunct chemotherapy treatment.” *Mol Cancer Ther.* 4(11):1764-71.

Wilczynski SP, Chen YY, Chen W, Howell SB, Shively JE, Alberts DS. (2005). “Expression and mutational analysis of tyrosine kinase receptors c-kit, PDGFRalpha, and PDGFRbeta in ovarian cancers.” *Hum Pathol.* 36(3):242-9.

Yerushalmi R, Nordenberg J, Beery E, Uziel O, Lahav M, Luria D, Fenig E. (2007). “Combined antiproliferative activity of imatinib mesylate (STI-571) with radiation or cisplatin in vitro.” *Exp Oncol.* 29(2):126-31.

Yoon SY, Tefferi A, Li CY. (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.

## ANHANG

### Abkürzungsverzeichnis und Glossar

Abb.	Abbildung
Abl	humanes Abelson-Protoonkogen, ein Gen zur Codierung einer Protein-Tyrosinkinase auf Chromosom 9
AGO	Arbeitsgruppe gynäkologischer Onkologie
Akt	Proteinkinase B, wichtiges Enzym in der Signaltransduktionskaskade der Apoptose
ALL	akute lymphatische Leukämie
Apoptose	gezielter programmierter Zelltod ohne Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes
aqua dest.	aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	pro-apoptotisches Protein
Bcl-2-Familie	Gruppe von Proteinen, die an der Regulierung der Apoptose beteiligt sind
Bcr-Abl	onkogenes Fusionsprotein als Folge der Translokation zwischen den Genen Abl und Bcr
Bim	Bcl-2 interacting mediator, pro-apoptotisches Protein
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
c-Abl	zytoplasmatische Tyrosinkinase Abl
Chemokinese	frei bewegliche Resonanz von Organismen oder Zellen auf Chemikalien, die eine Veränderung im Schwimm- und Migrationsverhalten hervorrufen
c-kit	Rezeptor-Tyrosinkinase und Rezeptor für den Stammzelleffektor
CML	chronisch myeloische Leukämie
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CP CML	chronisch myeloische Leukämie im Stadium der chronischen Phase
DAB	Diaminobenzidin, weit verbreitetes Substrat der Peroxidase
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff, der in der Fluoreszenzmikroskopie zur Markierung von DNA eingesetzt wird
DMSO	Dimethylsulfoxid, organisches Lösungsmittel
DNA	Deoxyribonucleic acid - Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

FasL	Fas ligand, pro-apoptotisches Protein
FCS	fetales Kälberserum
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
FIP1-like-1	ein Gen zur Codierung des Faktors FIP1 auf Chromosom 4, beteiligt an der Regulierung der Transkription
FUS1	Tumorsuppressor Gen lokalisiert auf Chromosom 3
GIST	Gastrointestinale Stromatumoren
HCl	Chlorwasserstoff
H <sub>2</sub> O	Wasser
IC	Inhibiting Concentration – Hemmkonzentration
IGFBP-1	insulin-like growth factor binding protein-1 - Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor Bindungsprotein-1
IU	International Units – Internationale Einheiten
M	molar
mL	Milliliter
mM	millimolar
μM	mikromolar
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, gelber, wasserlöslicher Farbstoff
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NFκB	nuclear factor for kappa chain transcription in B-cells - zellkernassoziierter Faktor für die Transkription der leichten Kette von Immunglobulinen in B-Zellen, pro-apoptotischer Faktor
NIH	National Institutes of Health, Abteilung des Gesundheitsministeriums der Vereinigten Staaten von Amerika
PBS	phosphate buffered saline – Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction – Polymerasekettenreaktion
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration

PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-phosphat
PTEN	Phosphatase and tensin homolog, Tumorsuppressor Protein
RPM	rounds per minute – Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Tab.	Tabelle
TEL	Gen auf Chromosom 12, zugehörig zur ETS Familie, eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV-Licht	ultraviolettes Licht
vgl.	vergleiche
VLE	very low endotoxin



## DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. med. Dr. hc. Walter Jonat danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Klinik als Doktorandin und die Möglichkeit wissenschaftlich im onkologischen Labor arbeiten zu können.

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

Dr. med. Marion T. Weigel hat mir durch ihr Fachwissen und ihre Anregungen sehr oft weitergeholfen. Danke für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und deine Hilfe, die du auch immer aus London angeboten hast.

Der Arbeitsgruppe um Christoph Mundhenke möchte ich meine Anerkennung aussprechen.

Frau Sigrid Hamann und Herrn Frank Rösel kommt ein ganz besonderer Dank zu. Ich danke ihnen für die Geduld und Mühe bei der Einarbeitung im Labor sowie Unterstützung bei allen Fragen und Schwierigkeiten während der experimentellen Phase meiner Arbeit. Danke, dass ihr auch später immer für mich erreichbar ward, um mich zu unterstützen.

Ich möchte mich auch für die freundliche Aufnahme im Laborteam, die ständige Hilfsbereitschaft und das stets gute Arbeitsklima bedanken.

Ein Dank gilt auch der Firma Novartis Onkology, Deutschland, die meine Doktorarbeit unterstützt hat.

Meiner Familie möchte ich ganz besonders für ihre ständige Unterstützung und Rücksicht während meines gesamten Studiums danken.

## PUBLIKATION

Journal of Clinical Oncology, 2010 ASCO Annual Meeting Abstracts.  
Vol 28, No 15\_suppl (May 20 Supplement), 2010: e15526  
© 2010 American Society of Clinical Oncology

### ***Effect of nilotinib on cell proliferation and migration of ovarian cancer cells alone and in combination with standard chemotherapy.***

**M. T. Weigel, K. Rath, C. Schem, M. Bauer, I. Alkatout, W. Jonat and C. Mundhenke**

Obstetrics/Gynecology, University of Kiel, Kiel, Germany

### **Abstract**

**e15526**

**Background:** Nilotinib, a multi-target tyrosine kinase inhibitor (TKI), was tested for the treatment of human ovarian cancer (target-receptors: c-Kit, abl, PDGFR  $\alpha/\beta$ ). Ovarian epithelial adenocarcinoma cells express several membrane-bound tyrosine kinase receptors, among others elevated levels of PDGFR.

**Methods:** The effect of nilotinib on ovarian cancer cell lines (OVCAR 3 and OVCAR 8) was studied alone and in combination with carboplatin. Cells were incubated with nilotinib (100 nM- 4  $\mu$ M) for monodrug therapy and nilotinib (2  $\mu$ M) was combined with increasing carboplatin concentrations to evaluate the combinatory effect. To determine nilotinib's apoptotic potential, TUNEL assays were performed after 24 and 48 hours of drug incubation. Furthermore, the effect of nilotinib on migration of ovarian cancer cells was detected using planar migration assays which were analyzed after 24, 48 and 72 hours.

**Results:** Nilotinib alone and in combination with carboplatin inhibits cell proliferation of ovarian cancer cell lines (IC<sub>50</sub> OVCAR3: 3 $\mu$ M, IC<sub>50</sub> OVCAR8: 2.5 $\mu$ M). The combination of nilotinib with carboplatin shows a synergistic effect on cell growth inhibition. The migration assays display a clear influence of nilotinib on the migratory behavior of ovarian cancer cells. The velocity of migration is significantly reduced in nilotinib treated OVCAR3 cells after 24, 48 and 72 hours ( $p < 0.01$  at all time points). Similar results can be observed for OVCAR8 cells, most distinctive after 72 hours ( $p < 0.01$ ). TUNEL-assays reveal an increased rate of apoptotic cells among ovarian cancer cells incubated with nilotinib, which further increases by adding carboplatin.

**Conclusions:** Nilotinib inhibits cell proliferation, cell migration and induces apoptosis in ovarian cancer cell lines in clinically relevant concentrations. The combination with carboplatin reveals a synergistic effect. These in vitro data suggest that especially the combination of carboplatin with nilotinib could be of clinical importance for the treatment of ovarian cancer patients.

## LEBENS LAUF

Vorname: Katrin

Nachname: Rath

Geburtsdatum: 31.10.1985

Geburtsort: Gelsenkirchen

Familienstand: Ledig, keine Kinder

### Schulbildung:

1992 - 1996 Besuch der Park-Grundschule in Gelsenkirchen

1996 - 2005 Besuch des Grillo-Gymnasiums in Gelsenkirchen

### Studium:

10/2005 Beginn des Medizinstudiums (Staatsexamen) an der Philipps-Universität Marburg

09/2007 Erfolgreiches Ablegen des Physikums

04/2008 Wechsel an die med. Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

07/2012 Erfolgreiches Ablegen des Staatsexamens

### Famulaturen:

01/2008 Marienhospital Gelsenkirchen, Fachbereich Kardiologie

02/2008 - 03/2008 Marienhospital Gelsenkirchen, Fachbereich Gynäkologie und Geburtshilfe

07/2008 - 08/2008 Gemeinschaftspraxis Allgeier, Trippe, Wilmsmann in Gelsenkirchen, Fachbereich Allgemeinmedizin

03/2009 LWL-Klinik Marl-Sinsen, Fachbereich Kinder- und Jugendpsychiatrie

03/2010 - 04/2010 Augusta-Kranken-Anstalt Bochum, Fachbereich Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Notfallmedizin

### Praktisches Jahr:

02/2011 – 06/2011 Victoria Hospital Wynberg, Kapstadt, Südafrika, Fachbereich Chirurgie

06/2011 – 10/2011 Klinikum Itzehoe, Fachbereich Innere Medizin

10/2011 – 01/2012 Universitätsfrauenklinik Kiel, Fachbereich Gynäkologie und Geburtshilfe

### Berufliche Tätigkeit:

Seit 12/2012 Assistenzärztin im Bethesda Krankenhaus Bergedorf, Frauenheilkunde

### Publikationen:

2010 Co-Autorin beim 2010 ASCO Annual Meeting veröffentlichten Abstract: "Effect of nilotinib on cell proliferation and migration of ovarian cancer cells alone and in combination with standard chemotherapy"

