

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität zu Lübeck

Direktor: Professor Dr. med. Achim Rody

**Chemosensitivität unterschiedlicher
triple-negativer Mammakarzinomsubtypen
gegenüber Eribulin**

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Katharina Friederike Mitzlaff
aus Hamburg

Lübeck 2020

- 1. Berichtstatterin: Prof. Dr. med. Cornelia Kolberg-Liedtke**
- 2. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Fetscher**

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2020

Zum Druck genehmigt Lübeck, den 04.12.2020

- Promotionskommission Sektion Medizin -

I. Inhaltsverzeichnis

II. Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms.....	1
1.2 Subtypisierung des Mammakarzinoms nach Rezeptorstatus.....	1
1.3 Das triple-negative Mammakarzinom.....	2
1.3.1 Epidemiologie und Risikofaktoren.....	2
1.3.2 Klinische Charakteristika.....	3
1.3.3 Chemotherapieansprechen und Prognose.....	3
1.4 Molekulargenetische Taxonomie des Mammakarzinoms.....	4
1.4.1 Intrinsische Subtypen.....	4
1.4.2 Intrinsische Subtypen beim triple-negativen Mammakarzinom	6
1.4.3 Klassifikationen des triple-negativen Mammakarzinoms.....	7
1.4.3.1 Basal-Like-Subtypen.....	7
1.4.3.2 Mesenchymal-Like-Subtypen.....	9
1.4.3.3 Luminal-Androgen-Receptor-Like-Subtypen.....	9
1.5 Therapie des Mammakarzinoms	11
1.6 Das Chemotherapeutikum Eribulin.....	11
1.6.1 Pharmakodynamik von Eribulin.....	11
1.6.2 Eribulin in klinischen Studien.....	12
1.8 Fragestellung.....	14
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Zelllinien, Zellkulturmedien und –zusätze.....	15
2.1.1 Humane triple-negative Mammakarzinomzelllinien.....	15
2.1.2 Zellkulturmedien und –zusätze.....	15
2.2 Arzneimittel, Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	15
2.2.1 Arzneimittel.....	15
2.2.2 Chemikalien.....	16
2.2.3 Gebrauchslösungen und Puffer.....	16
2.2.4 Kits.....	17
2.3 Materialien und Geräte.....	17

2.3.1 Materialien.....	17
2.3.2 Geräte.....	17
2.4 Zellkultur.....	18
2.4.1 Zellkultur der nicht-adhärent wachsenden Zelllinie DU-4475	19
2.5 Zellviabilitäts-Test.....	20
2.6 Durchflusszytometrische Analyse.....	21
3. Ergebnisse.....	23
3.1.1 Einfluss Abnahme Zellmedium auf MTT-Test.....	23
3.1.2 Einfluss des Lösungsmittels Ethanol auf die Zellviabilität	24
3.2 Chemosensitivität der getesteten Zelllinien gegenüber Eribulin.....	25
3.3 Apoptoseinduktion durch Eribulin.....	30
4. Diskussion.....	33
4.1 Chemosensitivität der getesteten Zelllinien gegenüber Eribulin.....	33
4.2 Eribulinresistenz der Zelllinie DU-4475.....	35
4.3 Unterschiede zwischen verschiedenen TNBC-Subtypen in der Chemosensitivität gegenüber Eribulin.....	37
4.4 Übertragbarkeit der Ergebnisse aus der Zellkultur in die Klinik....	40
4.5 Apoptoseinduktion durch Eribulin.....	42
4.6 Fazit und Ausblick.....	43
5. Zusammenfassung.....	46
6. Literaturverzeichnis.....	47
7. Danksagungen.....	56
8. Publikation	57
9. Lebenslauf.....	58
10. Anhang.....	60

5-FU	5- Fluoruracil
5-JÜR	5- Jahres- Überlebensrate
APC	Adenomatosis Polyposis Coli-Gen
ATP	Adenosintriphosphat
BL-1	Basal-like 1
BL-2	Basal-like 2
BLIA	Basal-like immune-activated
BLIS	Basal-like immune-suppressed
BRCA1	Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gen 1
CISH	Chromogene in-situ Hybridisierung
CK	Cytokeratin
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	engl.: Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	engl.: estrogen receptor; Östrogenrezeptor
FBS	engl.: fetal bovine serum; Fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung
FITC	engl.: fluorescein isothiocyanate
G2-Phase	engl.: gap 2-phase
Her2/neu	engl.: human epidermal growth factor receptor 2
HR	Hormonrezeptor
IC 50	engl.: half maximal inhibitory concentration
IHC-Score	immunohistochemischer Score
IM	Immunomodulatory
LAR-Subtyp	Luminal-Androgen-Rezeptor
M-Subtyp	Mesenchymal
MEGS	engl.: Mammary Epithelial Growth Supplement
MES	Mesenchymal
MET	Mesenchymal- epitheliale Transition
M-Phase	Mitose- Phase
MSL	Mesenchymal-stem-like
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid
nTNBC	engl.: non- triple- negative breast cancer
PBS	engl.: phosphate buffered saline
pCR	engl.: pathological complete response
PgR	Progesteronrezeptor
PI	Propiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
RNA	engl.: ribonucleic acid; Ribosenukleinsäure
Rpm	engl.: rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
TILs	engl.: tumor-infiltrating lymphocytes
TNBC	engl.: triple-negative breast cancer

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist weltweit die häufigste Krebserkrankung der Frau und die zweithäufigste Krebserkrankung überhaupt (1). Trotz der für eine maligne Erkrankung vergleichsweise guten Prognose stellt das Mammakarzinom weltweit die häufigste und in den Industrienationen die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen dar (1,2). In Deutschland beträgt die Lebenszeitprävalenz des Mammakarzinoms für Frauen 12,8 % (3). Das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, steigt bei Frauen ab dem 25. Lebensjahr und erreicht ein Maximum um das 65. Lebensjahr (3). Männer erkranken etwa hundertmal seltener als Frauen an einem Mammakarzinom (3). Im Folgenden wird alleine das Mammakarzinom der Frau thematisiert.

1.2 Subtypisierung des Mammakarzinoms nach Rezeptorstatus

In der klinischen Routine werden Mammakarzinome nach Expression von Rezeptoren für Östrogen und Progesteron sowie nach Vorhandensein einer Überexpression bzw. Amplifikation des HER2/neu-Wachstumshormonrezeptors subtypisiert. Der Nachweis der Expression von Hormonrezeptoren für Östrogen und Progesteron erfolgt immunhistochemisch (4). Ein Mammakarzinom gilt als Östrogenrezeptor (ER)-positiv bzw. Progesteronrezeptor (PgR)-positiv, wenn sich mindestens 1 % der Tumorzellkerne anfärben lassen (4). Ist ein Mammakarzinom ER- und/oder PgR-positiv, bezeichnet man es als Hormonrezeptor (HR)-positives Mammakarzinom (4). Ein positiver Hormonrezeptorstatus ist ein positiv-prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine endokrine Therapie (5). Etwa 81-83 % aller Mammakarzinome sind HR-positiv (6–8). Sie haben die beste Prognose unter den Mammakarzinomen (5–8). Zu den Risikofaktoren für die Entstehung eines HR-positiven Mammakarzinoms zählen Nulliparität, frühe Menarche, ein langes Intervall zwischen Menarche und Erstparität, späte Erstparität, späte Menopause, sowie eine menopausale Hormonersatztherapie (9,10).

Eine Überexpression des membranständigen Her2/neu-Wachstumshormonrezeptors kann mittels immunhistochemischer Färbung und Genexpressionsanalysen nachgewiesen werden (11). Beim immunhistochemischen Nachweis wird der Anteil angefärbter Zellen, Homogenität der Zellwandfärbung und die Färbeintensität erhoben und mittels IHC-Score zu einem Punktwert zusammengefasst. Dieser reicht von „0“ entsprechend einem Her2/neu-negativen immunhistochemischen Befund bis „3+“ entsprechend einem Her2/neu-positiven immunhistochemischen Befund (11). Ein Mammakarzinom gilt als Her2/neu-Rezeptor-positiv, wenn sich bei mehr als 10 % der Tumorzellen die Zellmembran homogen anfärben lässt (11). Lassen sich mehr als 10 % der Tumorzellen anfärben, jedoch nur mit schwacher Intensität und inkompletter Membranfärbung lautet der IHC-Score „1+“ und entspricht einem negativen Her2/neu-Rezeptorstatus (11). Der IHC-Score „2+“ beschreibt einen grenzwertigen Befund mit starker zirkulärer Membranfärbung bei weniger als 10 % der Tumorzellen bzw. schwacher, jedoch zirkulär ausgeprägter Membranfärbung bei mehr als 10 % der Tumorzellen (11). In diesen Fällen entscheidet der Nachweis der Genamplifikation des Her2/neu-Rezeptors mittels Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung (FISH) bzw. chromogene in-situ-Hybridisierung (CISH) über den Her2/neu-Rezeptorstatus (11). Etwa 14,5 -16 % der Mammakarzinome sind Her2/neu-Rezeptor-positiv (6–8). Ein positiver Her2/neu-Rezeptorstatus ist ein negativer prognostischer Marker (5). Man kann Her2/neu-Rezeptor-positive Mammakarzinome nach Hormonrezeptorstatus unterteilen, wobei Hormonrezeptor-positiv Her2/neu-Rezeptor-positiv Mammakarzinome eine bessere Prognose aufweisen (12). Ein positiver Her2/neu-Rezeptorstatus ist ein prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern, die gegen den Her2/neu-Rezeptor gerichtet sind. Ist ein Mammakarzinom Hormonrezeptor-negativ und Her2/neu-Rezeptor-negativ, so spricht man von einem triple-negativen Mammakarzinom.

1.3 Das triple-negative Mammakarzinom

1.3.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Etwa 10-14 % der Mammakarzinome lassen sich immunhistochemisch als triple-negative Mammakarzinome (englisch: triple negative breast cancer, kurz: TNBC) klassifizieren (6,8,13–15). Das TNBC tritt im Gegensatz zum nicht-triple-negativen Mammakarzinom

(englisch non-triple negative breast cancer, kurz: nTNBC) überwiegend prämenopausal auf (13,16). Daher sind Patientinnen, die an einem triple-negativen Mammakarzinom erkranken, im Durchschnitt jünger als an anderen Subtypen erkrankte Frauen (13–16). Die klassischen endokrinen Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms wie Nulliparität oder späte Erstparität finden sich beim TNBC nicht (9). Es besteht jedoch durchaus eine positive Korrelation zwischen einem kurzen Intervall zwischen Menarche und Erstparität und Entwicklung eines TNBC (9). Ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung eines TNBC stellt prämenopausale Adipositas dar (17). Afroamerikanische und West-Afrikanische Frauen erkranken überdurchschnittlich häufig an einem TNBC, wobei diese bei afroamerikanischen Frauen etwa 20-30 %, bei West-Afrikanischen Frauen sogar 50-60 % aller Mammakarzinome darstellen (13,18–21). Stillen und körperliche Bewegung vermindern das Erkrankungsrisiko (9,22). Frauen mit einer zum Mammakarzinom prädisponierenden BRCA1-Mutation (Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gen 1) entwickeln überdurchschnittlich häufig ein TNBC (15,23,24).

1.3.2 Klinische Charakteristika

Triple-negative Mammakarzinome werden seltener als HR-positivem Mammakarzinom-Subtypen im Rahmen des Mammographie-Screenings diagnostiziert und sind bei Diagnose häufiger bereits symptomatisch (14). Man spricht in diesem Zusammenhang von Intervall-Karzinomen, da sie sich aufgrund ihres aggressiven Wachstums der Früherkennung im Intervall des Mammographie-Screenings entziehen (24). Bei Diagnosestellung sind die TNBC im Mittel größer als die nTNBC und häufiger schlecht differenziert (13,14). Im Gegensatz zum nTNBC findet sich beim TNBC keine Korrelation zwischen Tumorgöße und der Wahrscheinlichkeit von Lymphknotenmetastasen (14). Insgesamt treten beim TNBC axilläre Lymphknotenmetastasen seltener als beim nTNBC auf (25). Im Vergleich zum HR-positivem Mammakarzinom entstehen beim TNBC häufiger viszerale Metastasen und Hirnmetastasen im Gegensatz zu einer geringeren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Knochenmetastasen (26).

1.3.3 Chemotherapieansprechen und Prognose

Triple-negative Mammakarzinome zeigen ein signifikant besseres klinisches Ansprechen auf Chemotherapeutika als nTNBC, welches sich in Studien nach neoadjuvanter Chemotherapie in signifikant höheren Raten von pathologischer Komplettremission (pCR)

beim TNBC im Vergleich zum nTNBC widerspiegelt (26,27). Patientinnen mit TNBC, die nach neoadjuvanter Chemotherapie eine pCR erreichen, haben keinen Überlebensnachteil im Vergleich zu Patientinnen mit nTNBC, die ebenfalls eine pCR erreichen (26). Insgesamt sind die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) und die progressionsfreie Lebenszeit beim TNBC jedoch deutlich niedriger bzw. kürzer als beim nTNBC (14,26). Hieraus entstand der Begriff des „triple-negativen Paradoxon“, welches beschreibt, dass die Prognose des TNBC trotz des guten Ansprechens auf Chemotherapie schlecht ist. Dieser Umstand ist darauf zurückzuführen, dass Patientinnen mit TNBC, die nach neoadjuvanter Chemotherapie keine pCR erreichen, eine signifikant niedrigere 5-JÜR haben als Patientinnen mit nTNBC, die ebenfalls keine pCR erreichen (26). In den ersten drei bis fünf Jahren nach Diagnose treten beim TNBC häufiger Rezidive und tumorbedingte Todesfälle als beim nTNBC auf (14). Auffällig ist hierbei ein aggressiver Krankheitsverlauf. So entstehen Rezidive nicht nur häufiger als beim nTNBC, sondern in der Regel auch in einem kürzeren zeitlichen Intervall nach Diagnosestellung (14). Nach Auftreten eines Rezidivs ist die Überlebenszeit bei den Patientinnen mit TNBC signifikant kürzer als bei Patientinnen mit nTNBC (14). Insgesamt wird deutlich, wie entscheidend das Erreichen einer pCR und demnach eine wirksame systemische Therapie für Patientinnen mit TNBC ist. In klinischer Erprobung befinden sich derzeit neue Therapieansätze, wie eine Platinbasierte Chemotherapie und monoklonale Antikörper, wie z.B. PARP-Inhibitoren, PI3K-Inhibitoren und Androgenrezeptor-Inhibitoren (15,24). Mit den Immuncheckpoint-Inhibitoren gibt es zudem eine weitere Gruppe Immuntherapeutika, die in Zukunft klinische Anwendung finden könnte (15).

1.4 Molekulare Taxonomie des Mammakarzinoms

1.4.1 Intrinsische Subtypen

Perou *et al.* (2000) legten mit den sogenannten „intrinsischen Subtypen“ den Grundstein für eine auf Genexpressionsanalysen basierende Taxonomie des Mammakarzinoms (28). Inzwischen sind vier bis fünf intrinsische Subtypen sowie ein dem normalen Brustgewebe entsprechender Subtyp beschrieben (28–31). Die Subtypen unterscheiden sich bezüglich Inzidenz, Risikofaktoren, Therapieansprechen und Prognose (12,28,30,32–34). Prat und Perou (2009) stellten die Hypothese auf, dass die verschiedenen Subtypen aus unterschiedlichen Zelltypen bzw. Entwicklungsstadien hervorgehen (33). Damit

übereinstimmend weisen einige intrinsische Subtypen charakteristische Eigenschaften der beiden Zelltypen des Brustdrüsenparenchyms, der luminalen bzw. basalen/myoepithelialen Zellen auf (siehe Abb. 1).

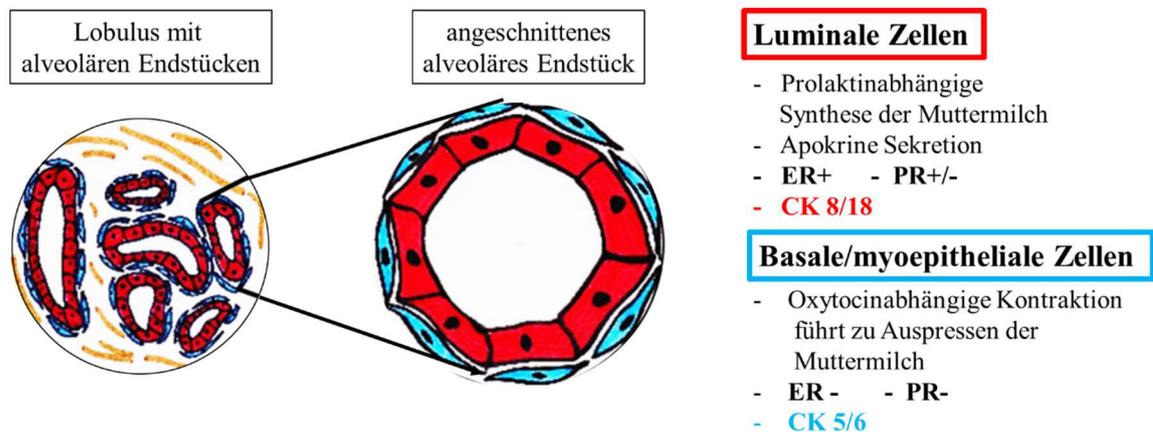


Abb. 1: Schematische Darstellung der luminalen und basalen Zellen des Brustdrüsenparenchyms, modifiziert nach Pandya und Moore (2011) und Ulfig Kurzlehrbuch Histologie (35,36).

Der Luminal A- und Luminal B-Subtyp sind in der Regel ER-positiv (28,30). In beiden lassen sich die für die luminalen Zellen typischen Zytokeratine 8/18 nachweisen (28). Der Luminal B-Subtyp exprimiert vermehrt Proliferationsgene, weist höhere pCR-Raten und eine signifikant schlechtere Prognose als der Luminal A-Subtyp auf (30). Der sogenannte Her2-enriched-Subtyp ist durch eine Überexpression des Her2/neu-Rezeptors und dazugehöriger Signalwege gekennzeichnet (28). Beim Basal-like-Subtyp lassen sich die für die basalen/myoepithelialen Zellen typischen Zytokeratine 5/6 nachweisen (28,29). Mammakarzinome vom Basal-like Subtyp sind in der Regel Hormonrezeptor-negativ und in etwa 73-80 % der Fälle triple-negativ (28,29,31). Mammakarzinome vom Basal-like-Subtyp sind hochproliferativ, weisen nach neoadjuvanter Chemotherapie hohe pCR-Raten auf und haben eine vergleichsweise schlechte Prognose (29,31,37). Der Claudin-low-Subtyp ist der neueste (und nicht in allen Publikationen einheitlich) beschriebene intrinsische Subtyp, der durch verminderte Expression von für die Zell-Zell-Adhäsion essentiellen Claudinen, Occludin und E-Cadherin charakterisiert ist (29,31,38). Die Tumorzellen vom Claudin-low-Subtyp besitzen Stammzeleigenschaften und exprimieren Gene, die im Zusammenhang mit der Immunantwort stehen (39). Sie sind oft schlecht differenziert und befinden sich häufig in Epithelial-mesenchymaler

Transition (EMT) (29,31), die eine Voraussetzung für die Metastasierung ist. EMT beschreibt den Verlust epithelialer Zelleigenschaften (Zellpolarität, Zell-Zell-Kontakte) und die Ausprägung von mesenchymalen Zelleigenschaften (Fähigkeit der Migration) (5). Claudin-low-Tumore sind in etwa 71 % der Fälle triple-negative Mammakarzinome (31). Häufig werden immunhistochemische Surrogatparameter zur Einteilung in die intrinsischen Subtypen verwendet. Bei Anwendung der Surrogatparameter werden alle TNBC per Definition dem Basal-like-Subtyp zugeordnet.

Tab. 1: Zusammenfassung der für die klassischen intrinsischen Subtypen häufig verwendeten immunhistochemischen Surrogatparameter (12,32,37,40–42)

	Luminal A	Luminal B		Her2-enriched	Basal-like	
		Luminal B Her2-	Luminal B Her2+ bzw. „Luminal Her2“		EGFR	+ und/oder CK 5/6
ER	+	+		-	-	
Her2/neu	-	-	+	+	-	
PR	+ (>20 %)	+(<20 %)/ - und /oder	/	-	-	
Ki-67	Low Ki-67	High Ki-67	/	/	Zytokeratine	

1.4.2 Intrinsische Subtypen beim triple-negativen Mammakarzinom

Mittels der intrinsischen Subklassifikation wird hauptsächlich zwischen triple-negativen Mammakarzinomen, die sich dem Basal-like-Subtyp zuordnen lassen, und solchen, die sich nicht diesem Subtyp zuordnen lassen, unterschieden. Etwa 50-75 % der TNBC sind dem Basal-like Subtyp zuzuordnen (29). Mit Berücksichtigung des Claudin-low-Subtyps ist etwa die Hälfte aller TNBC dem Basal-like-Subtyp zuzuordnen und etwa ein Drittel dem Claudin-low-Subtyp (31). Daraus folgt, dass viele der ausgewiesenen Eigenschaften des TNBC Eigenschaften des Basal-like TNBC darstellen. Das Basal-like TNBC weist höhere pCR-Raten, aber eine schlechtere Prognose als TNBC anderer intrinsischer Subtypen auf (16,22,43). TNBC, die sich nicht dem Basal-like-Subtyp zuordnen lassen, zeigen ein ähnliches Metastasierungsmuster wie das ER-positive Mammakarzinom (44).

1.4.3 Molekulargenetische Klassifikationen des triple-negativen Mammakarzinoms

Lehmann *et al.* erstellten 2011 anhand von Genexpressionsprofilen von 587 triple-negativen Mammakarzinomproben eine molekulargenetische Klassifikation des triple-negativen Mammakarzinoms, welche auch die sogenannte Vanderbilt-Klassifikation genannt wird. Diese Klassifikation beschreibt sechs Subtypen (45). Diese lassen sich den drei Hauptgruppen „Basal-like“, „Mesenchymal-like“ und „Luminal-Androgen-Receptor“ zuordnen (45). Ziel der Vanderbilt-Klassifikation war es, anhand der Subtypen prognostische und prädiktive Marker zu identifizieren und außerdem für einzelne Subtypen immanente Signalwege zu finden, die sich therapeutisch nutzen lassen. An Zelllinien konnte exemplarisch gezeigt werden, dass die verschiedenen Subtypen *in vitro* unterschiedlich sensitiv auf Cisplatin und mehrere neue Immuntherapeutika reagieren (45). Zwischen den unterschiedlichen Subtypen konnten zudem signifikante Unterschiede hinsichtlich der pCR-Raten nach Standard-Chemotherapie festgestellt werden (46). Demnach stellt der jeweilige TNBC-Subtyp einen unabhängigen Prädiktor für das Chemotherapieansprechen dar. Die Klassifikationen in TNBC-Subtypen konnte die pCR-Raten zudem besser als die Unterscheidung nach der intrinsischen Klassifikation in Basal-like und nicht-Basal-like vorhersagen (46). Die Vanderbilt-Klassifikation wurde 2016 revidiert, nachdem sich herausgestellt hatte, dass die Genexpressionsprofile zweier Subtypen durch Tumor-infiltrierende Stromazellen bzw. Lymphozyten bedingt sind (47). In der revidierten Version mit dem Namen „TNBCtype-4“ sind vier Subtypen beschrieben (s. Tab. 2) (47). Neben den Vanderbilt-Klassifikationen existieren zwei weitere molekulargenetische Klassifikationen des TNBC. Diese schließen das Leukozyten- und Stromazellinfiltrat des Tumors ausdrücklich mit ein. Jezequel *et al.* (2015) definierten mit der sogenannten „French“-Klassifikation drei triple-negative Mammakarzinomsubtypen (48). Burstein *et al.* (2015) mit der sogenannten „Baylor“-Klassifikation vier triple-negative Mammakarzinomsubtypen (s. Tab. 2) (49).

1.4.3.1 Basal-like-Subtypen

Die molekulargenetischen Klassifikationen des TNBC beschreiben jeweils mehrere Subtypen, die sich dem Basal-like-Subtyp der intrinsischen Klassifikation zuordnen lassen. In der Regel unterscheiden sich diese hinsichtlich der Expression von Leukozytenspezifischen Genen. Der immunomodulatorische Subtyp (IM) der ersten Vanderbilt-Klassifikation zeichnet sich durch vermehrte Expression von Genen aus, die an wichtigen Signalwegen in Leukozyten beteiligt sind, z.B. Gene Zytokin-abhängiger

Signalwege (45). Es stellte sich heraus, dass das Genexpressionsprofil des IM-Subtyps Ergebnis einer Lymphozyteninfiltration ist und nicht das Genexpressionsprofil der eigentlichen Tumorzellen darstellt (47). Dieser Subtyp wurde in der revidierten Vanderbilt-Klassifikation (TNBCtype-4-Klassifikation) nicht mehr aufgegriffen (47). Der basal-enriched-Subtyp der French-Klassifikation zeigt vermehrtes Vorkommen von tumorsupprimierenden M1-Makrophagen (48). Der Basal-like-immune activated-Subtyp (BLIA) der Baylor-Klassifikation wird durch die Expression von Genen charakterisiert, die die Immunantwort durch Lymphozyten und Natürliche Killerzellen regulieren und weist als Zeichen von tumorinfiltrierenden Immunzellen eine erhöhte Rate an Zellen mit diploiden Chromosomensätzen auf (49). Tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs) sind beim TNBC ein unabhängiger positiver prognostischer Marker und prädiktiver Marker für das Erreichen einer pCR nach neoadjuvanter Chemotherapie (50,51). Kochi *et al.* (2017) konnten zeigen, dass die Genexpression Lymphozytenspezifischer Gene mit der Rate an TILs korreliert und genau wie diese ein prädiktiver Marker für das Erreichen einer pCR ist (52). Damit ist erklärlich, dass der BLIA- und basal-enriched Subtyp jeweils die besten Prognosen unter den Subtypen ihrer Klassifikation aufweisen (48,49). Die French und Baylor-Klassifikation beschreiben jeweils einen weiteren Basal-like Subtyp, der sich durch ein immunsupprimiertes Milieu und eine schlechte Prognose auszeichnet. Der Basal-like with low immune-response Subtyp der French-Klassifikation zeigt ein vermehrtes Vorkommen von immunsuppressiv wirkenden M2-Makrophagen (48). Der Basal-like immune-suppressed Subtyp (BLIS) geht mit der schlechtesten Prognose von allen Subtypen der Baylor-Klassifikation einher und weist eine niedrige Expression von Genen, welche die Antigenpräsentation regulieren und an Leukozyten-spezifischen Signalwegen beteiligt sind, auf (49). Die erste Vanderbilt-Klassifikation beschreibt neben dem IM-Subtyp zwei weitere basale Subtypen. Die beiden Subtypen Basal-like-1 (BL-1) und Basal-like-2 (BL-2) weisen eine starke Expression von Proliferationsgenen auf, die im Rahmen des Zellzyklus bei der DNA-Replikation und -Reparatur bedeutsam sind (45). Der BL-1-Subtyp hebt sich durch verstärkte Amplifikation von DNA-Reparaturgenen, der BL-2-Subtyp durch verstärkte Expression von Wachstumshormon-abhängigen Signalwegen und Wachstumshormon-Rezeptoren hervor (45). Beide basalen Subtypen zeigen als Zeichen von starker Proliferation eine erhöhte Expression von Ki-67 und gehen vermehrt mit BRCA1/2-Mutationen einher (45). Der BL-1-Subtyp weist im Vergleich mit allen anderen Subtypen die höchsten pCR-Raten und der BL-2-Subtyp die schlechtesten pCR-Raten auf (46,47).

1.4.3.2 Mesenchymal-Like-Subtypen

Triple-negative Mammakarzinomsubtypen mit mesenchymalen Eigenschaften finden sich in der Vanderbilt- und Baylor-Klassifikation wieder. Die Subtypen „mesenchymal“ (M) und „mesenchymal stem-like“ (MSL) der Vanderbilt Klassifikation von 2011 zeigen eine vermehrte Expression von Genen, die für die Zellmotilität und Zelldifferenzierung bedeutsam sind (45). Der MSL-Subtyp wird zudem durch die Expression von Genen, die für Teile der Wachstumshormonsignalkaskade, Angiogenese und Immunsignalwege kodieren, definiert (45). Außerdem weist er eine vermehrte Expression von Stammzellgenen und eine relativ niedrige Expression von Proliferationsgenen und Claudinen auf (45). Lehmann *et al.* stellten 2016 fest, dass sich das Genexpressionsprofil vom MSL-Subtyp durch Tumor-infiltrierende Stromazellen definiert und damit keinen eigentlichen triple-negativen Mammakarzinomsubtyp darstellt (47). In der TNBCType-4-Klassifikation ist nur noch ein Mesenchymal-Subtyp (M) beschrieben (47). Dieser hebt sich durch eine negative Korrelation mit der IM-Signatur, also eine besonders niedrige Immunzellinfiltration und vermehrtes Auftreten von Lungenmetastasen hervor (47). Der M-Subtyp zeigt die zweithöchste pCR-Rate unter den TNBCType-4-Subtypen (47). Der Mesenchymal-Subtyp (MES) der Baylor-Klassifikation weist Überschneidungen mit dem MSL-Subtyp der Vanderbilt-Klassifikation auf und lässt sich oftmals dem Claudin-low Subtyp der intrinsischen Klassifikation zuordnen (49). Er weist eine vermehrte Rate an diploiden Chromosomensätzen als Zeichen von Tumor-infiltrierenden Leukozyten bzw. Stromazellreichtum auf (49).

1.4.3.3 Luminal-Androgen-Receptor-Like-Subtypen

Alle molekularen triple-negativen Mammakarzinom-Klassifikationen beschreiben einen Luminal-Androgenreceptor-Subtyp und weisen bei diesem Subtyp die größte Übereinstimmung auf (48,49,53). Der Luminal-Androgenreceptor-Subtyp (LAR) hebt sich am stärksten von den anderen Subtypen ab. Tumore vom LAR-Subtyp sind in der Regel nicht dem Basal-like Subtyp der intrinsischen Klassifikation zuzuordnen, sondern zu einem großen Teil dem Her2-neu-enriched-Subtyp, gefolgt von Luminal B- und A-Subtyp (45,48,49,53). Charakteristischerweise zeigt der LAR-Subtyp eine starke Expression von Hormonsignalwegen, des Androgenrezeptors und eine vergleichsweise niedrige Expression von Proliferationsgenen (45,48,49). Lehmann *et al.* konnten zeigen, dass Zelllinien vom LAR-Subtyp von allen Subtypen *in vitro* am besten auf den Androgenreceptor-Inhibitor Bicalutamide ansprechen (45). Patientinnen mit

LAR-Tumoren sind im Durchschnitt älter als Patientinnen mit anderen TNBC-Subtypen (47,48). Der LAR-Subtyp hat klinische Ähnlichkeiten zum HR-positiven Mammakarzinom. So zeigt er vergleichsweise niedrige pCR-Raten und weist im Vergleich mit den anderen TNBC-Subtypen vermehrt Lymphknoten- und Knochenmetastasen auf (46,47).

Tab. 2: Molekulargenetische Klassifikationen des TNBC

Subtypen der verschiedenen molekulargenetischen Klassifikationen. Rechts und links aufgetragen, die für die Subtypen in den entsprechenden Zeilen regelhaften intrinsischen Subtypen, bzw. die Zuordnung zum jeweiligen übergeordneten triple-negativen Cluster. Hellgrau: Subtypen mit Leukozyteninfiltrat, bzw. infiltrierenden Stromazellen. (45,47–49)

		Vanderbilt-Klassifikationen		Baylor-Klassifikation	French-Klassifikation	Intrinsisch-Subtypen	
TNBC Cluster	TNBCtype-4 (2016)	TNBCtype (2011)					
BASAL-LIKE	Basal-like 1 (BL-1)	Basal-like 1 (BL-1)	Basal-like immune-suppressed (BLIS, Typ 3)	Basal-like with Low Immune-response (C2)			
		Basal-like 2 (BL-2)					
		Immunsignatur					
MESENCHYMAL-LIKE	Basal-like 2 (BL-2)	<i>Immunomodulatory (IM)</i> → durch <i>Lymphozyteninfiltrat</i>	Basal-like immune-activated (BLIA, Typ 4)	Basal-enriched with High-immune response (C3)			
		Mesenchymal (M)	Mesenchymal (M)				
MESENCHYMAL-LIKE		<i>Mesenchymal-stem-like (MSL)</i> → <i>Tumor-infiltrierende Stromazellen</i>	Mesenchymal (MES, Typ 2)				
		Mesenchymal (M)					
LUMINAL-ANDROGEN-RECEPTOR	Luminal-Androgen-Receptor (LAR)	Luminal-Androgen-Receptor (LAR)	Luminal-Androgen-Receptor (LAR, Typ 1)	non-basal-like (C1)	Her2-enriched Luminal A/B		

1.5 Therapie des Mammakarzinoms

Die Therapie des Mammakarzinoms besteht bei kurativem Vorgehen aus einer Resektion des Tumors verbunden mit einem operativen Staging der regionalen Lymphknoten (54). In der Regel folgt eine adjuvante Bestrahlung des Tumorfeldes (54). Eine adjuvante Chemotherapie ist beim Her2/neu-Rezeptor-positiven Mammakarzinom und TNBC weitestgehend unabhängig vom Stadium indiziert (54). Beim HR-positiven Mammakarzinom kann je nach Krankheitsstadium und weiteren Prognosefaktoren gegebenenfalls auf eine Chemotherapie verzichtet werden und eine alleinige endokrine adjuvante Therapie durchgeführt werden (54). Die primäre adjuvante Chemotherapie des Mammakarzinoms besteht aus einem Taxan oder einer Kombination aus einem Taxan und einem Anthrazyklin. Anstelle einer adjuvanten Chemotherapie kann eine Chemotherapie auch neoadjuvant durchgeführt werden, wodurch sich die Prognose nicht ändert (54). HR-positive Mammakarzinome können langfristig mit einer anti-hormonellen Therapie behandelt werden (54). HER2/neu-Rezeptor-positive Mammakarzinome werden zusätzlich mit HER2/neu-Rezeptorantagonisten behandelt (54). In der palliativen Situation kommen Mono- und Polychemotherapien mit Taxanen, Vinkaalkaloiden, Vinorebelin, Antimetaboliten, Platinkomplexe und Eribulin sowie je nach Rezeptorstatus endokrine Therapeutika und Her2-Rezeptorantagonisten zum Einsatz (54). Außerdem kann der VEGF-Inhibitor Bevacizumab eingesetzt werden (54).

1.6 Das Chemotherapeutikum Eribulin

1.6.1 Pharmakodynamik von Eribulin

Eribulin ist ein synthetisch hergestelltes Struktur analogon des zytotoxisch wirksamen Halichondrin B, das natürlicherweise im japanischen Meeresschwamm *Halichondria okadai* vorkommt (55,56). Der Wirkmechanismus von Eribulin beruht auf der in Abb. 2 dargestellten Bindung an das Tubulin der Mikrotubuli des Spindelapparates während der Mitose (55–58). Die Bindung von Eribulin an die Mikrotubuli führt zum irreversiblen Zellzyklusarrest in der G2-M-Phase, zur Zerstörung des Spindelapparates, Bildung inaktiver Mikrotubuliaggregate und zur Einleitung der Apoptose (58).

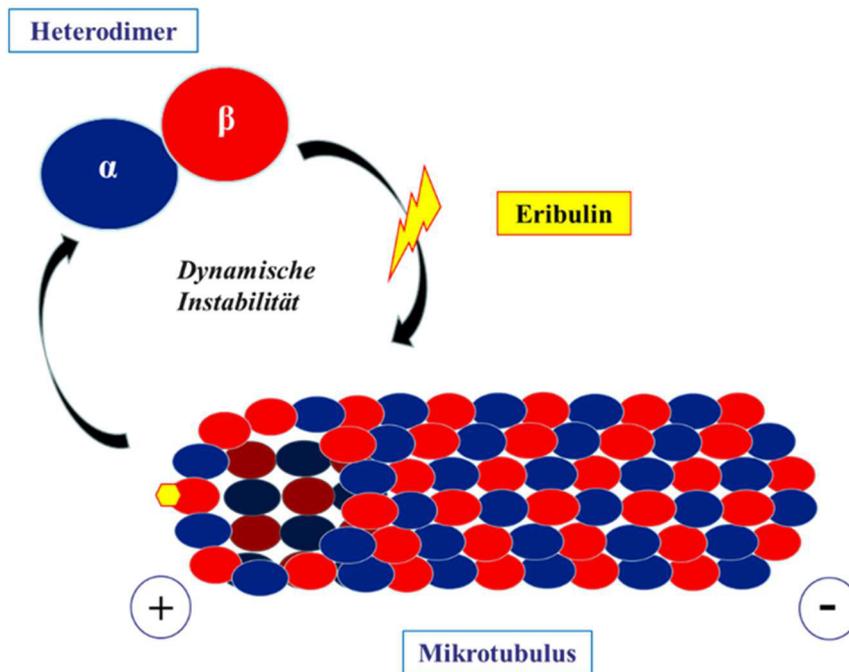


Abb. 2: Wirkung von Eribulin auf die Dynamische Instabilität des Mikrotubulus. Eribulin bindet am Plus-Ende der Mikrotubuli an die β -Untereinheit des Tubulins und inhibiert so das Wachstum der Mikrotubuli, jedoch nicht ihre Verkürzung (55,59).

Yoshida *et al.* (2014) konnten nach Eribulinbehandlung von triple-negativen Mammakarzinomzelllinien *in vitro* eine MET mit konsekutiv vermindertem Invasions- und Migrationspotenzial nachweisen (59). Neben der direkten Wirkung auf Tumorzellen wurden außerdem Effekte von Eribulin auf das Mikromilieu von Tumoren nachgewiesen. So hat Eribulin in subtoxischen Dosen einen antiangiogenetischen Effekt auf die Ausbildung von Kapillarnetzwerken durch Perizyten *in vitro* (60). Funahashi *et al.* (2014) konnten anhand von Xenograft-Modellen mit den triple-negativen Mammakarzinomzelllinien MX-1 und MDA-MB-231 zeigen, dass Tumore nach Eribulinbehandlung eine verbesserte Tumorperfusion aufwiesen (61). Der Einfluss von Eribulin auf die Angiogenese löst somit phänotypische Veränderungen aus, die zu einer Abnahme der Chemoresistenz durch Reduktion von Metastasierungsfördernder Hypoxie und EMT führen könnten (61).

1.6.2 Eribulin in klinischen Studien

Die Verträglichkeit und Wirksamkeit von Eribulin konnte in mehreren Phase-I-Studien bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumorerkrankungen, insbesondere bei Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem, chemotherapeutisch

vorbehandeltem Mammakarzinom nachgewiesen werden (62–65). Dabei konnte eine maximal tolerable Dosis von 1,4 mg/m² Eribulin bei wöchentlicher Gabe ermittelt werden (62). In Phase-II-Studien konnte die Wirksamkeit von Eribulin bei vielfach vorbehandelten Patientinnen mit fortgeschrittenen oder metastasierten Mammakarzinomen bestätigt werden (66–69). Die EMBRACE-Studie (the Eisai Metastatic Breast Cancer Study Assessing Physician's Choice versus E 7839), eine Phase-III-Studie mit 762 Patientinnen mit metastasierten, chemotherapeutisch vorbehandelten Mammakarzinomen zeigte eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit durch eine Eribulin-Therapie im Vergleich zur Therapie der Wahl des Arztes (70). Die mediane Überlebenszeit betrug in der Gruppe der mit Eribulin behandelten Patientinnen 13,1 Monate (95 % CI 11,8-14,3) im Vergleich zu 10,6 Monaten (95 % CI 9,3 -12,5) in der Kontrollgruppe, dieser Unterschied war signifikant (Hazard Ratio 0,81, CI 0,66-0,99; p= 0,041) (70). Überraschend war die Beobachtung, dass diese verlängerte Gesamtüberlebenszeit jedoch nicht wie sonst üblich mit einer Verlängerung der progressionsfreien Überlebenszeit durch Eribulin einherging. Unerwünschte Nebenwirkungen traten unter Eribulin öfter, schwerwiegende Nebenwirkungen jedoch nicht häufiger als in der Kontrollgruppe auf (70). Daten zur Lebensqualität wurden im Rahmen der Studie nicht erhoben. Aufgrund der EMBRACE-Studie wurde Eribulin 2011 in der europäischen Union unter dem Handelsname Halaven[®] zur Monotherapie des lokal fortgeschrittenen, metastasierten oder therapierefraktären Mammakarzinoms zugelassen (71). In einer weiteren randomisierten Phase-III-Studie an Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom zeigte sich keine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit oder des progressionsfreien Überlebens beim Vergleich einer Eribulin-Behandlung mit Capecitabine (72). Eine Subgruppenanalyse ergab jedoch, dass Eribulin die mediane Überlebenszeit in der Gruppe der Her2/neu-negativen, der Östrogenrezeptor-negativen und der triple-negativen Mammakarzinome im Vergleich zu Capecitabine signifikant verlängerte (15,9 Monate, 14,4 Monate und 14,4 Monate im Vergleich zu 13,5 Monate, 10,5 Monate und 9,4 Monate, p<0,05) (73). Bei Erhebung der Lebensqualität konnten keine Unterschiede in der Einschränkung des Funktionsniveaus zwischen Capecitabine- und Eribulin-Behandlung festgestellt werden, wenngleich sich die erlebten Einschränkungen zwischen den Gruppen qualitativ unterschieden (74). Eine gepoolte Analyse beider Phase-III-Studien ergab insgesamt einen statistisch signifikanten Vorteil einer Eribulin- Behandlung bezüglich der medianen Überlebenszeit mit 15,2 Monaten gegenüber 12,8 Monaten in der Kontrollgruppe (75). Auch hier ließ sich

zeigen, dass insbesondere Patientinnen mit einem triple-negativen und einem Her2-negativen Mammakarzinom von einer Eribulin-Behandlung profitierten (75).

1.8 Fragestellung

Das TNBC stellt eine klinisch und molekulargenetisch heterogene Gruppe von Tumoren dar. Dies ist insbesondere problematisch, da eine Chemotherapie bislang die einzige systemische Therapiemöglichkeit ist. Lehmann *et al.* (2011) erstellten eine molekulargenetische Klassifikation, die sechs triple-negative Mammakarzinomsubtypen differenziert (45). Die Klassifikation könnte ein hilfreiches Instrument bei der Wahl der Chemotherapie sein. So wurde gezeigt, dass sich die verschiedenen Subtypen signifikant in ihrem Ansprechen auf das Chemotherapeutikum Cisplatin unterscheiden (45). Eribulin ist ein neues Chemotherapeutikum, welches zur Therapie des fortgeschrittenen Mammakarzinoms eingesetzt wird und welches besondere Wirksamkeit bei Patientinnen mit TNBC gezeigt hat (70).

Ziel dieser Arbeit war es, anhand von exemplarischen Mammakarzinomzelllinien zu untersuchen, ob sich triple-negative Mammakarzinomsubtypen hinsichtlich ihrer Chemosensitivität gegenüber Eribulin unterscheiden. Ein weiteres Ziel war, besonders chemosensitive bzw. chemoresistente Mammakarzinomzelllinien und Subtypen zu identifizieren.

Hierzu wurde/n

- die mittleren Hemmkonzentrationen für zehn triple-negative Mammakarzinomzelllinien mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Test (MTT-Test) ermittelt.
- mit durchflusszytometrischer Analyse untersucht, ob Eribulin bei der triple-negativen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 Apoptose induziert.

2. Material und Methoden

2.1 Zelllinien, Zellkulturmedien und -zusätze

2.1.1 Humane triple-negative Mammakarzinomzelllinien

Zelllinien	TNBC-Subtyp	Intrinsischer Subtyp	Produzent
HCC 1937	BL-1	Her2	LGC, Wesel
MDA-MB-468	BL-1	Basal-like/ Her2/neu	
HCC 1806	BL-2	Unclassified	
HDQ-P1	BL-2	Unclassified	DSMZ, Braunschweig
DU 4475	IM	Unclassified	
BT-549	M	Claudin-low	LGC, Wesel
MDA-MB-231	MSL	Claudin-low	
MDA-MB-436	MSL	Claudin –low	
MDA-MB-453	LAR	Luminal A	DSMZ, Braunschweig
CAL-148	LAR	Luminal A	

2.1.2 Zellkulturmedien und –zusätze

Produktname	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Life Technologies, Darmstadt
Fetales Bovines Serum (FBS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Mammary Epithelial Growth Suppl. (MEGS)	Life Technologies, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
RPMI Nährmedium 1640	Life Technologies, Darmstadt

2.2 Arzneimittel, Chemikalien, Lösungen und Puffer

2.2.1 Arzneimittel

Produktname	Hersteller
HALAVEN® 0,44 mg/ml Injektionslösung	EISAI, Europe Ltd., Hertfordshire, UK

2.2.2 Chemikalien

Produktname	Hersteller
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
(<i>S</i>)-(+)-Camptothecin ≥ 90 % (HPLC), powder	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Life Technologies, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
N, N-Dimethylformamid	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypan Blue Dye, 0.4 % solution	BIO-RAD, München
0,05 % Trypsin-EDTA	Life Technologies, Darmstadt
Nuclease freies Wasser, Ultra pure H ₂ O	Promega, Mannheim

2.2.3 Gebrauchslösungen und Puffer

MTT-Test	Rezeptur
5 % Ethanol-Gebrauchslösung (10 ^o ml)	0,5 ml Ethanol (100 %) 9,5 ml Aqua dest.
MTT-Lösung (50 ml)	250 mg MTT 50 ml PBS
10 % MTT-Gebrauchslösung (10 ml)	1 ml MTT-Lösung 9 ml DMEM
MTT-Stoppuffer (500 ml)	50 g SDS 250 ml Aqua dest. 250 ml N, N-Dimethylformamid
Durchflusszytometrische Analyse	Rezeptur
Camptothecin-Gebrauchslösung (1 ml)	1 mg Camptothecin 1 ml DMSO

2.2.4 Kits

Produktname	Hersteller
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Bioscience, Allschwil, Schweiz

2.3 Materialien und Geräte**2.3.1 Materialien**

Produktname	Hersteller
Zellkulturpipetten (5, 10, 25 ml), Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (Plastik, 15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kulturflaschen (Plastik, 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturplatten 6-well	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturplatten 24-well	BD Bioscience, Allschwil, Schweiz
Gewebekulturplatten 96-well	Sarstedt, Nümbrecht
Tissue Culture Dishes, Polystyrene	BD Bioscience, Allschwil, Schweiz
Kryogefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (Safe Lock Tubes 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Dual Counting Slides	Bio-Rad, München
Plastikröhren, 5 ml, für Durchflusszytometer	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen gestopft, steril (10, 20, 200, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen sterile/unsterile (10, 20, 200, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht

2.3.2 Geräte

Produktname	Hersteller
Absaugpumpe Gel Pump GP110	Savant, New York, USA
Durchflusszytometer BD FACSAria™ III cell sorter	BD Bioscience, Allschwil, Schweiz
Feinwaage Scaltec SBC 21	Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Flockeneisbereiter Icematic F80C	Icematic Deutschland, Düsseldorf
Heizschüttler, Thermomixer compact	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Horizontalschüttler Vibrax VXR S15	IKA Labortechnik, Staufen
Kühlzentrifuge Sigma 2K15	Sigma, Osterode am Harz
Laborwaage Sartorius basic BA310S	Sartorius AG, Göttingen

Magnetrührer MR82	Heidolph Instruments, Schwabach
Mehrkanalpipette Multipette® plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Mikroskop (Axiovert 135M)	Carl Zeiss, Göttingen
Mikroskop (Wilovert A)	Hund, Wetzlar
Mikrozentrifuge MC6	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrozentrifuge Rotilabo®	Roth, Karlsruhe
Orbitalschüttler Shaker S4	ELMI Lab. Equipment, Riga, LV
pH-Meter pH526 MultiCal®	WTW, Weilheim
Photometer, MRX Multiplate-Reader	Dynatech Laboratories, Burlington, USA
Pipettierhilfe accu-jet	Brand GmbH, Wertheim
Pipettierhilfe pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Sterile Sicherheitswerkbank CleanAir BS-5726	CleanAir, Wörden, NE
Sterile Sicherheitswerkbank NUAIRE NU440-400E	Integra Biosciences, Fernwald
Thermocycler, Biometra TPersonal 48	Biometra GmbH, Göttingen
Trockenschrank	Heraeus, Hanau
Variable Einkanalpipetten Eppendorf Research® (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Vortex-Schüttler Assistent Reamix 2789	Hecht-Assistent, Sondheim
Vortex-Schüttler VWR 1719	VWR International GmbH, Darmstadt
Wasserbad GFL1083	GFL, Großburgwedel
Zellzählgerät, Automated Cell Counter Tc 20 TM	BIO-RAD, München
Zentrifuge Universal 32	Hettich, Tuttlingen

2.4 Zellkultur

Die Durchführung der Zellkultur-Analysen erfolgte grundsätzlich unter sterilen Bedingungen. Kryokonservierte Zellen wurden im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und rasch in Nährmedium überführt. Anschließend wurden die Zellen durch 7 min Zentrifugation mit 1.500 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 15 ml Nährmedium gelöst. Die Zellsuspension wurde in 75 cm² Zellkulturflaschen gegeben und in einem CO₂-Inkubator in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre aus Luft mit 5 % CO₂ inkubiert. Als Nährmedium wurde RPMI 1640 Medium mit Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem fetalem bovinem Serum und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Bei der Zelllinie CAL-148 wurde entsprechend der Verkäuferangaben dem Standardnährmedium 0,5 % Mammary Epithelial Growth Supplement (MEGS) zugefügt.

Bei Gelbfärbung des Nährmediums, die einen pH-Umschlag und damit einen Nährstoffmangel anzeigt, wurde das Nährmedium ersetzt. Unabhängig davon erfolgt ein Austausch des Nährmediums mindestens zweimal wöchentlich. Sobald der Zellrasen mehr als 70 % des Zellkulturflaschenbodens bedeckte, wurde eine Zellpassage durchgeführt. Hierzu wurde zunächst das Nährmedium entfernt und die Zellkulturflasche mit 10 ml DPBS gewaschen. Danach wurden 5 bzw. 8 ml Trypsin/EDTA-Lösung in die 75 cm² bzw. 175 cm² Zellkulturflaschen gegeben und diese für 5 min im Brutschrank inkubiert. Die Protease Trypsin löst die adhärent wachsenden Zellen aus dem Zellverband heraus und vom Flaschenboden. Nach vollständiger Lösung der Zellen vom Flaschenboden, wurde die Trypsin-Zellsuspension für 7 min bei 1.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss verworfen und das Zellpellet in 10 ml Nährmedium gelöst. Je nach Zellwachstum wurden 20-50 % der Ursprungsmenge der Zellsuspension in 75 cm² bzw. 175 cm² Zellkulturflaschen gegeben und die Flaschen mit Nährmedium auf 15 ml bzw. 25 ml Endvolumen aufgefüllt. Zur Kryokonservierung wurden 10⁵ Zellen in 1,5 ml Nährmedium mit Zusatz von 10 % DMSO gelöst, in 1,5 ml Kryoröhrchen überführt und im Einfriercontainer bei -80 °C gelagert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte maschinell mit dem Automated Cell Counter Tc 20 nach Herstellerangaben und unter Einsatz der dazugehörigen Dual Chamber Slides und Verwendung von 1 Vol Trypan Blau, einem Farbstoff der avitale Zellen blau färbt.

2.4.1 Zellkultur der nicht-adhärent wachsenden Zelllinie DU-4475

Die Zellkultur der nicht-adhärent wachsenden Zelllinie DU-4475 erfolgte in 25 cm² Zellkulturflaschen mit Zusatz von 15 ml Nährmedium. Zum Austausch des Nährmediums und gleichermaßen zur Zellpassage wurde der Inhalt der Zellkulturflasche für 7 min bei 1.500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet in 15 ml Nährmedium gelöst und die Zellsuspension zum Austausch des Nährmediums komplett in die Zellkulturflasche gegeben. Zur Zellpassage wurde jeweils die Hälfte der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche gegeben und mit Nährmedium auf insgesamt 15 ml aufgefüllt. Die Entscheidung zur Passage erfolgte, wenn bei 10-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop mehrere große Zellcluster in jedem Gesichtsfeld zu erkennen waren.

2.5 Zellviabilitäts-Test

Zur Ermittlung der jeweiligen IC 50-Konzentration von Eribulin wurde der MTT-Test, ein etablierter Zellviabilitäts- und Zellproliferationstest, eingesetzt. Zur Durchführung des MTT-Tests wurden jeweils 3.000 Zellen in 100 μ l Nährmedium in jedes Well einer 96 Well-Platte gegeben. Anschließend wurde die 96 Well-Platte für 24 h im CO₂-Inkubator inkubiert. Nach 24 h wurden jeweils 6 Wells durch Zugabe von 50 μ l verdünnter Eribulin-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen (3 μ M, 300 nM, 30 nM, 3 nM, 300 pM und 30 pM) behandelt, so dass letztlich Endkonzentrationen von 1 μ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM und 10 pM Eribulin erreicht wurden. Da Eribulin in Halaven[®] in 5 % Ethanol gelöst vorliegt, wurden zudem Lösungsmittelkontrollen mit Ethanol durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 6 Wells mit 50 μ l einer in Nährmedium verdünnten Ethanollösung behandelt, so dass die in den Wells erreichte Endkonzentration 0,0008 % Ethanol betrug und somit der Ethanolkonzentration bei einer Behandlung mit 1 μ M Eribulin entsprach. Als unbehandelte Kontrolle wurde in 12 Wells jeweils 50 μ l des Nährmediums zugegeben. Nach 72 h im CO₂-Inkubator wurden die Überstände der Wells verworfen und je 100 μ l der 10 % MTT-Gebrauchslösung in jedes Well gegeben. Die 96 Well-Platte wurde anschließend für 2,5 h im CO₂-Inkubator inkubiert. Danach wurden 100 μ l Stopppuffer in jedes Well gegeben und die 96 Well-Platte für ca. 18 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Abschließend wurde die Extinktion im Photometer bei einer Wellenlänge von 560 nm (650 nm Referenzwellenlänge) gemessen. Der MTT-Test wurde für jede Zelllinie mindestens dreimal durchgeführt.

Bei der Durchführung des MTT-Tests mit der nicht-adhären wachsenden Zelllinie DU-4475 und der lose-adhären wachsenden Zelllinie MDA-MB-453 wurden die Zellen in dem farbstofffreien Dulbeccos Modified Eagle's Medium ausgesät. Eribulin wurde zur Behandlung ebenfalls in diesem Medium verdünnt. Das Medium wurde vor der Zugabe der MTT-Lösung nicht entnommen, sondern 15 μ l unverdünnte MTT-Lösung dazugegeben, so dass die MTT-Endkonzentration der bei den adhären wachsenden Zellen erreichten Endkonzentration entsprach. Für die Zelllinie MDA-MB-453 wurde zusätzlich eine Vergleichsuntersuchung nach dem Standardprotokoll durchgeführt.

Um den Effekt vom Lösungsmittel Ethanol genauer zu untersuchen, wurden zudem drei exemplarische Zelllinien mit einer Ethanolverdünnungsreihe (166,0 %-0,00008 % bzw.

1,6 ‰-0,00008 ‰ Ethanol) behandelt und MTT-Tests durchgeführt, um den Einfluss der erreichten Ethanol-Konzentrationen auf die Zellviabilität zu ermitteln. Dabei wurde wie bei den oben beschriebenen MTT-Tests verfahren, der Versuch jedoch nur einmalig und mit jeweils 6 Kontrollproben durchgeführt.

Zur Auswertung der MTT-Tests wurde aus jedem Versuch der durchschnittliche Extinktionswert für die Kontrollproben ermittelt. Die Durchschnittswerte für die Kontrollen wurde als 100 % vitale Zellen definiert und alle Extinktionswerte in Relation dazu in Prozent angegeben. Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism[®] Version 5.00 für Windows, GraphPad Software, Kalifornien, USA. Hierbei wurden zunächst die Mittelwerte aus den 6 bzw. 12 Einzelwerten aus jedem Versuch ermittelt und dann die Mittelwerte aus 3 Versuchen bestimmt und als Balkendiagramme mit dazugehöriger Standardabweichung dargestellt. Danach wurde eine Multiple Varianzanalyse mittels Dunnett's -Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde hierbei als $p \leq 0,05$ definiert. Außerdem wurden für jede Zelllinie die logarithmische Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt. Die Wendepunkte dieser Dosis-Wirkungs-Kurven beschreiben die jeweilige mittlere inhibitorische Konzentration von Eribulin (IC 50-Konzentration). Der Mittelpunkt zwischen maximaler und minimaler IC 50-Konzentration wurde als Cut-Off definiert, um anhand der IC 50-Werte zwischen Eribulin resistenten und sensiblen Zelllinien zu unterscheiden.

2.6 Durchflusszytometrische Analyse

Die durchflusszytometrische Analyse wurde eingesetzt um die durch Eribulin induzierte Apoptose qualitativ und quantitativ nachzuweisen. Hierzu wurde das FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences, verwendet. Dieses enthält den an Annexin V-gekoppelten, fluoreszierenden Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und den Farbstoff Propidium-Iodid (PI). Annexin V ist ein Protein, das mit hoher Affinität an Phosphatidylserin bindet. Bei der Apoptose wird Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran an der Oberfläche der Zellmembran präsentiert. Aufgrund der Kopplung vom Fluoreszenzfarbstoff an Annexin V gelingt somit der Nachweis von apoptotischen Zellen. PI kann die geschädigte Zellmembran von Zellen permeieren und färbt spätapoptotische und nekrotische Zellen an. Demnach sind Annexin V- negative und

PI- negative Zellen vitale Zellen. Annexin V-positive und PI-negative Zellen sind apoptotische Zellen, Annexin V positive und PI-positive sind spätapoptotische oder nekrotische Zellen und Annexin V-negative und PI-positive Zellen sind nekrotische Zellen.

Zur Durchführung wurden jeweils Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 für 24 h mit der 10x IC 50-Konzentration für Eribulin behandelt. Anschließend wurden jeweils 10^6 Zellen geerntet, pelletiert, zweimal in kaltem PBS gewaschen und in 1 ml Bindungspuffer gelöst. Als Positivkontrolle für Apoptose wurden Zellen der Zelllinie MDA-MB-468 für 3 h mit 5 μ M Camptothecin behandelt. Hierfür wurde Camptothecingebrauchslösung in Nährmedium verdünnt. Außerdem wurde eine Nekrosekontrolle durch 10 min Erhitzung auf 95 °C angefertigt. Im Anschluss an die Camptothecin und Nekrosebehandlung wurden auch diese Zellen pelletiert, zweimal in kaltem PBS gewaschen und abschließend 10^6 Zellen in 1 ml Bindungspuffer gelöst. Die Färbung wurde mit dem FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences, nach Herstellerangaben durchgeführt. Dem Protokoll des Kit-Herstellers entsprechend wurden Färbekontrollen ohne Färbung, nur mit PI bzw. nur mit Annexin-FITC Färbung angefertigt. Die Messung erfolgte im BD FACSaria™ III cell sorter. Dabei wurden die in der BD FACSuite Software (BD Biosciences) vorinstallierten Geräteeinstellungen für den Annexin V-FITC-Test verwendet. Es wurden von jeder Probe jeweils 10^5 Zellen gezählt. Der Versuch wurde insgesamt drei Mal für die Zelllinie MDA-MB-468 durchgeführt.

Die Auswertung erfolgt mit der FLOWJO Single Cell Analysis Software (FLOWJO; LCC, Ashland, OR, USA). Hierbei wurden je nach Annexin V/PI-Färbung vier Zellzustände unterschieden und grafisch in vier Quadranten dargestellt. Die Anzahl der Zellen aus den jeweiligen Quadranten wurde prozentual zu allen gezählten Zellen angegeben (Abb. 3). Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism® Version 5.00 für Windows, GraphPad Software, Kalifornien, USA. Hierbei wurden zunächst die Mittelwerte aus den 3 Versuchen bestimmt und als Balkendiagramme mit dazugehöriger Standardabweichung dargestellt. Danach wurde eine Multiple Varianzanalyse mittels Dunnett's -Test durchgeführt, das Signifikanzniveau wurde hierbei als $p \leq 0,05$ definiert.

3. Ergebnisse

3.1 Vorversuche

3.1.1 Einfluss der Abnahme des Nährmediums beim MTT-Test mit nicht-adhären wachsenden Zelllinien

Da die Zelllinien MDA-MB-453 und DU-4475 lose-adhärentes bzw. nicht-adhärentes Wachstum zeigen, wurde der Versuchsablauf des MTT-Tests für diese Zelllinien modifiziert. So wurde auf das Verwerfen des Überstands vor der Färbung verzichtet. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen einer Versuchsdurchführung mit oder ohne Abnahme des Nährmediums vor Zugabe von MTT bei der lose-adhären wachsenden Zelllinie MDA-MB-453 festgestellt werden.

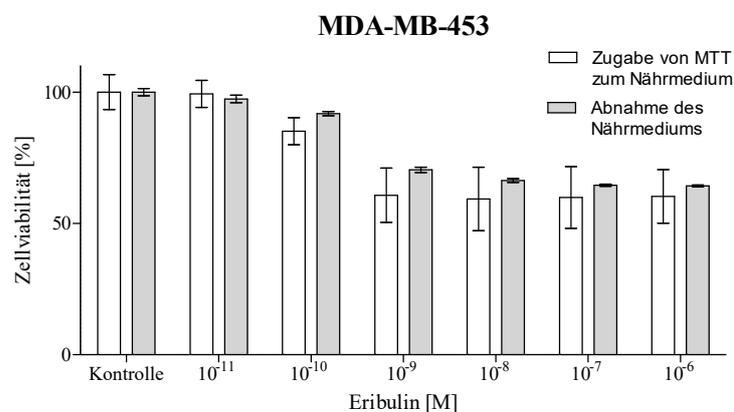


Abb. 3: Darstellung des Einflusses der Abnahme des Zellmediums vor Zugabe der MTT-Lösung bei der lose-adhären wachsenden Zelllinie MDA-MB-453. Die Eribulin-Behandlung erfolgte für 72 h, jeweils in sechs Parallelansätzen. Die Kontrolle erfolgte in 12-facher Ausführung. Die Zellviabilität nach Eribulin-Behandlung ist in Prozent von der unbehandelten Kontrolle angegeben. Die Balkendiagramme stellen die Mittelwerte aus allen Versuchen \pm Standardabweichung dar. Die Ergebnisse der Versuche ohne Abnahme des Nährmediums (weiße Balken) wurden mit den jeweiligen Ergebnissen aus dem Versuch mit Abnahme des Nährmediums verglichen (graue Balken). Signifikanzniveau: * $p \leq 0,05$

3.1.2 Einfluss des Lösungsmittels Ethanol auf die Zellviabilität

In Vorversuchen wurde ermittelt, dass das in Halaven® enthaltene Lösungsmittel Ethanol in Konzentrationen ab 0,008 ‰ bzw. 0,16 ‰ einen zytotoxischen Effekt auf die Zelllinie MDA-MB-468 und MDA-MB-436 hat. MDA-MB-453 wurde mit maximal 1,6 ‰ Ethanol behandelt, dabei zeigte sich, wie bei allen anderen getesteten Konzentrationen, kein signifikanter Effekt von Ethanol auf die Zellviabilität.

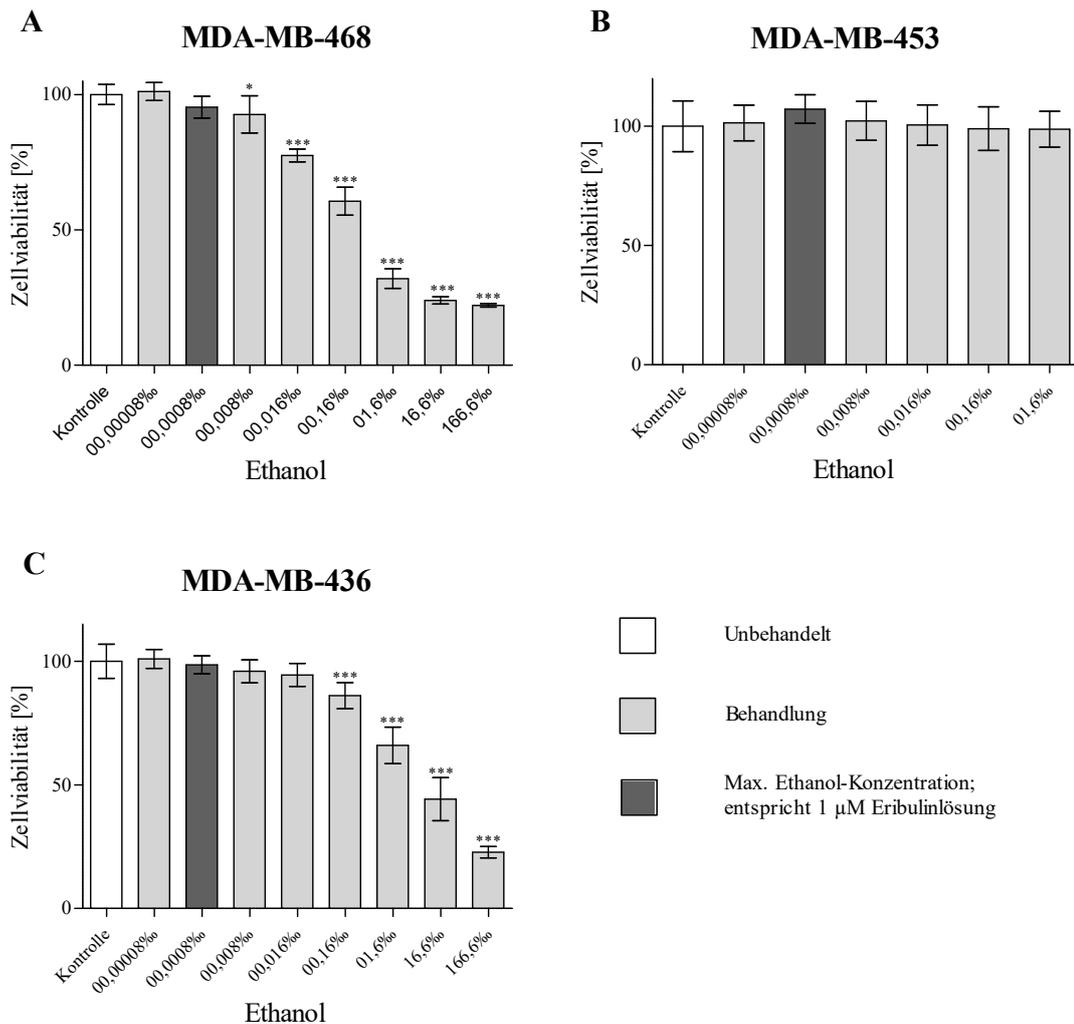
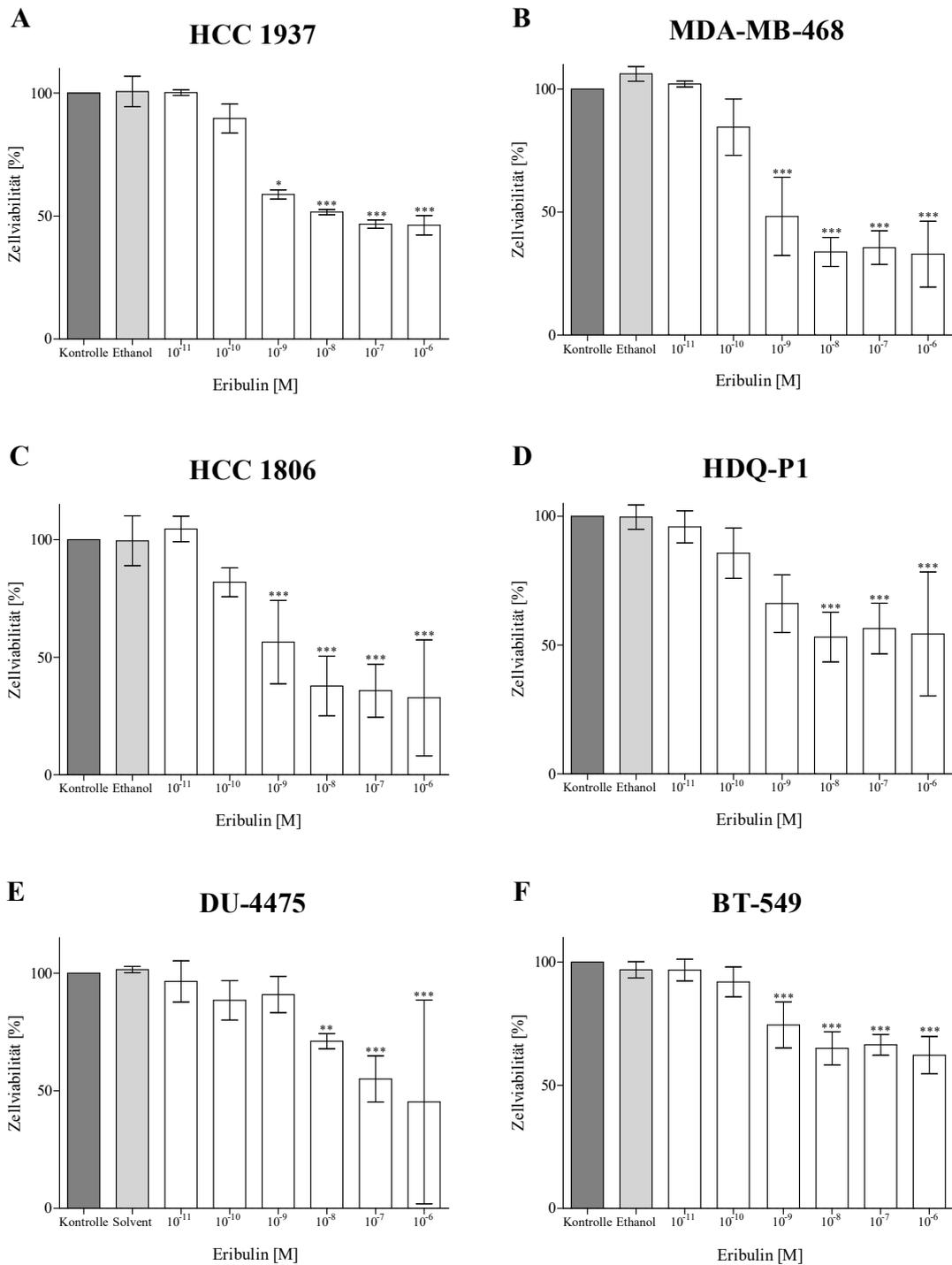


Abb. 4 A-C: Einfluss von Ethanol auf die Zellviabilität der Zelllinien MDA-MB-468, MDA-MB-453 und MDA-MB-436. Die Zellviabilität nach 72 h Ethanol-Behandlung ist in Abhängigkeit von der unbehandelten Kontrolle in Prozent angegeben. Die Darstellung zeigt jeweils den Mittelwert aus 6 Einzelwerten \pm Standardabweichung. Signifikanzniveau *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$ * $p \leq 0,05$

Die unter Verwendung von Ethanol als Lösungsmittel für Eribulin in den folgenden Versuchen maximal erreichte Ethanol-Konzentration von 0,0008 ‰ hatte keinen signifikanten Effekt auf die Viabilität der getesteten Zelllinien (s. Abb.4).

3.2 Chemosensitivität der getesteten Zelllinien gegenüber Eribulin

Zur Ermittlung der Chemosensitivität von zehn triple-negativen Mammakarzinomzelllinien gegenüber Eribulin wurden die Zelllinien *in vitro* mit Eribulin behandelt und der MTT-Zellviabilitätstest durchgeführt.



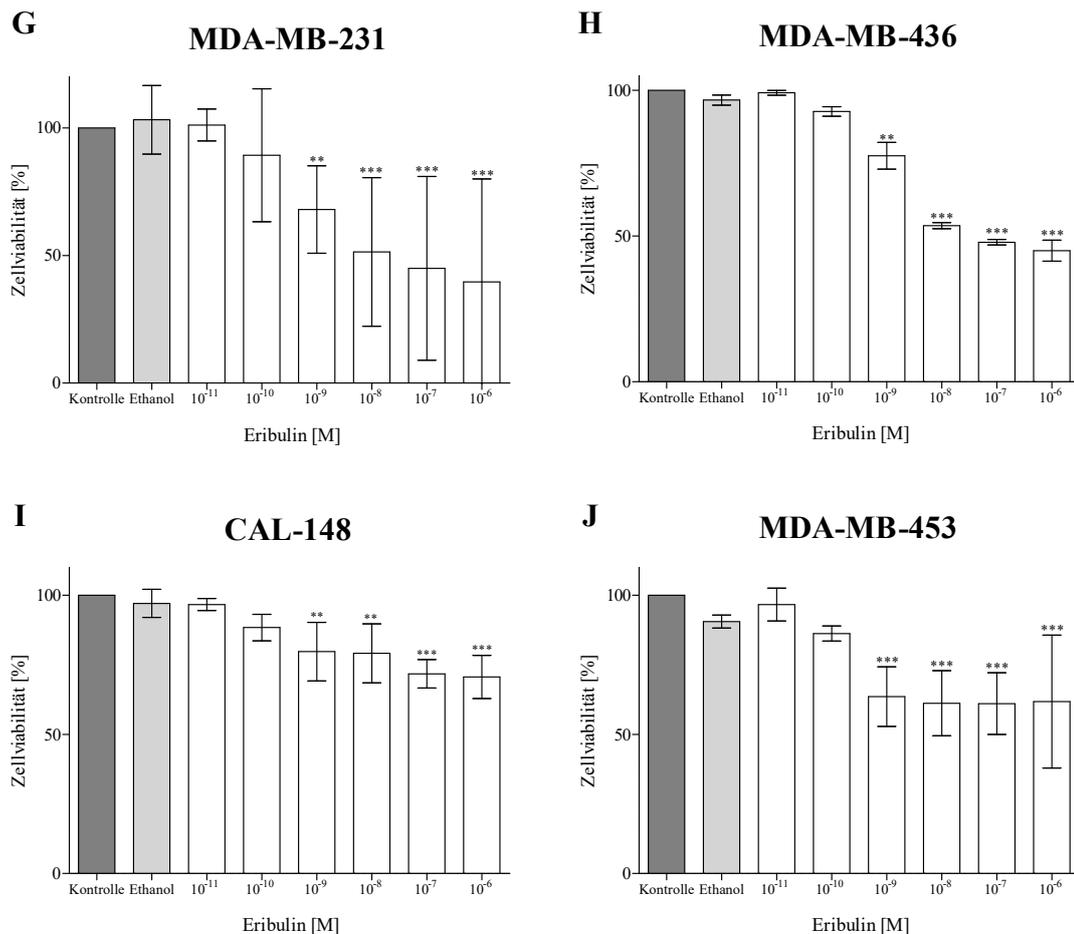


Abb. 5 A-J: Darstellung des Einflusses der Behandlung mit verschiedenen Eribulin-Konzentrationen auf die Zellviabilität von zehn getesteten Zelllinien. Die Eribulin-Behandlung erfolgte für 72 h, jeweils in 6 Parallelansätzen. Die Kontrolle erfolgte in 12-facher Ausführung. Als Lösungsmittelkontrolle wurden jeweils 6 Parallelansätze für 72 h mit der höchsten erreichten Ethanolkonzentration 0,0008 ‰ behandelt. Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche durchgeführt. Die Zellviabilität nach Eribulin-Behandlung (weiße Balken) bzw. nach Ethanol-Behandlung (hellgraue Balken) ist in Prozent von der unbehandelten Kontrolle angegeben (dunkelgraue Balken). Die Balkendiagramme stellen die Mittelwerte aus allen Versuchen \pm Standardabweichung dar. Signifikanzniveau: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$

Eribulin bewirkte bis zu einer Konzentration von 10^{-9} M eine signifikante Reduktion der Zellviabilität bei den meisten getesteten Zelllinien. Bei den Zelllinien DU-4475 und HDQ-P1 war eine signifikante Reduktion der Zellviabilität nur bis zu einer Konzentration von 10^{-8} M nachweisbar (siehe Abb. 5A-J). Bei einer Eribulin-Behandlung mit einer Konzentration von 10^{-10} M konnte bei keiner der getesteten Zelllinien ein signifikanter Effekt auf die Zellviabilität nachgewiesen werden. Die maximal erreichte Wirkung von

Eribulin unterschied sich zwischen den Zelllinien deutlich. Bei den Zelllinien MDA-MB-468 und HCC 1806 konnte durch eine Eribulin-Behandlung mit einer maximalen Dosis von 10^{-6} M eine maximale Reduktion der Zellviabilität um ca. 70 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erreicht werden. Bei diesen Zelllinien hatte Eribulin somit den stärksten Effekt. Bei der Zelllinie MDA-MB-231 betrug der maximale Effekt eine Reduktion um ca. 60 % der Zellviabilität. Bei den Zelllinien HCC 1937 und MDA-MB-436 wurde eine maximale Reduktion der Zellviabilität von etwa 50 % im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Die maximale Zytoreduktion durch eine Eribulin-Behandlung bei der Zelllinie HDQ-P1 betrug ca. 45 %, während diese bei den Zelllinien BT-549, CAL-148 und MDA-MB-453 mit einer Zellviabilitätsreduktion von etwa 30-40 % am geringsten ausfiel. Bei der Zelllinie MDA-MB-453 erreichte die zytotoxische Wirkung von Eribulin bereits ab 10^{-9} M das Wirkungsmaximum, bei den Zelllinien MDA-MB-468, HDQ-P1 ab einer Eribulin-Konzentration von 10^{-8} M und bei den Zelllinien HCC 1937 und CAL-148 bereits ab einer Konzentration von 10^{-7} M. Die IC 50-Werte für Eribulin liegen im subnanomolaren Bereich mit Ausnahme des IC 50-Wertes der Zelllinie DU-4475, der mit 15,5 nM Eribulin im zweistelligen nanomolaren Bereich liegt.

Die Behandlung mit 0,0008 % Ethanol als Lösungsmittelkontrolle hatte bei allen getesteten Zelllinien keine signifikanten Effekte auf die Zellviabilität.

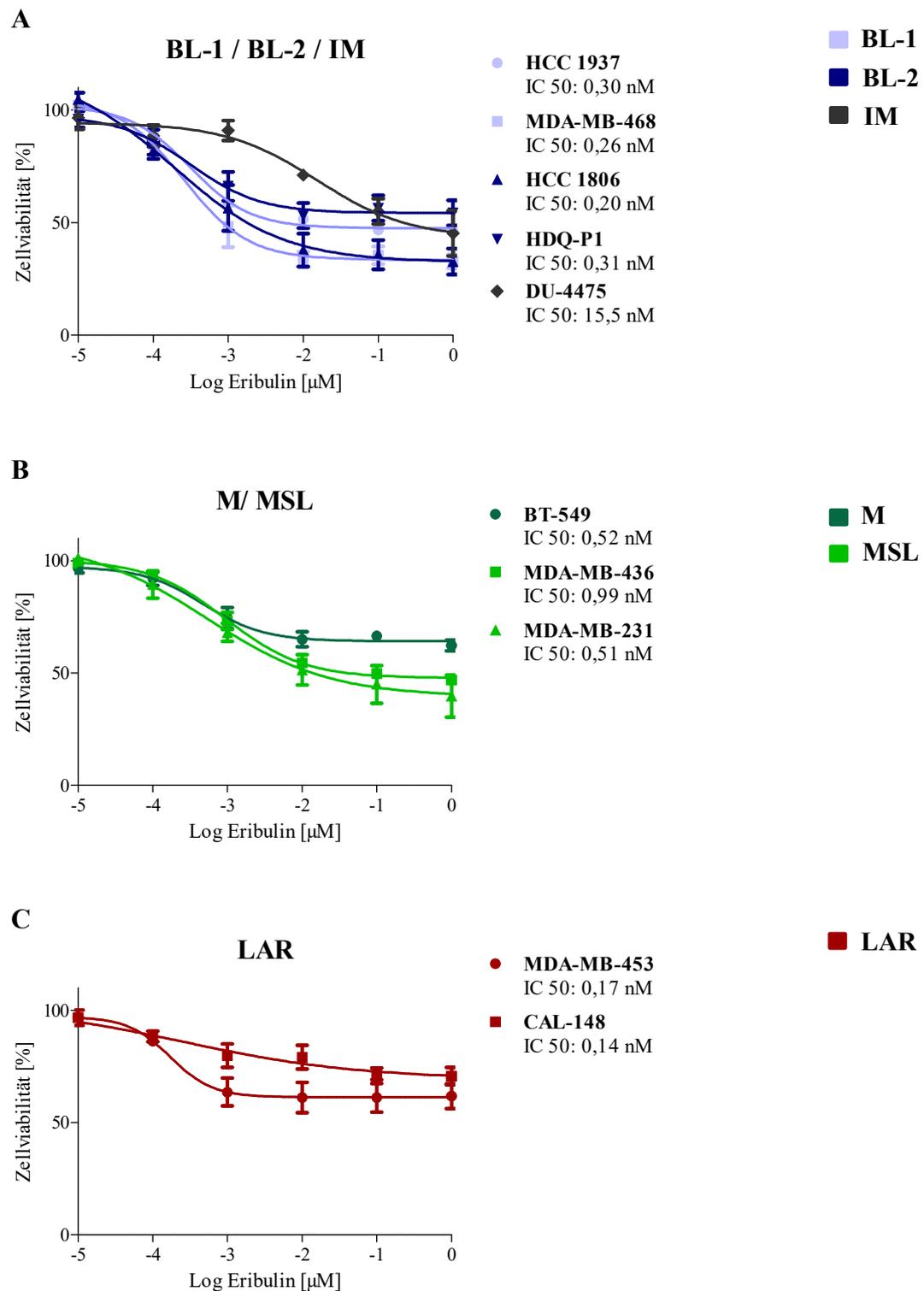


Abb. 6 A-C: Logarithmische Darstellung der Dosis-Wirkungskurven von Eribulin. Jeder Punkt stellt einen Mittelwert aus 3 Einzelwerten +/- Standardfehler dar. Zelllinien mit farblicher Zuordnung zu dem jeweiligen TNBC-Subtyp. In der Legende rechts neben den Graphen sind die IC 50-Werte für jede Zelllinie aufgeführt.

Die ermittelten IC 50-Werte liegen innerhalb und zwischen den verschiedenen Subtypen, mit Ausnahme der Zelllinie DU-4475 vom IM-Subtyp nah beieinander. Die Zelllinie DU-4475 vom IM-Subtyp reagierte deutlich weniger sensitiv auf die Behandlung mit Eribulin als alle anderen Zelllinien. Insgesamt konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den IC 50-Werten verschiedener TNBC-Subtypen gefunden werden.

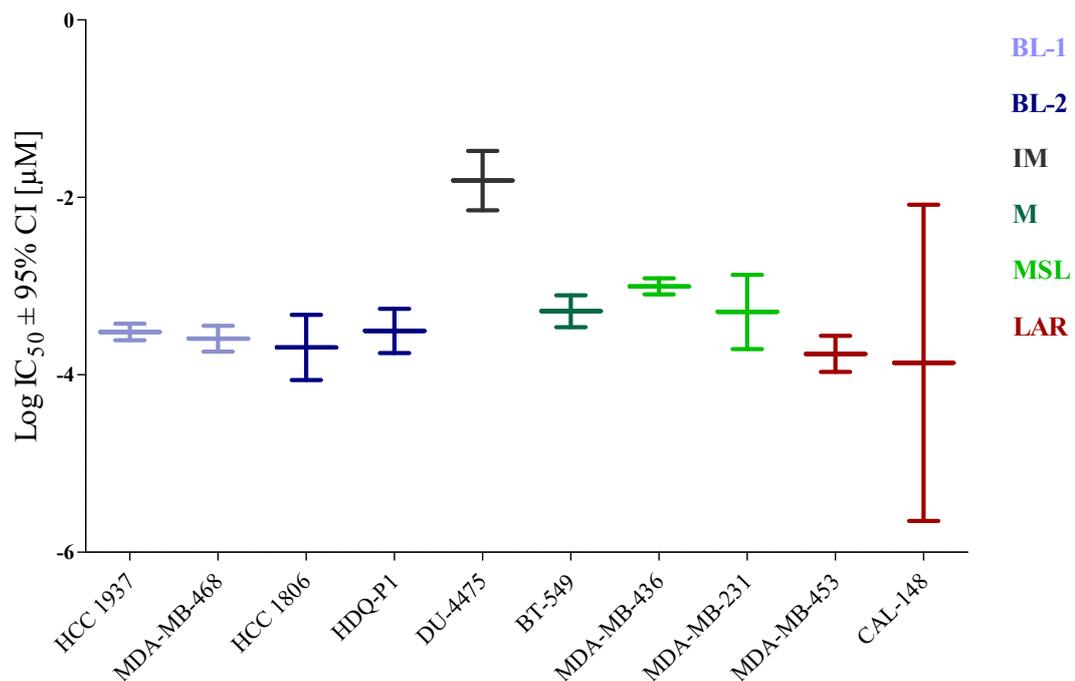


Abb. 7: Boxplot Log IC 50-Werte für Eribulin. Logarithmische Darstellung der IC 50-Konzentration von Eribulin für jede der getesteten TNBC-Zelllinien \pm 95 %-Konfidenzintervall. Die verschiedenen Subtypen, sind durch die Farbgebung voneinander abgegrenzt.

Es wurde eine Unterteilung in Eribulin-sensible bzw. Eribulin-resistente TNBC-Subtypen durch einen Cut-Off-Wert festgelegt (siehe Abb. 8). Die Zelllinie DU-4475 ist demnach als Eribulin-resistent, alle anderen als Eribulin-sensibel, zu bezeichnen. Es zeigt sich eine Tendenz, dass Zelllinien vom LAR-, BL-1- und BL-2-Subtyp auf die Eribulin-Behandlung am sensitivsten reagieren.

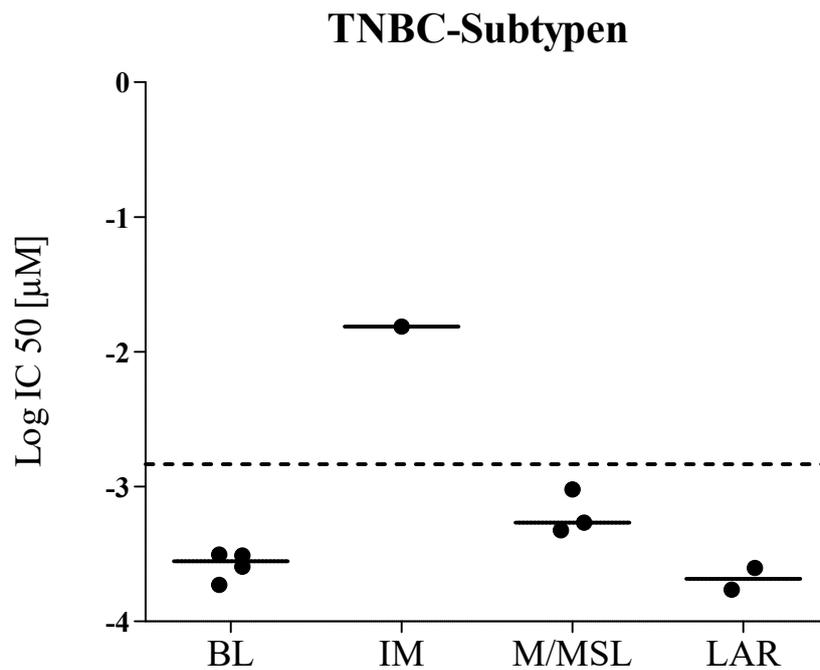
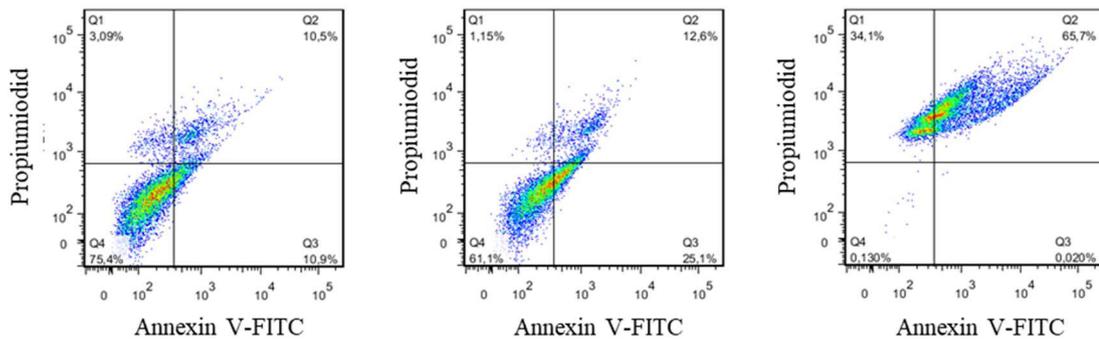


Abb. 8: Log IC 50-Konzentrationen für Eribulin der verschiedenen TNBC-Subtypen. Jeder Punkt zeigt die Log IC 50-Konzentration für Eribulin einer Zelllinie (Darstellung mit Median). Die gestrichelte Linie zeigt den Mittelpunkt zwischen Max. Log IC 50 und Min. Log IC 50, dieser wurde als Cut-Off zur Differenzierung in Eribulin-sensible und Eribulin-resistente Zelllinien gewählt. BL = Basal-like-1/2-Subtypen, IM = Immunomodulatory-Subtyp, M/MSL = Mesenchymal/Mesenchymal-stem-like-Subtyp, LAR= Luminal-Androgenreceptor-Like-Subtyp.

3.3 Apoptoseinduktion durch Eribulin

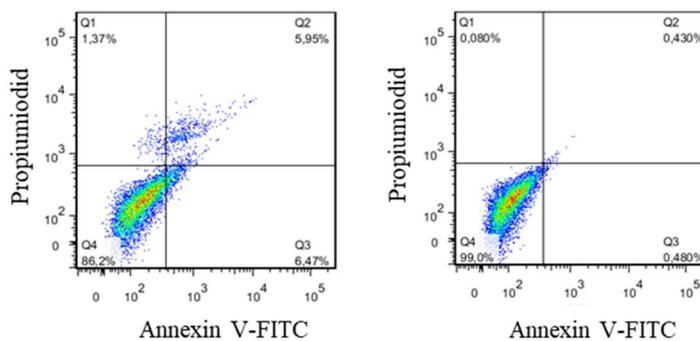
Da der MTT-Test nicht zwischen einer zytotoxischen oder zytostatischen Wirkung von Eribulin unterscheiden kann, erfolgte der Nachweis einer durch Eribulin induzierten Apoptose mittels durchflusszytometrischer Analyse für die Zelllinie MDA-MB-468.



9A) Kontrolle, unbehandelt

9B) Eribulin 24 h

9C) 95° C, 10 min (Nekrose)



9D) Camptothecin 3 h

9E) unbehandelt, ungefärbt

Abb. 9: Repräsentative Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid. In den Abbildungen ist das Ergebnis eines Versuchs mit der Zelllinie MDA-MB-468 gezeigt. Jeder Punkt in den Diagrammen stellt eine Zelle dar. 2A: unbehandelte Zellen, 2B: für 24 h mit der IC 50-Konzentration von Eribulin behandelte Zellen, 2C: 10 min bei 95°C / nekrotische Zellen, 2D: 3 h mit 5 µM Camptothecin behandelte Zellen, 2E: unbehandelte und ungefärbte Zellen. Auf der X-Achse ist die Färbintensität jeder Zelle für die Annexin V-FITC-Färbung (FITC-A) und auf der Y-Achse die Färbintensität für Propidiumiodid (PI) gezeigt. Mit dem eingefügten Gitternetz erfolgt eine Einteilung der Zellen in vier Quadranten gruppiert in Q1: Annexin V-FITC-negative und PI-positive Zellen, Q2: Annexin V-FITC-positive und PI-positive Zellen, Q3: Annexin V-FITC-positive und PI-negative Zellen, Q4: Annexin V-FITC-negative und PI-negative Zellen. Es wurden insgesamt 3 unabhängige Versuche durchgeführt. Die Auswertungen aus allen Versuchen mit Färbekontrollen sind im Anhang in der Tabelle 3 dargestellt.

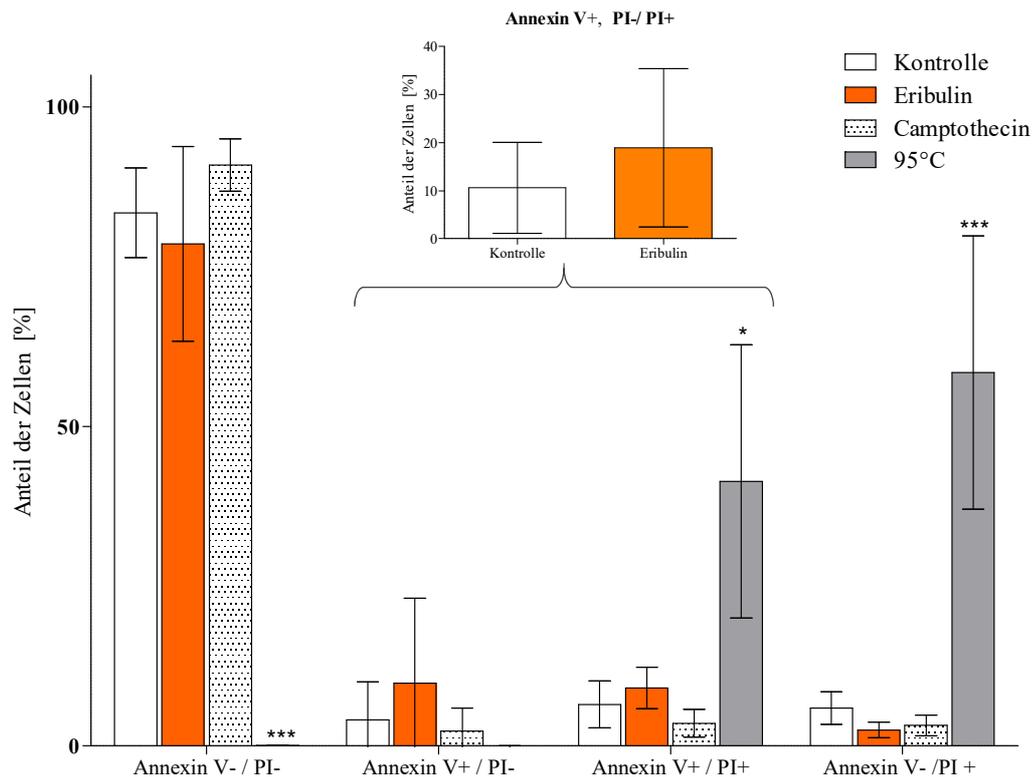


Abb. 10: Durchflusszytometrische Analyse Zelllinie MDA-MB-468. Darstellung der prozentualen Anteile vitaler Zellen (Annexin V-/PI-), apoptotischer Zellen (Annexin V+/PI-), spätapoptischer/nekrotischer Zellen (Annexin V+/PI+) und nekrotischer Zellen (Annexin V-/PI+) nach 24 h Eribulinbehandlung (orange Balken), 3 h Behandlung mit 5 μ M Camptothecin (gepunktete Balken) bzw. 5 Min Erhitzung auf 95 °C (graue Balken) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (weiße Balken). Mittelwerte aus 3 Versuchen in Prozent \pm Standardabweichung. Signifikanzniveau: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$

Nach 24 h Behandlung der Zelllinie MDA-MB-468 mit der zehnfachen IC 50-Konzentration von Eribulin zeigte sich in der durchflusszytometrischen Analyse ein deutlicher Anstieg der apoptotischen Zellrate auf 18,9 % im Vergleich zu 10,6 % in der unbehandelten Kontrolle, dieser war allerdings statistisch nicht signifikant (Abb. 10). Ein Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen nach Eribulinbehandlung lässt sich auch in den Abbildungen 9A und B nachvollziehen. Es zeigte sich kein signifikanter Anstieg der apoptotischen Zellen bei den mit Camptothecin behandelten Zellen. Es zeigte sich ein im Vergleich zur Kontrolle signifikanter Anstieg der nekrotischen Zellen bei den mit 95 °C erhitzten Zellen und reziprok ein signifikant erniedrigter Anteil an vitalen Zellen.

4. Diskussion

4.1 Chemosensitivität der Zelllinien gegenüber Eribulin

Von den in dieser Arbeit untersuchten zehn triple-negativen Mammakarzinomzelllinien reagierten neun mit IC 50-Werten im subnanomolaren Bereich sehr sensitiv auf das Chemotherapeutikum Eribulin. Die einzige Ausnahme stellte die Zelllinie DU-4475 dar, die im Vergleich zu den anderen getesteten Zelllinien mit einem IC 50-Wert von 15,5 nM als Eribulin-resistent zu bezeichnen ist. Deutlicher als bei den IC 50-Werten unterschieden sich die Zelllinien in der maximalen Wirkung von Eribulin, also bezüglich der Effektstärke des Chemotherapeutikums. Der maximale Effekt von Eribulin war bei den Zelllinien vom LAR-Subtyp (CAL-148 und MDA-MB-453) und der Zelllinie BT-549 vergleichsweise gering. Da die in Zellviabilitätstests gemessene Effektstärke von Chemotherapeutika von der jeweiligen Zellproliferationsgeschwindigkeit abhängt, ist sie als Maß für die Chemosensitivität von Zelllinien ungeeignet. Hingegen konnten Risinger *et al.* (2015) zeigen, dass die in der Zellkultur *in vitro* ermittelten IC 50-Werte für Eribulin unabhängig von der Proliferationsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie sind (76). Somit stellen die IC 50-Werte, die die pharmakologische Potenz von Eribulin bei der jeweiligen Zelllinien anzeigen, ein vergleichbares und geeignetes Maß für die Chemosensitivität dar.

Bemerkenswerterweise reagierten die Zelllinien HDQ-P1 und MDA-MB-453 sehr sensitiv auf die Eribulin-Behandlung. Diese Zelllinien weisen eine Chemoresistenz gegenüber dem Mikrotubuli-Inhibitor Paclitaxel auf, welcher zu der Gruppe der Taxane gehört (77,78). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Inoue *et al.* (2016), die zeigen konnten, dass Eribulin bei Patientinnen mit Taxan resistentem Mammakarzinom wirksam ist (79). Hingegen wurde in einer klinischen Studie eine primäre Taxanresistenz als prädiktiver Marker für ein schlechtes Ansprechen auf eine Eribulin-Behandlung beschrieben (80). Diesen Zusammenhang konnten wir in der Zellkultur nicht nachweisen.

Taxane sind Standardchemotherapeutika in der First-Line-Therapie des Mammakarzinoms. Da die Chemotherapie derzeit die einzige zugelassene systemische Therapie beim TNBC darstellt, sind alternative Chemotherapeutika, die beim Versagen der Standardtherapie wirksam sind, besonders relevant.

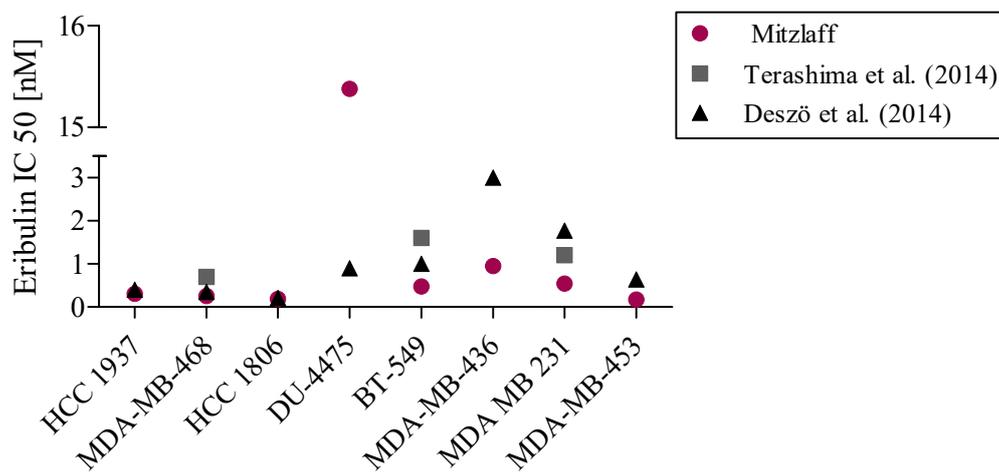


Abb. 13: Vergleich der ermittelten IC 50-Werte mit IC 50-Werten aus der Literatur. Darstellung der in dieser Arbeit ermittelten (Punkte), bzw. von Terashima *et al.* (2014) (Quadrate) und Deszö *et al.* (2014) (Dreiecke) publizierten IC 50-Konzentrationen [nM] für acht triple-negative Mammakarzinomzelllinien.

Terashima *et al.* (2014) ermittelten IC 50-Eribulinkonzentrationen für drei in dieser Arbeit getestete Zelllinien (81). Dabei verwendeten sie ebenfalls den MTT-Zellviabilitätstest mit einem mit Ausnahme des Stopppuffers identischen Protokoll. Die in dieser Arbeit ermittelten IC 50-Werte für die Zelllinien MDA-MB-468, BT-549 und MDA-MB-231 stimmen in der Tendenz mit den Ergebnissen von Terashima *et al.* (2014) überein. Demnach ist die Zelllinie MDA-MB-468 von allen dreien am sensitivsten und die Zelllinie BT-549 am wenigsten sensitiv für eine Eribulin-Behandlung (81). Die absoluten Werte für die genannten Zelllinien weichen bei Terashima *et al.* (2014) jedoch etwa um den Faktor 2,5 bis 3 von den hier publizierten Werten ab (81). Da die absoluten Werte um einen relativ konstanten Faktor voneinander abweichen, ist es wahrscheinlich, dass sich dies durch systematische Unterschiede in der Versuchsdurchführung oder durch unterschiedliche Laborbedingungen erklären lässt. Deszö *et al.* (2014) ermittelten für acht in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien IC 50-Werte für Eribulin (83). Die IC 50-Werte für Eribulin von den Zelllinien HCC 1937, MDA-MB-468, HCC 1806 vom BL-1 und BL-2-Subtyp sind dabei nahezu identisch mit den hier veröffentlichten Werten. Die

IC 50-Eribulinkonzentrationen von Deszö *et al.* (2014) für die Zelllinien BT-549, MDA-MB-436, MDA-MB-231 und MDA-MB-453 weichen hingegen um den Faktor 2-3,7 ab (83). Der von Deszö *et al.* (2014) ermittelte IC 50-Wert für Eribulin bei der Zelllinie DU-4475 weicht mit 0,9 nM deutlich von den hier veröffentlichten Werten ab (83). Die abweichenden Werte lassen sich möglicherweise durch methodische Unterschiede erklären.

4.2 Eribulinresistenz der Zelllinie DU-4475

Die Zelllinie DU-4475 war als einzige der getesteten Zelllinien gegenüber Eribulin resistent. Da Risinger *et al.* (2015) zeigen konnten, dass die IC 50-Werte für Eribulin *in vitro* unabhängig von der Zellproliferationsgeschwindigkeit sind, lässt sich die festgestellte Eribulinresistenz nicht durch eine langsamere Zellteilungsgeschwindigkeit erklären (76). Die Zelllinie DU-4475 unterscheidet sich von den anderen getesteten Zelllinien darin, dass sie ausschließlich nicht-adhärenz, in löslichen Zellverbänden wächst. Daher wurde das Protokoll des MTT-Tests für diese Zelllinie entsprechend abgeändert. Es ist nicht auszuschließen, dass dieser Umstand das Ergebnis des MTT-Tests beeinflusste. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die vergleichsweise hohe IC 50-Eribulinkonzentration für die Zelllinie DU-4475 durch das geänderte Protokoll bedingt ist, da für die lose-adhärenz wachsende Zelllinie MDA-MB-453 das gleiche Protokoll angewandt wurde und für diese Zelllinie eine sehr viele niedrigere IC 50-Eribulinkonzentration im subnanomolaren Bereich ermittelt werden konnte. Letztlich zeigte auch eine Vergleichsuntersuchung für die Zelllinie MDA-MB-453, dass das Protokoll ohne Abnahme des Überstands vor Zugabe der MTT-Lösung zu keinen vom Standardprotokoll abweichenden Ergebnissen führte. Die Zelllinie DU-4475 wächst in Lösung in traubenförmigen Zellverbänden, die anderen getesteten Zelllinien in einem einschichtigen Zellrasen am Kulturflaschenboden. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass die adhärenz-wachsenden Zellen einer Eribulin-Behandlung unmittelbarer ausgesetzt sind als Zellen der Zelllinie DU-4475, die im Inneren eines dreidimensionalen Zellverbandes in Lösung wachsen.

Die Zelllinie DU-4475 ist als einzige der getesteten Zelllinien homozygot für eine Nonsense-Mutation des Adenomatosis Polyposis Coli (APC)-Tumorsuppressorgens (82). Das APC-Tumorsuppressorgen ist vor allem im Zusammenhang mit der Karzinogenese des Kolorektalen-Karzinoms bekannt, ein APC-Verlust ist jedoch ebenfalls als Teil der onkogenen Transformation anderer epithelialer Tumore, darunter auch des Mammakarzinoms, beschrieben (84). Dabei tritt ein APC-Verlust gehäuft beim Hormonrezeptor-negativen Mammakarzinom auf und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (84). APC inhibiert physiologischerweise den Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Bei Abwesenheit von APC sorgt der aktivierte Wnt/ β -Catenin-Signalweg für steigende Konzentrationen von β -Catenin, das im Zellkern als Koaktivator von Transkriptionsfaktoren wirkt (85). Über den Wnt-Signalweg wird zudem die EMT induziert (86). Daneben übt APC weitere wichtige zelluläre Funktionen im Zusammenhang mit Zellmigration, Zellpolarität, Mikrotubuli-Organisation, Zellzyklus, DNA-Replikation und -Reparatur, sowie der Apoptose aus (84). Radulescu *et al.* (2010) konnten zeigen, dass ein APC-Verlust unabhängig vom Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine Taxanresistenz verursacht, die sich möglicherweise auf den Einfluss von APC auf die Sensitivität des Mitosespindel-Checkpoints zurückführen lässt (87). Ein solcher Mechanismus könnte potenziell auch eine Resistenz gegenüber Eribulin und anderen Mikrotubuli-Inhibitoren verursachen.

In der Literatur sind Eribulinresistenzmechanismen bei Mammakarzinomzelllinien *in vitro* beschrieben. Oba *et al.* (2016) und Laughney *et al.* (2014) beschreiben, dass Eribulin-resistente Mammakarzinomzelllinien vermehrt das Multi-Drug-Resistance-Protein 1 (MDR1), einen ATP-Binding-Casette-Transporter exprimieren und dass die vermehrte Expression von MDR1 zu einer Eribulinresistenz *in vitro* führt (88,89). Interessanterweise konnten VanKlompberg *et al.* (2015) zeigen, dass ein APC-Verlust zu einer vermehrten Expression von MDR1 führt (90). MDR1- und APC-Expression könnten demnach potenzielle prädiktive Biomarker für die Eribulin-Behandlung darstellen. Zudem stellt MDR1 ein potenzielles Angriffsziel für die medikamentöse Überwindung einer Eribulinresistenz dar.

Deszö *et al.* (2014) konnten nachweisen, dass die vermehrte Expression von Genen der EMT, sowie die vermehrte Expression bestimmter Tubulin-Isotypen Eribulin resistente Mammakarzinomzelllinien kennzeichnet (83). Es wurde beschrieben, dass die Expression von G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren vom Frizzled-Subtyp mit einer Eribulinresistenz korrelierte. Frizzled ist wiederum ein Rezeptor für Wnt und spielt damit, genau wie APC, eine wichtige Rolle im Wnt-Signalweg, der wiederum zur EMT führt (83).

4.3 Unterschiede zwischen verschiedenen TNBC-Subtypen in der Chemosensitivität gegenüber Eribulin

Lehmann *et al.* erstellten 2011 mit der Vanderbilt-Klassifikation eine molekulargenetische Klassifikation des triple-negativen Mammakarzinoms, die sechs triple-negative Mammakarzinomsubtypen unterscheidet (45). Zuvor hatte sich mit den intrinsischen Subtypen bereits eine insbesondere für das Hormonrezeptor-positive Mammakarzinom prognostisch relevante molekulargenetische Klassifikation etabliert (28–31,39). Die Kernfragestellung dieser Arbeit war, ob sich die verschiedenen TNBC-Subtypen der Vanderbilt-Klassifikation von 2011 in ihrer Chemosensitivität gegenüber Eribulin unterscheiden. Nachgewiesen wurde, dass die Zelllinien innerhalb eines Subtyps sehr homogen auf eine Eribulin-Behandlung reagierten. Es zeichnete sich zudem die Tendenz ab, dass Zelllinien vom BL-1-, BL-2- und LAR-Subtyp besonders sensitiv für eine Eribulin-Behandlung sind. Interessanterweise reagierten auch die Zelllinien vom M- und MSL-Subtyp sehr sensitiv auf Eribulin. Dies steht im Kontrast dazu, dass Deszö *et al.* (2014) erarbeiteten, dass eine EMT mit Eribulinresistenz einhergeht (83). Demnach sollten mesenchymale Subtypen eher schlecht auf Eribulin ansprechen. Die Zelllinie DU-4475 vom IM-Subtyp war im Chemosensitivitäts-Test Eribulin-resistent. Da von dem IM-Subtyp keine weiteren Zelllinien getestet wurden, kann jedoch nicht auf einen Subtypeneffekt zurückgeschlossen werden, wengleich dieser auch nicht auszuschließen ist. Letztendlich konnten keine signifikanten Unterschiede in der Chemosensitivität gegenüber Eribulin zwischen den verschiedenen Subtypen gefunden werden.

Lehmann *et al.* (2011) stellten Unterschiede in der Chemosensitivität zwischen verschiedenen triple-negativen Mammakarzinom-Subtypen gegenüber Cisplatin fest (45). Dabei reagierten Zelllinien des BL-1, BL-2 und IM-Subtyps, die im Basal-Like-Cluster zusammengefasst wurden, signifikant sensitiver auf die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin, als Zelllinien des Mesenchymal- oder Luminal-Androgenrezeptor-like-Cluster (45). Der LAR-Subtyp war tendenziell am wenigsten sensitiv gegenüber Cisplatin (45). In dieser Arbeit konnte im Gegensatz dazu gezeigt werden, dass die Zelllinien vom LAR-Subtyp sehr sensitiv auf eine Behandlung mit Eribulin reagieren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es Subtypenspezifische Unterschiede im Ansprechen auf verschiedene Chemotherapeutika gibt. Gautam *et al.* (2016) konnten bei Untersuchungen mit 16 triple-negativen Mammakarzinomzelllinien einen Zusammenhang zwischen TNBC-Subtyp und Chemosensitivität von Zelllinien *in vitro* nicht bestätigen (91). Dabei beobachteten Gautam *et al.* (2016) insgesamt ein heterogenes Chemotherapieansprechen verschiedener triple-negativer Mammakarzinomzelllinien, das nicht mit der Zugehörigkeit zu den Vanderbilt-Subtypen korrelierte (91). Insofern ist zu diesem Zeitpunkt offen, ob die TNBC-Subtypen der Vanderbilt-Klassifikation von 2011 zur Prädiktion der Chemosensitivität *in vitro* geeignet sind.

Zudem ist es problematisch, dass die Vanderbilt-Klassifikation während der Fertigstellung dieser Arbeit von Lehmann *et al.* (2016) revidiert wurde. Die IM- und MSL- Subtypen wurden aus der neuen Klassifikation entfernt bzw. in andere Subtypen integriert nachdem sich herausgestellt hatte, dass die charakteristischen Genexpressionsprofile dieser Subtypen durch Stromazell- bzw. Lymphozyteninfiltrate bedingt waren (47). Für diese Arbeit wurde jedoch weiterhin die Vanderbilt-Klassifikation von 2011 zu Grunde gelegt, da eine Typisierung der getesteten Zelllinien gemäß der revidierten Klassifikation bislang nicht vorliegt. Die Subtypenzugehörigkeit der Eribulin-resistenten Zelllinie DU-4475, die nach vorheriger Klassifikation dem IM-Subtyp zuzuordnen ist, bleibt unklar. Demnach steht zur Diskussion, ob sich die Eribulinresistenz dieser Zelllinie auf einen Subtypeneffekt zurückführen lässt, da sie nach der neuen Klassifikation in einen Subtyp mit anderen Eribulin sensitiven Zelllinien fallen oder aber als eigene Gruppe bewertet werden könnte. In diesem Zusammenhang erscheint es zudem erstaunlich, dass sich Zelllinien überhaupt dem IM- bzw. MSL-Subtypen zuordnen lassen, obwohl diese durch das Transkriptom von nicht-Tumorzellen

charakterisiert sind. Einerseits könnte man vermuten, dass Subtypen mit einem charakteristischen Leukozyten- bzw. Stromazellinfiltrat eigene Subtypen darstellen, die sich dadurch auszeichnen, dass sie in der Interaktion mit der Umgebung zu einem spezifischen Zellinfiltrat führen. In diesem Fall wäre jedoch zu erwarten, dass die Subtypen auch ohne Einbezug der Tumorzellinfiltrierenden Zellen weiter bestehen. Andererseits könnte eine falsche Zuordnung der Zelllinien erfolgt sein, da die molekulargenetische Methode sehr empfindlich ist. Gerade in der Empfindlichkeit und damit verbundenen Fehleranfälligkeit der Methodik, liegt eine große Schwäche molekulargenetischer Klassifikationen. Dadurch lässt sich auch erklären, dass es mehrere konkurrierend molekulargenetische Klassifikationen für das TNBC gibt, deren Subtypen sich in den jeweils anderen Klassifikationen nicht reproduzieren lassen. Lediglich der LAR-Subtyp stellt einen über alle TNBC-Klassifikationen hinweg stabilen Subtyp dar (48,49,53). Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Klassifikationen auch in der Grundannahme, ob sich ein Subtyp durch das gesamte Transkriptom des Tumors inklusive infiltrierender Stroma- und Immunzellen definiert oder ausschließlich durch das Transkriptom der eigentlichen Tumorzellen. Die French- und Baylor-Klassifikationen definieren ihre Subtypen explizit anhand charakteristischer Befunde von infiltrierenden Stroma- bzw. Immunzellen (48,49). Da Leukozyteninfiltrate beim TNBC als prognostischer und prädiktiver Marker relevant sind, scheint dies legitim zu sein (50,51). Es gilt die zukünftige Relevanz von molekulargenetischen Klassifikationen im klinischen Gebrauch abzuwarten. Sicherlich ist der hohe finanzielle und technische Aufwand dabei ein großes Hindernis. In den Leitlinien werden Multigentests für das Mammakarzinom noch nicht empfohlen und die etablierte Subtypisierung nach intrinsischer Klassifikation des Mammakarzinoms wird in der Regel nur anhand immunhistochemischer Surrogatparameter angewandt (40,54). In den Leitlinien wird die Anwendung von Multigentests beim ER-/PR-positiven, Her2/Neu-negativen, nodal-negativen invasiven Mammakarzinom diskutiert, wenn mittels etablierter Prognosemarker inklusive des Proliferationsmarkers Ki-67 keine Entscheidung bezüglich adjuvanter Chemotherapie abzuleiten ist (54). Im Zuge neuer Therapeutika, die auf molekulare Veränderungen in Tumorzellen abzielen, werden molekulargenetische Verfahren zur Typisierung von Mammakarzinomen vermehrt an Bedeutung gewinnen.

Aus den Vorversuchen geht hervor, dass Ethanol in hohen Konzentrationen einen zytotoxischen Effekt hat. Es konnte für die maximal verwendeten Ethanolkonzentrationen bei allen Zelllinien kein signifikanter Effekt auf die Zellviabilität festgestellt werden. Die Wirkung von Eribulin konnte jedoch nicht ohne Ethanol als Lösungsmittel untersucht werden, da es nur so verfügbar ist. Interaktionen zwischen Ethanol- und Eribulin-Effekten sind damit *in vitro* nicht auszuschließen. Es ist zu bedenken, dass auch das bei Patientinnen verwendete Präparat Halaven® Ethanol als Lösungsmittel in der hier verwendeten Konzentration enthält. Aufgrund der geringen absoluten Menge des Präparats, die den Patientinnen verabreicht wird, ist davon auszugehen, dass Ethanol als Lösungsmittel in Halaven® keinerlei systemischen Effekte hat.

4.4 Übertragbarkeit der Ergebnisse aus der Zellkultur in die Klinik

In dieser Arbeit wurden etablierte Mammakarzinomzelllinien verwendet um Erkenntnisse über die Chemosensitivität verschiedener TNBC-Subtypen gegenüber Eribulin *in vitro* zu gewinnen und damit eine Rationale für einen gezielten Einsatz von Eribulin bei Patientinnen mit bestimmten TNBC-Subtypen zu schaffen. Zelllinien bieten dabei den Vorteil, dass sie einfach verfügbar sind und gut definierte Eigenschaften besitzen (92). Im Gegensatz zu Primärkulturen lassen sie sich zudem einfach und auch langfristig kultivieren und eignen sich daher insbesondere für Chemosensitivitätstestungen (92). Die Diskrepanz zwischen Ergebnissen aus Untersuchungen an Zelllinien *in vitro* und Tumoren *in vivo* stellt jedoch ein Problem dar. Liedtke *et al.* (2010) demonstrierten, dass nach Chemosensitivitätstestungen an Zelllinien *in vitro* ermittelte prädiktive Biomarker das Chemotherapieansprechen bei Patientinnen nicht korrekt vorhersagen konnten (78). Eine Diskrepanz besteht beispielsweise auch zwischen den Chemosensitivitätstestungen mit Zelllinien vom BL-2-Subtyp *in vitro* und dem Chemotherapieansprechen von Tumoren vom BL-2-Subtyp *in vivo*. So konnten die hier präsentierten Ergebnisse und Chemosensitivitätstestungen von Lehmann *et al.* zeigen, dass Zelllinien vom BL-2-Subtyp *in vitro* sehr gut auf Chemotherapeutika ansprechen (45). Bei Untersuchungen nach neoadjuvanter Chemotherapie *in vivo* hatten

Patientinnen mit TNBC des BL-2-Subtyps jedoch von allen Subtypen die schlechtesten pCR-Raten (46). Im Kontrast dazu spiegelt sich das gute Ansprechen vom BL-1-Subtyp bei Chemosensitivitätstestungen *in vitro* in klinischen Untersuchungen wider. So erreichen Tumore vom BL-1-Subtyp von allen TNBC-Subtypen die höchsten pCR-Raten (46). Erklärlich sind Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen dadurch, dass in der Zellkultur ausschließlich die Tumorzellen betrachtet werden. Dabei ist gut belegt, dass Tumorstroma, Gefäßversorgung und der Einfluss des Immunsystems, alles Komponenten die in der Zellkultur *in vitro* fehlen, einen entscheidenden Einfluss auf das Chemotherapieansprechen *in vivo* haben (78). Darüber hinaus ist die Chemotherapieexposition *in vivo* von vielen pharmakokinetischen Faktoren, wie Perfusion, onkotischer Druck, Metabolismus und Elimination, abhängig, wohingegen diese *in vitro* sehr viel unmittelbarer, gleichmäßiger verteilt sind und die Chemokonzentration kontrollierbar ist (78). Für das triple-negative Mammakarzinom ist insbesondere der positive Einfluss von Tumor-Infiltrierenden Lymphozyten und eine aktivierte Immunantwort auf die Prognose und das Chemotherapieansprechen belegt (48,49,51,93,94). Nicht zuletzt spiegeln Mammakarzinomzelllinien die intratumorale und intertumorale Heterogenität von Tumorzellen nicht wider, da sie stark selektierte Zellklone darstellen (92,95). Die meisten verwendeten Zelllinien wurden aus Metastasen gewonnen, d.h. sie stammen von einem aggressiven Tumor und Tumorzellen mit der Fähigkeit zur Invasion und Migration ab (92). Zellkulturlinien sind zudem selektiert auf hochproliferative Zellen und Zellen die auf Plastik und in Nährmedien proliferationsfähig sind (95). Insgesamt stellt die Zellkultur eine sehr künstliche Wachstumsbedingung und Mammakarzinomzelllinien kein repräsentatives Spektrum aller Mammakarzinome dar. Letztlich konnten Prat *et al.* (2013) allerdings zeigen, dass sich das Genom und Transkriptom von Zelllinien und Mammakarzinomtumoren in entscheidenden Punkten gleichen (96). Es scheint insgesamt nicht verwunderlich, dass Ergebnisse aus der Zellkultur keine direkten Rückschlüsse auf Tumore *in vivo* zulassen. Auch wenn bei *in vitro* Untersuchungen nicht das gesamte Gefüge, das über ein Therapieansprechen entscheidet, abgebildet wird, so ist die Untersuchung von Tumorzelleigenschaften *in vitro* dennoch unerlässlich. Schließlich stellen die Tumorzelleigenschaften die Voraussetzung dafür dar, ob eine zytostatische oder zytotoxische Therapie überhaupt wirksam sein kann. Neben der Erforschung von Chemoresistenzmechanismen und Identifizierung von potenziellen prognostischen und prädiktiven Biomarkern können auf Ebene der Tumorzelle beispielsweise auch Angriffspunkte für neue Medikamente gefunden werden.

4.5 Apoptoseinduktion durch Eribulin

In der Literatur ist beschrieben, dass Eribulin bei Tumorzellen eine Apoptose induziert (58). Da mittels MTT-Test nicht zwischen zytotoxischer und zytostatischer Wirkung unterschieden werden kann, wurde exemplarisch für die Zelllinie MDA-MB-468 die Apoptoseinduktion durch Eribulin mittels Durchflusszytometrie untersucht. Im Einklang mit der Literatur wurde bei der Zelllinie MDA-MB-468 nach 24 h Behandlung mit der zehnfachen IC 50-Konzentration von Eribulin eine Zunahme des Anteils aller apoptotischen Zellen (Annexin V+ PI-/+) von 10,6 % auf 18,9 % festgestellt, allerdings war dieser Anstieg statistisch nicht signifikant (s. Abb. 10). Auch scheint die gemessene Apoptoserate in Anbetracht des im Zellviabilitätstest gemessenen Effekts von Eribulin eher gering. Gautam et al. (2016) zeigten, dass Ergebnisse aus Chemosensitivitätstests, die Zellviabilität bzw. Zelltoxizität messen, nicht immer miteinander korrelieren (91). Dies führe demzufolge dazu, dass die zytotoxische Wirkung von Medikamenten bei Zellviabilitätstestungen in vitro tendenziell überschätzt wird (91). Die Ergebnisse dieser durchflusszytometrischen Analyse geben daher Anlass darüber zu spekulieren, ob die Wirkung von Eribulin auf die Zellviabilität der Zelllinie MDA-MB-468 vordergründig auf zytostatischen Effekten beruht, z.B. durch Hemmung der Zellteilung. Einschränkend zu erwähnen ist, dass das Behandlungsprotokoll bei dem Apoptosenachweis von dem des Zellviabilitätstest hinsichtlich der Behandlungsdauer (24 h vs. 72 h) voneinander abwich. So kann man die Ergebnisse aus beiden Versuchen nicht direkt miteinander vergleichen. Interessanterweise konnten Gautam et al. (2016) zudem feststellen, dass triple-negative Mammakarzinomzelllinien sich darin unterscheiden, ob ein getestetes Medikament eine zytostatische oder zytotoxische Wirkung hat (91). Der Apoptosenachweis mittels Durchflusszytometrie erfolgte nur für die Zelllinie MDA-MB-468, insofern ist nicht auszuschließen, dass Eribulin bei unterschiedlichen Zelllinien in unterschiedlichem Maße zytotoxisch bzw. zytostatisch wirkt. Es wäre insbesondere interessant zu untersuchen, ob sich TNBC-Subtypen hinsichtlich zytotoxischer bzw. zytostatischer Wirksamkeit von Eribulin unterscheiden.

Auffällig war darüber hinaus, dass auch in der unbehandelten Kontrolle eine nicht unerhebliche Anzahl apoptotischer Zellen gezählt werden konnte. Dies könnte durch die Aufbereitung der Zellen für die Durchflusszytometrie bedingt sein, bei der die Zellen

mehrfach zentrifugiert, mit kaltem PBS gespült und transportiert werden mussten, wobei Zellen thermisch und mechanisch geschädigt worden sein könnten.

Einschränkend bei der Beurteilung der Ergebnisse hervorzuheben ist, dass auch in der nach Herstellerangaben angefertigten Apoptose-Kontrolle nach Camptothecin-Behandlung kein statistisch signifikanter Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen zu verzeichnen war. Eine Färbekontrolle mit Annexin V-Färbung war unauffällig, so dass nicht von einem Färbefehler auszugehen ist (siehe Tabelle 3 im Anhang). Es gilt zu bedenken, dass die Behandlung mit Eribulin nur für 24 h und mit Camptothecin nur für 3 h erfolgte, möglicherweise dauert es aber bei der Zelllinie MDA-MB-468 länger bis zum Eintreten einer Apoptose. Da die Apoptoseinduktion mittels Camptothecin als Positivkontrolle nicht gelang, ist das Versuchsergebnis leider nicht aussagekräftig. In künftigen Untersuchungen sollte daher ein anderer Apoptosenachweis durchgeführt werden, bzw. das Protokoll des Experimentes durch Verlängerung der Behandlungsdauer angepasst werden.

4.6 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnten keine Unterschiede zwischen verschiedenen TNBC-Subtypen hinsichtlich ihrer Chemosensitivität gegenüber Eribulin festgestellt werden. Gleichzeitig können Unterschiede in der Chemosensitivität gegenüber Eribulin zwischen den verschiedenen TNBC-Subtypen nicht ausgeschlossen werden. Dies liegt zum einen an der limitierten Zahl getesteter Zelllinien. Zum anderen lässt sich dieser Umstand damit begründen, dass die in dieser Arbeit verwendete Vanderbilt-Klassifikation von 2011 mittlerweile revidiert wurde (93). Das Subtypen-Modell von Lehmann *et al.* (2011) unterstützend, reagierten die Zelllinien innerhalb eines Subtyps sehr homogen auf die Behandlung mit Eribulin. Für eine abschließende Klärung der Frage, ob sich Unterschiede in der Chemosensitivität gegenüber Eribulin zwischen TNBC-Subtypen finden, wäre es interessant, eine größere Anzahl von triple-negativen Mammakarzinomzelllinien zu untersuchen. In letzter Konsequenz ist zukünftig vor allem die Auswertung neoadjuvanter Studien mit Eribulin nach Subtypen von Interesse, insbesondere da sich Ergebnisse aus der Zellkultur nicht zwingend auf Karzinome

in vivo übertragen lassen. Nach Standardtherapie konnten zwischen den TNBC-Subtypen der Vanderbilt-Klassifikation erhebliche Unterschiede in den pCR-Raten zwischen den verschiedenen Subtypen festgestellt werden, in diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob Unterschiede in pCR-Raten rein Subtypen-spezifisch oder auch Chemotherapie-spezifisch sind (46).

Die Zelllinie DU-4475 war im Vergleich zu den übrigen getesteten Zelllinien resistent gegenüber einer Eribulin-Behandlung. Ein Erklärungsansatz für die Eribulinresistenz von DU-4475 könnte eine homozygote Nonsense-Mutation des APC-Tumorsuppressorgens bei dieser Zelllinie sein. Es ist belegt, dass ein APC-Verlust zu Resistenzen gegenüber Mikrotubuli-Inhibitoren vom Taxantyp führt (87). Zudem konnte an Mammakarzinomzelllinien *in vitro* gezeigt werden, dass ein APC-Verlust zu einer vermehrten Expression von MDR1-Transportern führt, welche wiederum eine Eribulinresistenz bedingen können (88,89). An weiteren Ursachen für Eribulinresistenzen bei Mammakarzinomzelllinien *in vitro* ist die vermehrte Expression bestimmter Tubulin-Isotypen, sowie eine EMT beschrieben (83). Es ist von Interesse, genauer zu untersuchen, worauf sich die Eribulinresistenz der Zelllinie DU-4475 zurückführen lässt, um daraus prädiktive Biomarker und gegebenenfalls pharmakologische Strategien für die Überwindung einer Eribulinresistenz abzuleiten.

Die Apoptoseinduktion durch Eribulin ist in der Literatur beschrieben worden (58). Es konnte für exemplarische triple-negative Mammakarzinomzelllinien keine signifikante Apoptoseinduktion durch Eribulin in der durchflusszytometrischen Analyse gezeigt werden. Gautam *et al.* (2016) konnten zeigen, dass sich triple-negative Mammakarzinomzelllinien darin unterscheiden können, ob ein Chemotherapeutikum eine zytostatische oder zytotoxische Wirkung auf sie hat (91). Insofern wäre es interessant an einer größeren Stichprobe zu untersuchen, ob dieser Umstand auch für Eribulin zutrifft.

Eribulin ist für die Therapie des TNBC von besonderem Interesse, nachdem Subgruppenanalysen der beiden Phase-III-Studien ergeben haben, dass Patientinnen mit TNBC von der Eribulin-Behandlung besonders profitiert haben (73,75). Der

Chemotherapie kommt beim TNBC eine besondere Bedeutung zu, da sie die einzige systemische Behandlungsmöglichkeit darstellt. Zudem ist ein gutes Ansprechen auf die chemotherapeutische Behandlung beim TNBC prognostisch hoch-relevant (26).

Derzeit ist Eribulin zur Monotherapie des lokal fortgeschrittenen, metastasierten oder therapierefraktären Mammakarzinoms zugelassen und wird in der Regel erst in der Third-Line-Therapie eingesetzt (71). Bei guter Wirksamkeit von Eribulin bei mehrfach chemotherapeutisch vorbehandelten Patientinnen und fortgeschrittenen Krankheitsstadium kann im (neo-)adjuvanten Einsatz ebenfalls mit gutem Ansprechen gerechnet werden, jedoch stehen hier noch Ergebnisse aus klinischen Studien aus.

Eine besondere Rolle könnte Eribulin zukünftig als Chemosensitizer in der Kombination mit anderen Chemotherapeutika und targeted-therapies zukommen. Dabei sind zwei Eribulin-Effekte besonders interessant. Zum einen konnte demonstriert werden, dass Eribulin durch Wirkung auf die Vaskularisierung von Tumoren zu weniger hypoxischen und damit auch weniger chemoresistenten Arealen führt (60). Zum anderen hemmt Eribulin die EMT und wirkt somit einem weiteren Chemoresistenzmechanismus entgegen (59,81,97). Terashima *et al.* (2014) konnten zeigen, dass Eribulin den EMT-induzierenden Effekt vom Chemotherapeutikum 5-FU bei Mammakarzinomzelllinien *in vitro* aufheben konnte (81). Die Verträglichkeit und Wirksamkeit von Eribulin in Kombinationstherapien mit den Chemotherapeutika Cisplatin und Capecitabine konnte zudem bereits in klinischen Studien bestätigt werden (98,99). Auch die Kombination von Eribulin mit targeted-therapies ist vielversprechend. Bei einer oralen Plattenepithelkarzinomzelllinie konnte Eribulin eine durch EMT entstandene Resistenz gegenüber den monoklonalen Antikörper Cetuximab *in vitro* aufheben (97). Kozyreva *et al.* (2016) konnten zudem zeigen, dass die Gabe von Eribulin in Kombination mit einem Aurora A Kinase-Inhibitor die apoptotischen Wirkung beider Agenzien beim TNBC verstärkt (100). Derzeit werden mögliche Kombinationstherapien sowie der adjuvante Einsatz von Eribulin beim Mammakarzinom untersucht. Vorerst ist Eribulin in seiner jetzigen Indikation in der Third-Line-Therapie des Mammakarzinoms relevant. Dabei ist die große Stärke von Eribulin, dass es auch bei extensiv vorbehandelten Mammakarzinomen, im fortgeschrittenen Stadium sowie bei Vorliegen von Resistenzen gegenüber anderen Chemotherapeutika wirksam ist (67,69,70,72,101).

5. Zusammenfassung

Das triple-negative Mammakarzinom (engl. triple negative breast cancer, kurz: TNBC) zeichnet sich durch fehlende Expression von den Hormonrezeptoren für Östrogen- und Progesteron sowie durch fehlende Überexpression des Her2/neu-Rezeptors aus. Im Vergleich zu anderen Subtypen hat das TNBC eine vergleichsweise schlechte Prognose. Die einzige systemische Therapiemöglichkeit beim TNBC stellt bislang eine Chemotherapie dar. Eribulin ist ein neues Chemotherapeutikum mit Zulassung zur Therapie des fortgeschrittenen Mammakarzinoms (71). Die Auswertung von zwei Phase-III-Studien ergab, dass insbesondere die Subgruppe der Patientinnen mit TNBC von einer Eribulin-Behandlung profitieren (75). Dabei stellt das TNBC eine heterogene Gruppe von Tumoren dar. Lehmann *et al.* (2011) erstellten mit der Vanderbilt-Klassifikation eine molekulargenetische Klassifikation des TNBC und definierten sechs Subtypen (45). In dieser Arbeit wurde anhand von zehn triple-negativen Mammakarzinomzelllinien untersucht, ob sich die sechs Subtypen der Vanderbilt-Klassifikation in ihrer Chemosensitivität gegenüber Eribulin unterscheiden. Von jedem Subtyp wurde mindestens eine Zelllinie untersucht. Mittels des MTT- Zellviabilitätstests wurde die IC 50-Konzentration von Eribulin für jede Zelllinie ermittelt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Chemosensitivität zwischen den Subtypen gegenüber Eribulin gefunden werden. Die Zelllinie DU-4475 vom IM-Subtyp zeigte als einzige getestete Zelllinien eine Resistenz gegenüber Eribulin. Da von diesem Subtyp keine anderen Zelllinien getestet wurden, bleibt offen, ob dies eine Eigenschaft der Zelllinie oder des Subtyps ist. Lehmann *et al.* (2016) revidierten kürzlich die Vanderbilt-Klassifikation, die nunmehr nur noch 4 Subtypen beschreibt (93). Dabei wurde der IM-Subtyp nicht mehr aufgegriffen. Interessanterweise weist DU-4475 eine homozygote Nonsense-Mutation des APC-Tumorsuppressorgens auf (82). Ein APC-Verlust ist als Ursache für Resistenzen gegenüber Mikrotubuli-Inhibitoren von Taxantyp beschrieben (87). Daher ist vorstellbar, dass ein APC-Verlust ebenfalls eine Eribulinresistenz nach sich zieht. Die Apoptoseinduktion von Eribulin ist in der Literatur beschrieben, konnte in dieser Arbeit für die Zelllinie MDA-MB-468 in der durchflusszytometrischen Analyse jedoch nicht demonstriert werden (58).

6. Literaturverzeichnis

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-386.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015 Mar;65(2):87–108.
3. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 10. Ausgabe. Berlin, 2015;
4. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Jun 1;28(16):2784–95.
5. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J Cancer*. 2016;7(10):1281–94.
6. Howlader N, Altekruse SF, Li CI, Chen VW, Clarke CA, Ries LAG, et al. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *J Natl Cancer Inst*. 2014 May;106(5).
7. Wan D, Villa D, Woods R, Yerushalmi R, Gelmon K. Breast Cancer Subtype Variation by Race and Ethnicity in a Diverse Population in British Columbia. *Clin Breast Cancer*. 2016 Jun;16(3):e49-55.
8. Plasilova ML, Hayse B, Killelea BK, Horowitz NR, Chagpar AB, Lannin DR. Features of triple-negative breast cancer: Analysis of 38,813 cases from the national cancer database. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Aug;95(35):e4614.
9. Anderson KN, Schwab RB, Martinez ME. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Feb;144(1):1–10.
10. Glass AG, Lacey JV, Carreon JD, Hoover RN. Breast cancer incidence, 1980-2006: combined roles of menopausal hormone therapy, screening mammography, and estrogen receptor status. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Aug 1;99(15):1152–61.
11. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 Feb;138(2):241–56.
12. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006 Jun 7;295(21):2492–502.

13. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*. 2007 May 1;109(9):1721–8.
14. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2007 Aug 1;13(15 Pt 1):4429–34.
15. O'Reilly EA, Gubbins L, Sharma S, Tully R, Guang MHZ, Weiner-Gorzel K, et al. The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). *BBA Clin*. 2015 Mar 12;3:257–75.
16. de Ruijter TC, Veeck J, de Hoon JPJ, van Engeland M, Tjan-Heijnen VC. Characteristics of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011 Feb;137(2):183–92.
17. Chen L, Cook LS, Tang M-TC, Porter PL, Hill DA, Wiggins CL, et al. Body mass index and risk of luminal, HER2-overexpressing, and triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2016 Jun;157(3):545–54.
18. Morris GJ, Naidu S, Topham AK, Guiles F, Xu Y, McCue P, et al. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer*. 2007 Aug 15;110(4):876–84.
19. Jiagge E, Jibril AS, Chitale D, Bensenhaver JM, Awuah B, Hoenerhoff M, et al. Comparative Analysis of Breast Cancer Phenotypes in African American, White American, and West Versus East African patients: Correlation Between African Ancestry and Triple-Negative Breast Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2016 Nov;23(12):3843–9.
20. Huo D, Ikpat F, Khramtsov A, Dangou J-M, Nanda R, Dignam J, et al. Population differences in breast cancer: survey in indigenous African women reveals overrepresentation of triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Sep 20;27(27):4515–21.
21. Tichy JR, Deal AM, Anders CK, Reeder-Hayes K, Carey LA. Race, response to chemotherapy, and outcome within clinical breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Apr;150(3):667–74.
22. Ma H, Ursin G, Xu X, Lee E, Togawa K, Duan L, et al. Reproductive factors and the risk of triple-negative breast cancer in white women and African-American women: a pooled analysis. *Breast Cancer Res* 2017 Jan 13;19(1):6.
23. Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 Dec 20;24(36):5652–7.

24. Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N. Triple-negative breast cancer—current status and future directions. *Ann Oncol*. 2009 Dec 1;20(12):1913–27.
25. Holm-Rasmussen EV, Jensen M-B, Balslev E, Kroman N, Tvedskov TF. Reduced risk of axillary lymphatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Jan;149(1):229–36.
26. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Mar 10;26(8):1275–81.
27. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2007 Apr 15;13(8):2329–34.
28. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
29. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *The Oncologist*. 2011;16 Suppl 1:61–70.
30. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869–74.
31. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011 Feb;5(1):5–23.
32. Millikan RC, Newman B, Tse C-K, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 May;109(1):123–39.
33. Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. *Nat Med*. 2009 Aug;15(8):842–4.
34. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2005 Aug 15;11(16):5678–85.
35. Pandya S, Moore RG. Breast Development and Anatomy. *Clin Obstet Gynecol*. 2011 Mar;54(1):91–95.
36. Ulfig N. *Kurzlehrbuch Histologie*. 2., Aufl. Stuttgart: Thieme; 2005.
37. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1684–91.

38. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 2007;8(5):R76.
39. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res BCR.* 2010;12(5):R68.
40. Falck A-K, Fernö M, Bendahl P-O, Rydén L. St Gallen molecular subtypes in primary breast cancer and matched lymph node metastases--aspects on distribution and prognosis for patients with luminal A tumours: results from a prospective randomised trial. *BMC Cancer.* 2013 Nov 25;13:558.
41. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2004 Aug 15;10(16):5367–74.
42. Cheang MCU, Martin M, Nielsen TO, Prat A, Voduc D, Rodriguez-Lescure A, et al. Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. *The Oncologist.* 2015 May;20(5):474–82.
43. Bertucci F, Finetti P, Viens P, Birnbaum D. Difference in therapeutic response between basal and nonbasal triple-negative breast cancers. *The Oncologist.* 2013;18(9):1060–1.
44. Nofech-Mozes S, Trudeau M, Kahn HK, Dent R, Rawlinson E, Sun P, et al. Patterns of recurrence in the basal and non-basal subtypes of triple-negative breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Nov;118(1):131–7.
45. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011 Jul;121(7):2750–67.
46. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2013 Oct 1;19(19):5533–40.
47. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS ONE* 2016 Jun 16;11(6):e0157368/
48. Jézéquel P, Loussouarn D, Guérin-Charbonnel C, Campion L, Vanier A, Gouraud W, et al. Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. *Breast Cancer Res* 2015 Mar 20;17:43.
49. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SAW, et al. Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2015 Apr 1;21(7):1688–98.

50. Leon-Ferre RA, Polley M-Y, Liu H, Gilbert JA, Cafourek V, Hillman DW, et al. Impact of histopathology, tumor-infiltrating lymphocytes, and adjuvant chemotherapy on prognosis of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2017 Sep 14;
51. Mao Y, Qu Q, Zhang Y, Liu J, Chen X, Shen K. The value of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS One.* 2014;9(12):e115103.
52. Kochi M, Iwamoto T, Niikura N, Bianchini G, Masuda S, Mizoo T, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes (TILs)-related genomic signature predicts chemotherapy response in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2017 Sep 13;
53. Ahn SG, Kim SJ, Kim C, Jeong J. Molecular Classification of Triple-Negative Breast Cancer. *J Breast Cancer.* 2016 Sep;19(3):223–30.
54. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.0, 2017 AWMF Registernummer: 032-045OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (abgerufen am: 02.04.2018)
55. Smith JA, Wilson L, Azarenko O, Zhu X, Lewis BM, Littlefield BA, et al. Eribulin binds at microtubule ends to a single site on tubulin to suppress dynamic instability. *Biochemistry (Mosc).* 2010 Feb 16;49(6):1331–7.
56. Jordan MA, Kamath K, Manna T, Okouneva T, Miller HP, Davis C, et al. The primary antimitotic mechanism of action of the synthetic halichondrin E7389 is suppression of microtubule growth. *Mol Cancer Ther.* 2005 Jul;4(7):1086–95.
57. Okouneva T, Azarenko O, Wilson L, Littlefield BA, Jordan MA. Inhibition of centromere dynamics by eribulin (E7389) during mitotic metaphase. *Mol Cancer Ther.* 2008 Jul;7(7):2003–11.
58. Kuznetsov G, Towle MJ, Cheng H, Kawamura T, TenDyke K, Liu D, et al. Induction of morphological and biochemical apoptosis following prolonged mitotic blockage by halichondrin B macrocyclic ketone analog E7389. *Cancer Res.* 2004 Aug 15;64(16):5760–6.
59. Yoshida T, Ozawa Y, Kimura T, Sato Y, Kuznetsov G, Xu S, et al. Eribulin mesilate suppresses experimental metastasis of breast cancer cells by reversing phenotype from epithelial-mesenchymal transition (EMT) to mesenchymal-epithelial transition (MET) states. *Br J Cancer.* 2014 Mar 18;110(6):1497–505.
60. Agoulnik SI, Kawano S, Taylor N, Oestreicher J, Matsui J, Chow J, et al. Eribulin mesylate exerts specific gene expression changes in pericytes and shortens pericyte-driven capillary network in vitro. *Vasc Cell.* 2014;6(1):3.
61. Funahashi Y, Okamoto K, Adachi Y, Semba T, Uesugi M, Ozawa Y, et al. Eribulin mesylate reduces tumor microenvironment abnormality by vascular remodeling in preclinical human breast cancer models. *Cancer Sci.* 2014 Oct;105(10):1334–42.

62. Morgan RJ, Synold TW, Longmate JA, Quinn DI, Gandara D, Lenz H-J, et al. Pharmacodynamics (PD) and pharmacokinetics (PK) of E7389 (eribulin, halichondrin B analog) during a phase I trial in patients with advanced solid tumors: a California Cancer Consortium trial. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015 Nov;76(5):897–907.
63. Mukohara T, Nagai S, Mukai H, Namiki M, Minami H. Eribulin mesylate in patients with refractory cancers: a Phase I study. *Invest New Drugs*. 2012 Oct;30(5):1926–33.
64. Tan AR, Rubin EH, Walton DC, Shuster DE, Wong YN, Fang F, et al. Phase I study of eribulin mesylate administered once every 21 days in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009 Jun 15;15(12):4213–9.
65. Goel S, Mita AC, Mita M, Rowinsky EK, Chu QS, Wong N, et al. A phase I study of eribulin mesylate (E7389), a mechanistically novel inhibitor of microtubule dynamics, in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009 Jun 15;15(12):4207–12.
66. McIntyre K, O’Shaughnessy J, Schwartzberg L, Glück S, Berrak E, Song JX, et al. Phase 2 study of eribulin mesylate as first-line therapy for locally recurrent or metastatic human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Jul;146(2):321–8.
67. Vahdat LT, Pruitt B, Fabian CJ, Rivera RR, Smith DA, Tan-Chiu E, et al. Phase II study of eribulin mesylate, a halichondrin B analog, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Jun 20;27(18):2954–61.
68. Cortes J, Vahdat L, Blum JL, Twelves C, Campone M, Roché H, et al. Phase II study of the halichondrin B analog eribulin mesylate in patients with locally advanced or metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline, a taxane, and capecitabine. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Sep 1;28(25):3922–8.
69. Aogi K, Iwata H, Masuda N, Mukai H, Yoshida M, Rai Y, et al. A phase II study of eribulin in Japanese patients with heavily pretreated metastatic breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2012 Jun;23(6):1441–8.
70. Cortes J, O’Shaughnessy J, Loesch D, Blum JL, Vahdat LT, Petrakova K, et al. Eribulin monotherapy versus treatment of physician’s choice in patients with metastatic breast cancer (EMBRACE): a phase 3 open-label randomised study. *Lancet Lond Engl*. 2011 Mar 12;377(9769):914–23.
71. Pean E, Klaar S, Berglund EG, Salmonson T, Borregaard J, Hofland KF, et al. The European Medicines Agency Review of Eribulin for the Treatment of Patients with Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer: Summary of the Scientific Assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use. *Clin Cancer Res*. 2012 Sep 1;18(17):4491–7.

72. Kaufman PA, Awada A, Twelves C, Yelle L, Perez EA, Velikova G, et al. Phase III open-label randomized study of eribulin mesylate versus capecitabine in patients with locally advanced or metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2015 Feb 20;33(6):594–601.
73. Twelves C, Awada A, Cortes J, Yelle L, Velikova G, Olivo MS, et al. Subgroup Analyses from a Phase 3, Open-Label, Randomized Study of Eribulin Mesylate Versus Capecitabine in Pretreated Patients with Advanced or Metastatic Breast Cancer. *Breast Cancer Basic Clin Res*. 2016;10:77–84.
74. Cortes J, Hudgens S, Twelves C, Perez EA, Awada A, Yelle L, et al. Health-related quality of life in patients with locally advanced or metastatic breast cancer treated with eribulin mesylate or capecitabine in an open-label randomized phase 3 trial. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Dec;154(3):509–20.
75. Twelves C, Cortes J, Vahdat L, Olivo M, He Y, Kaufman PA, et al. Efficacy of eribulin in women with metastatic breast cancer: a pooled analysis of two phase 3 studies. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Dec;148(3):553–61.
76. Risinger AL, Dybdal-Hargreaves NF, Mooberry SL. Breast Cancer Cell Lines Exhibit Differential Sensitivities to Microtubule-targeting Drugs Independent of Doubling Time. *Anticancer Res*. 2015 Nov;35(11):5845–50.
77. Bauer JA, Chakravarthy AB, Rosenbluth JM, Mi D, Seeley EH, De Matos Granja-Ingram N, et al. Identification of markers of taxane sensitivity using proteomic and genomic analyses of breast tumors from patients receiving neoadjuvant paclitaxel and radiation. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2010 Jan 15;16(2):681–90.
78. Liedtke C, Wang J, Tordai A, Symmans WF, Hortobagyi GN, Kiesel L, et al. Clinical evaluation of chemotherapy response predictors developed from breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jun;121(2):301–9.
79. Inoue K, Saito T, Okubo K, Kimizuka K, Yamada H, Sakurai T, et al. Phase II clinical study of eribulin monotherapy in Japanese patients with metastatic breast cancer who had well-defined taxane resistance. *Breast Cancer Res Treat*. 2016 Jun;157(2):295–305.
80. Dell’Ova M, De Maio E, Guiu S, Roca L, Dalenc F, Durigova A, et al. Tumour biology, metastatic sites and taxanes sensitivity as determinants of eribulin mesylate efficacy in breast cancer: results from the ERIBEX retrospective, international, multicenter study. *BMC Cancer*. 2015 Oct 8;15:659.
81. Terashima M, Sakai K, Togashi Y, Hayashi H, De Velasco MA, Tsurutani J, et al. Synergistic antitumor effects of S-1 with eribulin in vitro and in vivo for triple-negative breast cancer cell lines. *SpringerPlus*. 2014;3:417.
82. Cell lines Project - Home Page [Internet]. [cited 2017 Oct 22]. Available from: http://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines/

83. Dezső Z, Oestreicher J, Weaver A, Santiago S, Agoulnik S, Chow J, et al. Gene expression profiling reveals epithelial mesenchymal transition (EMT) genes can selectively differentiate eribulin sensitive breast cancer cells. *PloS One*. 2014;9(8):e106131.
84. Lesko AC, Goss KH, Prospero JR. Exploiting APC function as a novel cancer therapy. *Curr Drug Targets*. 2014 Jan;15(1):90–102.
85. Deutzmann R, Hauser K, Netzker R, Rassow J. *Duale Reihe: Biochemie*. 2nd ed. Stuttgart: Thieme; 2008.
86. Yook JI, Li X-Y, Ota I, Hu C, Kim HS, Kim NH, et al. A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat Cell Biol*. 2006 Dec;8(12):1398–406.
87. Radulescu S, Ridgway RA, Appleton P, Kroboth K, Patel S, Woodgett J, et al. Defining the role of APC in the mitotic spindle checkpoint in vivo: APC-deficient cells are resistant to Taxol. *Oncogene*. 2010 Dec 9;29(49):6418–27.
88. Oba T, Izumi H, Ito K-I. ABCB1 and ABCC11 confer resistance to eribulin in breast cancer cell lines. *Oncotarget*. 2016 Oct 25;7(43):70011–27.
89. Laughney AM, Kim E, Sprachman MM, Miller MA, Kohler RH, Yang KS, et al. Single-cell pharmacokinetic imaging reveals a therapeutic strategy to overcome drug resistance to the microtubule inhibitor eribulin. *Sci Transl Med*. 2014 Nov 5;6(261):261ra152.
90. VanKlompberg MK, Bedalov CO, Soto KF, Prospero JR. APC selectively mediates response to chemotherapeutic agents in breast cancer. *BMC Cancer*. 2015 Jun 7;15:457.
91. Gautam P, Karhinen L, Szwajda A, Jha SK, Yadav B, Aittokallio T, et al. Identification of selective cytotoxic and synthetic lethal drug responses in triple negative breast cancer cells. *Mol Cancer*. 2016 May 10;15(1):34.
92. Burdall SE, Hanby AM, Lansdown MR, Speirs V. Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Res*. 2003;5(2):89–95.
93. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PloS One*. 2016;11(6):e0157368.
94. Rody A, Karn T, Liedtke C, Pusztai L, Ruckhaeberle E, Hanker L, et al. A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res BCR*. 2011 Oct 6;13(5):R97.
95. Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat*. 2004 Feb;83(3):249–89.
96. Prat A, Karginova O, Parker JS, Fan C, He X, Bixby L, et al. Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 Nov;142(2):237–55.

97. Kitahara H, Hirai M, Kato K, Bou-Gharios G, Nakamura H, Kawashiri S. Eribulin sensitizes oral squamous cell carcinoma cells to cetuximab via induction of mesenchymal-to-epithelial transition. *Oncol Rep.* 2016 Dec;36(6):3139–44.
98. Smith JW, Vukelja S, Hoffman AD, Jones VE, McIntyre K, Berrak E, et al. Phase II, Multicenter, Single-Arm, Feasibility Study of Eribulin Combined With Capecitabine for Adjuvant Treatment in Estrogen Receptor-Positive, Early-Stage Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2016 Feb;16(1):31–7.
99. Koczywas M, Frankel PH, Synold TW, Lenz H-J, Mortimer JE, El-Khoueiry AB, et al. Phase I study of the halichondrin B analogue eribulin mesylate in combination with cisplatin in advanced solid tumors. *Br J Cancer.* 2014 Dec 9;111(12):2268–74.
100. Kozyreva VK, Kiseleva AA, Ice RJ, Jones BC, Loskutov YV, Matakah F, et al. Combination of Eribulin and Aurora A Inhibitor MLN8237 Prevents Metastatic Colonization and Induces Cytotoxic Autophagy in Breast Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2016 Aug;15(8):1809–22.
101. O’Shaughnessy J, McIntyre K, Schwartzberg L, Wilks S, Puhalla S, Berrak E, et al. Impact of prior anthracycline or taxane use on eribulin effectiveness as first-line treatment for metastatic breast cancer: results from two phase 2, multicenter, single-arm studies. *SpringerPlus.* 2015;4:532.

7. Danksagungen

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Rody für die Bereitstellung des Doktorarbeitsthemas bedanken.

Mein herzlicher Dank geht an Prof. Kolberg-Liedtke für die Betreuung der Doktorarbeit, zahlreiche inhaltliche Anregungen und die Möglichkeit, Ergebnisse dieser Doktorarbeit zu präsentieren.

Ein riesiges Dankeschön geht an Dr. rer. nat. Karen Bräutigam für die tatkräftige Unterstützung im Labor, die jederzeitige und schnelle Beantwortung von Fragen und ganz, ganz besonders für das Korrekturlesen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei PD Dr. rer. nat. Frank Köster für die Anleitung im Labor, die kritische Überprüfung der Ergebnisse und Methodik, das Korrekturlesen, sowie viele hilfreiche formelle Tipps.

Ein großer Dank geht an Stephan Polack für die geduldige Anleitung im Labor, Einarbeitung in das Statistikprogramm und Hilfe bei administrativen Angelegenheiten

Mein großer Dank geht an Lisa für die Zusammenarbeit im Labor und den wertvollen Austausch.

Für die Möglichkeit der Nutzung des FACS-Geräts und die freundliche Einarbeitung danke ich Dr. rer. nat. Tillman Vollbrandt vom Institut für Systemische Entzündungsforschung der Universität zu Lübeck.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir die Zeit zur Vollendung der Arbeit geschenkt hat und ganz besonders bei Bandik.

Zuletzt bedanke ich mich bei Prof. Ludwig für wichtige Korrekturvorschläge.

.

8. Publikation

1. Bräutigam K, Mitzlaff K, Uebel L, Köster F, Polack S, Pervan M, Steinert G, Rody A, Liedtke C. Subtypes of Triple-negative Breast Cancer Cell lines React Differently to Eribulin mesylate. *ANTICANCER RESEARCH* 36: 2759-2766 (2016)

9. Lebenslauf



Beruf

Seit März 2017	Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik I, UKSH, Campus Lübeck
Juli 2016	Approbation als Ärztin

Studium

Oktober 2009- Mai 2016	Medizinstudium an der Universität zu Lübeck
Mai 2016	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2015	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Mai 2012- Dezember 2014	Wissenschaftliche Hilfskraft in der Hämostaseologischen Ambulanz, Institut für Klinische Chemie, UKSH, Lübeck
August 2011	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion

Oktober 2013- 2020	Doktorandin an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UKSH, Campus Lübeck Thema: „ Chemosensitivität unterschiedlicher triple-negativer Mammakarzinomsubtypen gegenüber Eribulin. “ Betreuerin: Prof. Dr. med. Cornelia Liedtke
--------------------	--

Praktisches Jahr

Dezember 2015 - April 2016	Wahlfach: Psychiatrie, Zentrum für integrative Psychiatrie, Lübeck
November- Dezember 2015	Transplantations- und Gefäßchirurgie, Churchill Hospital, Oxford, England
September- November 2015	Viszeralchirurgie, Northern General Hospital, Sheffield, England
Mai- September 2015	Innere Medizin, Sana Klinikum, Lübeck

10. Anhang

Tabelle 3: Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse aus 3 Versuchen mit der Zelllinie MD-MB-468

	Anteil der Zellen [%]				
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	MW	STABW
Kontrolle, FITC-A und PI-Färbung					
Q1: Annexin V-, PI+	7,97	6,70	3,09	5,92	2,53
Q2: Annexin V+ , PI+	3,29	5,79	10,50	6,53	3,66
Q3: Annexin V+ , PI-	0,42	0,95	10,90	4,09	5,90
Q4: Annexin V- , PI-	88,30	86,60	75,40	83,43	7,01
Eribulinbehandlung (10x IC 50, 24h) FITC-A und PI-Färbung					
Q1: Annexin V-, PI+	3,41	2,95	1,15	2,50	1,19
Q2: Annexin V+ , PI+	6,11	8,54	12,60	9,08	3,28
Q3: Annexin V+ , PI-	1,05	3,30	25,10	9,82	13,28
Q4: Annexin V- , PI-	89,40	85,20	61,10	78,57	15,27
Nekrose, 95°C für 10 min FITC-A- und PI-Färbung					
Q1: Annexin V-, PI+	74,30	66,90	34,10	58,43	21,40
Q2: Annexin V+ , PI+	25,50	33,00	65,70	41,40	21,38
Q3: Annexin V+ , PI-	0,00	0,00	0,02	0,01	0,01
Q4: Annexin V- , PI-	0,17	0,15	0,13	0,15	0,02
Camptothecin, 5 µM für 3h FITC-A- und PI-Färbung					
Q1: Annexin V-, PI+	4,51	3,73	1,37	3,20	1,63
Q2: Annexin V+ , PI+	1,69	2,99	5,95	3,54	2,18
Q3: Annexin V+ , PI-	0,18	0,42	6,47	2,36	3,56
Q4: Annexin V- , PI-	93,60	92,90	86,20	90,90	4,09
unbehandelt, ungefärbt					
Q1: Annexin V-, PI +	0,09	0,25	0,08	0,14	0,10
Q2: Annexin V+ , PI+	0,02	0,03	0,43	0,16	0,23
Q3: Annexin V+ , PI-	0,00	0,00	0,48	0,16	0,28
Q4: Annexin V- , PI-	99,90	99,70	99,00	99,53	0,47

	Anteil der Zellen [%]			MW	STABW
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3		
unbehandelt Annexin V-Färbung					
Q1: Annexin V-, PI+	0,27	0,49	0,03	0,26	0,23
Q2: Annexin V+ , PI+	5,57	7,71	10,20	7,83	2,32
Q3: Annexin V+ , PI-	2,00	3,12	16,90	7,34	8,30
Q4: Annexin V- , PI-	92,20	88,70	72,80	84,57	10,34
unbehandelt PI-Färbung					
Q1: Annexin V-, PI+	10,30	11,00	10,70	10,67	0,35
Q2: Annexin V+ , PI+	0,05	0,10	0,89	0,35	0,47
Q3: Annexin V+ , PI-	0,01	0,01	0,44	0,15	0,25
Q4: Annexin V- , PI-	89,60	88,90	88,00	88,83	0,80