

Research article

## Motility and proliferation of the triple negative breast cancer cell line MDA- MB 231 are selectively impeded by the ionophor salinomycin

Hero, T.<sup>1,2</sup>; Bühler, H.<sup>2</sup>; Adamietz, I.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Klinik für Radioonkologie und Strahlentherapie am Marien Hospital in Herne, Klinikum der Ruhr- Universität Bochum

<sup>2</sup>Institut für molekulare Onkologie, Strahlenbiologie und experimentelle Strahlentherapie der Ruhr- Universität Bochum

Korrespondenzanschrift des Autors: Thomas Hero, E- Mail

### Abstract

**Introduction** Tumorzellen mit dem Markerprofil CD 44<sup>+</sup>/CD24<sup>low/-</sup> besitzen ein hohes tumorinduzierendes Potential. Salinomycin kann solche zellen spezifisch hemmen. Die Effekte von Salinomycin auf die Viabilität und Migration an tripel- negativen Mammakarzinomzellen sollten untersucht werden.

**Methods** MDA- MB 231 und redifferenzierter Subklon als Kontrolle. Die Viabilität wurde durch den MTT- Test, die Migration mittels 24h- Videografie bestimmt.

**Results** Salinomycin führte zu einer Inhibierung aller Migrationsparameter an der MDA- MB 231. Es

zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen steigenden Salinomycinkonzentrationen und dem Verlust der Zellviabilität, welche bei der Kontrollgruppe signifikant geringer ausgeprägt war.

**Conclusion** Unter Salinomycin zeigt sich eine spezifische Hemmung der MDA- MB 231. Da die MDA- MB 231 über 90% CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>low/-</sup> positive Zellen besitzt, sind diese als möglicher Angriffspunkt für Salinomycin zu sehen.

Keywords: Salinomycin, tripel- negativ, Zellmigration, Proliferation

### Introduction

Das Mammakarzinom zählt mit mehr als einer Million Neuerkrankungen/Jahr weltweit zu den häufigsten malignen Erkrankungen der Frau (1). Immunhistochemische Kriterien sowie Genexpressionsanalysen erlauben eine spezifische Einteilung dieser Krankheitsentität. Hieraus ergeben sich therapeutische Konsequenzen in Form von anihormonellen Therapien bzw. einer zielgerichteten Antikörpertherapie mit Trastuzumab bei HER2- Überexpression (2).

Tripel- negative Mammakarzinome besitzen definitionsgemäß weder eine Expression von Hormonrezeptoren noch findet sich eine Überexpression von HER2, so dass antihormonelle- und zielgerichtete Therapien nicht erfolgversprechend sind (3).

Zur Erklärung der Entstehung maligner Tumoren ist die Tumorstammzellhypothese in das Zentrum der Forschung gerückt, welche erstmalig 1997 von Bonnet und Dick an der akuten myeloischen Leukämie postuliert und im Jahr 2003 auf Mammakarzinome übertragen wurde. Hiernach besitzen Mammakarzinomzellen mit dem Oberflächenprofil CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>low/-</sup> ein deutlich höheres tumorinduzierendes Potential. (4,5). Tripel-

negative Mammakarzinome enthalten einen hohen Anteil der o.g. Zellfraktion (6).

Salinomycin ist ein carboxylisches Ionophor mit antibiotischer Wirkung, welches speziell einwertige Kationen, mit einer Präferenz für Kaliumionen, über biologische Membranen transportieren kann. Es wird bereits seit Jahrzehnten in der Geflügelmast zur Prävention der Kokzidiose sowie als Futterzusatzstoff zur Wachstumsförderung in der Schweine- und Rinderzucht eingesetzt (7,8). 2009 konnte ein spezifischer zytotoxischer Effekt von Mammakarzinomzellen mit dem Oberflächenmarkerprofil CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>low/-</sup> nachgewiesen werden (9).

Bei der Mammakarzinomzelllinie MDA- MB 231 handelt es sich um eine tripel- negative Zelllinie mit mesenchyalem Phänotyp und einer Expression von CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>low/-</sup> Zellen von über 90% (10). Unter der Berücksichtigung der Ergebnisse von Gupta wäre daher auch ein signifikanter Einfluss von Salinomycin auf Zellen der MDA- MB 231 zu erwarten, wodurch Rückschlüsse auf die Wirksamkeit dieser Substanz bei tripel- negativen Mammakarzinomen als eine zusätzliche therapeutische Option gezogen werden könnten.

## Materials and methods

### Zelllinie

Die Experimente wurden an der etablierten tripel-negativen Mammakarzinomzelllinie MDA- MB 231 durchgeführt. Als Vergleichskollektiv diente ein redifferenzierter Subklon, bei welchem zuvor mittels Transfektion ein CK- 18 Expressionsvektor eingebracht wurde.

### Videografie

Für einen Videografielauf wurden die Zellen in einer Dichte von je 16.000 Zellen in sechs Petrischalen des Formates 35x10 mm ausgesät. Der Einfluss von Salinomycin auf die Motilität der beiden Zelllinien wurde in den Konzentrationen  $5 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  und  $5 \times 10^{-5}$  mol/l untersucht. Die Vorrichtung der Videografie ist aufgebaut auf einem inversen Mikroskop, welches mit einer Digitalkamera verbunden ist. Statt des Kreztisches ist eine klimatisierte Kammer angebracht, in der innerhalb einer Sechlochplatte max. 6 einzelne 35x10 mm messende Petrischalen aufgenommen werden können. Die Kammer ist gasdicht verschlossen und auf 37°C thermostatisiert. Die Kammer kann durch 3 Linearmotoren frei in allen Achsen positioniert werden. Die Steuerungssoftware „MicroControl“ erlaubt die Auswahl beliebig vieler Gesichtsfelder, die in frei wählbaren Zeitintervallen angesteuert und fotografiert werden können. Die Motilität der Zellen wurde über 24h beobachtet. Pro Schale wurden drei Gesichtsfelder mit ca. 20-30 Zellen ausgewählt und in Intervallen von 15 min. abfotografiert. Das Bildmaterial eines jeden Gesichtsfeldes wurde über das Programm „sci Taxis“ ausgewertet. Ausgewertet wurden die Parameter Migrationsgeschwindigkeit (V) ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ), euklidische Distanz (ED) ( $\mu\text{m}/24\text{h}$ ) und akkumulative Distanz (AD) ( $\mu\text{m}(24\text{h})$ ).

### Analyse der Daten

Die gewonnenen Daten wurden mit dem Programm „Chemotaxis and Migration Tool“ der Fa. Ibidi analysiert. Die statistische Analyse erfolgte unter der Anwendung des t- Testes für ungepaarte Stichproben.

### MTT- Test

Für den MTT- Test wurden die Zellen der jeweiligen Zelllinie mit einer Dichte von 5000 Zellen /Well in eine 96- Well- Platte ausgesät. Getestet wurden Salinomycinkonzentrationen von  $10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $1,25 \times 10^{-5}$ ,  $2,5 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $7,5 \times 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  und  $5 \times 10^{-4}$  mol/l. Die Zellviabilität wurde nach 24h und 72h bestimmt. Die photometrische Messung wurde bei einem Absorptionsmaximum von 570nm durchgeführt.

### Analyse der Daten

Nach photometrischer Messung wurden die gewonnenen Daten normalisiert in % umgerechnet. Die statistische Auswertung erfolgte unter Anwendung

des t- Testes für ungepaarte Stichproben und der Regressionsanalyse.

## Results

### Migrationsgeschwindigkeit (V)

Unter Salinomycin zeigte sich bei der MDA- MB 231 bereits ab der niedrigsten Konzentration von  $5 \times 10^{-7}$  mol/l zu einem statistisch hochsignifikanten Verlust der Migrationsgeschwindigkeit ( $p < 0,0001$ ). Hingegen war bei den mit CK 18 transfizierten Zellen kein Effekt nachweisbar (Figure 1a).

### Akkumulative Distanz (AD)

Unter dem Einfluss von Salinomycin kam es bei der MDA- MB 231 zu einem statistisch hochsignifikanten Abfall der AD ( $p < 0,0001$ ). Auch hier war kein inhibierender Effekt auf die Kontrollgruppe nachweisbar (Figure 1b).

### Euklidische Distanz (ED)

Im Vergleich zur Migrationsgeschwindigkeit und der akkumulativen Distanz war unter den Zellen der MDA- MB 231 erst ab einer Salinomycinkonzentration von  $10^{-5}$  mol/l ein statistisch signifikanter Abfall nachzuweisen ( $p < 0,05$ ). Ein hemmender Effekt auf die Kontrollgruppe zeigte sich nicht (Figure 1c).

### Zellviabilität

Zum direkten Vergleich der Viabilität der Zellen der mit CK 18 transfizierten Kontrollgruppe erfolgte mit Hilfe der Regressionsanalyse die Berechnung der IC 50. Hierbei zeigte sich nach 24h eine um den Faktor 60 benötigte höhere Salinomycinkonzentration zum Erreichen der IC 50 bei den mit CK 18 transfizierten Zellen im Vergleich zur MDA- MB 231. Nach 72h lag die Salinomycinkonzentration zum Erreichen der IC 50 bei den mit CK 18 transfizierten Zellen noch beim 10 fachen über den Zellen der MDA- MB 231.

## Discussion

Die inhibierende Wirkung von Salinomycin auf Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften ist seit der Arbeit von Gupta et al. bekannt und konnte unterdessen in weiteren Tumorentitäten wie z.B. Osteosarkomen (11) oder auch dem Endometriumkarzinom (12) nachgewiesen werden. Von Salinomycin wird daher angenommen, dass es eine spezifische Wirkung auf Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften besitzt. Bei der MDA- MB 231 handelt es sich um eine tripel- negative Zelllinie mit schlechter Differenzierung und mesenchyalem Phänotyp mit einer hohen Expression von Vimentin und damit verbundener hoher Invasivität (13). Die Tumorstammzellmarker des Mammakarzinoms bestehen nach Al- Hajj et al. aus einer Kombination der Oberflächenmarker  $\text{CD44}^+/\text{CD24}^{\text{low-}}$  (14). Zwar besitzen laut Fillmore und Kuperwasser die Zellen der MDA- MB 231 in weit über 90% das o.g. Oberflächenmarkerprofil, ein Befund welcher auch

durch Untersuchungen von Borgna et al. bestätigt werden konnte, jedoch geht dies für sich alleine noch nicht mit einer höheren tumorinduzierenden Wirkung einher (15,16). Eine erhöhte Tumorinduktion war hingegen durch eine Zellpopulation mit dem Markerprofil CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>low/-</sup> ESA<sup>+</sup> möglich, eine Fraktion die jedoch nur ca. 2% der Zellmasse ausmacht (15).

In dieser Arbeit sollte daher der Frage nachgegangen werden, inwiefern sich die Zellviabilität und die Migration der tripel- negativen Mammakarzinomzelllinie MDA- MB 231 durch die Wirkung von Salinomycin beeinflussen lässt. Als Vergleichskollektiv diente hierzu der mit CK18-transfisierte redifferenzierte Subklon. Kopp et al. konnten in Migrationsversuchen an verschiedenen Zelllinien, u.a. auch an der MDA- MB 231 unter Salinomycin eine Inhibierung der Migrationsfähigkeit im Boyden chamber assay bzw. im scratch assay nachweisen. Aufgrund der Ergebnisse wurde angenommen, dass neben Tumorstammzellen auch Tumorzellen ohne die definierten Stammzeleigenschaften wie Tumorinduktion durch Salinomycin in ihrer Migration gehemmt werden konnten (16). Die in dieser gefunden Ergebnisse bestätigen die Vermutungen von Kopp et al.. Dabei ist die Videografie den beiden andern Methoden, wie Migratin in der Boydenkammer und dem Scratchtest überlegen, da sie ausschließlich das Migrationspotential der untersuchten Zellen misst- Bei Transwellexperimenten muss ein zytokingradient angelegt werden, damit Zellen durch die Membran migrieren. Daher misst man zwingend immer eine Mischung aus Migration und Chemtaxis. Beim Scratchtest wird die Wunde nicht nur durch einwandernde Zellen geschlossen sondern auch durch eine Proliferation von den Rändern. Solche Nebeneffekte, die die Migrationswerte verfälschen, sind bei den Analysen durch die Videografie nicht zu erwarten. Unter der 24h- Videografie konnte in einem Salinomycinkonzentrationsbereich zwischen  $5 \times 10^{-7}$  mol/l und  $5 \times 10^{-5}$  mol/l ein statistisch signifikanter Abfall aller drei Migrationsparameter (V, AD und ED) an der MDA- MB 231 nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bezüglich der Zellviabilität. Für beide Zelllinien (MDA- MB 231 und MDA- MN 231 (CK18)) konnte eine hochsignifikante Korrelation zwischen zunehmender Salinomycinkonzentration und Abnahme der Zellviabilität nachgewiesen werden, ein Befund, welcher auch durch Viabilitätsstudien von An et al. gestützt wird (17). Zusätzlich konnte über die Ermittlung der IC50 eine erhöhte Toleranz gegenüber Salinomycin (MDA- MB 231 CK18)) im Vergleich zur MDA- MB 231 gefunden werden. Bei einem direkten Vergleich der Verlaufskurven der Zellviabilität mit den Verlaufskurven der Migrationsparameter deuten die Ergebnisse zudem darauf hin, dass es jeweils für die MDA- MB 231 und MDA- MB 231 (CK18) definierte Salinomycinkonzentrationsbereiche gibt, in denen der

Verlust der Viabilität insgesamt sehr gering ist. Interessanterweise findet sich in diesen Konzentrationsbereichen auch ein stabiler Verlauf aller Migrationsparameter, so dass möglicherweise davon auszugehen ist, dass die Migration in den gemessenen Salinomycinkonzentrationen abhängig ist von der Zellviabilität. Der Umstand, dass bei dem in dieser Arbeit untersuchten Salinomycinkonzentrationsbereich zwischen  $5 \times 10^{-7}$  mol/l und  $5 \times 10^{-5}$  mol/l kein signifikanter Effekt auf alle Parameter der Migration an der Zelllinie MDA- MB 231 (CK18) nachgewiesen werden konnte, könnte der Tatsache zugrunde liegen, dass der untersuchte Salinomycinkonzentrationsbereich in den Migrationsversuchen eben in diesem Konzentrationsbereich mit nur geringem Viabilitätsverlust lag. Möglicherweise müssen daher für isolierte Beobachtungen der Zellmobilität noch niedrigere Salinomycinkonzentrationen gewählt werden.

Laut Fillmore und Kuperwasser verfügt die zelllinie MDA- MB 231 nur über einen Anteil an Zellen mit Stammzeleigenschaften von ca. 2%. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten somit auf eine effektive Wirkung von Salinomycin auch auf Zellen ohne Stammzeleigenschaften hin.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die von gupta beschriebene selektive Hemmung von Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften durch Salinomycin offensichtlich auch bei Mammakarzinomen vom tripel-negativen Subtyp wirksam ist. Möglicherweise wären Ionophore wie Salinomycin daher eine Option in der Therapie dieser medikamentös schwer zugänglichen Tumorentität.