

Aus der
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor Professor Dr. med. Nicolai Maass)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

PRÄKLINISCHE ANALYSE DER EXPRESSION VON
REZEPTORTYROSINKINASEN BEIM MAMMAKARZINOM

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde einer Doktorin der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

MERLE KUMMERFELD

aus Kiel

Kiel 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Schem, MaHM
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Grünewald
Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 15.08.2018

gez.: Frau Prof. Dr. med. Christel Eckmann-Scholz

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	11
1.1 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	11
1.2 Mammakarzinom	12
1.3 Rezeptortyrosinkinasen	13
1.3.1 PDGF Rezeptortyrosinkinasen	14
1.3.2 c-Kit-Rezeptortyrosinkinase	15
1.3.3 Flt3-Rezeptortyrosinkinase	15
1.3.4 VEGF-Rezeptortyrosinkinasen	16
1.3.5 SU11248 Sunitinib	16
2 Kollektiv, Materialien und Methoden	17
2.1 Patientenkollektiv	17
2.2 Materialien	17
2.2.1 Verwendete Biochemikalien und Geräte	17
2.2.2 Paraffin-Schnitte	17
2.2.3 Zellmaterial für den Western Blot und die Proliferationsassays	18
2.3 Methoden	19
2.3.1 Immunhistochemie	19
2.3.2 Färbeprotokoll	20
2.3.2.1 Vorbereitung	21
2.3.2.2 Primäre Antikörper	21
2.3.2.3 Sekundäre Antikörper	23
2.3.2.4 Kernfärbung und Eindeckeln	24
2.3.2.5 Auswertung	24
2.3.3 Zellkultur	25
2.3.3.1 Western Blot	25
2.3.3.2 Proliferationsassays	28
2.3.3.3 FKS-Entzugsversuche	30
3 Ergebnisse	31
3.1 Immunhistochemie	31
3.1.1 Deskriptive Statistik	31
3.1.2 Analytische Statistik	34
3.2 Western Blot	34
3.3 Proliferationsassays	34
3.3.1 MDA MB231	34
3.3.2 MCF-7	36

4 Diskussion	39
4.1 Medizinische Notwendigkeit	39
4.2 Limitationen und mögliche Fehlerquellen	39
4.2.1 Patientenkollektiv	39
4.2.2 Immunhistochemie	40
4.2.3 Western Blot	40
4.3 Ausblick	41
5 Zusammenfassung	45
Literaturverzeichnis	47
Selbstständigkeitserklärung	54
6 Anhang	55
6.1 Danksagung	55
6.2 Tabellarischer Lebenslauf	56
6.3 Originalpublikationen und Tagungsbeiträge	56
6.3.1 Originalpublikationen	56
6.3.2 Tagungsbeiträge	56

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1 Vereinfachtes Schema der Signalvermittlung über Tyrosinkinasen	14
2.1 2-Schritt EnVision™-Methode	23
2.2 SABC-Methode für Enzymkomplexe	24
3.1 Immunhistochemische Färbung von a) VEGFR 2 Positivkontrolle, b) VEGFR 2 mit Gefäß, c) VEGFR 1, d) PDGFR- α , e) c-Kit und f) PDGFR- β	32
3.2 Expression der Rezeptoren auf den Primärtumoren	33
3.3 Expression der Rezeptoren auf den Lymphknoten-Metastasen	33
3.4 Nachweis von a) PDGFR- β auf der Zelllinie MCF-7, b) phosphoryliertem c-Kit auf der Zelllinie MDA-MB 231, c) VEGFR 2 auf der Zelllinie MDA-MB 231 und d) phosphoryliertem PDGFR- α auf der Zelllinie MDA-MB 231	35
3.5 Relative Absorption bei 490 nm nach Inkubation der Zelllinie MDA MB231 mit SU11248 (Stocklösung) über 48 h im Vergleich zu DMSO	35
3.6 Relative Absorption bei 490 nm nach Inkubation der Zelllinie MDA MB231 mit SU11248 über 72 h im Vergleich zu PBS im serumfreien Medium	36
3.7 Relative Absorption bei 490 nm nach Inkubation der Zelllinie MDA MB231 mit SU11248 (Stocklösung) über 72 h im Vergleich zu PBS	37
3.8 Relative Absorption bei 490 nm nach Inkubation der Zelllinie MCF-7 mit SU11248 (Stock- lösung) über 48 h im Vergleich zu DMSO	37
3.9 Relative Absorption bei 490 nm nach Inkubation der Zelllinie MCF-7 über 72 h mit SU11248 (Stocklösung) im Vergleich zu PBS	38

TABELLENVERZEICHNIS

2.1	Darstellung der Tumorcharakteristika des untersuchten Patientenkollektivs	18
2.2	Darstellung der verwendeten Biochemikalien	19
2.3	Darstellung der verwendeten Geräte	20
2.4	Verwendete Antikörper, Retrieval, Block und Inkubationszeiten der immunhistochemischen Färbung	22
2.5	Inhaltsstoffe der verwendeten Puffer	23
2.6	Aufgliederung des immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner	24
2.7	Konzentration und Inkubationszeiten der verwendeten Liganden	26
2.8	Spezifische Konzentrationen und Herkünfte der verwendeten Antikörper für den Protein-nachweis	28
2.9	Inkubationsschema auf der 96-well-Platte	29
3.1	Expression der Rezeptoren auf dem Primärtumor nach IRS	31
3.2	Expression der Rezeptoren auf den Lymphknoten-Metastasen	33
3.3	Signifikante Korrelationen aus der Analyse der Immunhistochemie	34

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

cm ³	Kubikzentimeter
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
min	Minute
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
AG	Antigen
AK	Antikörper
AVADO	Phase-III-Studie
BRCA	Breast Cancer, Tumorsuppressorgene
BSA	Rinderserumalbumin (Eng.: Bovine serum albumin)
c-Kit	Stammzellfaktor-Rezeptor (Eng.: tyrosine-protein kinase Kit)
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
E2100	Phase-III-Studie
ECL	verbesserte Chemilumineszenz (Eng.: Enhanced Chemiluminescence)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (antikörper-basiertes Nachweisverfahren)
Flk2	Zytokinrezeptor (Eng.: fetal liver kinase 2)
Flt3	Zytokinrezeptor (Eng.: fms-like tyrosine kinase)
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GIST	Gastrointestinaler Stromattumor
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
Grb2	Adapterprotein (Eng.: Growth factor receptor-bound protein 2)
HER	Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (Eng.: Human epidermal growth factor receptor)
HRP	Meerrettichperoxidase (Eng.: horseradish-peroxidase)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
Ig	Immunglobulin
IRS	Immunreaktiven Score
IU	Internationale Einheit (Eng.: International Units)
KI-67	Antigen KI-67 (Eng.: Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67)
LH	Luteinisierendes Hormon
LW	Leerwert
MCF-7	Michigan Cancer Foundation 7 (Mammakarzinomzelllinie Adenokarzinom)
MDA MB 231 ..	Mammakarzinomzelllinie Adenokarzinom
MMP	Magermilchpulver
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium
PAI-I	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor I (Eng.: plasminogen activator inhibitor type I)

Tabellenverzeichnis

PAM50	Genexpressionstest
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Eng.: phosphate buffered saline)
PDGF	Wachstumsfaktor, der bei der Verletzung von Thrombozyten freigesetzt wird (Eng.: Platelet-derived growth factor)
PDGFR	Wachstumsfaktorrezeptor (Eng.: Platelet-derived growth factor receptor)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLC	Phosphoinositid-Phospholipase C
PP	Prozentsatz positiver Zellen
PTB	Proteindomäne (Eng.: Phosphotyrosine-binding Domain)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIBBON-1/-2	Phase-III-Studie
rpm	Umdrehungen pro Minute (Eng.: revolutions per minute)
RPMI 1640	Zellkulturmedium des Roswell Park Memorial Institute
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SCF	Stammzellfaktor (Eng.: Stem cell factor)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (Eng.: Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamid-Gel-Electrophoresis)
SERD	selektiver Östrogenrezeptor Down-Regulator (Eng.: Selective estrogen receptor down regulators)
SERM	selektive Östrogenrezeptormodulatoren (Eng.: Selective estrogen receptor modulators)
SH2	Proteindomäne (Eng.: Src-homology 2)
SI	Farbintensität
Src	Akronym aus cellular und sarcoma (Proteinkinase, die in der SH2-Domäne zum ersten Mal beschrieben wurde)
T75	Zellkulturflaschen der Größe 75 cm ³
TBS	Tris-buffered saline (dreifach gepufferte Salzlösung)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	Tris-buffered saline with tween (dreifach gepufferte Salzlösung mit Zusatz von Tween 20)
Tween 20	Polysorbat 20, Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
UICC	Internationale Vereinigung gegen Krebs (Frz.: Union internationale contre le cancer)
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (Eng.: urokinase plasminogen activator)
VEGF	Endothelwachstumsfaktor (Eng.: Vascular Endothelial growth factor)

EINLEITUNG

1.1 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

DAS Mammakarzinom stellt in Deutschland die häufigste bösartige Neubildung der Frau dar und ist verantwortlich für die meisten tumorbedingten Todesfälle [1]. Aufgrund der Häufigkeit und Schwere der Erkrankung besteht eine besondere medizinische Notwendigkeit neue Therapien zu entwickeln. Mit der Forschung über die zelluläre Wachstumsregulation in Tumoren sowie der Weiterentwicklung der zielgerichteten medikamentösen Therapie ergeben sich neue Möglichkeiten der individuellen Therapie. Die Hemmung der Angiogenese ist eine der vielversprechendsten neuen Strategien der Karzinomtherapie. Die Zulassung von Angiogeneseinhibitoren in der Therapie von Karzinomen zeigt den Stellenwert der Target-Therapie an. Der Schwerpunkt zielgerichteter Therapien wird auf der Therapie der Metastasierung liegen, z.B durch Hemmung der Neoangiogenese. In Kombination mit einem zytotoxischen Chemotherapeutikum kann ein Maximum der Effektivität in der Tumorthherapie erreicht werden.

Die Rezeptortyrosinkinasen VEGFR 1 und 2, PDGFR- α und PDGFR- β , c-Kit und Flt-3 sind Transmembranproteine, die durch ihre Aktivierung zellbiologische Prozesse wie Angiogenese, Zellwachstum und Zellproliferation regulieren [2]. Diese Vorgänge spielen im Rahmen eines Tumorwachstums und der Metastasierung eine entscheidende Rolle. Durch Mutationen in der juxtamembranären Region kann es zu Störungen der Autoinhibition kommen. Damit gelten diese Rezeptortyrosinkinasen als Proto-Onkogene und können für eine ungerichtete Proliferation verantwortlich sein.

Eine Inhibition der Rezeptortyrosinkinasen könnte also, wenn diese Zielstrukturen auf den Zellen vorhanden sind, eine mögliche Behandlungsoption in der Therapie des Mammakarzinoms darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte immunhistochemisch die Expression der genannten Rezeptortyrosinkinasen auf Gewebeproben aus Mammakarzinomen nachgewiesen werden. Die Expressiondaten sollten dann hinsichtlich einer möglichen Korrelation mit den klassischen klinischen und histopathologischen Merkmalen (Tumorstadium, Grading, Hormonrezeptorexpression, HER2-neu-Expression) verglichen werden. Durch diese Analyse sollen Zusammenhänge im Expressionsmuster der Tumoren ermittelt werden. Würde sich zum Beispiel eine Expression der Rezeptortyrosinkinasen auf Primarius und korrespondierenden Lymphknoten unterscheiden, wäre eine zielgerichtete Therapie eventuell nur in einem bestimmten Stadium sinnvoll. Ebenso verhielte es sich bei einer Änderung der Expression ab einer bestimmten Tumorgröße.

Ein Medikament, welches diese Rezeptortyrosinkinasen hemmt, ist Sunitinib. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit erfolgt demnach der Nachweis der genannten Rezeptortyrosinkinasen auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analyse auf den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA MB 231 sowie deren Stimulation und Aktivierung durch die entsprechenden Liganden. Es sollen zudem Vorversuche zur Wirksamkeit des Tyrosinkinaseinhibitors Sunitinib (SU11248) auf den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA MB 231 durchgeführt werden.

Die Auswertung der Immunhistochemie und der Zellkulturarbeiten sollte folgende Fragen klären:

- 1) Werden die Rezeptortyrosinkinasen VEGFR 1 und 2, PDGFR- α und PDGFR- β , c-Kit und Flt-3 von Mammakarzinomzellen exprimiert?

1.2 Mammakarzinom

- 2) Besteht ein Zusammenhang der Rezeptorexpression mit der Tumorgröße, dem Nodalstatus oder der Expression von Progesteron- und Östrogenrezeptoren?
- 3) Gibt es eine Änderung des Expressionsmusters zwischen Lymphknoten und Primarius oder ab einem bestimmten Tumorstadium?
- 4) Wenn die Targets vorhanden sind und Sunitinib damit als mögliche Therapieoption zur Verfügung stünde: Gibt es eine Möglichkeit, bereits präklinisch zu erkennen, ob eine Therapie mit Sunitinib sinnvoll ist?
- 5) Kann eine Wirkung von Sunitinib auf Mammakarzinomzelllinien in vitro nachgewiesen werden?

1.2 MAMMAKARZINOM

DIE malignen Tumorerkrankungen sind nach den kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland. Jährlich werden ca. 480.000 bösartige Neubildungen diagnostiziert [3].

Das Mammakarzinom ist mit ca. 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr [4] mit Abstand die häufigste bösartige Neubildung der Frau. Diese Erkrankung ist für 29 % aller Malignom-Neuerkrankungen bei Frauen und damit für deutlich mehr als ein Viertel aller Krebserkrankungen bei Frauen verantwortlich. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren und damit sechs Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter aller Krebserkrankungen. Mit einer altersstandardisierten Sterblichkeitsrate von 23,9 % und 17.748 Todesfällen im Jahre 2012 [3] ist das Mammakarzinom die häufigste Krebstodesursache der Frau [5, 1]. Die Inzidenz ist seit Beginn der Registrierung im Jahr 1961 kontinuierlich gestiegen. Ein sprunghafter Anstieg der Inzidenz nach 2006 ist mit schrittweiser Einführung des Mammographie-Screening-Programmes für Frauen zwischen dem 51. und 70. Lebensjahr ab 2005 zu erklären. So stieg die altersstandardisierte Erkrankungsrate um 40 % von 206,7 je 100.000 Frauen im Jahr 2005 auf 289,3 im Jahr 2008. Die Anzahl der nicht-invasiven Tumoren hat sich mit 43,3 je 100.000 Frauen nach Beginn der flächendeckenden Mammographie mehr als verdoppelt (vor Einführung des Screenings 19 je 100.000 Frauen) [6]. Generell hat sich durch Früherkennungsuntersuchungen für Frauen ab dem 40. Lebensjahr und Mammographie-Screeningprogramme für Frauen zwischen dem 51. und 70. Lebensjahr die Tumorgröße zum Diagnosezeitpunkt im Vergleich zu früheren Jahrzehnten verringert. Auch die Mortalität sinkt seit Mitte der 1990er Jahre. Die 5-Jahres-Überlebensrate für Brustkrebspatientinnen beträgt derzeit über alle Stadien betrachtet 86 % [7].

Die Ursache des Mammakarzinoms ist, wie bei den meisten malignen Erkrankungen, multifaktoriell. Eine familiäre Prädisposition durch genetische Faktoren im Sinne einer Mutation der Tumorsuppressorgene BRCA 1 und 2, die auch durch Männer vererbt werden kann und bei Männern das Risiko von Darm- und Prostatakrebs erhöht, spielt vor allem eine Rolle bei der Erkrankung jüngerer Frauen [8]. Neben BRCA 1 und 2 sind aktuell mehr als 20 Risikogene publiziert. Zudem sind heutzutage eine Vielzahl von niedrig penetranten Risikogenen bekannt, welche die bekannten Mutationen der Tumorsuppressorgene in ihrer Penetranz modulieren [9, 10]. Faktoren des Lebensstils (Übergewicht, Bewegungsmangel), hormoneller Status (frühe Menarche, späte Menopause, Einnahme von Östrogen- und Progesteronhaltigen Ovulationshemmern, Hormontherapie mit einer Kombination von Östrogenen und Gestagenen in Klimakterium und Postmenopause), reproduktive Faktoren (Kinderlosigkeit, höheres Alter bei der ersten Geburt) und der Lebensstil (Alkohol, westliche Lebensweise, hoher Body-Mass-Index postmenopausal) erhöhen das Brustkrebsrisiko der Normalbevölkerung [11, 12]. Die Therapie des Mammakarzinoms stützt sich auf drei Säulen: Operation, Bestrahlung sowie Therapie mit

Medikamenten, zu der sowohl Chemotherapie, endokrine Therapie und die Gabe von zielgerichteten Wirkstoffen zählen. Die medikamentöse Therapie kann in Abhängigkeit von der primären Operabilität des Tumors adjuvant nach der Operation oder neoadjuvant zur Verkleinerung des Tumors vor der Operation sowie zur Therapie bei Metastasierung durchgeführt werden [13]. Die Therapie mit endokrin wirksamen Substanzen und zielgerichteten Wirkstoffen, wie zum Beispiel Antikörpern, setzt einen positiven Rezeptorstatus und damit das Vorhandensein der Zielstrukturen voraus.

Die endokrine Therapie bietet mehrere Möglichkeiten. Prämenopausal kommt mit Tamoxifen ein Hormonrezeptormodulator (SERM) zum Einsatz, welcher die Östrogenrezeptoren hemmt sowie die Progesteronrezeptoren stimuliert. Nach der Menopause werden Tamoxifen sowie Aromatasehemmer angewendet. Es werden SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators) von SERDs (Selective Estrogen Receptor Down Regulators) und „reinen Antiöstrogenen“ unterschieden. Letztere besetzen ebenfalls den Östrogenrezeptor der Krebszelle, schalten sie aber im Gegensatz zu den SERMs vollständig aus und bauen zudem die Rezeptoren ab, sodass das Tumorwachstum effektiv gehemmt wird. Antiöstrogene und Rezeptormodulatoren sind ein wichtiger Bestandteil der Rezidivprophylaxe. Die Aromatasehemmer werden ebenfalls zur Rezidivprophylaxe eingesetzt. Sie unterbinden die Östrogenproduktion im nicht-ovariellen Gewebe durch Blockierung der Umwandlung von Androgenen in Estrone und Estradiol [14].

Es gibt laufende Studien zur Therapie mit Androgenrezeptorblockern (AR-Blocker, Enzalutamid) bei progesteronpositiven Tumoren. Sie blockieren den Progesteronrezeptor oder verhindern die Signalweiterleitung, senken den Östrogenspiegel im Blut und reduzieren die Bildung von Hormonrezeptoren auf den Tumorzellen. Aufgrund von starken Nebenwirkungen werden sie nur in der palliativen Therapie sowie bei unzureichender Wirksamkeit der anderen Hormonbehandlungen eingesetzt [15]. Seit dem Jahr 2000 ist in der Europäischen Union mit Trastuzumab ein monoklonaler Antikörper zur Therapie des metastasierten Mammakarzinoms zugelassen. Die Zulassung wurde 2006 auf die adjuvante Therapie bei nicht metastasierten Tumoren erweitert. Trastuzumab bindet an HER2, den Humanen Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor, und blockiert so die Aufnahme der Wachstumsfaktoren in die Zelle [16].

Durch die Erforschung neuer Zielstrukturen wie zum Beispiel der Rezeptoren eröffnen sich weitere Möglichkeiten der zielgerichteten Therapie. Das beinhaltet Medikamente, die die Angiogenese des Tumors unterbinden, zum Beispiel Bevacizumab sowie Tyrosinkinaseinhibitoren. Bevacizumab bindet extrazellulär an den Wachstumsfaktor VEGF und verhindert eine Bindung des Liganden an den Rezeptor [17]. Tyrosinkinaseinhibitoren unterbrechen die Signalweiterleitung nach intrazellulär.

1.3 REZEPTORTYROSINKINASEN

PROTEINKINASEN regulieren zahlreiche intra- und extrazelluläre Prozesse. Sie werden, je nach phosphorylierter OH-Gruppe der Effektorproteine, in Serin/Threoninkinasen und Tyrosinkinasen unterschieden. Die Tyrosinkinasen werden abermals in zytoplasmatische non-Rezeptor-Tyrosinkinasen und in transmembrane Rezeptortyrosinkinasen unterteilt. Rezeptortyrosinkinasen sind single-pass Transmembranproteine. Die extrazelluläre Liganden-bindende Domäne ist mit der zytoplasmatischen Domäne über eine transmembrane Helix verbunden. Der intrazelluläre Anteil enthält eine Tyrosindomäne. Durch Ligandenbindung wird eine Rezeptoroligomerisierung, meist Dimerisierung, induziert. Die Tyrosindomänen werden aktiviert und phosphorylieren wiederum Tyrosinreste, an denen dann weitere Proteine mit SH2- oder PTB-Domänen binden können. So wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt. Die beteiligten Proteine wirken enzymatisch oder werden in ihrer strukturellen Veränderung von anderen Proteinen erkannt. Das Signal dieser Kaskade wird auf dem Weg potenziert.

Rezeptortyrosinkinasen regulieren so grundlegende zellbiologische Prozesse wie den Zellzyklus, Zellmigration, Zellmetabolismus, Apoptose, Zellwachstum und -proliferation sowie Zelldifferenzierung [2]. Ein vereinfachtes Schema der Signalvermittlung der Tyrosinkinasen ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Die Rezeptoraktivierung hat zelltypische zellbiologische Auswirkungen. Eine Rezeptortyrosinkinase kann also, je nachdem auf welcher Zelllinie sie exprimiert ist, eine andere Zellantwort induzieren [18]. Diese ist begründet in der zellspezifischen Expression von Effektorproteinen und Transkriptionsfaktoren [2]. Eine Kontrolle der Aktivität erfolgt durch die zellspezifische Expression der Oberflächenrezeptoren und Autoinhibition bei Abwesenheit des spezifischen Liganden. Die Autoinhibition wird durch die juxtamembranäre Region vermittelt. Mutationen in dieser Region resultieren in einer Ligandenunabhängigen Kinasen-Aktivierung [19]. Daher sind Rezeptortyrosinkinasen wichtige Proto-Onkogene und Mutationen können multiple Neoplasien hervorrufen. Die Rezeptortyrosinkinasen VEGFR 1 und 2, PDGFR- α und PDGFR- β sowie Flt-3 und c-Kit sind unter anderem verantwortlich in Prozessen der Angiogenese, des Zellwachstums und der Proliferation. Diese Prozesse spielen beim Tumorwachstum und der Metastasierung eine wichtige Rolle. Eine Hemmung dieser Rezeptoren könnte eine Möglichkeit der zielgerichteten Therapie beim Mammakarzinom darstellen.

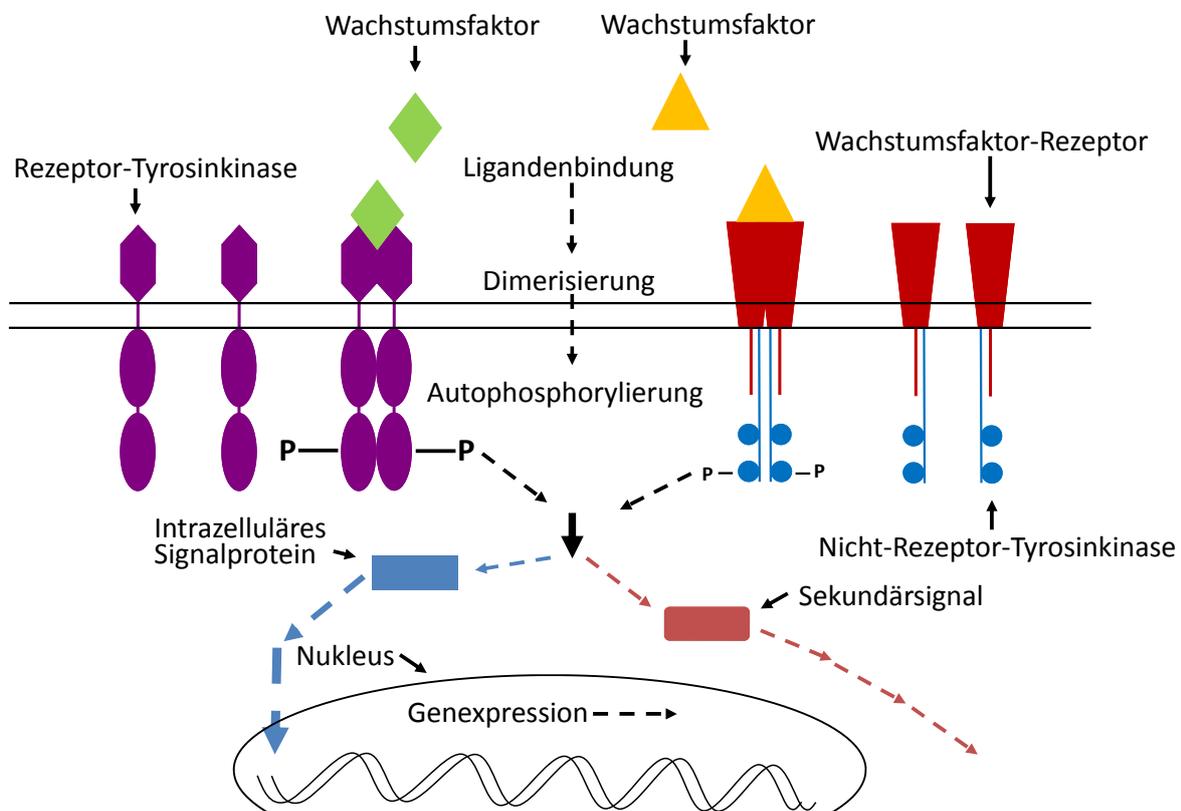


Abbildung 1.1: Vereinfachtes Schema der Signalvermittlung über Tyrosinkinasen. Abbildungen modifiziert nach Kolibaba et al. [20]. Links: Signaltransduktionskaskade über transmembranäre Rezeptor-Tyrosinkinasen. Rechts: Signaltransduktionskaskade über zytoplasmatische Non-Rezeptor-Tyrosinkinasen.

1.3.1 PDGF REZEPTORTYROSINKINASEN

DER platelet-derived growth factor receptor (PDGF-Rezeptor), auch CD140, ist eine membranständige Rezeptortyrosinkinase vom Typ III. Im Aufbau der Rezeptoren lassen sich zwei Untereinheiten, α und β , voneinander differenzieren [21]. PDGF-Isoformen sind Mitoseinduktoren für

Zellen mesenchymalen und glialen Ursprungs und damit beteiligt an Zellwachstum, Überleben und Migration der Zellen. Hohe Mengen an PDGF stabilisieren die Blutgefäße. Es handelt sich um durch Disulfidbrücken verbundene Dimere mit A-, B-, C- und D-Polypeptidketten. Die PDGF-Moleküle kommen sowohl als Homodimere, als auch als AB-Heterodimer vor, wobei die heterodimere Form die Hauptfraktion stellt.

Der α -Rezeptor bindet A-, B- und C-Ketten, während der β -Rezeptor eine Affinität zu B- und D-Ketten besitzt. Das PDGF-AB Heterodimer ist zwar in der Lage, an den reinen PDGF- β -Rezeptor zu binden, löst dort aber keine Signalweiterleitung aus [22].

Der extrazelluläre Anteil des Rezeptors besteht aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen, der intrazelluläre Teil ist eine Tyrosinkinase. Die Bindung von PDGF an den Rezeptor induziert die Bildung des Rezeptordimers, abhängig von der stimulierenden Isoform als α - oder β -Homodimere oder α - β -Heterodimer. Als Dimerform aktivieren sich die Rezeptoren durch Autophosphorylierung. Die Aktivierung hat zwei Funktionen: Zum Einen bewirkt die Autophosphorylierung der Aktivierungsschleife des Tyrosinrestes eine Aktivierung der Kinase. Zum Anderen wird durch die Autophosphorylierung von Tyrosinresten außerhalb der Kinasedomäne die Bildung von Bindungsstellen für nachgeschaltete Moleküle induziert, die SH2-Domänen enthalten. SH2-Domänen, wie zum Beispiel PI3-Kinasen und Lipidkinasen sind in sämtlichen eukaryoten Zellen vorhanden. Die PI3K sind an Schlüsselfunktionen wie Zellwachstum, Proliferation, Migration, Differenzierung, Überleben und Zelladhäsion beteiligt. Weitere Moleküle, die SH2-Domänen enthalten und durch die Ligandenbindung aktiviert werden, sind zum Beispiel PLC γ und Grb2.

PDGF-Rezeptortyrosinkinasen werden von Fibroblasten, Chondroblasten, Osteoblasten, glatten Muskelzellen, Gliazellen und Endothelzellen gebildet. Durch das ubiquitäre Vorkommen im Körper des Menschen sind auch die Auswirkungen der Mutationen vielfältig. Sie reichen von Atherosklerose und Fibrose über GIST zu myeloischen Leukämien und Glioblastomen.

1.3.2 C-KIT-REZEPTORTYROSINKINASE

C-KIT gehört wie PDGFR- α und PDGFR- β zu den membranständigen Rezeptortyrosinkinasen vom Typ III. Der Rezeptor ist auch unter den Bezeichnungen CD117, KIT oder Stammzellfaktor-Rezeptor bekannt. Auch c-Kit besitzt extrazellulär fünf Immunglobulin-ähnliche Domänen und intrazellulär eine zweiteilige Kinasedomäne. Durch Bindung des Stammzellfaktors SCF wird eine Dimerisierung des Rezeptors induziert, die eine Autophosphorylierung durch gegenseitige Phosphorylierung der Thyrosingruppen der intrazellulären Domäne zur Folge hat [23]. Wie bei den PDGF-Rezeptortyrosinkinasen bedingt die Aktivierung die Möglichkeit der Bindung weiterer Signaltransduktionsmoleküle, die eine SH2-Domäne enthalten, zum Beispiel PI3K.

1.3.3 FLT3-REZEPTORTYROSINKINASE

FLT3, auch Flk2 oder CD135, ist ebenfalls eine membranständige Tyrosinkinase vom Typ III. Diese RTK ist der Rezeptor des Zytokins Flt3-Ligand. Auch hier löst eine Bindung des Liganden eine Dimerisierung des Rezeptors mit anschließender Autophosphorylierung aus. Flt3 wird auf frühen hämatopoetischen Progenitorzellen exprimiert und unterstützt deren Wachstum und Differenzierung zu B- und T-Lymphozyten im Blutbildungssystem. Mutationen des Flt3-Rezeptors stehen im Zusammenhang mit der Entstehung einer akuten myeloischen Leukämie [24].

1.3 Rezeptortyrosinkinasen

1.3.4 VEGF-REZEPTORTYROSINKINASEN

DIE VEGF-RTKs gehören gleichfalls zur Gruppe der membranständigen Tyrosinkinasen vom Typ III. Es existieren drei Isoformen des Rezeptors: VEGFR 1, auch Flt-1, welcher auch als löslicher Rezeptor vorliegen kann [25], VEGFR 2, auch KDR oder FlK-1 sowie VEGFR 3, der auch Flt-4 genannt wird. Die Rezeptoren bestehen aus sieben Extrazellulärdomänen, einer transmembranen Domäne sowie einer aufgespaltenen intrazellulären Tyrosinkinase. Der biologische Einfluss wird durch die Liganden VEGF A bis D hervorgerufen, welche den zentralen Regulator und potentesten Stimulator der Endothelzellproliferation und damit der Vaskulo- und Angiogenese sowie der Steigerung der Gefäßpermeabilität darstellen [26]. Viele solide Tumoren sind in der Lage VEGF zu bilden und freizusetzen, welche dann die Neovaskularisierung und die Metastasenbildung fördern [27]. So korreliert eine hohe VEGF-Expression mit der Frührezidivrate bei Mammakarzinom sowie der Metastasierung bei Kolonkarzinomen [28, 29].

1.3.5 SU11248 SUNITINIB

EIN Inhibitor mehrerer Rezeptortyrosinkinasen ist Sunitinib (Handelsname Sutent®, Firma Pfizer), ein Multi-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor zur oralen Einnahme, welcher unter anderem die Rezeptoren für PDGF, VEGF, c-Kit und Flt-3 hemmt [30]. Damit hat das Medikament sowohl hemmenden Einfluss auf die Tumorpheriferation als auch auf die Neoangiogenese und Metastasierung.

Bisher besteht eine Zulassung in Deutschland bei metastasierten Nierenzellkarzinomen (mRCC), Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), wenn eine Resektion nicht möglich ist oder eine Resistenz gegen Imatinib (Gleevec®) vorliegt. Zudem ist Imatinib zur Behandlung von progressiven gut differenzierten pankreatischen neuroendokrinen Tumoren (pNET) zugelassen [31].

Die inhibitorische Wirkung wird durch die Hemmung der Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase und damit dem Unterbinden der intrazellulären Signalkaskade erzielt. Sunitinib wird über die Isoform CYP3A4 des Cytochroms 450 metabolisiert und kann somit durch andere Medikamente in seiner Wirksamkeit gesteigert oder gehemmt werden. Es wird zu 61 % hepatisch eliminiert [31].

2.1 PATIENTENKOLLEKTIV

DIE immunhistochemischen Färbungen erfolgten an tissue micro arrays von Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknoten aus dem Bestand der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Die Patientinnen waren Teil verschiedener Multicenter-Studien aus den Jahren 1996 bis 2002, welche durch die German breast cancer study group (jetzt German breast group), initiiert worden waren. Es handelte sich dabei sowohl um adjuvante als auch neoadjuvante Studien. Die Patientinnen waren mit der Teilnahme an einer wissenschaftlichen Studie einverstanden. Alle Daten wurden nach den Datenschutzrichtlinien vertraulich behandelt. Es konnten 158 Stanzbiopsien mit 59 korrespondierenden Lymphknoten ausgewertet werden. Für die statistische Analyse wurden folgende Parameter erhoben: Geburtsdatum, Alter bei Erstdiagnose, Histologie, Tumorstadium nach TMN-Klassifikation, Nodalstatus, Grading, Hormonrezeptorstatus, Her2-neu-Status, Rezidiv. Das mittlere Erkrankungsalter betrug 54,92 Jahre (mittlere Standardabweichung 9,78). Bei 98 (62 %) der 158 Patientinnen war die Ausdehnung des Primärtumors auf das Stadium T1 begrenzt. 60 (38 %) der Patientinnen wiesen ein ausgedehnteres Wachstum auf. Ein Lymphknotenbefall war bei 59 Patientinnen (37,1 %) nachweisbar. Histologisch betrachtet dominierte das invasiv duktales Mammakarzinom mit 86,1 % (n=136).

Die Charakteristika des untersuchten Patientenkollektives sind der Tabelle 2.1 zu entnehmen.

2.2 MATERIALIEN

2.2.1 VERWENDETE BIOCHEMIKALIEN UND GERÄTE

DIE verwendeten Biochemikalien können der Tabelle 2.2 entnommen werden. Die verwendeten Geräte sind in der Tabelle 2.3 aufgelistet.

2.2.2 PARAFFIN-SCHNITTE

BEI den Gewebeproben handelte es sich um formalinfixierte und paraffineingebettete tissue micro arrays. Zur Herstellung der tissue micro arrays wurden aus den Großschnitten auf der Höhe des Tumorschnittes Stenzen entnommen und diese dann geordnet nach den jeweiligen Studien in neue Blöcke zusammengefasst. Die Fixierung und Paraffineinbettung erfolgte durch das Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie des UKSH, Campus Kiel. Dort wurde auch die histologische Diagnose am Präparat gestellt sowie die Bestimmungen des Tumor- und Lymphknotenstatus und des Nachweises von Östrogen-, Progesteron- und Her2-neu-Rezeptoren vorgenommen.

Tabelle 2.1: Darstellung der Tumorcharakteristika des untersuchten Patientenkollektivs

	Anzahl Proben	%
Tumor		
Total	158	100
Invasiv duktal	136	86,1
Invasiv lobär	14	8,9
Tubulär	3	1,9
Adeno	2	1,3
Medullär	3	1,9
Ausdehnung des Primärtumors		
Total	158	100
pT1	98	62
pT2	52	32,9
pT3	8	5,1
Lymphknotenstatus		
Total	153	100
N0	94	59,1
≤3 positiven LK	28	17,6
≥4 positiven LK	31	19,5
Grading		
Total	158	100
G1/G2	113	71,5
G3	45	28,5
Östrogenrezeptor		
Total	155	100
Negativ	58	37,4
Positiv	97	62,6
Progesteronrezeptor		
Total	155	100
Negativ	62	40
Positiv	93	60
Her2neu-Status		
Total	127	100
Negativ ≤2	113	88,3
Positiv 3	14	11,7

2.2.3 ZELLMATERIAL FÜR DEN WESTERN BLOT UND DIE PROLIFERATIONSASSAYS

FÜR die in vitro-Versuche wurden folgende Mammakarzinom-Zelllinien verwendet: MCF 7 und MDA MB 231 (beide von ATCC). Die Zelllinien kommen aus dem Bestand der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

MCF 7 sind Zellen eines humanen Adenokarzinomes der weiblichen Brustdrüse. Eine Zellisolation erfolgte ursprünglich im Jahr 1970 aus einem malignen Pleuraerguss einer 69-jährigen Patientin [32]. Die MCF 7 Zellen zeichnen sich durch eine Expression des Östrogenrezeptors aus und können durch den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) inhibiert werden [33, 34].

MDA MB 231 sind ebenfalls Zellen eines humanen Adenokarzinoms der weiblichen Brustdrüse und wurden aus einem malignen Pleuraerguss einer 51-jährigen Patientin isoliert. Die Zellen dieser Zelllinie exprimieren den epidermal growth factor (EGF) und den transforming growth factor α (TGF- α). Das Wachstum ist hochinvasiv [35].

Tabelle 2.2: Darstellung der verwendeten Biochemikalien

Biochemikalien	
96 Well Mikrottestplatte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Albumin Fraktion V	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Bio-Rad DC Protein Assay Reagenz A	Bio-Rad, München, Deutschland
Bio-Rad DC Protein Assay Reagenz B	Bio-Rad, München, Deutschland
Bio-Rad DC Protein Assay Reagenz S	Bio-Rad, München, Deutschland
Biosphere Filter Tips 10 µm, 100 µm, 1000 µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	Bio-Rad, München, Deutschland
CellTiter96@Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega Medicine, Wisconsin, USA
ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare, München, Deutschland
Elektrophoresekammer XCell Sure Lock™	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorftubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fetales Kälberserum FKS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Filterpapier	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München, Deutschland
MagicMark™XP Western Standard	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Multistepper	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Novex®Sharp Pre-Stained Protein Standards	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPage Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPage®Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPage®Gel 10 % Bis-Tris Gel	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPage®Gel 4-12 % Bis-Tris Gel	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPage®LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPage®MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPage®Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Pipettierhilfe	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail for use with mammalian cell and tissue extracts	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
PVDF Membran Amersham Hybond™	GE Healthcare, München, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Sarstedt-Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
SDS (Sodiumdodecylsulfat) 20 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Serological Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml, 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
SpongePad for XCell II™ Blotting	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tissue culture flask 25 cm ³ , 75 cm ³	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypitanblau 0,5 %	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin-EDTA	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
XCell II™ Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Walter GmbH, Kiel, Deutschland
Zellschaber 2 Positionsklinge 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hydrogenchlorid (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DAKO Cytomation Endogene Peroxidase Blocking Reagent Matrix-Metalloproteinase	DAKO, Glostrup, Dänemark
EnVision HRP	
DAB+Chromogen X50	DAKO, Glostrup, Dänemark
Hämalaun	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.3 METHODEN

2.3.1 IMMUNHISTOCHEMIE

THEORETISCHER Hintergrund: Diese Untersuchungsmethode bezeichnet die Anfärbung von Zellen oder Gewebestrukturen mit an Antikörper gekoppelten Farbstoffen. Antikörper sind Immunglobuline. Diese lassen sich in fünf Hauptklassen unterteilen: IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. Bei den

Tabelle 2.3: Darstellung der verwendeten Geräte

Geräte	
Bench NuAire Biological Safety Cabinets Model No NU-440-400E	NuAire Corp., Plymouth, MN, USA
ELISA-Reader Dynatech MR 5000	Dynatech Corp., Burlington, MA, USA
Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Inkubator Steri-Cult CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Kodak X-OMAT Multiloader 300	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Microplate Reader	Dynatech Corp., Burlington, MA, USA
Mikrowelle Modell R-332	Sharp Electronics, Hamburg, Deutschland
Schnellkochtopf P25307	Tefal, Rumilly, Frankreich
Vortex-Genie 2®	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Zentrifuge Rotina 48RC	Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Objektträger SuperFrost®	Menzel, Braunschweig, Deutschland

verschiedenen Färbungen kamen polyklonale und monoklonale Antikörper verschiedener Spezies zur Anwendung. Polyklonale Antikörper werden von vielen B-Lymphozyten-Zellklonen gebildet und reagieren mit unterschiedlichen Epitopen des Antigens, gegen welches sie generiert worden sind. Monoklonale Antikörper werden demgegenüber nur von einem Zellklon gebildet und haben nur eine Bindungsstelle für das Antigen. Daher sind sie weitaus spezifischer als polyklonale Antikörper. Die Spezifität und die Affinität des Antikörpers sind zusammen mit der Einwirkzeit entscheidend für die Festigkeit der Antikörper-Epitop-Bindung. Spezifische, im Gewebe vorhandene Proteine, sogenannte antigene Determinanten (AG), können mit enzymmarkierten (zum Beispiel Meerrettichperoxidase, Alkalische Phosphatase) Antikörpern (AK) reagieren. Bei der direkten Methode wird diese Reaktion genutzt, um durch den entstandenen Enzym-Substrat-Komplex eine Farbreaktion hervorzurufen. In der häufiger verwendeten indirekten Zwei-Schritt-Methode bindet zunächst ein unmarkierter Primärantikörper an das Antigen. Dann erst folgt das Aufbringen eines enzymmarkierten Sekundärantikörpers, welcher sich spezifisch an den unmarkierten Primär-AK bindet. Die dabei entstehenden AG-AK-Komplexe können lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Dafür werden Chromogene, die von entsprechenden Enzymen katalysiert werden, eingesetzt. Das erhaltene Farbsignal kann durch Aufbringen eines zweiten enzymkonjugierten Antikörpers (Tertiärantikörper) oder durch Zugabe eines löslichen Enzym-Immunkomplexes verstärkt werden. In dem Fall wird die Substrat-Chromogenlösung erst nach dem dritten Schritt aufgebracht. Der Sekundärantikörper bildet dabei eine Brücke zwischen Primär- und Tertiär-AK, bzw. zwischen Primär-AK und Enzym-Immunkomplex. Einfluss auf die Qualität des Ergebnisses haben multiple Faktoren. So spielen die Spezifität der AK, der Umgang mit dem zu untersuchenden Gewebe und damit der Erhalt der Antigenstrukturen, die fachgerechte Lagerung und Anwendung der Reagenzien sowie die Einhaltung von pH-Wert, Zeit- und Temperaturbestimmungen eine außerordentlich wichtige Rolle.

2.3.2 FÄRBEPROTOKOLL

ES wurden die im onkologischen Labor genutzten, standardisierten Methoden der immunhistochemischen Anfärbung der gesuchten Antigene verwendet. Es waren die wichtigsten Färbeparameter (Auswahl des primären AK, die Stärke seiner Verdünnung, die Dauer seiner Inkubationszeit sowie die Auswahl eines geeigneten AG-Retrievals) aufeinander abgestimmt worden. Im Rahmen der Etablierung der immunhistochemischen Färbemethoden waren Positivkontrollen an Geweben durchgeführt worden, die das Antigen ebenfalls enthielten. Hierfür wurden Präparate aus dem Bestand des Universitätsklinikums Kiel verwendet. Bei jeder Färbung wurden Substitutionskontrollen als Negativkontrollen mitgeführt. Hierbei konnten unspezifische Immunreaktionen des Sekundärantikörpers erkannt und

die Blockierung der Endogenen Peroxidase überprüft werden. Bei den Negativkontrollen kamen die Präparate nicht mit dem spezifischen AK, sondern mit dem Verdünnungsmedium des primären AK zur Inkubation. Bei regelrechtem Versuchsablauf konnten hierbei keine Immunreaktionen festgestellt werden. Alle Schritte wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.3.2.1 Vorbereitung

ZUR Deparaffinierung für die immunhistochemischen Arbeitsschritte wurden die Paraffinschnitte in Xylol getränkt und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe ($3 \times 100\%$, $2 \times 96\%$, $2 \times 70\%$ Ethanol) rehydriert. Hiernach wurden die Präparate in frischem Waschpuffer gelagert. Zwischen den einzelnen immunhistochemischen Arbeitsschritten erfolgte ebenfalls eine Überführung in Waschpuffer.

Bei den formalinfixierten Präparaten war zur Demaskierung der antigenen Bindungsstellen im Gewebe ein Antigen-Retrieval zur Durchführung der Färbungen nötig. Durch das Formalin entstehen Quervernetzungen, die eine Konformitätsänderung der Epitopstrukturen zur Folge haben. Einige Antigene reagieren auf eine Formalinfixierung sensibler und verlieren durch diese intra- und intermolekulare Quervernetzungen ihre Immunreaktivität. Die Quervernetzungen können durch ein heat induced epitope retrieval (HIER) durch Hitzeeinwirkung und mittels eines geeigneten Puffers wieder aufgebrochen werden. Das Retrieval bezeichnet also die Renaturierung eines Antigens und damit die Wiederherstellung seiner Immunreaktivität.

Hierbei wurden die Schnittpräparate in dem entsprechenden Puffer (siehe Tabelle 2.4 und Tabelle 2.5) gelagert und teilweise für eine für das Standardverfahren ermittelte Zeit erhitzt (Mikrowelle, Dampfdrucktopf). In einer folgenden Abkühlungsphase von 20 min Dauer wurden die Schnittpräparate erst bei Raumtemperatur und dann unter langsam fließendem Leitungswasser bis auf Raumtemperatur herunter gekühlt. Anschließend wurden die Präparate dreimal für je eine Minute mit frischem Waschpuffer gewaschen.

Nach Abschluss dieser Arbeitsschritte wurde die Endogene Peroxidase zur Vermeidung einer unspezifischen Hintergrundfärbung blockiert. Das erfolgte mit DAKO Cytomation Endogene Peroxidase Blocking Reagent für 20 min bzw. 30 min Minuten in den Färbungen von VEGFR 1 und 2, PDGFR- α und PDGFR- β sowie Flt-3 bzw. mit Matrix-Metalloproteinase in Tris-Puffer für die c-Kit-Darstellung (siehe Tabelle 2.4) Danach wurden die Präparate wiederum drei Mal für je 1 min mit frischem Waschpuffer gewaschen.

Um unspezifische Bindungsreaktionen der Primärantikörper an freien Antigenen im Gewebe zu verhindern, wurden die Gewebeschnitte in einem verdünnten Serum inkubiert. Dieses stammte aus der Tierspezies, von der der Sekundärantikörper hergestellt wurde. Die verdünnten Seren wurden anschließend nur abgegossen bevor der primäre Antikörper aufgebracht wurde.

2.3.2.2 Primäre Antikörper

IM Anschluss erfolgte die Inkubation der Paraffinschnitte mit dem jeweiligen unkonjugierten primären Antikörper in der feuchten Kammer. Die dafür optimale Verdünnung war in der Austestung durch Verdünnungsreihen im Rahmen der Entwicklung der Standardmethode bestimmt worden. Außerdem waren die bestmöglichen Inkubationsbedingungen (Zeit und Temperatur) und ein funktionierendes Detektionssystem ermittelt worden (siehe Tabelle 2.4). Anschließend erfolgte eine Waschung in TBS-Waschpuffer.

Tabelle 2.4: Verwendete Antikörper, Retrieval, Block und Inkubationszeiten der immunhistochemischen Färbung

Name	Retrieval	Endog. Peroxidase Block	Hintergrund Block	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper	Tertiärer Antikörper
VEGFR 2	TEC, pH 7,8, Dampfkoctopf 3 min	Dako 20 min	Donkey NS 1 : 2; 20 min	RD AF 357 1 : 100 30 min	Jackson Imm. 705-065-147 1 : 200 30 min	Strept-Avidin-Kit/HRP 1 : 100 30 min
VEGFR 1	TEC, pH 7,8, Mikrowelle 20 min	Dako 20 min	Goat NS 1 : 5	Biozol VEGFR 1 Y103 1 : 200 45 min	Envision/HRP	Vectastain Avidin-Biotin Komplex-Lösung 30-60 min RT
c-KIT	TEC, pH 7,8, Dampfkoctopf 3 min	4% MMP in TRIS	NS	Dako A4502 CD 117, c-KIT 1 : 500 30 min	20-30 min RT	
FLT-3	TEC, pH 7,8, Mikrowelle 20 min	Dako 20 min	Goat NS 1 : 5	Cell Signal. #3462 rabbit mAb (8F2) 1 : 25 30 min	Envision/HRP	
PDGFR- α	Kein Retrieval	Dako 30 min	Goat NS 1 : 10	Santa Cruz (c-20) sc338 1 : 100 45 min	Envision/HRP	
PDGFR- β	1 mM/1 EDTA, pH 8,0 Mikrowelle 20 min	Dako 20 min	Goat NS 1 : 5	Cell Signal. #3169 (28E1) 1 : 50 45 min	Envision/HRP	

Tabelle 2.5: Inhaltsstoffe der verwendeten Puffer, jeweils auf 10 Liter aufgefüllt mit destilliertem Wasser

Puffer	pH	Inhaltsstoffe
TBS-Puffer (Waschpuffer)	7,4	83,6 g NaCl, 12 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 11 ml 25 % HCl
TEC-Puffer	7,8	2,5 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 5 g EDTA
Tris-EDTA-Puffer mit Tween	9,0	12,1 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 3,7 g EDTA, 3,2 g Tri-Natrium-Citrat, 5 ml Tween 20 (Polysorbat 20)

2.3.2.3 Sekundäre Antikörper

ES kamen zwei Methoden der Verwendung von enzymmarkierten Sekundärantikörper zur Anwendung.

HRP-METHODE (ENVISION)

DIE Meerrettichperoxidase (horseradish-peroxidase, HRP) wird aus der Wurzel der Meerrettichpflanze gewonnen. Durch Oxidation einer Häm-Gruppe durch einen Elektronen-Donor bildet sich ein sichtbar brauner, unlöslicher Komplex.

Die Meerrettichperoxidase ist bei dem EnVision-System zusammen mit dem markierten Sekundär-AK an einen Polymerkonjugat gekoppelt. Als Elektronen-Donor und damit Chromogen wurde DAB (3'3-Diaminobenzidin) eingesetzt. Eine schematische Darstellung ist der Abbildung 2.1 zu entnehmen.

Die Inkubationszeit der EnVision-HRP betrug nach Angaben des Herstellers 30 min. Der Sekundärantikörper wurde durch mehrere Waschungen in TBS-Puffer entfernt. Im Anschluss folgte die Entwicklung mittels des Chromogens DAB für 1–10 min. Die Einwirkzeit wurde bei einer sichtbaren Braunfärbung der mitgeführten Positivkontrolle beendet. Die Reaktion wurde mit Leitungswasser gestoppt.

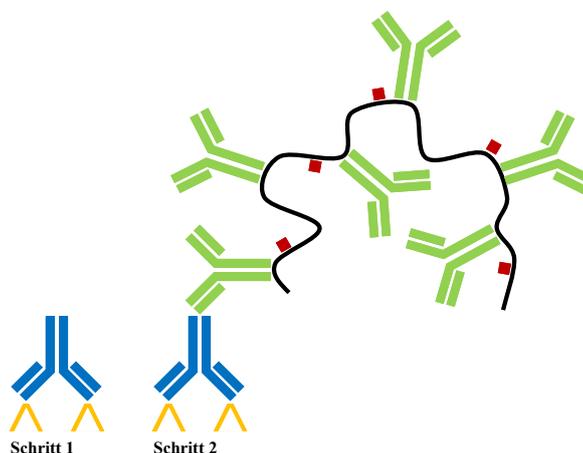


Abbildung 2.1: 2-Schritt EnVision™-Methode. Abbildungen modifiziert nach Boenisch et al [36].

(STREPT-)AVIDIN-BIOTIN-KOMPLEXMETHODE

BEI der (Strept-)Avidin-Biotin-Komplexmethode entsteht durch Vermengen von Strept-Avidin und einem biotinmarkiertem Enzym ein Komplex. Dieser Komplex bindet sich als tertiäre Markierung an den biotinylierten Sekundärantikörper. Als Enzym dient auch hier die Meerrettichperoxidase, die das Chromogen DAB zu einem unlöslichen braunen Farbstoff umsetzen kann. Schematisch ist diese Methode in der Abbildung 2.2 dargestellt.

Hierfür wurden die Präparate mit dem biotinylierten Sekundärantikörper für 30 min nach Angaben des Herstellers inkubiert. Nach erneuter Waschung erfolgte das Aufbringen der chromogenen Substratlösung (DAB) für 1–10 min, bis die gewünschte Braunfärbung eingetreten war. Auch hier wurde die Reaktion mit Leitungswasser gestoppt.

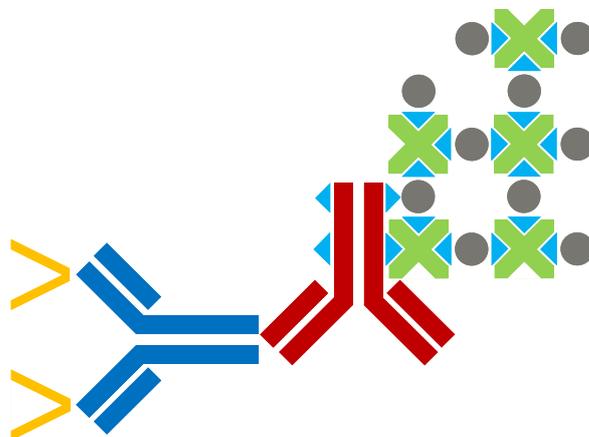


Abbildung 2.2: SABC-Methode für Enzymkomplexe. Abbildungen modifiziert nach Boenisch et al [36].

2.3.2.4 Kernfärbung und Eindeckeln

ZUR Darstellung der Zellkerne und des umliegenden Gewebes (Gegenfärbung) wurden die Präparate mit Mayers saurem Hämalaun für zehn Minuten inkubiert. Zum Nachbläuen folgte eine 30-minütige Spülung mit Leitungswasser. Anschließend erfolgte die Dehydratation der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe ($3 \times 100\%$, $2 \times 96\%$, $2 \times 70\%$ Ethanol) und dann das Einlegen in ein Xylolbad. Zur Einbettung wurden die Präparate mit einem Tropfen Eindeckmedium versehen und luftfrei mit einem Deckglas verschlossen. Die Aushärtung des Eindeckmediums erfolgte für mindestens zwei Stunden unter dem Abzug.

2.3.2.5 Auswertung

DIE Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte nach dem Immunreaktiven Score (IRS) [37]. Dieser Score berücksichtigt zum einen die Farbintensität (SI) sowie den Prozentsatz positiver Zellen (PP) im Gewebepreparat. Aus dem Produkt dieser beiden Parameter ergibt sich dann der Immunreaktive Score. Wie aus der Tabelle 2.6 zu entnehmen ist, kann der Score Werte zwischen 0 und 12 annehmen, wobei es sich bei 0 um ein Präparat ohne den Nachweis von positiven Zellen handelt.

$$IRS(0 - 12) = SI(0 - 3) \cdot PP(0 - 4)$$

Tabelle 2.6: Aufgliederung des immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner

SI-Einteilung	PP-Einteilung
0 = keine Farbreaktion	0 = keine positiven Zellen
1 = schwache Farbreaktion	1 = 0 – 10 % positive Zellen
2 = mäßige Farbreaktion	2 = 10 – 50 % positive Zellen
3 = starke Farbreaktion	3 = 51 – 80 % positive Zellen
	4 = 81 – 100 % positive Zellen

Mit einem Lichtmikroskop wurden in 400 facher Vergrößerung durch zwei unabhängige Untersucher fünf Gesichtsfelder mit 100 Zellen ausgezählt. Getrennt voneinander wurde darauf der immunreaktive Score nach dem obigen Schema ermittelt. Aus den 10 erhaltenen Werten wurde der Mittelwert berechnet. Ein IRS von 0-4 wurde als schwache Expression bezeichnet, ein IRS von 5-12 als starke Expression.

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm SPSS verwendet. Die Ermittlung der Signifikanz erfolgte über Kreuztabellen und den Chi-Quadrat-Test. Dabei wurden die einzelnen untersuchten Rezeptortyrosinkinasen sowohl mit der Tumorentität, dem Grading, dem Nodalstatus, dem Vorhandensein von Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie Her2-neu, der Expression der anderen untersuchten Rezeptortyrosinkinasen und, sofern nachweisbar, der Expression der Rezeptortyrosinkinasen auf den korrespondierenden Lymphknoten verglichen. Als statistisch signifikant galt ein p -Wert $< 0,05$.

2.3.3 ZELLKULTUR

DIE Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an Präparations- und Sterilbänken durchgeführt. Zur Langzeitaufbewahrung wurden MCF 7 und MDA MB 231 in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach der Entnahme wurde das Zellaliquot im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Es erfolgte die Aufschwemmung (Suspension) der Zellen in 5 ml Zellkulturmedium. Im Anschluss wurden die Zellen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und die Zellen in eine T75 Zellkulturflasche überführt. Nach ca. 2-3 Passagen konnten diese für die Versuche verwendet werden.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte mit RPMI 1640 Medium, dem 10 % fetales Kälberserum FKS und 30.000 IU Penicillin/Streptomycin hinzugefügt wurden. Es folgte eine sterile Filtration. Die Kultivierung der Zelllinien fand durch Inkubation bei 37 °C und 5 % CO² im Brutschrank statt. Alle 2-3 Tage erfolgte standardmäßig ein Mediumwechsel um eine optimale Versorgung der Zellen sicherzustellen. Bei einer Konfluenz von 70-80 % (Subkonfluenz) wurde eine Passagierung/Subkultivierung durchgeführt. Damit wurde eine Hemmung des Wachstums durch Kontakt der Zellen vermieden. Für die Subkultivierung wurde zunächst das Medium aus der T75-Flasche abgesaugt und die Zellen wurden mit 10 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen. Daraufhin erfolgte eine Zugabe von 3 ml Trypsin-EDTA, um die Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Die Zellkulturflaschen wurden für 10 min im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Um die Trypsinwirkung zu stoppen, wurden nach 10 min 7 ml Medium hinzugegeben. Nach mehrmaligen resuspendieren wurde die Lösung in ein Falcon-Tube überführt, welches bei 1350 rpm für 10 min zentrifugiert wurde. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Zellpellet mit 5 ml Medium resuspendiert. Von der Suspension wurde die jeweils benötigte Verdünnung in neue Zellkulturflaschen gegeben, diese mit 13 ml Medium aufgefüllt und inkubiert.

Zu verschiedenen Zeitpunkten der Zellkulturversuche wurde eine Lebendzellzahlbestimmung mit der Trypanblaumethode durchgeführt. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblau versehen und diese anschließend in einer Neubauerzählkammer ausgezählt.

2.3.3.1 *Western Blot*

THEORETISCHER Hintergrund: Der Western Blot ist ein Verfahren zur Identifizierung spezifischer Proteine aus einem Proteingemisch, hier einem Zelllysate. Dazu müssen die Proteine zunächst mittels einer Acylamidgel-Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Hier wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamid-Gel-Electrophoresis = SDS-Page) durchgeführt. Mittels SDS-Page erfolgt die Auftrennung der

Proteine und Bestimmung ihrer relativen Molekularmassen. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein stark anionisches Detergens, welches stark an Proteine bindet. Aufgrund dieser konstanten negativen Ladungsverteilung wandern alle Proteine während der Elektrophorese zur Anode. Hierbei ist die zurückgelegte Strecke umgekehrt proportional zum Molekulargewicht der Proteine [38].

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung werden die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF-)Membran transferiert, auf welcher sie aufgrund hydrophober und polarer Wechselwirkungen anhaften. Nach Herauswaschen des SDS können die Proteine teilweise renaturieren und sind somit einer Immundetektion spezifischer Primärantikörper zugänglich. Wie bei der Immunhistochemie erfolgt dann das Auftragen eines an Meerrettichperoxidase gebundenen Sekundärantikörpers. Das Visualisieren des so entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexes geschieht mittels Chemilumineszenz (Enhanced Chemilumineszenz = ECL). Das Prinzip der Chemilumineszenz beruht auf der Anregung von Elektronen durch eine enzymatische Reaktion. Kehren die Elektronen durch Einfall von Licht in ihren Grundzustand zurück, so geben sie Energie ab, die im Bereich des sichtbaren Spektrums liegt. Hier wurde die durch Meerrettichperoxidase katalysierte Oxidation von im ECL-Reagenz enthaltenden Luminol (zyklisches Diazylhydrazid) in alkalischem Milieu genutzt. Die maximale Lichtemission wird bei einer Wellenlänge von 428 nm erreicht. Die Detektion erfolgt auf einem für diese Wellenlänge sensitiven Röntgenfilm, indem eine Schwärzung des photographischen Films sichtbar wird. Das so erhaltene Bandenmuster spiegelt die Verteilung der Proteine im Originalgel exakt wieder [39].

VORBEHANDLUNG MIT SU11248

VOR dem Beginn der Proteinextraktion der Mammazelllinien wurden diese einer Behandlung mit SU11248 unterzogen. Zunächst wurden aus subkonfluenten Zellkulturflaschen definierte Zellzahlen (MCF-7 2,5 Millionen, MDA MB 231 750.000) in jeweils wieder acht Flaschen umgesetzt. Ziel war es, zu Beginn der Proteinextraktion wieder eine Subkonfluenz (70–80 % Konfluenz) der Zellen zu erreichen. Bei der vorgegebenen Zellzahl wuchsen die Zellen in RPMI 1640 mit 10 % FKS für 48 Stunden. Am dritten Tag erfolgte ein Mediumwechsel auf RPMI 1640 mit 0,1 % FKS für 24 Stunden. Danach wurde serumfreies Medium für 12 Stunden aufgebracht. Die Hälfte der Zellkulturflaschen erhielt des Weiteren einen Zusatz von SU11248 in der Konzentration von 100 nM/µl in das serumfreie Medium. Die andere Hälfte der Flaschen fungierte als Kontrolle und wurde ohne SU11248 inkubiert.

ZELLSTIMULATION

NACH 12 Stunden wurde das serumfreie Medium von dem Zellrasen entfernt. Um den Nachweis der phosphorylierten Rezeptortyrosinkinasen zu erbringen, erfolgte die Stimulation der Zellrezeptoren der Zellkulturen mit dem dazugehörigen Wachstumsfaktor (SCF, VEGF, PDGF-BB) für verschiedene definierte Zeiten. Die Konzentrationen und Inkubationszeiten können der Tabelle 2.7 entnommen werden. Zudem wurde ein Leerwert als Kontrolle mitgeführt.

Tabelle 2.7: Konzentration und Inkubationszeiten der verwendeten Liganden

Ligand	Konzentration	Zeiten in Minuten
VEGF	100 ng/ml	1, 5, 10
SCF	50 ng/ml	5, 15, 30
PDGF-BB	10 ng/ml	5, 15, 30

PROTEINEXTRAKTION

BEI der Proteingewinnung wurde das Prinzip der Denaturierung (Hitze und SDS) angewendet. Es wurden subkonfluente Zellkulturen mit einer Konfluenz < 80 % für die Versuche verwendet. Der spezifische Ligand wurde für die definierten Zeiten (5 min, 15 min und 30 min) aufgebracht und

anschließend wieder entfernt. Die Zellen wurden dann mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und die Waschlösung ebenfalls entfernt. Als Lysis-Puffer erfolgte das Aufbringen von 2 ml 1 % SDS. Die Zellen wurden mittels Zellschaber von der Wand der Flasche gelöst und die Suspension in ein 1,5 ml-Eppendorftube überführt. Die Zellsuspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte das Erhitzen für 10 min bei 99 °C und 300 rpm im Thermomixer. Im Anschluss wurde das Eppendorftube erneut auf Eis gelagert und dann in der auf 4 °C gekühlten Zentrifuge 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und weiter verwendet. Pro 50 µl Proteinlösung wurden jeweils 1 µl Protease- und Phosphataseinhibitor hinzugefügt und die Proteine bei −20 °C weggefroren.

BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION NACH BRADFORD

DER Proteingehalt der Zell-Lysate wurde im Verfahren nach Bradford [40] photometrisch ermittelt. Diese Methode nutzt die Bindung des Farbstoffes Comassie-Brilliant-Blue G250 an Proteine im sauren Milieu. Dadurch wird das Absorptionsmaximum der Farbe auf 595 nm erhöht. Die Zunahme der Absorption im Vergleich zu verschiedenen Mengen des Standardproteins BSA ist hierbei ein Maß für die Proteinkonzentration der Probe. Aus den Extinktionswerten des BSA-Standards ließ sich eine Eichgerade erstellen, mit deren Hilfe die Konzentration der Proteine in den Proben ermittelt werden konnte.

SDS-PAGE

ZUR Auftrennung des Blots wurde das MiniGel System XCell verwendet. Es wurden 4–12 %ige Bis-Tris-Gradientengele mit 10 Taschen à 25 µl benutzt. Nach Einbau der Gele in die „XCell SureLock Mini Cell“ Elektrophoresekammer wurde diese mit MOPS-Laufpuffer (3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure) gefüllt. In der inneren Kammer wurde dem Laufpuffer noch 500 µl Antioxidant zugegeben. Durch die Kombination des Gradientengels mit dem MOPS-Puffer war die Auftrennung der Proteine im erwarteten Molekulargewichtsbereich am besten.

PROTEINANSATZ:

- 15 µl/20 µl/30 µl Proteine
- 2,5 µl Reducing agent
- 6,25 µl sample buffer

Entsprechend der Proteinmenge wurde mit destilliertem Wasser bis zu einer Gesamtmenge von 25 µl aufgefüllt

Die Proben wurden bei 95 °C im Thermomixer inkubiert und anschließend in die Taschen des Gels eingebracht. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanten 200 Volt für 60–70 Minuten.

PROTEINTRANSFER

DER Transfer erfolgte mit dem XCell II Blot Module, in dem die PVDF-Membran laut den Herstellerangaben in ein Sandwich mit dem proteintragenden Gel, Schwämmen und Filterpapier gepackt wurde. Die PVDF-Membran musste zur Aktivierung 30 Sekunden in Methanol liegen. Anschließend wurde es zusammen mit dem Filterpapier und den Schwämmen in Blottingpuffer eingeweicht. Nach dem Packen des Sandwichs wurde das Modul mit Blottingpuffer gefüllt. Die äußere, das Modul umgebene Kammer, wurde zur Vermeidung der Überhitzung mit destilliertem Wasser gefüllt. Die Dauer des Transfers belief sich bei konstanten 30 Volt auf 60 Minuten. Nach abgeschlossenem Transfer wurde die Membran in ein Falcon-Tube überführt und 5 Minuten mit TBS gewaschen.

PROTEINNACHWEIS

VOR der Detektion der gesuchten Proteine mussten noch die unbesetzten Protein-bindungsstellen mit Blockierlösung abgesättigt werden. Hierzu wurde die Membran mit 20 ml 5%igem Magermilchpulver in TBS mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rolling Mixer inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper in der spezifischen Konzentration (Tabelle 2.8) in 5 ml 5%igem MMP in TBS aufgebracht. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Rolling Mixer. Am nächsten Tag waren zunächst drei Waschschrte mit je 30 ml TBS für jeweils 5 Minuten notwendig, bevor der, dem primären Antikörper entsprechende, mit Meerrettichperoxidase markierte, sekundäre Antikörper (Anti-Kaninchen) aufgebracht werden konnte. Dieser verblieb für eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran. Nach der Inkubation erfolgten erneut drei Waschschrte mit je 30 ml TBS à 30 Minuten. Die Membran wurde nun aus dem Falcon Tube entnommen und mit dem ECL-Reagenz bedeckt. Nach einer Einwirkzeit von drei Minuten wurden die Membranen in einer Röntgenkassette in die Dunkelkammer überführt. Dort wurde der Röntgenfilm für unterschiedliche Zeiten zum Belichten auf die Membran gelegt und anschließend entwickelt. Das entsprechende Molekulargewicht wurde anhand der mitgeführten Standard-Leitern ermittelt.

Tabelle 2.8: Spezifische Konzentrationen und Herkünfte der verwendeten Antikörper für den Protein-nachweis

Antikörper	Herkunft	Verdünnung
Phospho-PDGFR- α (Tyr 1021)	Kaninchen, monoclonal	1:200
Phospho-PDGFR- β (Tyr 720)	Kaninchen, polyclonal	1:100
Phospho-c-Kit (Tyr 719)	Kaninchen, polyclonal	1:500
Phospho-VEGFR 2 (Tyr 951)	Kaninchen, monoclonal	1:200
Sekundärer Antikörper	Anti-Kaninchen	1:2000

2.3.3.2 Proliferationsassays

UM die Wirkung von SU11248 auf die Proliferation der Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231 in vitro zu testen, wurden verschiedene Proliferationsassays auf 96-well-Platten durchgeführt. Ziel dieser Versuche war es, eine ungefähre Annäherung an die IC50 von SU11248 zu erhalten. Die IC50 bezeichnet die mittlere inhibitorische Konzentration und ist somit die Konzentration einer Substanz, die für die 50%ige Inhibierung in vitro notwendig ist [41].

Von der Herstellerfirma Pfizer wurde die aktive Konzentration von SU11248 zur Hemmung der Ziel-Rezeptortyrosinkinase in einem Bereich zwischen 10 nmol und 50 nmol angegeben. Eine Konzentration unter 300 nmol für die mittlere inhibitorische Konzentration wird angestrebt, da höhere Konzentrationen der Substanz in vivo nicht erzielt werden sollten, da sie wahrscheinlich aufgrund der Toxizität pharmakologisch irrelevant für die klinische Anwendung sind.

Für die Proliferationsassays wurden subkonfluente T75 Zellkulturflaschen verwendet. Die Zellen wurden zunächst mit 13 ml PBS gewaschen, das PBS abgesaugt, 3 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und die Zellkulturflaschen für 10 Minuten zurück in den Inkubator gestellt. Dann wurde die Trypsinreaktion mit 7 ml Medium gestoppt und die nun von der Wand der Zellkulturflasche in Medium gelösten Zellen in ein Falcon-Tube überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 1350 U/min für 5 min. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 5 ml Medium resuspendiert.

Die Ermittlung der Zellkonzentration wurde in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Es wurden 10 μ l der Zellsuspension und 10 μ l Trypanblau zusammen in ein Eppendorf Tube gegeben. Von dieser Mischung wurden 10 μ l in die vorbereitete Neubauer-Zählkammer pipettiert und vier Quadranten ausgezählt. Die anschließend ausgerechnete Zellzahl/ μ l wurde dazu verwendet, die mittels Vorversuchen ermittelte Zellzahl in jede Vertiefung der 96-well-Platten zu geben.

Die insgesamt benötigten Zellen wurden mit Medium auf das benötigte Volumen gebracht und mittels einer Multipipette in die 96-well-Platten gebracht. Zunächst wurde in Vorversuchen eine geeignete Zellzahl bestimmt, damit bei Abschluss des Versuches in den einzelnen Vertiefungen eine Konfluenz von 80–90 % erreicht wird. Für MCF-7 entsprach die optimale Zellzahl 2000 Zellen/Vertiefung, für MDA MB 231 500 Zellen/Vertiefung. Zur Bestimmung der IC₅₀ von SU11248 wurden die Zellen zuerst auf der 96-well-Platte nach folgendem Schema (Tabelle 2.9) ausgesät und für 24 h bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 2.9: Inkubationsschema auf der 96-well-Platte

nmol/μmol	3000	1000	300	100	30	10	3	1	0,3	0,1	Zellen	Medium
SU												
SU												
SU												
SU												
PBS												
PBS												
PBS												
PBS												

Wie in Tabelle 2.9 sichtbar, wurden die einzelnen Konzentrationsstufen jeweils vierfach aufgetragen. Anschließend wurde aus den vier Messwerten das arithmetische Mittel gebildet. Da SU11248 eine gelbliche Färbung besitzt wurden in den letzten beiden Spalten Referenzwerte eingestellt: zum einen Zellen in dem Normalmedium, zum anderen nur Medium. Die SU11248-Verdünnung wurde aus einer 10 nmol Stocklösung hergestellt, welche als Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfid) enthielt.

Das PBS wurde analog der jeweilig verwendeten Medikamentenkonzentration aufgetragen und inkubiert, um den beobachteten Effekt des Medikamentes zu ermitteln und eine Wirkung, die allein auf das Lösungsmittel zurückzuführen ist, auszuschließen.

Nach 24 Stunden waren die Zellen angewachsen. Das Medium wurde abgesaugt und die Vertiefungen wurden mit der jeweiligen Menge an Medium wieder aufgefüllt. Nun erfolgte die Zugabe von SU11248 und PBS in die erste Spalte. Mit der Mehrkanalpipette wurde nun von der ersten Spalte nach obigem Schema nach rechts weiterverdünnt.

Als weiterer Parameter wurden die Proliferationsversuche mit DMSO in analogen Verdünnungsstufen statt reinem PBS durchgeführt. Dimethylsulfid (DMSO) ist in hohen Konzentrationen zytotoxisch [42]. Da die SU11248-Stocklösung auf DMSO-Basis hergestellt wurde, sollte so eine zytotoxische Wirkung aufgrund einer hohen Konzentration des Lösungsmittels ausgeschlossen werden.

Nach 48 bzw. 72 Stunden Inkubation wurde das Zellwachstum mittels MTS-Test gemessen. Dafür wurden die Zellen in Zellkulturmedium unter Zugabe von 20 μl Celltiter 96 Aqueous One Solution Assay für eine Stunde inkubiert.

Das Prinzip dieses Assays beruht auf dem Umsatz einer Tetrazoliumverbindung (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-Tetrazolium, MTS) in ein wasserlösliches Formazan durch zelluläre Dehydrogenasen. Da diese nur in lebenden Zellen aktiv sind, kann die Umwandlung von MTS als Maß für die Vitalität der Zellen angesehen werden [43]. Die Absorption des entstandenen Produktes wurde bei 490 nm im ELISA-Reader gemessen.

2.3.3.3 *FKS-Entzugsversuche*

DIE Inkubation mit einem Hungermedium, welches statt der üblichen 10% FKS nur 2% oder gar kein FKS enthält, bewirkt eine Arretierung der Zellen in der G0-Phase des Zellzyklus und somit eine Synchronisation des Wachstumsverhaltens [44]. Dazu wurden die Zellen in den Vorversuchen ermittelten Konzentrationen aufgebracht und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit waren die Zellen am Boden der Vertiefungsplatten angewachsen. Das Medium wurde abgesaugt und durch 2%iges FKS- bzw. serumfreies Medium ersetzt. Die Platten wurden dann wiederum 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach obigem Schema (Tabelle 2.9) SU11248- und Kontrollmedium aufgebracht und 48 Stunden inkubiert.

Die Messung und Auswertung erfolgte ebenfalls nach dem Prinzip des MTS-Assays mit dem ELISA-Reader.

 ERGEBNISSE

3.1 IMMUNHISTOCHEMIE

3.1.1 DESKRIPTIVE STATISTIK

ZUR Auswertung kamen 158 paraffin-gebettete Stanzbiopsien von Mammakarzinomgewebe mit 59 Stanzbiopsien von korrespondierenden Lymphknoten. Als interne Kontrolle diente normales Brustgewebe, welches aus Reduktionsplastiken stammte.

Insgesamt zeigte sich eine meist moderate oder hohe VEGFR 1-Expression (77 %) und mit 51,8 % eine moderate oder hohe Expression von PDGFR- α auf den Zellen des Primärtumors. VEGFR 2 ist zu 44,4 % moderat oder stark exprimiert. Auf den Zellen des Primärtumors findet sich zum größten Teil eine eher niedrige Expression von PDGFR- β (99,7 %), c-Kit (98,5 %) und Flt3 (99,2 %). Wie aus der Tabelle 3.1 zu entnehmen, wurde eine niedrige Expression bei einem IRS von 0-4 und eine moderate bis hohe Expression bei einem IRS von 5-12 definiert. Die Tabelle 3.1 und die Abbildung 3.3 zeigen die Expression der Rezeptoren auf dem Primärtumor nach dem IRS. Mikroskopische Bilder der immunhistochemischen Färbungen werden in den Abbildungen 3.1 gezeigt.

Die Gewebeproben der korrespondierenden Lymphknoten zeigten immunhistochemisch keine Expression von PDGFR- β , c-Kit und Flt3. Die starke Expression von VEGFR 1 spiegelte sich auch auf den korrespondierenden Lymphknoten wieder (81,6 %). PDGFR- α war mit 48 % sowie VEGFR 2 mit 34,2 % moderat oder stark exprimiert und korreliert damit ebenfalls mit dem Ausmaß der Expression auf dem Primarius. Die Expression der Rezeptoren auf den Lymphknoten-Metastasen kann der Tabelle 3.2 sowie der Abbildung 3.3 entnommen werden.

Tabelle 3.1: Expression der Rezeptoren auf dem Primärtumor nach IRS

	Anzahl Proben	%
c-Kit		
IRS 0-4 (schwach)	128	98,5
IRS 5-12 (stark)	2	1,5
Flt3		
IRS 0-4 (schwach)	122	99,2
IRS 5-12 (stark)	1	0,8
PDGFR- α		
IRS 0-4 (schwach)	67	48,2
IRS 5-12 (stark)	72	51,8
PDGFR- β		
IRS 0-4 (schwach)	150	99,3
IRS 5-12 (stark)	1	0,7
VEGFR 1		
IRS 0-4 (schwach)	26	23
IRS 5-12 (stark)	87	77
VEGFR 2		
IRS 0-4 (schwach)	65	55,6
IRS 5-12 (stark)	52	44,4

3.1 Immunhistochemie

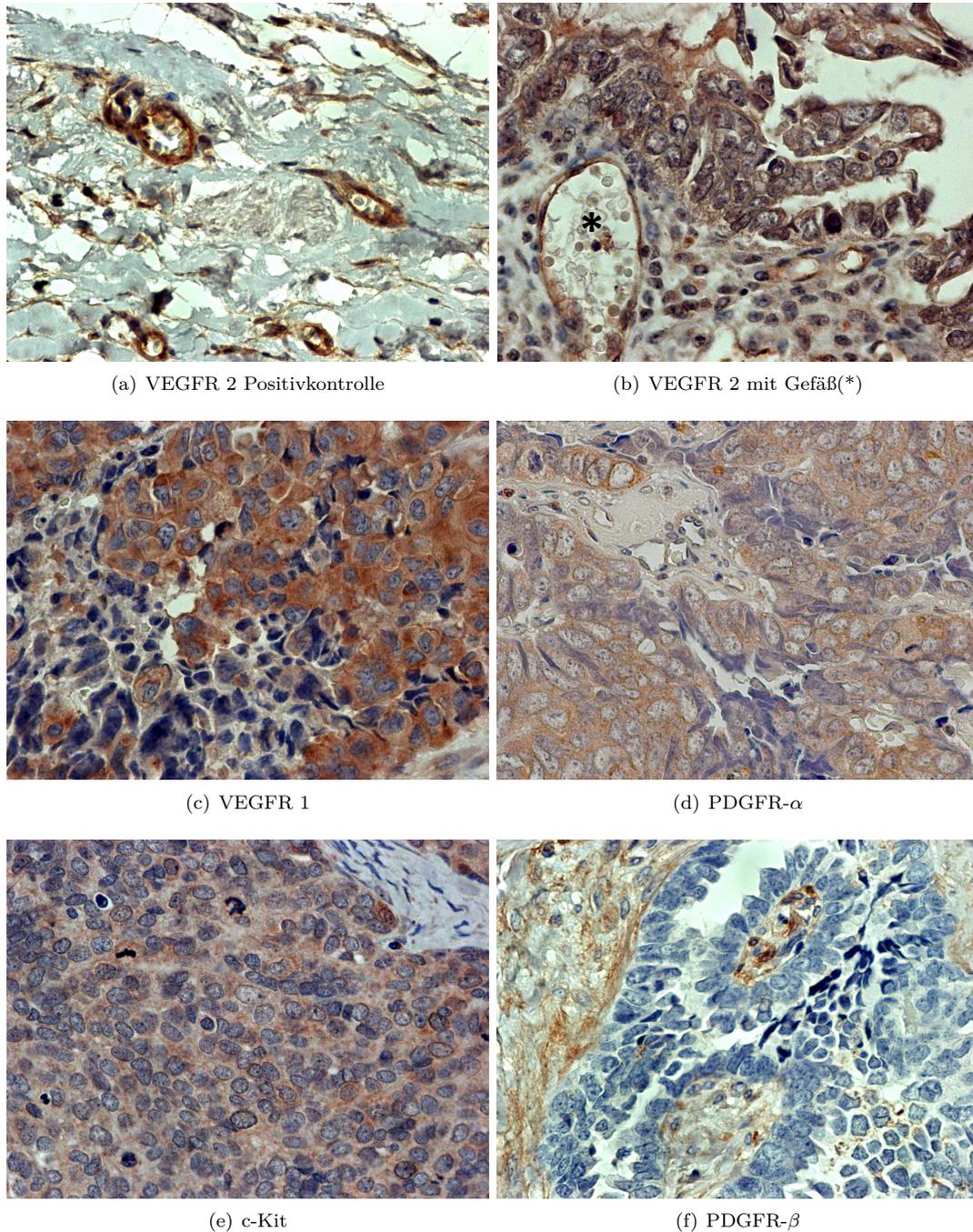


Abbildung 3.1: Immunhistochemische Färbung (400 \times Vergrößerung) von a) VEGFR 2 Positivkontrolle, b) VEGFR 2 mit Gefäß, c) VEGFR 1, d) PDGFR- α , e) c-Kit und f) PDGFR- β

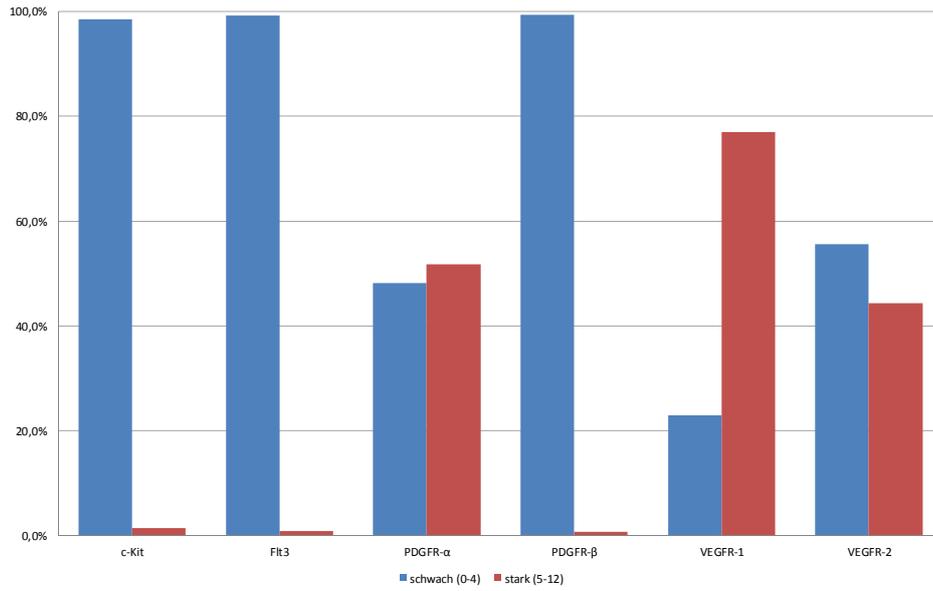


Abbildung 3.2: Expression der Rezeptoren auf den Primärtumoren

Tabelle 3.2: Expression der Rezeptoren auf den Lymphknoten-Metastasen. Keine Expression von Flt3, PDGFR-β und c-Kit nachweisbar.

	Anzahl Proben	%
PDGFR-α		
IRS 0-4 (schwach)	26	52
IRS 5-12 (stark)	24	48
VEGFR 1		
IRS 0-4 (schwach)	7	18,4
IRS 5-12 (stark)	31	81,6
VEGFR 2		
IRS 0-4 (schwach)	25	65,8
IRS 5-12 (stark)	13	34,2

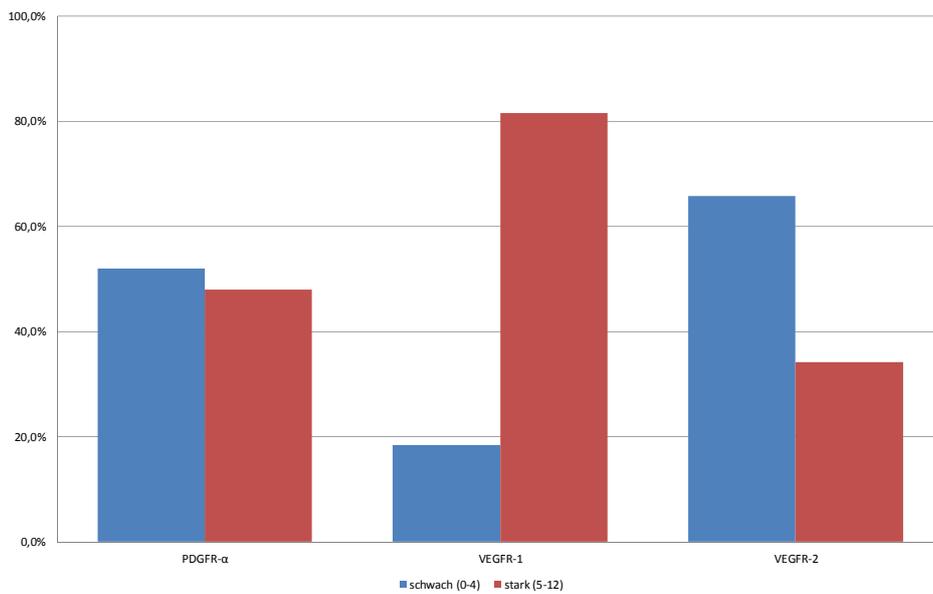


Abbildung 3.3: Expression der Rezeptoren auf den Lymphknoten-Metastasen

3.3 Proliferationsassays

3.1.2 ANALYTISCHE STATISTIK

SIGNIFIKANTE Korrelationen zeigten sich in der Expression der Rezeptortyrosinkinasen VEGFR 1 und VEGFR 2 des Primärtumors mit dem Nodalstatus ($p = 0,019$ bei VEGFR 1, $p = 0,035$ bei VEGFR 2), aber nicht mit dem Grading des Primarius ($p = 0,489$ bzw. $p = 0,581$).

Die Expression von VEGFR 2 auf dem Primärtumor korreliert hoch signifikant mit der Expression des Östrogen-Rezeptors auf dem Primärtumor ($p = 0,01$). Ebenso zeigte sich ein höchst signifikanter Zusammenhang zwischen der VEGFR 2-Expression des Primarius und der Expression dieser Rezeptortyrosinkinase auf den korrespondierenden Lymphknoten. Dieser konnte allerdings mit dem Spearman-Rho-Korrelationskoeffizienten nicht bestätigt werden.

Weitere Zusammenhänge zeigten sich in der Expression von PDGFR- α auf dem Primärtumor mit der Expression von VEGFR 1 auf den Lymphknotenmetastasen. Es fanden sich keine Korrelationen zwischen der Ausprägung der Rezeptortyrosinkinasen und dem Her2-neu-Status. Auch die Überlebensrate ließ sich nicht mit dem Vorhandensein der Rezeptortyrosinkinasen auf den Zellen des Primärtumors in Zusammenhang bringen. Die signifikanten Korrelationen aus der Analyse der Immunhistochemie sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

Tabelle 3.3: Signifikante Korrelationen aus der Analyse der Immunhistochemie

Rezeptor	Korrelation mit	Signifikanz ($p < 0,05$)
PDGFR- α	PDGFR- α in LK	0,014
PDGFR- β	PDGFR- β in LK	0,042
VEGFR 1	Nodalstatus	0,019
VEGFR 2	Nodalstatus	0,035
VEGFR 2	Östrogenrezeptorexpression	0,001
VEGFR 2	VEGFR 2 in LK	$< 0,001$

3.2 WESTERN BLOT

Es erfolgte der Nachweis von VEGFR 2, PDGFR- α und PDGFR- β sowie c-Kit auf den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA MB 231 nach Stimulation mit den jeweiligen Liganden. Zudem konnten die phosphorylierten und damit aktivierten Rezeptortyrosinkinasen nachgewiesen werden (Abbildungen 3.4). Ein Nachweis der gesteigerten Aktivierung, im Sinne einer Änderung der Bandenstärke, durch vorherige Stimulation mit den entsprechenden Liganden, gelang jedoch nicht. Es ließ sich lediglich ein indirekter Nachweis der Aktivierung erbringen, indem sich zeigte, dass die Bandenstärke von nicht phosphoryliertem PDGFR- β nach Stimulation abnahm. Zudem waren durch Vorbehandlung mit Sunitinib die Banden der nicht phosphorylierten Anteile von PDGFR- α und VEGFR 2 länger und stärker vorhanden. Die phosphorylierte Form des PDGFR- α zeigte hingegen eine Abnahme der Bandenstärke unter der Vorbehandlung mit Sunitinib.

3.3 PROLIFERATIONSASSAYS

3.3.1 MDA MB231

IN dem vergleichenden Versuch von SU11248 und DMSO zeigte sich durch beide Substanzen ein zytotoxischer Effekt im Sinne eines Abfalls der Absorption, welcher bei SU11248 in DMSO aus-

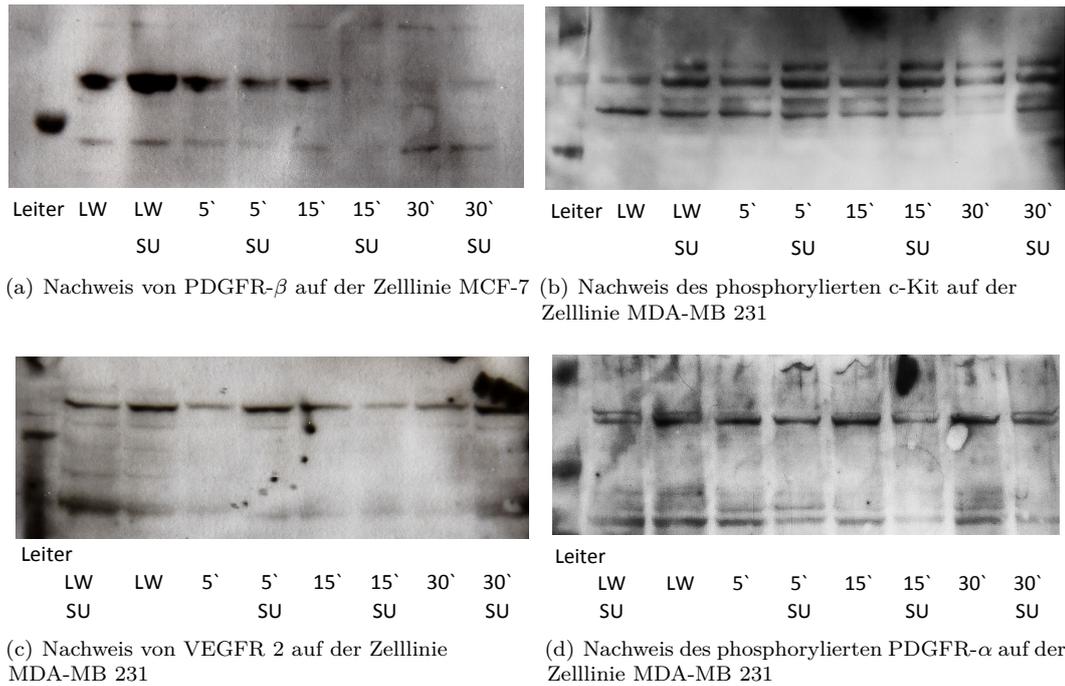


Abbildung 3.4: Nachweis von a) PDGFR- β auf der Zelllinie MCF-7, b) phosphoryliertem c-Kit auf der Zelllinie MDA-MB 231, c) VEGFR 2 auf der Zelllinie MDA-MB 231 und d) phosphoryliertem PDGFR- α auf der Zelllinie MDA-MB 231

geprägter war, als nur durch das Lösungsmittel. Die IC₅₀ lag jedoch deutlich über dem erwarteten Konzentrationsbereich unter 300 μ M [45] und damit außerhalb des physiologischen Bereiches.

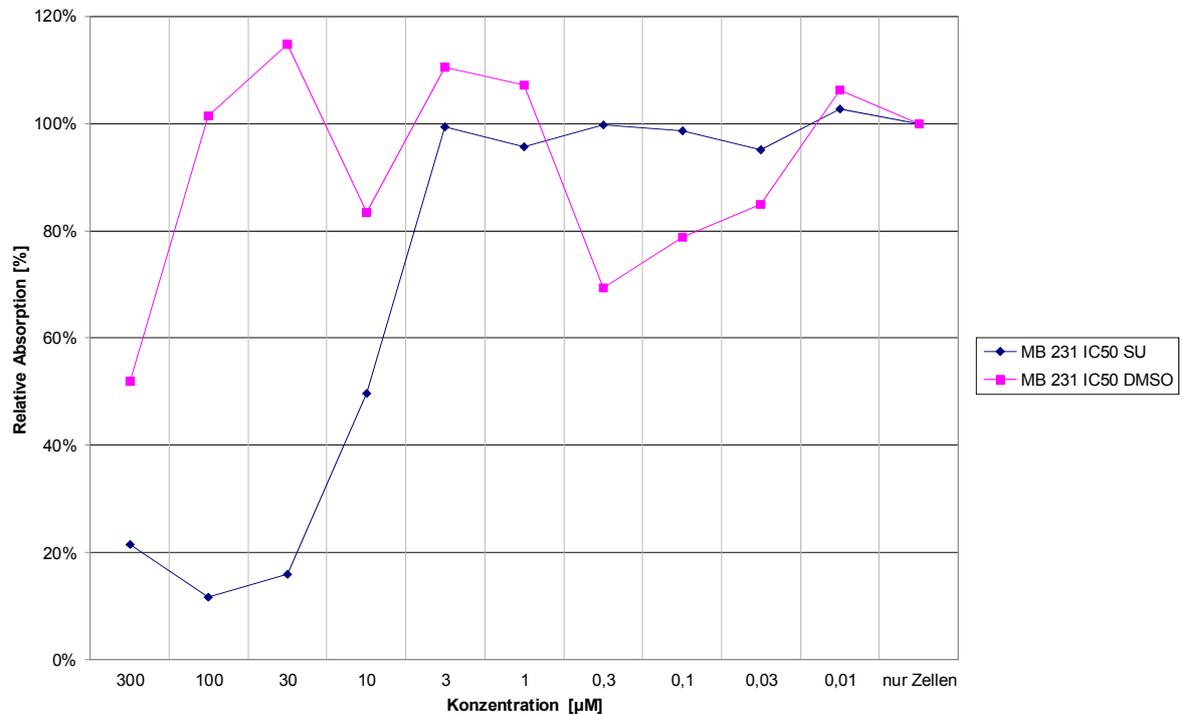


Abbildung 3.5: Relative Absorption bei 490 nm nach Inkubation der Zelllinie MDA MB231 mit SU11248 (Stocklösung) ber 48 h im Vergleich zu DMSO

3.3 Proliferationsassays

In den FKS-Entzugsversuchen mit 2% FKS in PBS bzw. PBS ohne FKS-Zusatz blieb die Extinktion sowohl bei den in SU11248 inkubierten Zellen als auch bei den Zellen, welche nur dem Medium ausgesetzt waren, konstant. Es ließ sich jedoch eine gleichbleibend niedrigere Absorption bei SU11248 darstellen (Abbildung 3.6).

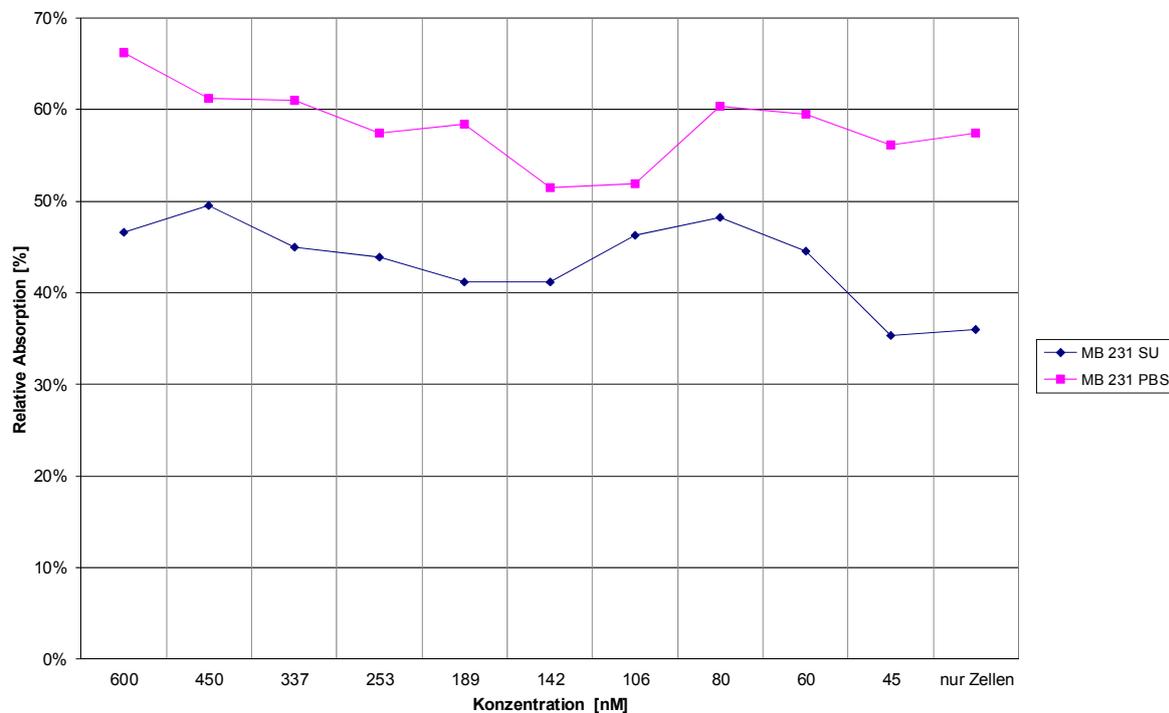


Abbildung 3.6: Relative Absorption bei 490 nm nach Inkubation der Zelllinie MDA MB231 mit SU11248 über 72 h im Vergleich zu PBS im serumfreien Medium

Aufgrund der sich präsentierenden Ergebnisse, der nicht oder nur in hohen Konzentrationen änderlichen Absorption und damit Zytotoxizität der Substanz SU11248, wurden die Proliferationsversuche mit Stocklösung in absteigender Konzentration, beginnend bei 300 mM, vorgenommen. Damit sollte eine Erweiterung des Bereiches der mittleren inhibitorischen Konzentration erreicht werden, auch wenn dieser in nicht erreichbaren *in vivo*-Konzentrationen lag.

Die Proliferationsversuche mit Inkubation der Zellen in der Stocklösung der Substanz wurden ebenfalls im Vergleich zu DMSO und PBS durchgeführt (Abbildung 3.5 und Abbildung 3.7). Dabei zeigte sich wie erwartet eine konstante Absorption und damit keine Beeinträchtigung des Zellwachstums durch PBS. Ein zytotoxischer Effekt des SU11248 ließ sich nachweisen. Jedoch lag die IC₅₀ mit 3 μ M und damit 3000 nM auch in diesen Versuchen reproduzierbar deutlich über dem angestrebten und klinisch möglichen Konzentrationsbereich. SU11248 wurde in Phase II Studien bei Patienten mit Mammakarzinomen bisher mit einer Tagesdosis von unter 40 mg eingesetzt [46, 47]. Eine Konzentration von 3000 nM entspricht jedoch einer Dosis von 1,5977 g.

3.3.2 MCF-7

DIE Proliferationsversuche wurden in gleichem Umfang auch mit der Zelllinie MCF-7 durchgeführt. Die Vergleichsversuche von SU11248 und DMSO zeigten einen minimalen Abfall der Absorption und damit einen zytotoxischen Effekt beider Lösungen im Konzentrationsbereich von 330 nM. Dabei zeigte sich ein gering stärker ausgeprägter zytotoxischer Effekt von SU11248.

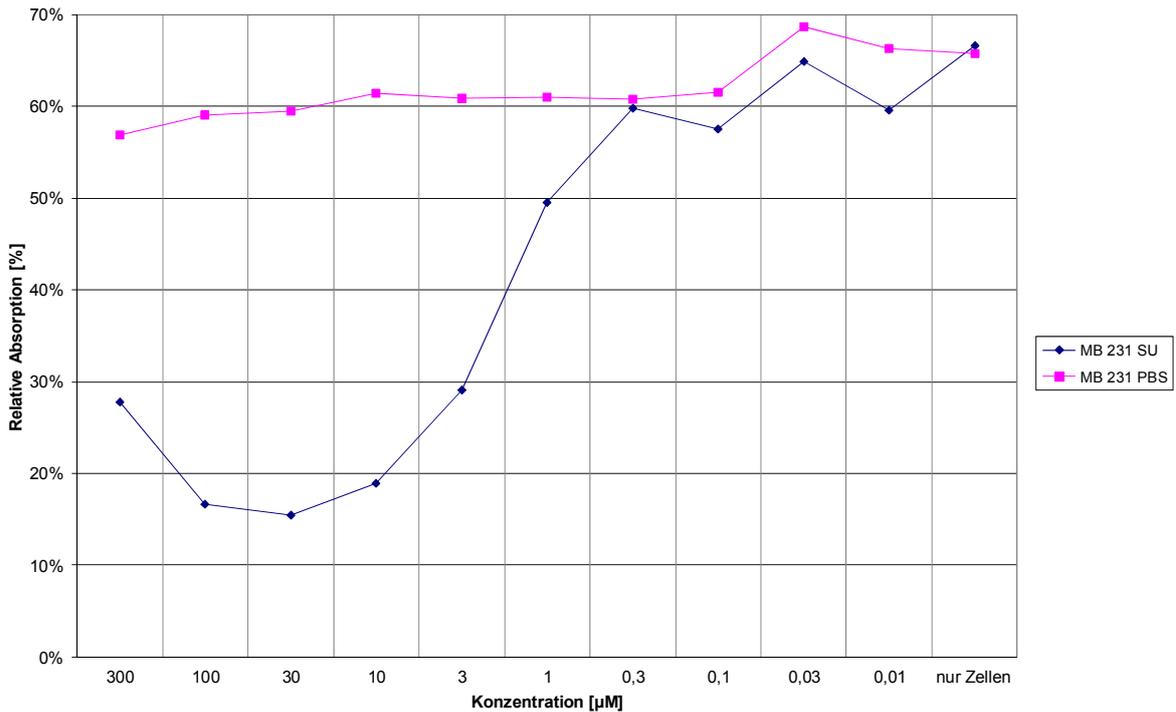


Abbildung 3.7: Relative Absorption bei 490 nm nach Inkubation der Zelllinie MDA MB231 mit SU11248 (Stocklösung) über 72 h im Vergleich zu PBS

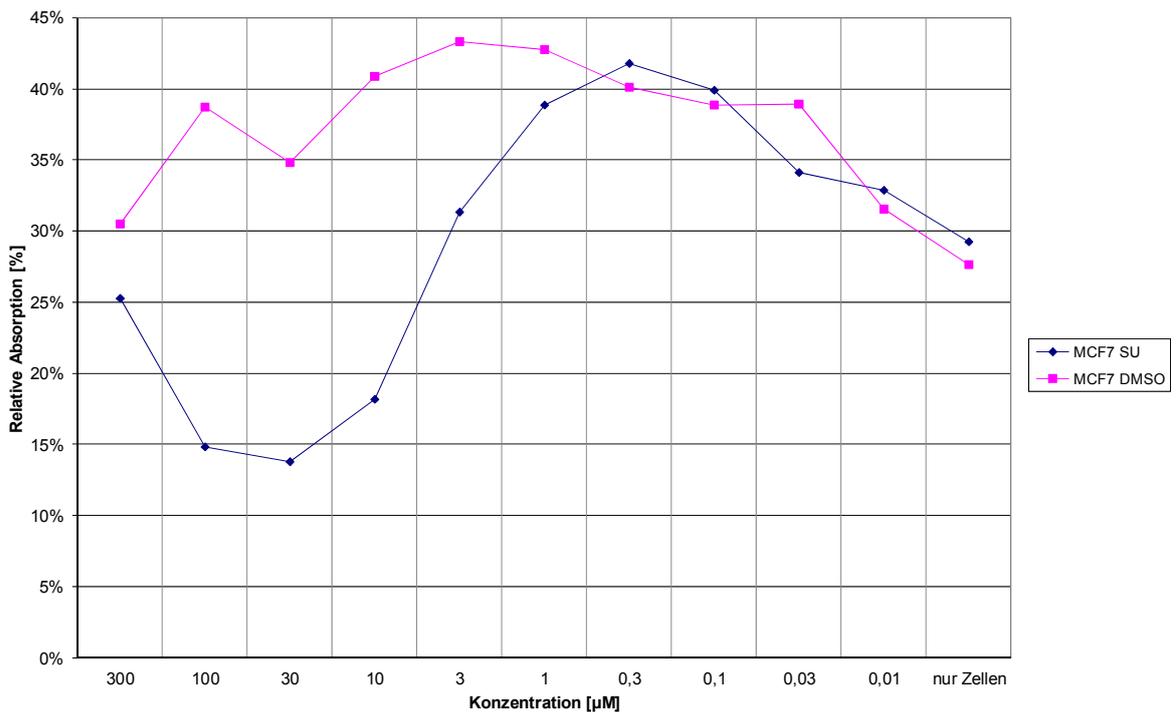


Abbildung 3.8: Relative Absorption bei 490 nm nach Inkubation der Zelllinie MCF-7 mit SU11248 (Stocklösung) über 48 h im Vergleich zu DMSO

Die FKS-Entzugsversuche ließen keinen zytotoxischen Effekt der Substanz SU11248 im nanomolaren Konzentrationsbereich gegenüber der Inkubation mit PBS ohne bzw. mit 2% FKS erkennen.

Da sich in den Proliferationsassays mit der Zelllinie MCF-7 ähnliche Ergebnisse bezüglich des zytotoxischen Effektes von SU11248 im klinisch möglichen Konzentrationsbereich zeigten, wurden auch

3.3 Proliferationsassays

hier die Versuchsreihen wie bei MDA MB231 um den Versuch der Inkubation mit Stocklösung in absteigender Konzentration erweitert. Die Assays erfolgten ebenfalls im Vergleich zu DMSO und PBS (Abbildung 3.8 und Abbildung 3.9).

Die bereits durch die Versuchsreihen mit MDA MB231 gewonnenen Ergebnisse ließen sich auch auf der zweiten Zelllinie bestätigen. Es zeigte sich ein zytotoxischer Effekt von SU11248 im Konzentrationsbereich > 3000 nM.

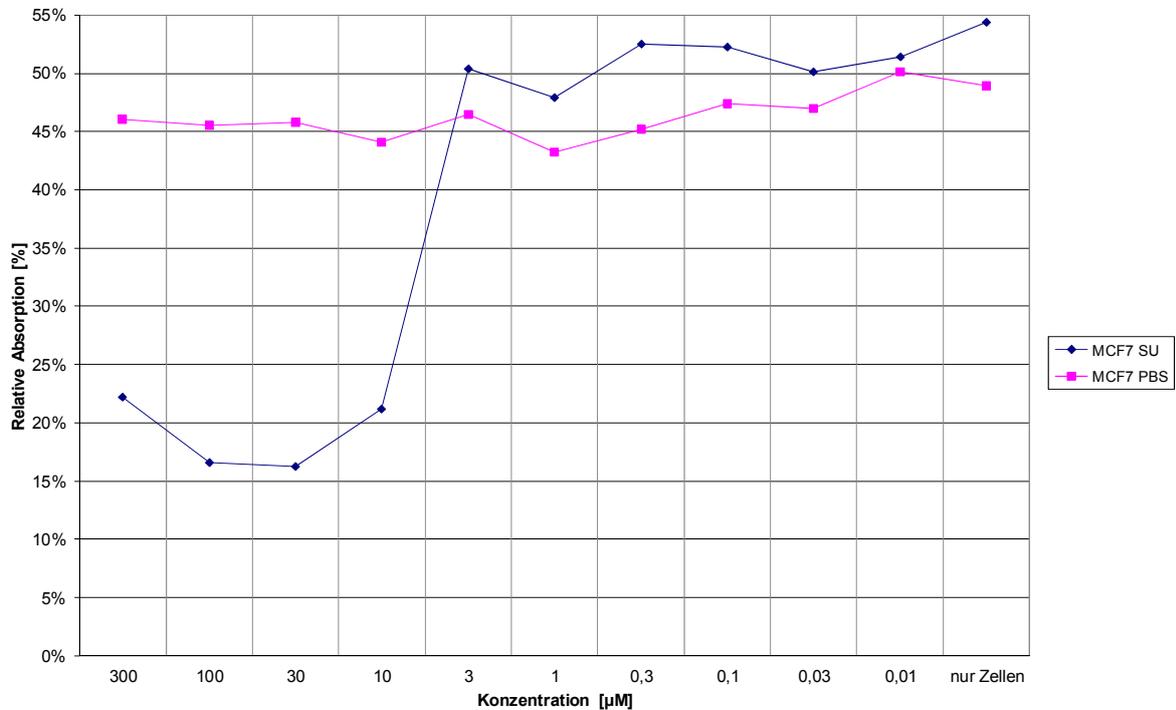


Abbildung 3.9: Relative Absorption bei 490 nm nach Inkubation der Zelllinie MCF-7 über 72 h mit SU11248 (Stocklösung) im Vergleich zu PBS

DISKUSSION

4.1 MEDIZINISCHE NOTWENDIGKEIT

AUFGRUND der Häufigkeit der Erkrankung und der Tatsache, dass das Mammakarzinom die häufigste tumorbedingte Todesursache der Frau darstellt, besteht eine hohe medizinische Notwendigkeit, die Therapie zu verbessern. Die Bestimmung des Vorhandenseins von Hormonrezeptoren ist zur weiteren Klassifizierung und der sich anschließenden Therapie des Mammakarzinoms Standard. Während sich diese jedoch nicht bei allen Entitäten nachweisen lassen, ist für das Tumorwachstum bei allen Betroffenen die Aktivierung von Wachstumsrezeptoren notwendig. Die vorliegende Arbeit diene dazu, die Expression der Rezeptortyrosinkinasen VEGFR 1 und 2, PDGFR- α und PDGFR- β sowie Flt3 und c-Kit auf tissue arrays aus Mammakarzinomen und den korrespondierenden Lymphknoten nachzuweisen. Darüber hinaus sollten Zusammenhänge zwischen der jeweiligen Rezeptorexpression mit den bereits genutzten prognostischen Parametern wie Lymphknotenstatus, Hormonrezeptorstatus, HER2-neu-Status, Grading und Tumorgröße aufgedeckt werden. Für das Tumorwachstum und die Angiogenese ist eine Störung der Rezeptoraktivität notwendig. Bei einer bedeutenden Rezeptorexpression kann der Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib eine neue Therapieoption bei Brustkrebspatientinnen darstellen. Voraussetzungen für die klinische Wirksamkeit ist die Einsetzbarkeit in notwendiger Konzentration ohne limitierende Nebenwirkungen. Gegebenenfalls ist eine Kombination mit einer Chemotherapie notwendig, um eine höhere Ansprechrage zu erreichen.

4.2 LIMITATIONEN UND MÖGLICHE FEHLERQUELLEN

4.2.1 PATIENTENKOLLEKTIV

VERGLEICHT man das untersuchte Kollektiv mit den Daten der Literatur, finden sich einige Abweichungen. Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt im vorliegenden Kollektiv bei 54,92 Jahren (Standardabweichung $p = 9,78$) und damit 10 Jahre unter dem Durchschnittsalter, welches vom Robert-Koch-Institut angegeben wird [4]. Auch in der Differenzierung der Histologie und der Wachstumsmuster waren Unterschiede festzustellen. In der Literatur finden sich die invasiv-duktalem Tumoren mit einer Häufigkeit von 65–80 %. Der Anteil in unserem Kollektiv betrug 86,1 %. Die invasiv-lobären Tumoren lagen hingegen mit 8,9 % in dieser Arbeit etwas unter der, in der Literatur angegebenen Höhe von 10 %. Die tubulären, medullären und Adenokarzinome waren mit jeweils unter 2 % in unserem Kollektiv, ebenso wie in der Literatur beschrieben, in geringerem Maße vorhanden [48]. Bei Betrachtung der Tumorstadien bei Erstdiagnose zeigt sich eine Verteilung zugunsten der niedrigeren Stadien (pT1 62 %, pT2 32,9 %, pT3 5,1 %). In UICC-Stadien (Union internationale contre le cancer) findet sich eine Verteilung von 53,2 % Stadium I, 34,7 % Stadium II, 8,4 % Stadium III und 3,7 % Stadium IV [49].

DIE untersuchten Proben stellen ein historisches, eher kleines, Patientenkollektiv mit 158 Stichproben dar. Eine differenzierte Aufarbeitung kleinerer Abweichungen war nicht möglich. Für die statistische Auswertung mussten größere Gruppen gebildet werden, um eine relevante Korrelation zu erzielen.

Es standen außerdem keine Proben zum Nachweis von Ki-67 als Proliferationsmarker zur Verfügung. Somit war eine Einstufung des Mammakarzinoms zur genauen Evaluation und Einordnung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nach aktuellen Richtlinien nicht möglich. Die St.Gallen-Klassifikation [50] von 2011, in der das Mammakarzinom nach positivem Hormonrezeptornachweis sowie HER2-Positivität und insbesondere der Proliferationsrate durch Bestimmung des Ki-67-Index eingeteilt wird, zeigt die Neuorientierung im Therapieregime von Brustkrebspatientinnen. Operation, Bestrahlung und Pharmaka bleiben die drei Säulen der Therapie. Mit dem Ki-67-Index als Korrelationsmarker zur Mitoserate und damit zu der Aggressivität des Tumorstadiums ist eine andere Gradeinteilung für die Sinnhaftigkeit einer neo- oder adjuvanten Chemotherapie festgelegt worden [51]. Ein niedriger Ki-67-Index, nach St.Gallen-Klassifikation festgelegt auf $< 14\%$, in Kombination mit einem positiven Hormonrezeptorstatus geht mit einer niedrigen Chemosensitivität einher, sodass bei diesen Patientinnen die neoadjuvante Chemotherapie überdacht werden muss. Die Klassifikation scheint der klassischen Stadienbestimmung mittels Grading überlegen zu sein. Auch zeigt sich in dieser Einteilung die Wertigkeit und Effektivität einer zielgerichteten Therapie, denn als das prognostisch ungünstigste Mammakarzinom gilt im Rahmen dieser Klassifikation der triple-negativ Status, der laut aktueller Leitlinie einer adjuvanten Chemotherapie bedarf.

Eine mögliche Fehlerquelle der Versuche in dieser Arbeit besteht darin, dass ein immunhistochemischer Nachweis der Rezeptoren in nicht-phosphorylierter Form erfolgt. Es wird damit keine absolute Aussage zur tatsächlichen Aktivität der Rezeptoren im Tumorgewebe getroffen. Das alleinige Vorhandensein der Rezeptoren kann nicht unbedingt als prädiktiver Marker für die Wirksamkeit eines Medikamentes *in vivo* herangezogen werden, auch wenn mit dem Her2neu-Rezeptor und dem Medikament Trastuzumab diese Korrelation existiert.

Die immunhistochemische Quantifizierung ist zudem für die untersuchten Rezeptoren nicht etabliert, war jedoch Grundlage der Untersuchung und statistischen Auswertung.

Das in dieser Arbeit verwendete Patientenkollektiv stellte ein historisches Kollektiv dar. Die Überlebensrate war aufgrund der niedrigen Eventrate nicht relevant, sodass eine Überlebenskorrelation mit den untersuchten Markern nicht möglich war. Zudem können verschiedenen Faktoren das Ergebnis der Immunhistochemie beeinflussen. Die Färbeprotokolle für die Untersuchung der Rezeptorexpression waren alle im onkologischen Labor der Universitätsfrauenklinik etabliert. Die Proben waren jedoch in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Es musste also zunächst ein Antigen-Retrieval vorgenommen werden, um die Antikörper-Epitop-Bindung zu ermöglichen. Die Aufarbeitung der Gewebeproben war nicht Bestandteil dieser Arbeit, so fanden sich nicht in allen Stenzen Tumorschnitte und eine Abweichung in der Fixierung oder Einbettung kann ebenfalls zu Änderungen der Färbintensität führen.

IN den Western blots zum Nachweis der aktivierten Rezeptoren ließen sich die immunhistochemischen Ergebnisse nicht untermauern. Es wurde lediglich der Nachweis von VEGFR 2, PDGFR- α

und PDGFR- β sowie c-Kit durchgeführt. Der Nachweis von VEGFR 1 und Flt-3 gelang mit den verwendeten Antikörpern nicht.

In den durchgeführten Proliferationsassays mit den verwendeten Zellkulturen konnte im erwarteten Bereich der mittleren inhibitorischen Konzentration keine Hemmung des Zellwachstums durch Sunitinib nachgewiesen werden. Erst nach Verlassen des nanomolaren Bereiches und damit im Bereich der vermuteten Toxizität, zeigte sich eine Inhibition des Zellwachstums im Vergleich zum ebenfalls toxischen Lösungsmittel. Dieses war sowohl für die hochproliferative Zelllinie MDA MB231 als auch für die langsamer wachsende Zelllinie MCF-7 nachweisbar. Ein direkter Vergleich der in vitro-Ergebnisse mit der Anwendung des Medikamentes in vivo kann jedoch nicht durchgeführt werden.

4.3 AUSBLICK

WENN die Immunhistochemie die wahre Rezeptoraktivität in Mammakarzinomen repräsentiert, würden die meisten Patienten (77%) von einer Inhibition des VEGFR 1 profitieren. Ebenso ein Nutzeffekt wäre von einer PDGFR-Blockade zu erwarten, während c-Kit- und Flt3-Expression keine Relevanz für die Target-Therapie beim Mammakarzinom zu haben scheinen.

Klinische Studien zeigen bereits einen Nutzen von VEGFR-Antagonisten/Antikörpern, wie zum Beispiel Bevacizumab in der Palliativtherapie von Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom [52, 53]. Im Frühstadium oder als Monotherapie hat die Hemmung der Angiogenese beim Mammakarzinom bisher keinen Vorteil gegenüber den klassischen Therapien gezeigt [54].

Die Einzelversuche mit Sunitinib blieben bisher ohne quantifizierbaren Effekt des Medikamentes bei dieser Tumorentität. In Tierversuchen konnte nachgewiesen werden, dass Sunitinib als Kombinationstherapie mit dem Bisphosphonat Zoledronat oder mit Docetaxel die Entstehung von ossären Metastasen verlangsamen kann [55]. Die Monotherapie mit Sunitinib zeigte jedoch keinen Vorteil im Vergleich zur Placebogruppe. Bisher zeigen klinische Studien der Phase III, in denen Sunitinib bei Patienten mit fortgeschrittenem Mamma-Karzinom eingesetzt wurde, keine Verlängerung der Lebensdauer, sowohl wenn Sunitinib als Monotherapie als auch wenn das Medikament in einer Kombinationstherapie mit einem Chemotherapeutikum eingesetzt wurde [56, 57]. Aber die Studien waren nicht optimal als Überlegenheitsstudien konzipiert. Somit war es schwer, für die Monotherapie gegen eine Chemotherapie zu überzeugen. Darüber hinaus war in der Kombination mit der Chemotherapie die Toxizität so ausgeprägt, dass nicht die volle Sunitinib-Dosis aus anderen Behandlungserfahrungen eingesetzt werden konnte. Es ist zu vermuten, dass die Angiogenese im Frühstadium des Mammakarzinoms eine weniger relevante Rolle spielt und erst ab einem bestimmten Tumorstadium und in der Metastasierung wichtig wird. Die bisher durchgeführten Studien konnten nur in der metastasierten Situation in Phase II-Studien einen Effekt zeigen.

Bei stark angiogenetisch wachsenden Tumoren, wie gastrointestinalen Stromatumoren und Nierenzellkarzinomen, werden Tyrosinkinaseinhibitoren erfolgreich in der adjuvanten Therapie in nicht toxischer Dosierung eingesetzt.

Die gewonnenen präklinischen Erkenntnisse dieser Arbeit ließen sich in Phase III-Studien an Mammakarzinom-Patienten leider nicht bestätigen. Es zeigte sich eine relevante Toxizität bereits in Normaldosierung. Dieses lässt sich durch eine Potenzierung durch Kombination mit einem Chemotherapeutikum eventuell erklären. Sunitinib als Multi-Tyrosinkinaseinhibitor ist zudem keine Target-Therapie im eigentlichen Sinne, da zu viele Zielpunkte inhibiert werden. Die Entwicklung von Medikamenten mit gezielteren Angriffspunkten senkt die mögliche Risikokonfiguration durch Senkung der unerwünschten Nebenwirkungen. Die sogenannten Pantyrosinkinaseinhibitoren werden derzeit durch spezifischere Wirkstoffe ersetzt.

Die Hemmung der Angiogenese stellt dennoch einen wichtigen Ansatz in der Therapie des Mammakarzinoms dar. In verschiedenen Phase-III-Studien wie zum Beispiel E2100, AVADO, RIBBON-1 und -2, wurde Bevacizumab in Kombination mit einem Chemotherapeutikum getestet. Bevacizumab ist ein Antikörper gegen VEGF-A. Der Ligand wird blockiert und ist nicht mehr in der Lage, an den Rezeptor zu binden. Nach Veröffentlichung der Ergebnisse der E2100-Studie im Jahre 2007 [58] wurde Bevacizumab von der AGO als Erstlinientherapie in Kombination mit Paclitaxel empfohlen. Seit 2011 ist auch die Kombination mit Capecitabin in die Empfehlungen als gleichwertig aufgenommen [59]. Die Studien konnten eine gute Ansprechrate bei verlängertem progressionsfreiem Überleben in unterschiedlicher Länge (unter 3 Monate in Ribbon-1 und AVADO gegenüber 11,8 Monate in E2100) aufzeigen. Die Ergebnisse zeigten sich neoadjuvatem und metastatischen Setting gleichermaßen [60]. Eine Verlängerung des Gesamtüberlebens konnte in keiner der Studien bewiesen werden [61, 62]. Neuere Studien zeigen eine Verbesserung der pathologisch kompletten Remission unter Zugabe von Bevacizumab bei Hormonrezeptor-positiven Patienten [63]. Unter der Therapie mit Bevacizumab treten jedoch häufiger Nebenwirkungen wie insbesondere Blutungen, Proteinurie, linksventrikulärer Dysfunktion und Hypertension auf [64]. Die bisher durchgeführten Studien haben jedoch keine direkte Messung der VEGFR-Aktivität vorgenommen. In der MERiDian-Studie [65] sollte mit VEGF-A als Biomarker ein Messparameter für die Wirksamkeit von Bevacizumab gesucht werden. Eine Korrelation von VEGF-A mit der Ansprechbarkeit auf den Antikörper konnte jedoch nicht bestätigt werden [65]. Es gibt also bisher keinen direkten Messparameter für den Profit durch eine antiangiogenetische Therapie.

Nichtsdestotrotz sollte es mit Fortschreiten der labormedizinischen Möglichkeiten Ziel sein, weitere Rezeptoren für die zielgerichtete Therapie zu analysieren. Zur klinischen Nutzbarkeit ist zudem eine reproduzierbare, schnelle und kostengünstige Nachweismethode zu wählen, beziehungsweise zu entwickeln, um standardmäßig jede Patientin mit Mammakarzinom einer möglichen Target-Therapie zuzuführen. Zudem würde die Entwicklung eines Testes, welcher nachweist, welche Patientin ein Angiogenese-getriggertes Tumorgeschehen hat, eine Bandbreite neuer Therapieansätze eröffnen. Es würde eine gezielte Therapieauswahl für einzelne Patientinnen darstellen. Die molekulare Subtypisierung des Mammakarzinoms stellt einen besseren Ansatz zur prognostischen und prädiktiven Differenzierung dar. Die molekulare Klassifikation wie die PAM50-Analyse, Oncotype DX oder uPA/PAI-I weisen den Weg dorthin [66]. Sowohl die Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie als auch die American Society of Clinical Oncology empfehlen bei nodal negativen Patientinnen mit Her2-negativem und Hormonrezeptor-positivem Tumor die weitere molekulare Untersuchung. Anhand dieser lässt sich die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs bestimmen und die Patientinnen isolieren, die von einer postoperativen Chemotherapie nicht profitieren würden. Auf der Konsensuskonferenz in St. Gallen 2015 wurde als Leitlinie festgelegt, dass nach Verifizierung durch molekulare Tests keine Chemotherapie bei Patientinnen mit Luminal-B-like disease durchgeführt werden sollte [67]. Oncotype DX, PAM50 und Endopredict sind Multigentests bei welchen nach Gentestung und Hinzuziehen von klassischen Stagingparametern wie Tumorgöße und Nodalstatus ein Score für ein Rückfallrisiko berechnet wird [68, 69, 70]. In dem Multigentest MammaPrint wird eine Voraussage für das Metastasierungsrisiko getroffen [71]. Dieser Test ist zwar als prognostischer Test zugelassen, wird jedoch durch keine der genannten Gremien in den Leitlinien empfohlen. Es wird sowohl durch die AGO als auch die ASCO zur Therapieentscheidung über die Durchführung einer Chemotherapie die Messung der Konzentration der Proteine uPa und PAI-I im Tumorgewebe auf höchstem Evidenzniveau in der S3-Leitlinie empfohlen [16, 72, 73]. Auch diese sind Prognosemarker für das Auftreten eines Rezidivs. Problem für die Logistik in der klinischen Routine ist hier die Tatsache, dass Frischgewebe für die Testung erforderlich ist.

Diese Entwicklung verdeutlicht die Wichtigkeit neuer molekularer Nachweismethoden und, damit verbunden, neuer Angriffspunkte für eine zielgerichtete Therapie.

Die Blockade der Tumor-Angiogenese stellt sicherlich nicht nur in der Therapie des Mammakarzinoms eine zentrale Zielsetzung dar. Mit Hemmung der Gefäßversorgung erfolgt eine wirksame Inhibition der Tumorprogredienz in Größe und Metastasierung. Es birgt jedoch auch die Gefahr, dass andere Therapeutika, wie die klassische Chemotherapie, nicht an den richtigen Ort der Wirkung gelangen können, wenn die Gefäßversorgung unterbunden wird. Darüber hinaus setzt die Tumorphypoxie zusätzliche neue Wachstumsreize in soliden Tumoren und bildet so einen escape Mechanismus für die antiangiogene Therapie. Durch eine bessere Subtypisierung wird hoffentlich in Zukunft eine zielgerichtete Therapie ermöglicht. Das Ziel sollte das Erreichen einer geringeren Mortalität sein. Die bewährte Methode der Immunhistochemie ist zwar meist zeitintensiv, jedoch günstig durchführbar. Die neuen Nachweismethoden auf Proteinebene sind häufig teuer. Wenn sich keine Änderung oder andere Möglichkeit einer Therapie an die Ergebnisse anschließt, muss eine Abwägung von Wirtschaftlichkeit und Effektivität erfolgen.

Eine Frage für die zukünftige Weiterentwicklung wird sein, inwieweit die Immunhistochemie ein nützliches Verfahren ist, um eine gute Vorhersage für die Wirksamkeit der Target-Therapie im Bereich der Rezeptortyrosinkinasen zu sein, wie es bei dem Her2-neu der Fall ist? Eine weitere Frage wird sein, inwieweit die Indikation für bereits vorhandene Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren auf andere Tumorentitäten erweitert werden kann?

ZUSAMMENFASSUNG

DIE Therapie des Mammakarzinoms stützt sich aktuell auf die Säulen der Operation, der Bestrahlung sowie der medikamentösen Therapie mit Chemotherapie, endokriner Therapie und zielgerichteter Therapie mittels Antikörpern. Der Effekt der Therapien steht in ständiger Optimierung. Unter anderem gibt es Hinweise auf einen Vorteil eines antiangiogenetischen Therapiekonzeptes auch bei soliden Tumoren.

ZIELSETZUNG: In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression möglicher Targets und deren Beeinflussung durch den Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib überprüft. Es sollten Zusammenhänge von Expressionsmuster von Rezeptorkinasen und klassischen pathologischen Risikofaktoren aufgedeckt werden. Zudem sollte eine mögliche Wirkung von Sunitinib auf die Proliferation von Mammakarzinom-Zelllinien *in vitro* nachgewiesen werden.

METHODEN: Es wurden Nachweise von Rezeptorkinasen, die durch Sunitinib gehemmt werden können, mittels Immunhistochemie und Western Blot durchgeführt. Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden micro tissue arrays aus Gewebeproben von 158 Patientinnen aus den Jahren 1996 bis 2002 verwendet. Bei 72 Proben konnten die dazugehörigen axillären Lymphknotenmetastasen ebenfalls untersucht werden. Es erfolgte der Nachweis und die Quantifizierung der Rezeptortyrosinkinasen VEGFR 1 und 2, PDGFR- α und PDGFR- β , c-Kit und Flt-3. In der statistischen Analyse erfolgte die Korrelation der Expression der Rezeptortyrosinkinasen mit den bekannten Risikofaktoren (Nodalstatus, Grading und Expression von Her2-neu sowie Progesteron- und Estrogenrezeptor) des Patientenkollektivs. Im Western Blot konnten die Rezeptorisoformen von VEGFR2, PDGFR- α und PDGFR- β sowie c-Kit auf den Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231 nachgewiesen werden. Es erfolgte eine Stimulation mit den entsprechenden Liganden, um die Rezeptortyrosinkinasen zu phosphorylieren und damit zu aktivieren. Um einen medikamentösen Effekt aufzuzeigen, erfolgte die Vorbehandlung der Zelllinien mit Sunitinib. In Proliferationsassays wurden die Zelllinien verschiedenen Konzentrationen von Sunitinib ausgesetzt und der Effekt mittels MTS-Assay gemessen.

ERGEBNISSE: In der statistischen Auswertung der Immunhistochemie zeigte sich, dass die Expression von VEGFR1 und 2 positiv mit dem Nodalstatus korreliert ($p < 0,05$). Eine Korrelation mit dem Grading fand sich nicht. Die Expression von VEGFR2 im Primärtumor zeigte eine signifikante positive Korrelation mit der Estrogenrezeptorexpression ($p < 0,001$). VEGFR1 und 2 sowie PDGFR- α waren sowohl im Primärtumor als auch in den korrespondierenden Lymphknoten moderat oder hoch exprimiert, PDGFR- β , Flt-3 und c-Kit niedrig. Das Expressionslevel der Rezeptoren der Lymphknotenmetastasen stand in signifikantem Zusammenhang mit der Expression der Rezeptoren auf dem Primärtumor. Ein Zusammenhang mit der Überlebensrate konnte nicht festgestellt werden.

Die Expressionsanalyse mittels Western Blot erbrachte den quantitativ unterschiedlichen Nachweis der Rezeptorisoformen von VEGFR2, PDGFR- α und PDGFR- β sowie c-Kit auf den Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231. Zudem konnten nach Stimulation mit dem entsprechenden Liganden Unterschiede im Aktivierungszustand nachgewiesen werden. Ein indirekter Nachweis war ebenfalls möglich, so nahm die Bandenstärke von nicht phosphoryliertem PDGFR- β nach Stimulation ab. Durch Vorbehandlung der Zellen mit Sunitinib zeigte sich eine geringere Bandenstärke des akti-

4.3 Ausblick

vierten PDGFR- α . Die nicht-phosphorylierten Anteile von PDGFR- α und VEGFR2 waren nach der Vorbehandlung mit Sunitinib länger und stärker vorhanden.

Die durchgeführten Proliferationsassays mit den Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA MB 231 zeigten bei Veränderung der Konzentration von Sunitinib im physiologischen Konzentrationsbereich keine Inhibition. Die Proliferationsaktivität der Tumorzellen wurde nur im nicht-physiologischen Konzentrationsbereich negativ beeinflusst.

SCHLUSSFOLGERUNG: Es konnte eine Expression der Zielrezeptoren des Pantyrosinkinaseinhibitors Sunitinib immunhistochemisch und auf Proteinebene nachgewiesen werden. Damit wären die Voraussetzungen für die Wirksamkeit von Sunitinib beim Mammakarzinom gegeben. Eine Hemmung der Proliferation der Mammakarzinom-Zelllinien konnte jedoch nur außerhalb der physiologischen Konzentration nachgewiesen werden. Die forcierte Suche einer zielgerichteten antiangiogenetischen Therapie für das Mammakarzinom ist durch die nachgewiesene Expression der Rezeptoren sinnvoll. Sunitinib scheint jedoch nicht das geeignete Medikament dazustellen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. L. Patnaik, T. Byers, C. DiGuseppi, D. Dabelea, and T. D. Denberg. Cardiovascular disease competes with breast cancer as the leading cause of death for older females diagnosed with breast cancer: a retrospective cohort study. *Breast Cancer Research*, 13(3):R64, Jun 2011. (Zitiert auf den Seiten 11 und 12.)
- [2] J. Schlessinger. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103(2):211–225, Oct 2000. (Zitiert auf den Seiten 11 und 14.)
- [3] Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Atlas der Krebsinzidenz und –mortalität in Deutschland (GEKID-Atlas). <http://www.gekid.de>, 12 2014. (Zitiert auf Seite 12.)
- [4] Robert Koch Institut. Pressemitteilung “Neue Daten zu Krebs in Deutschland“. http://www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2015/11_2015.html, 2015. (Zitiert auf den Seiten 12 und 39.)
- [5] D. Schön, J. Bertz, B. Görsch, J. Haberland, and B.-M. Kurth. Die Dachdokumentation Krebs. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 47(5):429–436, May 2004. (Zitiert auf Seite 12.)
- [6] Gemeinsames Krebsregister der Länder Berlin Brandenburg Mecklenburg-Vorpommern Sachsen-Anhalt und der Freistaaten Sachsen und Thüringen. Gemeinsames Krebsregister. <https://www.berlin.de/gkr/>, 2015. (Zitiert auf Seite 12.)
- [7] Zentrum für Krebsregisterdaten (Brustkrebs). Brustkrebs (Mammakarzinom) ICD-10 C50. http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html, March 2012. (Zitiert auf Seite 12.)
- [8] E. K. Bancroft, E. C. Page, E. Castro, H. Lilja, A. Vickers, D. Sjoberg, M. Assel, and other. Targeted prostate cancer screening in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the initial screening round of the IMPACT study. *European Urology*, 66(3):489–499, Sep 2014. (Zitiert auf Seite 12.)
- [9] Alfons Meindl, Juliane Ramser, Jan Hauke, and Eric Hahnen. Genetik des familiären Brust- und Eierstockkrebses: Paneldiagnostik – Möglichkeiten und Grenzen. *Medizinische Genetik*, 27(2):202, August 2015. (Zitiert auf Seite 12.)
- [10] J. Scalia-Wilbur, B. L. Colins, R. T. Penson, and D. S. Dizon. Breast Cancer Risk Assessment: Moving Beyond BRCA 1 and 2. *Semin Radiat Oncol*, 26(1):3–8, Jan 2016. (Zitiert auf Seite 12.)
- [11] A. Daudt, A. J. Alberg, and K. J. Helzlsouer. Epidemiology, prevention, and early detection of breast cancer. *Curr Opin Oncol*, 8(6):455–461, Nov 1996. (Zitiert auf Seite 12.)
- [12] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncology*, 13(11):1141–1151, Nov 2012. (Zitiert auf Seite 12.)

- [13] PDQ Adult Treatment Editorial Board. *PDQ Cancer Information Summaries*. Breast cancer treatment (pdq®) health professional version edition, 3 2017. (Zitiert auf Seite 13.)
- [14] E. Dalmau, A. Armengol-Alonso, M. Munoz, and M. A. Segui-Palmer. Current status of hormone therapy in patients with hormone receptor positive (HR+) advanced breast cancer. *Breast*, 23(6):710–720, Dec 2014. (Zitiert auf Seite 13.)
- [15] D. R. Cochrane, S. Bernales, B. M. Jacobsen, D. M. Cittelly, E. N. Howe, N. C. D’Amato, N. S. Spoelstra, and other. Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Research*, 16(1):R7, January 2014. (Zitiert auf Seite 13.)
- [16] Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften. S3-Leitlinie “Mammakarzinom der Frau; Diagnostik, Therapie und Nachsorge“. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-0450L_1_S3__Brustkrebs_Mammakarzinom_Diagnostik_Therapie_Nachsorge_2012-07.pdf, 07 2016. (Zitiert auf den Seiten 13 und 42.)
- [17] G. W. Prager, E. M. Lackner, M. T. Krauth, M. Unseld, M. Poettler, S. Laffer, S. Cerny-Reiterer, W. Lamm, G. V. Kornek, B. R. Binder, C. C. Zielinski, and P. Valent. Targeting of VEGF-dependent transendothelial migration of cancer cells by bevacizumab. *Mol Oncol*, 4(2):150–160, Apr 2010. (Zitiert auf Seite 13.)
- [18] M. Sahni, D. C. Ambrosetti, A. Mansukhani, R. Gertner, D. Levy, and C. Basilico. FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes and Development*, 13(11):1361–1366, Jun 1999. (Zitiert auf Seite 14.)
- [19] P. M. Chan, S. Ilangumaran, J. La Rose, A. Chakrabartty, and R. Rottapel. Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region. *Molecular and Cellular Biology*, 23(9):3067–3078, May 2003. (Zitiert auf Seite 14.)
- [20] K. S. Kolibaba and B. J. Druker. Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1333(3):F217–248, December 1997. (Zitiert auf Seite 14.)
- [21] T. Matsui, M. Heidarani, T. Miki, N. Popescu, W. La Rochelle, M. Kraus, J. Pierce, and S. Aaronson. Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science*, 243(4892):800–804, Feb 1989. (Zitiert auf Seite 14.)
- [22] M. A. Heidarani, J. H. Pierce, J. C. Yu, D. Lombardi, J. E. Artrip, T. P. Fleming, A. Thomason, and S. A. Aaronson. Role of alpha beta receptor heterodimer formation in beta platelet-derived growth factor (PDGF) receptor activation by PDGF-AB. *Journal of Biological Chemistry*, 266(30):20232–20237, Oct 1991. (Zitiert auf Seite 15.)
- [23] J. S. Philo, J. Wen, J. Wypych, M. G. Schwartz, E. A. Mendiaz, and K. E. Langley. Human stem cell factor dimer forms a complex with two molecules of the extracellular domain of its receptor, Kit. *Journal of Biological Chemistry*, 271(12):6895–6902, Mar 1996. (Zitiert auf Seite 15.)
- [24] M. Nakao, S. Yokota, T. Iwai, H. Kaneko, S. Horiike, K. Kashima, Y. Sonoda, T. Fujimoto, and S. Misawa. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 10(12):1911–1918, Dec 1996. (Zitiert auf Seite 15.)
- [25] B. Barleon, G. Simeister, G. Martiny-Baron, K. Weindel, C. Herzog, and D. Marme. Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells. *Cancer Research*, 57(23):5421–5425, Dec 1997. (Zitiert auf Seite 16.)

- [26] J. Kroll and J. Waltenberger. [Regulation of the endothelial function and angiogenesis by vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)]. *Z Kardiol*, 89(3):206–218, Mar 2000. (Zitiert auf Seite 16.)
- [27] G. M. Abu-Jawdeh, J. D. Faix, J. Niloff, K. Tognazzi, E. Manseau, H. F. Dvorak, and L. F. Brown. Strong expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in ovarian borderline and malignant neoplasms. *Laboratory Investigation*, 74(6):1105–1115, Jun 1996. (Zitiert auf Seite 16.)
- [28] M. Toi, S. Hoshina, T. Takayanagi, and T. Tominaga. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Japanese Journal of Cancer Research*, 85(10):1045–1049, Oct 1994. (Zitiert auf Seite 16.)
- [29] Y. Takahashi, Y. Kitadai, C. D. Bucana, K. R. Cleary, and L. M. Ellis. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Research*, 55(18):3964–3968, Sep 1995. (Zitiert auf Seite 16.)
- [30] H. Prenen, J. Cools, N. Mentens, C. Folens, R. Sciot, P. Schoffski, A. Van Oosterom, P. Marynen, and M. Debiec-Rychter. Efficacy of the kinase inhibitor SU11248 against gastrointestinal stromal tumor mutants refractory to imatinib mesylate. *Clinical Cancer Research*, 12(8):2622–2627, Apr 2006. (Zitiert auf Seite 16.)
- [31] European Medicines Agency (EMA). Product Information “SUTENT“. http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000687/WC500057737.pdf. (Zitiert auf Seite 16.)
- [32] H. D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, and M. Brennan. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5):1409–1416, Nov 1973. (Zitiert auf Seite 18.)
- [33] A. S. Levenson, V. C. Jordan, and H. Soule. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research*, 57(15):3071–3078, Aug 1997. (Zitiert auf Seite 18.)
- [34] M. Lacroix and G. Leclercq. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Research and Treatment*, 83(3):249–289, Feb 2004. (Zitiert auf Seite 18.)
- [35] LGC Standard homepage. Datenblatt MDA MB 231. <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRM-HTB-26.aspx#generalinformation>, 2015. (Zitiert auf Seite 18.)
- [36] T. Boenisch and other. *Handbuch Immunchemische Färbemethoden*. DakoCytomation GmbH, 3 edition, March 2006. (Zitiert auf den Seiten 23 und 24.)
- [37] W. Remmele and H. E. Stegner. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, 8(3):138–140, May 1987. (Zitiert auf Seite 24.)
- [38] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, Aug 1970. (Zitiert auf Seite 26.)
- [39] W. N. Burnette. “Western blotting“: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody

- and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2):195–203, Apr 1981. (Zitiert auf Seite 26.)
- [40] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254, May 1976. (Zitiert auf Seite 27.)
- [41] M.W. Hoetelmans. PK-PD relationships for antiretroviral drugs. <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/00/slides/3621s1d/s1d036.htm>, 7 2016. (Zitiert auf Seite 28.)
- [42] G. Da Violante, N. Zerrouk, I. Richard, G. Provot, J. C. Chaumeil, and P. Arnaud. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(12):1600–1603, Dec 2002. (Zitiert auf Seite 29.)
- [43] T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2):55–63, Dec 1983. (Zitiert auf Seite 29.)
- [44] M. Chen, J. Huang, X. Yang, B. Liu, W. Zhang, L. Huang, F. Deng, J. Ma, Y. Bai, R. Lu, B. Huang, Q. Gao, Y. Zhuo, and J. Ge. Serum starvation induced cell cycle synchronization facilitates human somatic cells reprogramming. *PLoS ONE*, 7(4):e28203, 2012. (Zitiert auf Seite 30.)
- [45] L. Sun, C. Liang, S. Shirazian, Y. Zhou, T. Miller, J. Cui, J. Y. Fukuda, J. Y. Chu, A. Nematalla, X. Wang, H. Chen, A. Sistla, T. C. Luu, F. Tang, J. Wei, and C. Tang. Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(7):1116–1119, Mar 2003. (Zitiert auf Seite 35.)
- [46] G. Curigliano, X. Pivot, J. Cortes, A. Elias, R. Cesari, R. Khosravan, M. Collier, X. Huang, P. E. Cataruzolo, K. A. Kern, and A. Goldhirsch. Randomized phase II study of sunitinib versus standard of care for patients with previously treated advanced triple-negative breast cancer. *Breast*, 22(5):650–656, Oct 2013. (Zitiert auf Seite 36.)
- [47] A. L. Wong, R. Sundar, T. T. Wang, T. C. Ng, B. Zhang, S. H. Tan, T. I. Soh, A. S. Pang, and other. Phase Ib/II randomized, open-label study of doxorubicin and cyclophosphamide with or without low-dose, short-course sunitinib in the pre-operative treatment of breast cancer. *Oncotarget*, 7(39):64089–64099, Sep 2016. (Zitiert auf Seite 36.)
- [48] A.C. Regierer and K. Possinger. Mammakarzinom: Morphologische Grundlagen, Klassifikation, Stadieneinteilung, 2005. <http://www.onkodin.de/e2/e32345/e32485/>, 2005. (Zitiert auf Seite 39.)
- [49] M. O. Celaya, E. M. Berke, T. L. Onega, J. Gui, B. L. Riddle, S. S. Cherala, and J. R. Rees. Breast cancer stage at diagnosis and geographic access to mammography screening (New Hampshire, 1998-2004). *Rural Remote Health*, 10(2):1361, 2010. (Zitiert auf Seite 39.)
- [50] D. N. Krag, S. J. Anderson, T. B. Julian, A. M. Brown, S. P. Harlow, J. P. Costantino, T. Ashikaga, D. L. Weaver, E. P. Mamounas, L. M. Jalovec, T. G. Frazier, R. D. Noyes, A. Robidoux, H. M. Scarth, and N. Wolmark. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival

- findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncology*, 11(10):927–933, Oct 2010. (Zitiert auf Seite 40.)
- [51] W. Jonat and N. Arnold. Is the Ki-67 labelling index ready for clinical use? *Annals of Oncology*, 22(3):500–502, Mar 2011. (Zitiert auf Seite 40.)
- [52] H. J. Burstein, A. D. Elias, H. S. Rugo, M. A. Cobleigh, A. C. Wolff, P. D. Eisenberg, M. Lehman, B. J. Adams, C. L. Bello, S. E. DePrimo, C. M. Baum, and K. D. Miller. Phase II study of sunitinib malate, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane. *Journal of Clinical Oncology*, 26(11):1810–1816, Apr 2008. (Zitiert auf Seite 41.)
- [53] S. Reddy, M. Raffin, and V. Kaklamani. Targeting angiogenesis in metastatic breast cancer. *Oncologist*, 17(8):1014–1026, 2012. (Zitiert auf Seite 41.)
- [54] Z. Wang, M. Wang, F. Yang, W. Nie, F. Chen, J. Xu, and X. Guan. Multitargeted antiangiogenic tyrosine kinase inhibitors combined to chemotherapy in metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 70(5):531–538, May 2014. (Zitiert auf Seite 41.)
- [55] C. Schem, D. Bauerschlag, S. Bender, A. C. Lorenzen, D. Loermann, S. Hamann, F. Rosel, H. Kalthoff, C. C. Gluer, W. Jonat, and S. Tiwari. Preclinical evaluation of sunitinib as a single agent in the prophylactic setting in a mouse model of bone metastases. *BMC Cancer*, 13:32, Jan 2013. (Zitiert auf Seite 41.)
- [56] J. Bergh, I. M. Bondarenko, M. R. Lichinitser, A. Liljegren, R. Greil, N. L. Voytko, A. N. Makhson, J. Cortes, A. Lortholary, J. Bischoff, A. Chan, S. Delalogue, X. Huang, K. A. Kern, and C. Giorgetti. First-line treatment of advanced breast cancer with sunitinib in combination with docetaxel versus docetaxel alone: results of a prospective, randomized phase III study. *Journal of Clinical Oncology*, 30(9):921–929, Mar 2012. (Zitiert auf Seite 41.)
- [57] C. H. Barrios, M. C. Liu, S. C. Lee, L. Vanlemmens, J. M. Ferrero, T. Tabei, X. Pivot, and other. Phase III randomized trial of sunitinib versus capecitabine in patients with previously treated HER2-negative advanced breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 121(1):121–131, May 2010. (Zitiert auf Seite 41.)
- [58] K. Miller, M. Wang, J. Gralow, M. Dickler, M. Cobleigh, E. A. Perez, T. Shenkier, and other. Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel Alone for Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 357(26):2666–2676, 2007. PMID: 18160686. (Zitiert auf Seite 42.)
- [59] Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. Zielgerichtete Substanzen. <https://www.ago-online.de/de/infothek-fuer-aerzte/leitlinienempfehlungen/mamma/maerz-2011/>, March 2011. (Zitiert auf Seite 42.)
- [60] A. N. Seddon, S. Cuellar, and C. M. Haaf. The life, death, and attempted rebirth of bevacizumab in breast cancer. *J Oncol Pharm Pract*, 20(6):433–444, Dec 2014. (Zitiert auf Seite 42.)
- [61] G. von Minckwitz, H. Eidtmann, M. Rezai, P. A. Fasching, H. Tesch, H. Eggemann, I. Schrader, and other. Neoadjuvant Chemotherapy and Bevacizumab for HER2-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(4):299–309, 2012. PMID: 22276820. (Zitiert auf Seite 42.)
- [62] I. Kumler, O. G. Christiansen, and D. L. Nielsen. A systematic review of bevacizumab efficacy in breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 40(8):960–973, Sep 2014. (Zitiert auf Seite 42.)

- [63] H. D. Bear, G. Tang, P. Rastogi, C. E. Geyer, A. Robidoux, J. N. Atkins, L. Baez-Diaz, and other. Bevacizumab added to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(4):310–320, Jan 2012. (Zitiert auf Seite 42.)
- [64] J. Cortes, V. Calvo, N. Ramirez-Merino, J. O’Shaughnessy, A. Brufsky, N. Robert, M. Vidal, and other. Adverse events risk associated with bevacizumab addition to breast cancer chemotherapy: a meta-analysis. *Annals of Oncology*, 23(5):1130–1137, May 2012. (Zitiert auf Seite 42.)
- [65] D. Miles, D. Cameron, I. Bondarenko, L. Manzyuk, J. C. Alcedo, R. I. Lopez, S. A. Im, and other. Bevacizumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for HER2-negative metastatic breast cancer (MERiDiAN): A double-blind placebo-controlled randomised phase III trial with prospective biomarker evaluation. *European Journal of Cancer*, 70:146–155, Jan 2017. (Zitiert auf Seite 42.)
- [66] L. N. Harris, N. Ismaila, L. M. McShane, F. Andre, D. E. Collyar, A. M. Gonzalez-Angulo, E. H. Hammond, N. M. Kuderer, M. C. Liu, R. G. Mennel, C. Van Poznak, R. C. Bast, and D. F. Hayes. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Oncology*, 34(10):1134–1150, Apr 2016. (Zitiert auf Seite 42.)
- [67] A. S. Coates, E. P. Winer, A. Goldhirsch, R. D. Gelber, M. Gnant, M. Piccart-Gebhart, B. Thurlimann, and other. Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Annals of Oncology*, 26(8):1533–1546, Aug 2015. (Zitiert auf Seite 42.)
- [68] B. Wallden, J. Storhoff, T. Nielsen, N. Dowidar, C. Schaper, S. Ferree, S. Liu, S. Leung, G. Geiss, J. Snider, T. Vickery, S. R. Davies, E. R. Mardis, M. Gnant, I. Sestak, M. J. Ellis, C. M. Perou, P. S. Bernard, and J. S. Parker. Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Med Genomics*, 8:54, Aug 2015. (Zitiert auf Seite 42.)
- [69] E. Senkus, S. Kyriakides, F. Penault-Llorca, P. Poortmans, A. Thompson, S. Zackrisson, and F. Cardoso. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 24 Suppl 6:7–23, Oct 2013. (Zitiert auf Seite 42.)
- [70] E. Senkus, S. Kyriakides, S. Ohno, F. Penault-Llorca, P. Poortmans, E. Rutgers, S. Zackrisson, and F. Cardoso. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 26(suppl_5):v8, 2015. (Zitiert auf Seite 42.)
- [71] F. Cardoso, M. Piccart-Gebhart, L. Van’t Veer, and E. Rutgers. The MINDACT trial: the first prospective clinical validation of a genomic tool. *Mol Oncol*, 1(3):246–251, Dec 2007. (Zitiert auf Seite 42.)
- [72] N. Harbeck, M. Schmitt, C. Meisner, C. Friedel, M. Untch, M. Schmidt, B. Lisboa, C. Sweep, F. Jänicke, and C. Thomssen. Final 10-year analysis of prospective multicenter Chemo N0 trial for validation of ASCO-recommended biomarkers uPA/PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(15S):511–511, 2009. (Zitiert auf Seite 42.)
- [73] N. Harbeck, M. Schmitt, C. Meisner, C. Friedel, M. Untch, M. Schmidt, C. G. Sweep, and other. Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making

in node-negative breast cancer patients. *European Journal of Cancer*, 49(8):1825–1835, May 2013.
(Zitiert auf Seite 42.)

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

HIERMIT erkläre ich, Merle Kummerfeld, geboren am 15.02.1980 in Kiel, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Präklinische Analyse der Expression von Rezeptortyrosinkinasen beim Mammakarzinom“ selbstständig unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Christian Schem und ohne Verwendung anderer als der angegebenen Hilfsmittel (und Quellen) verfasst habe. Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden. Ich erkläre weiterhin, dass ich zuvor kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe.

Rostock, den 6. November 2018

Merle Kummerfeld

ANHANG

6.1 DANKSAGUNG

ZUALLERERST danke ich dem Betreuer dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. med. Christian Schem, für die Überlassung des Themas sowie die Förderung bei der Versuchsplanung und die ausdauernde Hilfe bei dem Verfassen des Textes.

Ganz besonderer Dank gilt Sigrid Hamann, die mich in die Immunhistochemie und wissenschaftliche Laborarbeit mit Geduld und Freude eingeführt hat. Ebenso Frank Rösel, der eine tatkräftige Hilfe beim Kennenlernen der Western Blot-Methode und RNA-Gewinnung darstellte.

Für die Unterstützung und wertvollen Tipps zur Erstellung der Dissertation in LaTeX danke ich Dr.-Ing. Niels Lohmann ganz herzlich.

Außerdem danke ich Marcus Sümnick, M.Sc., für die Hilfestellung bei der Bildbearbeitung.

Bei Dr. med. Götz Klaunick und Ulrike Volkmann möchte ich mich für die penible Rechtschreibprüfung bedanken.

Ich danke meinen Eltern für das Ermöglichen des Studiums der Humanmedizin. Ihre Liebe und Unterstützung begleiten mich.

Dr. med. Klaus Klepik danke ich für die unermüdliche Motivation, die Beharrlichkeit, seinen Glauben an meine Fähigkeiten sowie die Weitergabe eines kleinen Teils seines Computerwissens.

6.3 Originalpublikationen und Tagungsbeiträge

6.2 TABELLARISCHER LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE DATEN:

Name, Vorname Kummerfeld, Merle
Geburtsdatum 15.02.1980
Geburtsort Kiel

SCHULISCHER WERDEGANG:

1986–1990 Hermann-Ehlers-Grundschule in Preetz
1990–1999 Friedrich-Schiller-Gymnasium in Preetz; Allgemeine Hochschulreife

BERUFLICHER WERDEGANG:

09/1999–03/2000 Pflegepraktikum im Kreiskrankenhaus des Kreises Plön
04/2000–03/2003 Ausbildung zur Kinderkrankenschwester in der DRK-Heinrich-Schwesternschaft in Kiel; Staatlich geprüfte Kinderkrankenschwester
04/2003–09/2003 Kinderkrankenschwester im St. Antoniushaus in Kiel
10/2003–07/2008 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
08/2008 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/2008–12/2009 Praktisches Jahr an der Universität Rostock
12/2010 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung mit Erlangung der Approbation
seit 01/2010 Weiterbildungsassistentin in der Abteilung für Kinderchirurgie, Universitätsmedizin Rostock

6.3 ORIGINALPUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE

6.3.1 ORIGINALPUBLIKATIONEN

- **Kummerfeld M.**, Klaunick G., Drückler E., Classen C.F., Hauenstein C., Stuhldreier G. (2010) Hepatoblastoma in association with bilateral polycystic kidneys. *Journal of Pediatric Surgery* 45(11):e23-5 DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2010.07.018

6.3.2 TAGUNGSBEITRÄGE

- **Kummerfeld M.**, Bielefeld T., Bauerschlag D.O., Mundhenke C., Sipos B., Maass N., Schem C. (2008), Which tyrosinekinase inhibitor for which patient? Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (Poster)