

Aus der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Wirkung unterschiedlicher p38 MAPK-Inhibitoren auf das funktionelle Verhalten von
Mammakarzinomzellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Anna Breitbach
aus Neuwied

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

08.12.2020

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
TABELLENVERZEICHNIS.....	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURDISKUSSION.....	3
2.1 DAS MAMMAKARZINOM	3
2.1.1 <i>Epidemiologie</i>	3
2.1.2 <i>Risikofaktoren</i>	3
2.1.3 <i>Histopathologie und Klassifikationen</i>	4
2.1.4 <i>Therapieoptionen und Prognose</i>	6
2.1.5 <i>Wichtige Signalwege</i>	8
2.2 MAPK	9
2.2.1 <i>Übersicht und Einteilung</i>	10
2.2.2 <i>p38 MAPK</i>	11
2.2.2.1 Bedeutung von p38 MAPK in Tumoren.....	12
2.2.2.1.1 Bedeutung der p38 MAPK im Mammakarzinom - klinisch	12
2.2.2.1.2 Bedeutung der p38 MAPK im Mammakarzinom - in vitro und im Mausmodell.....	13
2.2.2.2 p38 MAPK als mögliches Ziel in der Therapie des Mammakarzinoms.....	14
2.2.2.3 p38 MAPK-Inhibitoren.....	15
2.2.2.3.1 SB203580	16
2.2.2.3.2 Skepinone-L.....	16
2.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	17
3 MATERIAL UND METHODEN.....	18
3.1 MATERIALIEN.....	18
3.1.1 <i>Substanzen</i>	18
3.1.3 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	20
3.1.4 <i>Gebrauchsmaterialien</i>	20
3.1.5 <i>Kit-Systeme</i>	21
3.1.6 <i>Geräte</i>	21
3.1.7 <i>Antikörper</i>	22
3.1.7.1 Primäre Antikörper	22
3.1.7.2 Sekundäre Antikörper	22
3.1.8 <i>Puffer und Lösungen</i>	23
3.1.9 <i>Computerprogramme</i>	24
3.1.10 <i>Kontinuierliche Zelllinien</i>	24
3.2 METHODEN	25
3.2.1 <i>Steriles Arbeiten</i>	25

3.2.2	<i>Kultivierung humaner Zelllinien</i>	25
3.2.3	<i>Zellkonzentrationsbestimmung</i>	25
3.2.4	<i>Kryo-Konservierung und Rekultivierung</i>	26
3.2.5	<i>Proteinanalyse</i>	26
3.2.5.1	Proteinextraktion aus Zellkulturen.....	26
3.2.5.2	Protein-Konzentrationsbestimmung.....	27
3.2.5.3	Proteinfällung und Lösen von Proteinen.....	27
3.2.5.4	SDS-PAGE.....	28
3.2.5.5	Western-Blot.....	29
3.2.5.6	Proteindetektion.....	29
3.2.6	<i>Migration in der Boyden-Kammer</i>	30
3.2.7	<i>Adhäsion an Komponenten der Extrazellulärmatrix</i>	31
3.2.8	<i>Proliferationsassay</i>	32
3.2.9	<i>Viabilitätsassay</i>	33
3.3	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	34
4	ERGEBNISSE	35
4.1	EXPRESSION UND AKTIVITÄT DER P38 MAPK UNTER INHIBITION.....	35
4.2	CHEMOTAKTISCHE ZELLMIGRATION UNTER P38 MAPK-INHIBITION.....	39
4.3	ZELLADHÄSION UNTER P38 MAPK-INHIBITION.....	42
4.4	ZELLPROLIFERATION UNTER P38 MAPK-INHIBITION.....	44
4.5	ZELLVIABILITÄT UNTER P38 MAPK-INHIBITION.....	47
5	DISKUSSION	51
5.1	UNTERSCHIEDLICHE SELEKTIVITÄT DER VERWENDETEN INHIBITOREN: SKEPINONE-L HEMMT SELEKTIV P38A UND B MAPK.....	51
5.2	AUSWIRKUNGEN DER INHIBITOREN AUF DIE EXPRESSION VON P38 MAPK UND PHOSPHO- P38 MAPK IN MAMMAKARZINOMZELLEN.....	52
5.3	BEDEUTUNG DER P38 MAPK FÜR DIE MIGRATION VON MAMMAKARZINOMZELLEN.....	54
5.4	BEDEUTUNG DER P38 MAPK FÜR DIE ADHÄSION VON MAMMAKARZINOMZELLEN.....	56
5.5	BEDEUTUNG DER P38 MAPK FÜR DIE PROLIFERATION VON MAMMAKARZINOMZELLEN..	57
5.6	BEDEUTUNG DER P38 MAPK FÜR DIE VIABILITÄT VON MAMMAKARZINOMZELLEN.....	59
5.7	P38 MAPK ALS TUMORSUPPRESSOR.....	60
5.8	AUSBLICK.....	62
6	ZUSAMMENFASSUNG	63
7	REFERENZEN	64
8	ANHANG: WERTE ZU DEN ABBILDUNGEN UND TABELLEN	81
	DANKSAGUNG	VI
	TABELLARISCHER LEBENS LAUF	VII

Abkürzungsverzeichnis

AKT	AKT8 virus oncogene cellular homolog
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BET	Brusterhaltende Therapie
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumin
CAMK	Calcium/calmodulin-dependent kinase
CDK	Cyclin-dependent kinase
CK	Casein kinase
CLK	CDC-like kinase
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DFG	Asparagin - Phenylalanin - Glycin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffer Saline
DTT	Dithiothreitol
DUSP	Dual-specificity phosphatase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial-Mesenchymale-Transition
ER	Estrogen receptor
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal calf serum
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1
GAK	Cyclin-G-associated kinase
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish peroxidase
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
IRAK	Interleukin-1 receptor associated kinase
JAK	Janus-family tyrosine kinase

JNK	Jun N-terminal kinase
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKAPK	MAP kinase activated protein kinase
MAP2K	Mitogen-activated protein kinase kinase
MAP3K	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MEKK	MAPK/Erk kinase kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MK	MAP kinase activated protein kinase
MKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MPK	MAP kinase phosphatase
MSK	Mitogen and stress activated kinase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
nfd	Nonfat dried milk
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NST	No special type (Brustkrebs)
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PKA	Protein kinase A
PPM1D	Protein phosphatase 1D
P/S	Penicillin/Streptomycin
pH	Potentia hydrogenii
PR	Progesterone receptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAF	Rat fibrosarcoma
RANK	Receptor Activator of NF-κB
RAS	Rat sarcoma
Rb	Retinoblastom
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSK	Ribosomal protein S6 kinase
RTK	Receptor tyrosine kinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBS	Tris-buffered Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNBC	Triple-negative Breast Cancer
TNM	Tumor Nodus Metastasen

TK	Thymidinkinase
TKL	Tyrosinekinase-like kinase
TP53	Tumor Protein 53
UICC	Union internationale contre le cancer
uPA	Urokinase-type plasminogen activator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms (Li et al. 2017).....</i>	<i>6</i>
<i>Tabelle 2 UICC/AJCC-Stadien des Mammakarzinoms, modifiziert nach (Leitlinienprogramm Onkologie 2018)</i>	<i>7</i>
<i>Tabelle 3: Primäre Antikörperlösungen, nfd: non-fat dried milk</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 4: Pipettierschema SDS-PAGE für 2 Gele.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 5: Veränderung der Expression von p38 MAPK und Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) in den Zelllinien AU565, MCF7, MCF10A, MDA-MB231 und ZR751.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 6: Übersicht über die Effekte der beiden Inhibitoren auf die Expression der p38 MAPK in den untersuchten Zelllinien.</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 7: Übersicht über die Effekte der beiden Inhibitoren auf die Expression der phosphorylierten p38 MAPK (T180/Y182) in den untersuchten Zelllinien.</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 8: Übersicht über die Effekte der beiden Inhibitoren auf das chemotaktische Migrationsverhalten der untersuchten Zelllinien.</i>	<i>56</i>
<i>Tabelle 9 Übersicht über die Effekte der beiden Inhibitoren auf das Adhäsionsverhalten der untersuchten Zelllinien.</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 10: Übersicht über die Effekte der beiden Inhibitoren auf die Proliferation der untersuchten Zelllinien.</i>	<i>59</i>
<i>Tabelle 11: Übersicht über die Effekte der beiden Inhibitoren auf die Viabilität der untersuchten Zelllinien.</i>	<i>59</i>

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Schema des histologischen Aufbaus der Mamma im Sagittalschnitt modifiziert nach (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012)</i>	<i>5</i>
<i>Abbildung 2 Stufen der Signaltransduktionskaskade des MAPK-Signalwegs mit Beispielen beteiligter Moleküle, nach (Kyriakis und Avruch 2012).....</i>	<i>10</i>
<i>Abbildung 3 Strukturformel von SB203580 (Cuenda et al. 1995)</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 4 Strukturformel von Skepinone-L (Koeberle et al. 2011)</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 5: Expression von p38 MAPK unter Einfluss steigender Konzentrationen der p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L in der Zelllinie AU565.</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 6: Expression von phosphorylierter p38 MAPK (Thr180/Tyr182) unter Einfluss steigender Konzentrationen der p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L in der Zelllinie AU565.....</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 7: Einfluss steigender Konzentrationen der p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L auf die chemotaktische Migration der Zelllinien MCF7 (A), MCF10A (B), MDA-MB231 (C) und ZR751 (D).....</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 8: Adhäsion der Mammakarzinom-Zelllinien AU565 (A), MCF7 (B), MCF10A (C), MDA-MB231 (D) und ZR751 (E) unter Einfluss steigender Konzentrationen der p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L an Fibronektin und BSA.....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 9: Proliferation der Mammakarzinom-Zelllinien AU565 (A), MCF7 (B), MCF10A (C), MDA-MB231 (D) und ZR751 (E) unter Einfluss steigender Konzentrationen der p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L, quantifiziert mittels BrdU-ELISA.</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 10: Zellviabilität der Mammakarzinom-Zelllinien AU565 (A), MCF7 (B), MCF10A (C), MDA-MB231 (D) und ZR751 (E) nach der Behandlung mit den p38 MAPK-Inhibitoren SB 203580 und Skepinone-L.</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 11 Dendrogramme der durch SB203580 (A) und Skepinone-L (B) inhibierten Kinasen, (A) (Fabian et al. 2005), (B) (Koeberle et al. 2011).....</i>	<i>51</i>

1 Einleitung

Für das Jahr 2019 wurde die Zahl neu diagnostizierter Brustkrebsfälle in den Vereinigten Staaten von Amerika auf rund 270.000 geschätzt. Damit ist das Mammakarzinom die häufigste Krebsneuerkrankung der Frau (Siegel et al. 2019). Ähnlich stellt sich die Situation in Deutschland dar. Die 5-Jahres-Überlebensrate hängt vom UICC-Stadium ab: Während im Stadium 1 noch fast alle Patientinnen die nächsten 70 Monate überleben, versterben im Stadium 4 mehr als 70% der Frauen an ihrer Brustkrebserkrankung (Robert Koch-Institut 2019). Durch die Einführung des Mammographie-Screenings, einer verbesserten supportiven Therapie und der Einführung neuer, zielgerichteter Therapeutika konnte die Mortalität gesenkt werden, sodass in den letzten Jahren die häufigste weibliche Krebstodesursache nicht mehr das Mammakarzinom, sondern das Bronchialkarzinom ist (International Agency for Research on Cancer 2019; Barnes et al. 2016).

Unter dem Überbegriff Mammakarzinom werden viele verschiedene Typen zusammengefasst, die sich beispielsweise in ihrem Rezeptorprofil unterscheiden. Dieses besitzt prädiktive Aussagekraft, da davon das Ansprechen bestimmter Therapeutika abhängt. So sprechen sogenannte Triple-negative Karzinome (TNBC), die weder Hormonrezeptoren, noch HER2/neu exprimieren, weder auf eine antihormonelle Therapie an, noch auf eine Antikörpertherapie mit Trastuzumab, einem HER2/neu-blockierenden Antikörper (Böcker und Kreipe 2012). Da besonders dieser Typ ein aggressives biologisches Verhalten aufweist und vermehrt in höheren Stadien diagnostiziert wird, ist die Suche nach neuen Therapeutika beim TNBC Gegenstand aktueller Forschung (Lee und Djamgoz 2018; Lyons 2019). Doch auch für andere Subtypen des Mammakarzinoms besteht ein großes Interesse an neuen, effektiven Therapeutika, da diese Erkrankung einen schwerwiegenden Einschnitt in die Lebensqualität der Patientinnen darstellt und, nicht zuletzt durch ihre hohe Prävalenz, bedeutende sozio-ökonomische Konsequenzen mit sich bringt (Masià et al. 2019).

Neue Tumorthherapie-Strategien konzentrieren sich neben immunologischen Ansätzen auf die Inhibition spezieller intrazellulärer Signalwege, wie beispielsweise des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK)-Signalwegs. Als Teil der Familie der MAPK ist die p38 MAPK als zentrales Enzym dieses intrazellulären *pathways* an der Steuerung vielfältiger zellulärer Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Migration und Invasion beteiligt (Cuadrado und Nebreda 2010; Koul et al. 2013). Diese Schlüsselrolle macht sie als potenziell therapeutisch nutzbares Ziel in der Onkologie attraktiv. Jedoch ist die genaue Bedeutung der p38 MAPK, ob sie tumorsuppressive oder tumorfördernde Effekte vermittelt, noch nicht abschließend geklärt (Igea und Nebreda 2015).

Viele Studien, die auf die Charakterisierung des p38 MAPK-Signalwegs abzielten, haben in der Vergangenheit den etablierten Inhibitor SB203580 verwendet. Doch SB203580 ist nicht spezifisch für dieses Enzym, sondern hemmt eine Reihe weiterer Kinasen, die ebenfalls das zelluläre Verhalten bestimmen (Fabian et al. 2005). Die Aussagekraft der unter Behandlung mit SB203580 gefundenen Effekte ist beschränkt, da sich nicht abschließend bestimmen lässt, ob die beobachteten Auswirkungen auf die Hemmung der p38 MAPK oder eines anderen, unselektiv gehemmten Signalwegs zurückzuführen sind. Mit der Einführung einer neuen Substanz, Skepinone-L, steht erstmals ein hoch-selektiver p38 MAPK-Inhibitor zur Verfügung (Koeberle et al. 2011).

Die vorliegende Arbeit stellt die Wirkung des etablierten, unselektiven Inhibitors SB203580 der des neuen, selektiven Inhibitors Skepinone-L auf das funktionelle Verhalten verschiedener Mammakarzinomzelllinien gegenüber. Betrachtet werden dabei die Expression der Kinase, sowie die chemotaktische Zellmigration, Adhäsion an Komponenten der Extrazellulärmatrix, Proliferation und Viabilität der Karzinomzellen. Ziel ist es, die Rolle der p38 MAPK im Mammakarzinom genauer zu beleuchten und zu klären, ob diesem Signalweg eine tumorsuppressive oder -fördernde Funktion zukommt und ob eine Inhibition der p38 MAPK folglich eine potenziell therapeutisch nutzbare Option darstellt.

2 Literaturdiskussion

2.1 Das Mammakarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2018 erkrankten rund 72 000 Frauen in Deutschland an Brustkrebs. Damit ist das Mammakarzinom mit einem Anteil von fast 26% an allen Malignomen (ausgenommen das Plattenepithelkarzinom der Haut) die häufigste weibliche Krebsneuerkrankung. Zudem ist Brustkrebs, nach dem Lungenkarzinom, die zweithäufigste Krebstodesursache. (International Agency for Research on Cancer 2019). Jede achte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs und 30% der Betroffenen sind bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre (Robert Koch-Institut 2019). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64,3 Jahren (Barnes et al. 2016). Mehr als zehn Jahre nach Einführung des Mammographie-Screenings in Deutschland kann ein Anstieg der Brustkrebsinzidenz beobachtet werden, der vor allem durch die Detektion früher Stadien der Erkrankung erklärt werden kann. Tatsächlich konnte die Brustkrebsmortalität von noch 25,8% in der Prä-Screening-Ära (2003/2004) auf 21,2% in den Jahren 2015/2016 gesenkt werden. Dieser positiven Auswirkung des Screeningprogramms steht die Gefahr der Überdiagnose, vor allem von *in situ*-Läsionen, gegenüber (Katalinic et al. 2019). Die 5-Jahres-Überlebensrate variiert global gesehen stark, von über 80% in Industrieländern bis 40% in Entwicklungsländern (Coleman et al. 2008).

2.1.2 Risikofaktoren

Es sind eine Reihe von Faktoren bekannt, die das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, erhöhen. Diese lassen sich in die drei Kategorien *Hereditäre Faktoren*, *Hormonelle Einflüsse* und *Umweltfaktoren* einteilen (Böcker und Kreipe 2012). Zur ersten Kategorie zählt die positive Familienanamnese bei Verwandten ersten Grades (Eberl et al. 2005). Man vermutet bei 5 – 10% aller Brustkrebsfälle eine erbliche Komponente. Dabei spielen Mutationen in verschiedenen Genen, von denen *BRCA1* und *BRCA2* zu den bekanntesten zählen, eine Rolle (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2001). Darüber hinaus werden weitere, multifaktorielle genetische Einflüsse vermutet (Colditz et al. 2012). Zu den hormonellen Faktoren gehören eine frühe Menarche, eine späte Menopause und hohes Alter bei der ersten Geburt, bzw. Nulliparität (Barnard et al. 2015). Der Einfluss einer postmenopausalen Hormonersatztherapie wird diskutiert (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2019). Unter die dritte Kategorie fallen Lifestylefaktoren, wobei hier

vor allen Dingen Adipositas und Alkoholkonsum zu nennen sind (Sun et al. 2017). Die Zunahme der Brustkrebsinzidenz in Deutschland und anderen Industrienationen in den vergangenen Jahrzehnten wird dabei auch auf das Vorliegen steigender Zahlen solcher Risikofaktoren zurückgeführt (Barnes et al. 2016). Fettzellen, die mit dem Enzym Aromatase eine gesteigerte Produktion von Östrogenen verursachen, wurden bereits früh für die steigende Brustkrebsinzidenz im Alter verantwortlich gemacht, da die postmenopausale Brust einen erhöhten Fettanteil aufweist (Fishman et al. 1977). Neuere Studien heben vermehrt den Zusammenhang zwischen der Gewichtung der einzelnen, etablierten Risikofaktoren in den unterschiedlichen Subtypen (vgl. 2.1.3) des Mammakarzinoms hervor (Barnard et al. 2015).

2.1.3 Histopathologie und Klassifikationen

Als häufigste maligne Erkrankung der weiblichen Brust geht das Mammakarzinom vom Drüsenepithel aus (Adenokarzinom) (Böcker und Kreipe 2012). Die Brustdrüse selbst besteht aus mehreren Einzeldrüsen (sogenannte Lobi), die in fettreiches, bindegewebiges Stroma eingebettet sind. Diese wiederum sind aus zahlreichen Endstücken (den Lobuli) aufgebaut, die über ein verzweigtes Gangsystem (den Ductus lactiferi) über einen gemeinsamen Hauptausführungsgang mit terminaler Erweiterung (dem Sinus lactiferi) in der Brustwarze münden (Abbildung 1, (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012)). Das Epithel ist zweischichtig aufgebaut, bestehend aus Drüsenzellen und Myoepithelzellen, die von einer gemeinsamen Stammzelle ausgehen und durch eine Basalmembran vom umgebenden Stroma abgegrenzt sind (Stingl et al. 2006). Das Parenchym ist hormonsensibel und reagiert auf hormonelle Schwankungen, zum Beispiel im Rahmen des Menstruationszyklus (Jagannathan und Sharma 2017).

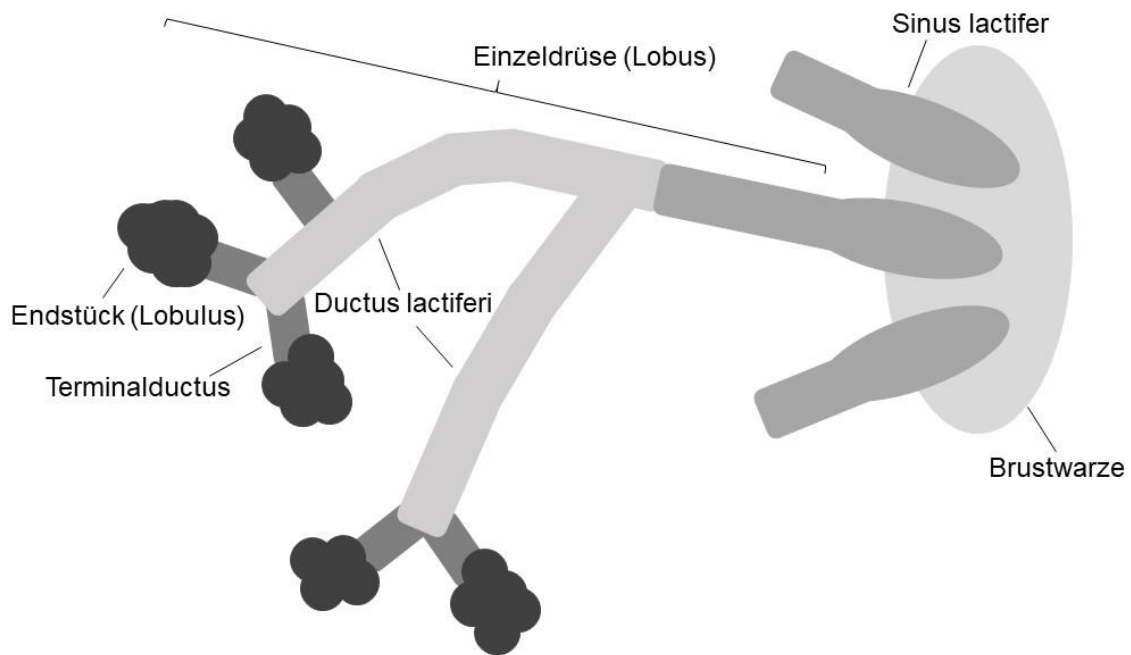


Abbildung 1: Schema des histologischen Aufbaus der Mamma im Sagittalschnitt modifiziert nach (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012)

Das Mammakarzinom als heterogene Erkrankung lässt sich entsprechend verschiedener Merkmale in unterschiedliche Klassifikationssysteme einteilen: Nach der *Histomorphologie*, der *Molekulargenetik* und dem *Rezeptorprofil*.

Im Falle invasiv wachsender Malignome werden nach dem morphologischen Erscheinungsbild der Läsionen invasive Karzinome ohne speziellen Typ (invasive carcinomas of no special type, NST), ehemals als invasiv-duktales Karzinom bezeichnet, und invasive Karzinome mit speziellem Typ unterschieden. Erstere zeichnen sich durch ein kohäsives Wachstumsmuster aus, während letztere ein nicht-kohäsives (lobuläres Karzinom), siebförmiges (kribriiformes Karzinom) oder anders gestaltetes *pattern* aufweisen (Sinn und Kreipe 2013). Dabei fallen etwa 60% auf NST-Karzinome, 10-15% auf den lobulären Typ und der Rest auf die übrigen Subtypen (Böcker und Kreipe 2012).

Schon früh wurde vermutet, dass den verschiedenen Phänotypen des Mammakarzinoms unterschiedliche Genotypen zugrunde liegen (Perou et al. 2000; Sørlie et al. 2001). Daraus entwickelte sich die Einteilung nach molekularer Klassifikation in vier Subtypen, entsprechend der Expression bestimmter Gene (Tabelle 1, (Li et al. 2017)). Die verschiedenen Typen unterscheiden sich in auch ihrer Proliferationsrate und ihrem biologischen Verhalten. So weisen Karzinome vom Luminal A-Typ, welcher der häufigste Subtyp ist, die beste Prognose auf, was für Therapieentscheidungen genutzt werden könnte (Tolaney et al. 2015). Ein

verbessertes Verständnis der genetischen Hintergründe des Mammakarzinoms führt fortlaufend zu einer Anpassung und Erweiterung dieser Einteilung (Haakensen et al. 2011).

Tabelle 1 Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms (Li et al. 2017)

Subtyp	Molekulare Eigenschaften / Expression
Luminal A	ER+, PR+/-, HER2/neu-
Luminal B	ER+, HER2/neu+
HER2/neu	HER2/neu+, ER-, PR-
Basal like	Myoepitheliale Keratine (5, 6, 17)

Besondere klinische Relevanz hat die immunhistochemische Einteilung nach dem Expressionsmuster der Rezeptoren, da diese als prädiktive Marker therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen. Immunhistochemisch wird das Rezeptorprofil für Östrogen-, Progesteron- und HER2/neu-Rezeptor bestimmt (Böcker und Kreipe 2012). Die daraus resultierenden therapeutischen Angriffspunkte werden im Folgenden besprochen.

2.1.4 Therapieoptionen und Prognose

Die Behandlung des Mammakarzinoms richtet sich nach dem Stadium der Erkrankung in der UICC/AJCC-Klassifikation (Tabelle 2 UICC/AJCC-Stadien des Mammakarzinoms, modifiziert nach (Leitlinienprogramm Onkologie 2018)). Dafür wird wiederum das Ergebnis der klinisch-pathologischen Untersuchung der TNM-Einteilung verwendet, die die Größe des Primärtumors, den Lymphknotenstatus und das Vorliegen von Fernmetastasen berücksichtigt (Brierley et al. 2017). Die aktuelle Leitlinie unterscheidet einen primär kurativen Ansatz beim lokoregionär begrenzten Karzinom von einem palliativen Ansatz bei fernmetastasiertem Karzinom.

Tabelle 2 UICC/AJCC-Stadien des Mammakarzinoms, modifiziert nach (Leitlinienprogramm Onkologie 2018)

UICC/AJCC-Stadium		TNM	
0		Tis N0 M0	Lokal begrenztes Karzinom
I	A	T1 N0 M0	
	B	T0-T1 N1mi M0	
II	A	T0-T1 N1 M0 T2 N0 M0	Lokal fortgeschrittenes Karzinom
	B	T2 N1 M0 T3 N0 M0	
III	A	T0-T2 N2 M0 T3 N1-N2 M0	
	B	T4 N0-N2 M0	
	C	T0-4 N3 M0	
IV		T0-4 N0-3 M1	Fernmetastasiertes Karzinom

Bei der lokal begrenzten Erkrankung ist ein operatives Vorgehen mit brusterhaltender Therapie (BET) vorgesehen, inklusive der Entnahme des Wächterlymphknotens zur histologischen Beurteilung des Lymphknotenstatus, sofern sich vorab in der Bildgebung oder der klinischen Untersuchung kein Hinweis auf eine stattgehabte lymphogene Metastasierung ergeben hat. Adjuvant sollte eine Radiotherapie erfolgen, die, abhängig vom Befund, gegebenenfalls auch die Lymphabflusswege miterfasst. Über die sich anschließende Systemtherapie entscheiden danach prädiktive Faktoren, zu denen unter anderem auch das Rezeptorprofil des Tumors zählt (vgl. 2.1.3). So sollten Karzinome, die ER/PR-positiv sind, einer Hormontherapie zugeführt werden, wobei die Auswahl der Wirkstoffklasse (Östrogenrezeptormodulatoren vs. Aromataseinhibitoren) vom menopausalen Status der Patientin abhängt. Als *target* einer zielgerichteten Therapie, beispielsweise mit dem Antikörper Trastuzumab, dient der HER2/neu-Rezeptor. So genannte Triple-negative Karzinome blieben bezüglich der Systemtherapie lange auf eine konventionelle Chemotherapie (mit Anthracyclinen und Taxanen) beschränkt, welche jedoch auch additiv beim Vorliegen bestimmter Risikofaktoren, wie beispielsweise einer geringen Differenzierung der Tumorzellen, bei rezeptorpositiven Karzinomen angewendet werden sollte. Das Therapiekonzept beim lokal fortgeschrittenen Karzinom gestaltet sich ähnlich. Hier sollte jedoch die Indikation zur Axilladisektion oder zur adjuvanten Chemotherapie großzügiger gestellt werden. In den vergangenen Jahren haben Therapien gegen neue molekulare *targets* Einzug in die Behandlung des Mammakarzinoms gefunden. Dazu zählen Bevacizumab (Antikörper gegen *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)) und Inhibitoren bestimmter *cyclin-dependent kinases* (CDK4/6) oder der Kinase *mammalian Target of Rapamycin*

(mTOR) (Leitlinienprogramm Onkologie 2018). Darüber hinaus befinden sich auch Immuncheckpoint-Inhibitoren in klinischer Erprobung (Schmid et al. 2020).

Beim fernmetastasierten Karzinom wird ein palliatives Therapiekonzept eingeleitet, welches eine Systemtherapie vorsieht. Auch hier sollte jedoch der Rezeptorstatus erhoben werden, um zusätzlich zur Chemotherapie auch eine hormonelle Therapie, bzw. eine *targeted therapy* einleiten zu können (Leitlinienprogramm Onkologie 2018). Im Sinne der palliativen Zielsetzung wird hier eine Verbesserung der Lebensqualität und eine Verlängerung der Lebenszeit angestrebt, im Gegensatz zur definitiven Heilung (Schnell und Schulz 2012).

Im Zeitalter immer gezielter wirkender onkologischer Medikamente, die selektiv Tumorzellen schädigen, während gesunde Körperzellen maximal geschont werden sollen, ist die Charakterisierung targetierbarer Antigene von Karzinomzellen von großer Bedeutung. Vor allem in der Behandlung des Triple-negativen Brustkrebs, für den die Möglichkeit der Antihormonellen Therapie oder der HER2/neu-Blockade nicht gegeben ist, besteht ein großes Interesse auf diesem Feld (Lee und Djamgoz 2018; Lyons 2019). Dafür ist ein Verständnis karzinomspezifischer Signalverarbeitung und intrazellulärer *pathways* unabdingbar.

2.1.5 Wichtige Signalwege

Durch Sequenzierung des Genoms repräsentativer Gewebeproben von Mammakarzinomen konnte gezeigt werden, dass Mammakarzinome aus vielen verschiedenen Zellklonen bestehen, die sich bereits früh in der Tumorentwicklung aufspalten können und Mutationen in verschiedensten Genen aufweisen, von denen *PIK3CA*, *TP53*, *PTEN*, *BRCA2* und *MYC* zu den häufigsten zählen (Yates et al. 2015). Die damit einhergehenden veränderten Abläufe in zellulären Signalwegen sind divers und noch nicht vollständig verstanden.

Circa 75% aller Mammakarzinome weisen eine Überexpression von ER auf (Nadji et al. 2005). Als nukleäre Rezeptoren wirken ER α und β nach Ligandenbindung als Transkriptionsfaktoren verschiedener Gene (Cheskis et al. 2007). Dazu zählt zum Beispiel das Gen Cyclin D1, durch dessen erhöhte Expression der Zellzyklus vorangetrieben wird und die Zellen proliferieren können (Cicatiello et al. 2004).

In den letzten Jahren konnten vor diesem Hintergrund verschiedene spezifischere Fragestellungen aufgeklärt werden. Dazu zählt beispielsweise das Phänomen der primären oder erworbenen Resistenz gegenüber Aromatase-Inhibitoren bei ER-positivem Brustkrebs. So führt die Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren wie HER2/neu durch EGF zu ähnlichen genomischen Effekten wie ER α (Lupien et al. 2010). Aber auch andere Rezeptoren,

wie FGFR1 (Turner et al. 2010) und IGF1R (Fox et al. 2011) spielen in der Resistenz gegenüber endokrinen Therapieansätzen eine Rolle. Zu deren nachgeschalteten Signalwegen gehören PI3K/AKT/mTOR (Miller et al. 2010), aber auch MAPK (Jeng et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Überaktivierung von MAPK zu einem ER-negativen und damit Hormontherapie-resistenten Phänotyp führt (Oh et al. 2001). Mit Inhibitoren von beispielsweise PI3K sind bereits Substanzen zur Überwindung der Resistenz in Erprobung (Bendell et al. 2012). Des Weiteren führt auch eine Dysregulation des Zellzyklus durch aberrante Aktivität verschiedener CDK zu Hormontherapieresistenz (Rocca et al. 2014). So führt die Aktivierung von Cyclin D über den RAS/RAF/MAPK-, NF- κ B, JAK/STAT-Signalweg oder Steroidhormone über die Komplexbildung mit CDK4/6 zu einer Inaktivierung des Tumorsuppressors Rb (Alberts et al. 2015).

Die Fähigkeit von Zellen zur gesteigerten Migration begründet die Voraussetzung für lokale und systemische Ausbreitung von Tumorzellen und stellt somit einen *hallmark of cancer* dar (Hanahan und Weinberg 2011). Den dafür notwendigen Prozess der morphologischen Alteration bezeichnet man als Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT), an dessen Zustandekommen eine Reihe verschiedener intrazellulärer Signalwege beteiligt ist (Huber et al. 2005). Dabei erlangen epitheliale Zellen die Eigenschaften von Mesenchymzellen. EMT kommt physiologisch während der Embryonalentwicklung vor, aber auch bei pathologischen Prozessen, wie etwa der Gewebsfibrose oder der Karzinogenese. Eine wichtige Eigenschaft ist dabei der Verlust der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, etwa über die Herabregulation von Zelladhäsionsmolekülen wie E-Cadherin (Thiery et al. 2009). Dies wird durch den Notch-Signalweg erreicht (Leong et al. 2007), aber auch über den MAPK-Signalweg (del Barco Barrantes und Nebreda 2012).

Insgesamt weisen Mammakarzinomzellen Dysregulationen in vielen verschiedenen Signalwegen auf. Einige von ihnen sind bereits Angriffspunkte verschiedener neuartiger Medikamente. Doch noch sind nicht alle intrazellulären *pathways* ausreichend charakterisiert, um das therapeutische Potenzial solcher etwaigen *targets* voll auszuschöpfen. Dazu gehört auch die an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligte Gruppe der MAPK.

2.2 MAPK

Das Akronym MAPK steht für *mitogen-activated protein kinase* und stellt eine heterogene und in Eukaryonten hoch konservierte Gruppe von Regulatoren dar. Durch sie werden eine Reihe biologischer Prozesse gesteuert, wie zum Beispiel Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Entzündung. Damit nehmen sie eine Schlüsselposition in der Steuerung des Zellverhaltens ein (Koul et al. 2013).

2.2.1 Übersicht und Einteilung

Als Element einer Signalkette sind die klassischen MAPK in ein komplexes Netzwerk integriert. Durch verschiedene Signale, die im Folgenden näher besprochen werden, wird eine typisch dreistufige Kaskade aus Phosphorylierungsschritten aktiviert, an deren Ende die aktivierte, an einem typischen Threonin-X-Tyrosin-Motiv phosphorylierte MAPK steht (Doza YN, Cuenda A, Thomas GM, Cohen P, Nebreda AR 1995). Diese vorgeschalteten Kinasen werden als MAPK-Kinase (MAP2K), beziehungsweise als MAPKK-Kinase (MAP3K) bezeichnet. Zu diesen Gruppen zählen zahlreiche, auch in anderen Signalwegen aktive Kinasen, wie etwa MEK (MAP2K) oder RAF (MAP3K). Die MAPK selbst phosphoryliert wiederum Serin-/Threoninreste ihrer Substrate. Durch definierte Andockstellen am Molekül und dem Erkennen einer bestimmten Aminosäuresequenz, die Prolin enthält, wird die Substratspezifität gewährleistet (Kyriakis und Avruch 2012). Diese sogenannten MAPK-aktivierte Proteinkinasen (MAPKAPK) stellen wiederum eine heterogene Gruppe dar (Cargnello und Roux 2011). Aus dieser Konvergenz verschiedener Signalwege auf der Stufe der MAPK und der anschließenden divergenten Weiterleitung können vielfältige zelluläre Antworten resultieren (Abbildung 2).

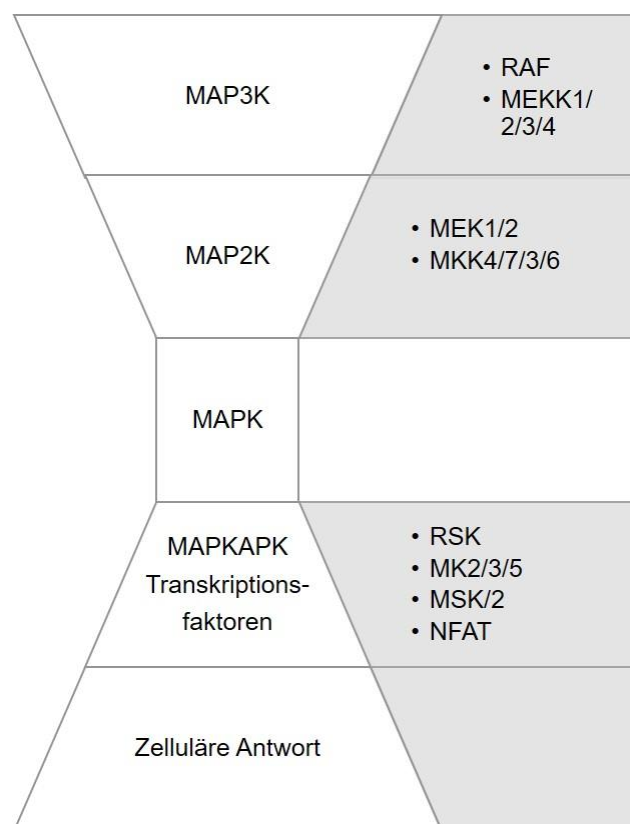


Abbildung 2 Stufen der Signaltransduktionskaskade des MAPK-Signalwegs mit Beispielen beteiligter Moleküle, nach (Kyriakis und Avruch 2012)

Die Regulation dieser Signalwege erfolgt unter anderem durch *scaffolding proteins*, die durch den Zusammenschluss mehrerer Kaskadenelemente in Funktionseinheiten für eine spezifische Signalweiterleitung sorgen (Morrison und Davis 2003). Die Beendigung der Signalübertragung erfolgt durch Phosphatasen, die in der Klasse der MAP-Kinase-Phosphatasen (MPK) zusammengefasst werden (Theodosiou und Ashworth 2002). Da nicht nur das Signal selbst, sondern auch die Dauer der Signalübertragung Auswirkungen auf die zelluläre Antworten hat, stellt auch die Inaktivierung der MAPK eine Stellschraube in der Regulation dar (Marshall 1995).

Die Gruppe der klassischen MAPK lassen sich in zumindest vier Untergruppen aufteilen. Dazu zählen die extracellulär signal-related Kinasen 1/2 (ERK1/2), die Jun amino-terminal Kinasen (JNK), die p38 MAPK und die ERK5. Diese Untergruppen unterscheiden sich in der Art ihrer Aktivierung sowie in den zellulären Prozessen, die sie anstoßen (Chang und Karin 2001). So werden ERK1/2 vor allem von extrazellulären Mitogenen aktiviert, dahingegen JNK und p38 MAPK durch zellulären Stress (Cargnello und Roux 2011).

2.2.2 p38 MAPK

Zu der Untergruppe der p38 MAPK zählen vier verschiedene Isoformen, die man heute als p38 α , β , γ und δ MAPK bezeichnet. Während p38 α MAPK ubiquitär exprimiert wird, weisen die Isoformen γ und δ eine Restriktion auf Zelltypen bestimmter Gewebearten auf, wie beispielsweise Gehirn, Muskel oder endokrine Drüsen, und sind unter anderem an der insulinabhängigen metabolischen Regulation beteiligt (Cuadrado und Nebreda 2010; Sumara et al. 2009). Bereits früh wurde die Rolle der p38 α MAPK bei der Embryogenese durch Regulation der plazentaren Angiogenese festgestellt (Mudgett et al. 2000). Die β -Isoform weist eine ähnlich ubiquitäre Expression auf - jedoch sind die Levels des Proteins geringer als die der α -Isoform und auch die Funktionen scheinen ähnlich, doch nicht identisch zu sein (del Barco Barrantes et al. 2011).

Allen Untergruppen gemeinsam ist die Aktivierung über Stresssignale aus der Umwelt der Zelle. Dazu zählen oxidative Stimuli, UV-Strahlung, Hypoxie und Ischämie sowie inflammatorische Zytokine, wie TNF- α und IL-1. Als wichtigste aktivierende Elemente der Signalkette (MAP2K) zählen dabei MKK3 und MKK6 (Cargnello und Roux 2011; Dérijard et al. 1995). Neben dem oben beschriebenen, sogenannten kanonischen Weg der Aktivierung über eine Signalkaskade, ausgelöst durch externe Stimuli, kann insbesondere auch p38 α MAPK durch alternative Mechanismen aktiviert werden. Dazu zählt beispielsweise bei T-Lymphozyten die Antigenpräsentation (Salvador et al. 2005). Die durch die p38 MAPK angestoßenen Prozesse lassen sich als Regulation von Proliferation, Apoptose und Migration,

aber auch Differenzierung und Zellüberleben zusammenfassen (Cuenda und Rousseau 2007). Diese werden vor allem über einen Eingriff in der Transkription verschiedener Gene erreicht, die je nach zeitlicher Dauer des Signals und Art des Stimulus variieren können (Ferreiro et al. 2010). Insgesamt sind zahlreiche Moleküle potenzielle Substrate der p38 MAPK, was die vielfältigen Effekte dieses Signalwegs erklärt (Trempelec et al. 2013). Die Bedeutung der p38 MAPK an Prozessen wie Entzündung und Atherosklerose ist Gegenstand aktueller Forschung (Cheng et al. 2017), aber auch diverse andere Erkrankungen, wie etwa Neurodegeneration oder Diabetes, liegen im wissenschaftlichen Fokus (Coulthard et al. 2009).

2.2.2.1 Bedeutung von p38 MAPK in Tumoren

Durch ihre Beteiligung an elementaren Aspekten des funktionellen Zellverhaltens (siehe 2.2.2), stellt die p38 MAPK einen interessanten Gegenstand in der onkologischen Forschung dar. In der Vergangenheit wurden zahlreiche maligne Entitäten unterschiedlichsten Gewebsursprungs auf die Aktivität dieses Signalwegs hin untersucht. Die oben geschilderte komplexe Architektur des Netzwerks und die Fülle an beteiligten Molekülen stellt dabei eine besondere Herausforderung dar.

2.2.2.1.1 Bedeutung der p38 MAPK im Mammakarzinom - klinisch

Untersuchungen an Gewebe von Brustkrebspatientinnen liefern Hinweise auf die Aktivität des p38 MAPK-Signalwegs und dessen Korrelation mit klinischen Daten *in vivo*. Immunhistochemisch konnte gezeigt werden, dass die aktivierte p38 MAPK in Tumorzellen signifikant höher exprimiert wurde als im umgebenden Normalgewebe (Wang et al. 2016), was darauf hinweist, dass dem p38 MAPK-Signalweg in Brustkrebszellen eine tragende Rolle zukommt. Allerdings spielt die Heterogenität des Mammakarzinoms auch hier eine Rolle. So belegen Studien an Gewebeproben von Brustkrebspatientinnen, dass p38 MAPK in Östrogenrezeptor-positiven Karzinomen überexprimiert wird und auch hier die höchsten Level an phosphorylierter, also aktivierter Kinase vorliegen, wohingegen die niedrigsten Spiegel in Triple-negativen Karzinomen gefunden wurden (Merlin et al. 2013). Weitere Studien fanden eine Korrelation zwischen HER2/neu-positiven Karzinomen mit Trastuzumab-Resistenz und hohen Spiegeln von phosphorylierter p38 MAPK (Donnelly et al. 2014).

Tumoren mit Lymphknotenmetastasen, in denen man hohe Level an phosphorylierter p38 MAPK findet, tendieren zu einem kürzeren ereignisfreien Überleben, vor allem bei HER2/neu-negativen Karzinomen (Esteva et al. 2004). Tatsächlich findet sich ein Zusammenhang zwischen hoher Aktivität dieses Signalwegs und Resistenz gegenüber Therapeutika, wie beispielsweise Tamoxifen (Gutierrez et al. 2005) und hohe Level an

p38 MAPK scheinen als Marker für intrinsische Resistenz gegenüber adjuvanter Hormontherapie nutzbar zu sein (Linderholm et al. 2011). Insgesamt bleibt jedoch die klinische Bedeutung der unterschiedlichen Isoformen der p38 MAPK noch unklar.

2.2.2.1.2 Bedeutung der p38 MAPK im Mammakarzinom - *in vitro* und im Mausmodell

Zur genaueren Charakterisierung des Signalwegs in Mammakarzinomzellen liefern Studien an Zelllinien *in vitro* oder am Mausmodell wichtige Hinweise. Auf diese Weise konnte die oben erwähnte klinisch gefundene Korrelation der p38 MAPK-Aktivität mit Resistenzen gegenüber verschiedenen Therapeutika näher charakterisiert werden. So zeigen Brustkrebszelllinien, bei denen eine Tamoxifenresistenz induziert wurde, ebenfalls höhere Spiegel von p38 MAPK und phosphorylierter p38 MAPK (Aesoy et al. 2008). Auch die Resistenz von triple-negativen Mammakarzinomzellen gegenüber Paclitaxel wird über die Überexpression des Rezeptors IRAK1 vermittelt, der *upstream* der p38 MAPK-Kaskade geschaltet ist und so letztendlich ein antiapoptotisch wirkendes Signal generiert. Die selektive Inhibition der p38 α und β MAPK führt im Mausmodell zur Wiederherstellung der Paclitaxel-Sensitivität beim TNBC (Wee et al. 2015). Ebenso konnte gezeigt werden, dass HER2/neu-positive Zelllinien mit intrinsischer oder erworbener Resistenz gegenüber Trastuzumab erhöhte Level der phosphorylierten p38 MAPK aufweisen und dass deren Blockade die Sensitivität erhöht (Donnelly et al. 2014).

Bereits im frühen Stadium der Krebsentstehung scheint der p38 MAPK eine besondere Bedeutung zuzukommen. Im Mausmodell führt der gewebsspezifische *knockout* der p38 α MAPK zu einer verminderten Anzahl von Progenitorzellen und östrogenrezeptorpositiven Zellen im Brustdrüsengewebe. Durch den so verminderten Pool an tumorinitiierenden Zellen findet sich eine reduzierte Karzinogenese (del Barco Barrantes et al. 2018). Wu et al. konnten zeigen, dass Hypoxie durch die Aktivierung des p38 MAPK-Signalwegs zu einer Transformation von Brustdrüsenzellen hin zu sogenannten *breast cancer-initiating cells* (BTIC) führt und somit einen der ersten Schritte in der Karzinogenese darstellen kann (Wu et al. 2015).

Des Weiteren konnte die Bedeutung der p38 MAPK an anderen, für Karzinomzellen vorteilhafte Prozesse untersucht werden. *In vitro*-Studien mit Karzinomzelllinien unterschiedlichen Ursprunggewebes konnten zeigen, dass die physiologische Rolle der p38 α MAPK als negativer Regulator verschiedener Zellzyklus-Kontrollpunkte in Krebszellen umgekehrt wird und durch Aktivität der p38 α MAPK eine gesteigerte Proliferation beobachtet werden kann (Wagner und Nebreda 2009). Auch der δ -Isoform wurden proliferationssteigernde Effekte bei Brustkrebszellen zugeschrieben (Wada et al. 2017). Die p38 MAPK ist ebenfalls Teil der intrazellulären Kaskade entzündungsfördernder Zytokine wie

TNF α , welches eine gesteigerte peritoneale Dissemination von Ovarialkarzinomzellen triggert (Kulbe et al. 2007; Sato et al. 2005). Darüber hinaus wurde bereits früh beobachtet, dass die Expression von Enzymen wie Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA), die Karzinomzellen durch Degradation der Extrazellulärmatrix zur gesteigerten Invasivität befähigen, durch p38 α MAPK erreicht wird (Huang et al. 2000). Auch bei Brustkrebszelllinien konnte dies beobachtet werden (Wang et al. 2010; Wang et al. 2013). Ebenso wird die Herabregulation von Zelladhäsionsmolekülen wie E-Cadherin, die eine Voraussetzung für die Möglichkeit der Invasivität von Brustkrebszellen darstellt, durch den p38 MAPK-Signalweg ermöglicht (Wang et al. 2015). Aber nicht nur die Karzinomzellen selbst, sondern auch die umgebenden Stromazellen haben einen Einfluss auf die Aggressivität des Malignoms. So sezernieren Fettzellen, reguliert durch den p38 MAPK-Signalweg, IL-6 und tragen dadurch zu einer gesteigerten Migration von Brustkrebszellen bei (Walter et al. 2009; Koul et al. 2013).

Der p38 MAPK-Signalweg kann neben der Propagation des Primärtumors auch bei dessen Metastasierung fördernd wirken. Es konnte gezeigt werden, dass Brustkrebszellen durch das *signalling* der p38 α MAPK die Fähigkeit erlangen, in die Lunge zu filialisieren (Wu et al. 2014). Insgesamt gibt es Evidenz, dass der p38 MAPK-Signalweg an Prozessen wie Wachstum, Migration und Invasivität von Brustkrebszellen beteiligt ist (Park et al. 2019).

2.2.2.2 p38 MAPK als mögliches Ziel in der Therapie des Mammakarzinoms

Durch die wichtige Rolle, die die p38 MAPK in der Regulation der verschiedenen Aspekte des funktionellen Zellverhaltens besonders in Tumorzellen spielt, scheint eine Blockade dieses Signalwegs als Therapieoption in der Onkologie potenziell sinnvoll. Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibition der α - und β -Unterformen der p38 MAPK durch den Inhibitor LY2228820 zu einer Reduktion des Größenwachstums von *xenografts* humaner Brustkrebszelllinien führt (Campbell et al. 2014). Ebenso konnte durch eine Inhibition des Signalwegs im Mausmodell eine Reduktion ossärer Mammakarzinometastasen erreicht werden (Suarez-Cuervo et al. 2004).

Neben der direkten Wirkung auf den Primarius und seine Metastasen finden sich Hinweise auf einen synergistischen Effekt einer p38 MAPK-Blockade in der Behandlung mit konventionellen Therapieschemata wie etwa einer Cisplatin-basierten Chemotherapie (Pereira et al. 2013). Doch auch Angriffspunkte anderer etablierter Therapeutika werden durch die p38 MAPK reguliert und deren Wirkung so durch die Blockade dieses Signalwegs potenziell potenziert. Beispielsweise regulieren die p38 α und β MAPK die genomische Stabilität von Tumorzellen positiv. Chemotherapeutika wie Taxane, die über eine Induktion

chromosomaler Instabilität und daraus resultierenden Zelltod wirken, könnten von einer Blockade der p38 MAPK profitieren (Cánovas et al. 2018). Auch die bereits angesprochene Resistenz gegenüber Trastuzumab, die durch p38 MAPK-Aktivität unterhalten wird, kann durch eine Blockade des p38 MAPK-Signalwegs *in vitro* unterbunden und Zellen so wieder der Wirkung der HER2/neu-Blockade zugänglich gemacht werden (Donnelly et al. 2014). Darüber hinaus konnten durch die p38 MAPK-Blockade wieder funktionelle Levels des ER α -Rezeptors in hormonrezeptornegativen Tumorzellen erreicht und somit die Antihormontherapie auch in diesen Zellen anwendbar gemacht werden (Bhatt et al. 2012).

Neben dem Einsatz von p38 MAPK-Inhibitoren in kurativer Absicht, könnte auch eine neue Möglichkeit in der supportiven Therapie des metastasierten Mammakarzinoms entstehen. Bei ossären Metastasen konnte durch die p38 MAPK-Blockade sowohl die Progression der Erkrankung als auch die durch die Metastasen bedingten Knochenschmerzen reduziert werden (Sukhtankar et al. 2011).

Auch wenn zum aktuellen Stand diverse p38 MAPK-Inhibitoren als potenzielle neue Therapeutika für verschiedene Entitäten, wie beispielsweise das Ovarialkarzinom, in klinischen Studien getestet werden, gibt es nach wie vor noch keinen zugelassenen Wirkstoff (Vergote et al. 2020). Ein Grund dafür könnten die vielfältigen Nebenwirkungen wie beispielsweise erhöhte Leberwerte sein, die durch eine ungenügende Selektivität oder ungünstiges pharmakokinetisches Profil der verwendeten Inhibitoren erklärbar sind (Gangwal et al. 2013).

2.2.2.3 p38 MAPK-Inhibitoren

Um die Rolle der p38 MAPK auf das funktionelle Verhalten von Karzinomzellen zu untersuchen, werden Inhibitoren des Signalwegs benötigt. Durch Wegfall der Wirkung der p38 MAPK kann so auf deren Einfluss auf die Zellbiologie geschlossen werden. Dabei sind verschiedene Angriffspunkte denkbar. Zum einen kann die Funktion des Proteins selbst gehemmt werden. Dieser Ansatz wurde bereits früh verfolgt (Kumar et al. 1999). Darüber hinaus ist ebenfalls eine Hemmung auf Ebene der mRNA oder der Genexpression denkbar. Eine andere Methode, die Wirkung des Signalwegs zu unterbinden, besteht in der Inhibition der Kaskadenelemente, die *upstream* oder *downstream* der p38 MAPK gelegen sind (Zhang et al. 2005).

2.2.2.3.1 SB203580

SB203580 (Abbildung 3) aus der Klasse der Pyridinylimidazol-Inhibitoren wurde erstmals bereits im Jahr 1994 verwendet. Der dabei beobachtete Effekt bestand in der Unterbindung der LPS-induzierten Zytokinproduktion in Monocyten (Lee et al. 1994). Die Identifizierung des dabei gehemmten Enzyms, das heute als p38 α MAPK bezeichnet wird, gelang Cuenda et al. (Cuenda et al. 1995). Als Enzym mit Kinaseaktivität verfügt die p38 α MAPK über eine ATP-Bindungsstelle (Wang et al. 1997). Darüber hinaus existieren weitere regulatorische Einheiten, wie etwa der *activation loop* mit dem DFG-Motiv (Asparagin - Phenylalanin - Glycin), welches die Kinase durch Konformationsänderung zwischen einer aktiven und inaktiven Form schaltet (Peng et al. 2013). Als sogenannter Typ I-Inhibitor bindet SB203580 kompetitiv zu ATP an dessen Bindungsstelle, ohne dass die Konformation des DFG-Motivs einen Einfluss nimmt (Astolfi et al. 2015). Der IC₅₀-Wert liegt bei 0,5 μ M (Lali et al. 2000).

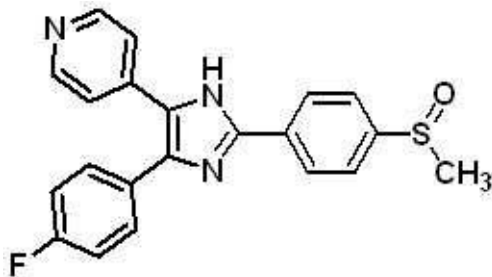


Abbildung 3 Strukturformel von SB203580 (Cuenda et al. 1995)

2.2.2.3.2 Skepinone-L

Im Jahr 2011 wurde von Koeberle et al. ein neuer Inhibitor der p38 MAPK vorgestellt: Skepinone-L (Abbildung 4), ein Dibenzosuberone, ist ein ebenfalls ATP-kompetitiver Hemmstoff, der allerdings keine zytotoxischen Effekte aufweist und auch *in vivo* wirkt. Darüber hinaus ist Skepinone-L sehr potent; der IC₅₀-Wert liegt bei 5 nM. Ein wichtiges Merkmal und die entscheidende neue Eigenschaft dieses Inhibitors ist die Selektivität für die p38 α und β MAPK (Koeberle et al. 2011).

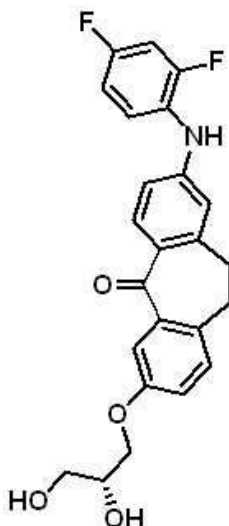


Abbildung 4 Strukturformel von Skepinone-L (Koeberle et al. 2011)

2.3 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte der beiden p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L auf das funktionelle Verhalten von Mammakarzinomzellen untersucht. Dabei wurden insgesamt fünf Zelllinien, die sich in ihrem Rezeptorprofil unterscheiden, verwendet. Betrachtet wurden die Expression der p38 MAPK in phosphorylierter und unphosphorylierter Form sowie Auswirkungen der Blockade des Signalwegs durch die oben genannten Substanzen auf die chemotaktische Migration, die Zelladhäsion, -proliferation und -viabilität der Karzinomzellen. Durch die Gegenüberstellung der Effekte des etablierten Inhibitors SB203580 und des neuartigen Inhibitors Skepinone-L soll ein besseres Verständnis der Bedeutung des p38 MAPK-Signalwegs in Brustkrebszellen erreicht werden und die Frage, ob eine Blockade dieses *pathways* potenziell therapeutisch sinnvoll wäre, weiter erörtert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Substanzen

Aceton, p.a.	AppliChem, Darmstadt
Acrylamide Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
APS p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	Braun, Melsungen
BenchMark Pre-Stained Protein Ladder	Invitrogen, Carlsbad, USA
BSA	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Collagen human type I	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Collagen type IV	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
DMEM/F12	Thermo Scientific, Waltham, USA
DPBS	Gibco, Carlsbad, USA
DTT	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA-Na ₄	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
EGF	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Ethanol absolute, p.a.	AppliChem, Darmstadt
FCS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Fibronektin Bovine Protein Plasma	Thermo Scientific, Waltham, USA
Hemacolor Lösungen 2 und 3	Merck, Darmstadt
HEPES, 1M	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Insulin	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Kristallviolett	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Laminin	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
MagicMark XP Western Protein Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Nagellack Express Nailcare	Maybelline Jade, New York, USA
NaCl, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
NaOH	Merck, Darmstadt

nonfat dried milk powder	AppliChem, Darmstadt
Paraformaldehyd	Fluka Chemika, Saint Louis, USA
Penicillin/Streptomycin (Anti-Anti, 100x)	Gibco, Carlsbad, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Puffer nach Weise Tabletten	Merck, Darmstadt
Resolving Gel Buffer for PAGE (Trenngelpuffer)	BIO-RAD, Hercules, USA
Roti®-Block 10x Konzentrat	Carl Roth, Karlsruhe
Roti®-Blot A 10x	Carl Roth, Karlsruhe
Roti®-Blot K 10x	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI Medium 1640	Gibco, Carlsbad, USA
SB203580	CST, Danvers, USA
Schwefelsäure p.a.	Merck, Darmstadt
SDS (10%ig)	Carl Roth, Karlsruhe
Skepinone	Merck, Darmstadt
Stacking Gel Buffer for PAGE (Sammelgelpuffer)	BIO-RAD, Hercules, USA
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Terg-a-Zyme	Sigma, Saint Louis, USA
Tris Pufferan	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-HCl Pufferan p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-HCl Buffer 0,5 M pH 6,8	BioRad, Hercules, USA
Tris-HCl Buffer 1,5 M pH 8,8	BioRad, Hercules, USA
Triton X-100	AppliChem, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Tween20, molecular biology grade	AppliChem, Darmstadt
Vitronektin, cell culture tested	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Cellstar Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner Frickenhausen	Bio-one,
Cellstar Zellkulturplatten (6-Well, 96-Well)	Greiner Frickenhausen	Bio-one,
Chromatography Paper	Whatman, Maidstone, UK	
Cryo Tube Vials	Thermo Waltham, USA	Scientific,
Deckgläser Marienfeld 24x50 mm	Marienfeld, Königshofen	Lauda
Einwegpipetten Cellstar, serologisch (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Greiner Frickenhausen	Bio-one,
Einweghandschuhe, Supreno	Microflex, Chemnitz	
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5, 1 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg	
Immobilon-P Transfer Membran, PVDF 0,45 µm	Millipore, Temecula, USA	
LUNA™ Cell Counting Slides	logos Südkorea	Biosystems,
Pasteurpipetten, Kunststoff	Carl Roth, Karlsruhe	
Pipettenspitzen FilterTips, TipOne® (0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 101-1000 µl)	StarLab, Hamburg	
Pierce Maleic Anhydride Activated Plates, Clear, 96-Well	Thermo Waltham, USA	Scientific,
Polycarbonatmembranen 25x80 mm, Porengröße 8 µm	Neuro Gaithersburg, USA	Probe,
Objektträger	Thermo Waltham, USA	Scientific,
Zellheber, Grifflänge 18 cm, Klinge 9 cm	Corning BV, Wiesbaden	

3.1.4 Gebrauchsmaterialien

BIO-RAD Mini-Protean Tetra System Gelkammer	BIO-RAD, Hercules, USA	
Blotting Roller	Invitrogen, USA	
Boyden-Migrationskammer, 48-Well-Mikro-Chemotaxis-Kammer	Neuro Gaithersburg, USA	Probe,
Mehrkanalpipetten Eppendorf Research Plus (10-100 µl, 30-300 µl)	Eppendorf, Hamburg	

Pipetten Eppendorf Research (0,5-10 µl, 1-100 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe, Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Pinzetten	Labotec, Wiesbaden
Scheren	Labotec, Wiesbaden
Teigschaber	Rösle, Marktoberdorf

3.1.5 Kit-Systeme

<i>BCA Protein Assay Kit</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Kit</i>	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
<i>RealTime Glo Cell Viability Assay</i>	Promega, Mannheim
<i>Western Lightning Plus ECL Kit</i>	PerkinElmer Inc., Waltham, USA

3.1.6 Geräte

Absaughilfe <i>Vacuboy</i>	IBS Integra Biosciences, Fernwald
<i>AquaLine AL 18</i> Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen
Axioskop 40 Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
BIO-RAD Trans-Blot Turbo	BIO-RAD, Hercules, USA
CO ₂ -Inkubator Hera Cell 240	Heraeus, Hanau
Cellspin®/THARMACspin Zytocentrifuge	THARMAC Cellspin®, Waldsolms
Computer	Dell, Round Rock, USA
Eismaschine	Ziegra, Hannover
ELISA Reader GLOMAX multi	Promega detections system, Mannheim
Fluorochem E	Protein Simple, Santa Clara, USA
Gefrierschrank -20°C	Bosch, Gerlingen
Gefrierschrank -80°C	Nalge Nunc Int, Penfield, USA
Geldetektionsgerät Fluorochem E	ProteinSimple, USA
Heraeus™ Fresco™ 17 Mikrozentrifuge	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kryo Stickstofftank Locator 6 Plus	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank 4°C	Bosch, Gerlingen
Kühlzentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific, Waltham, USA
Labor-Feinwaage	Sartorius, Göttingen
LUNA™ Automated Cell Counter	logos Biosystems, Südkorea
Mini-Gelkammer mit Gelträger und Gelkämmen	PeqLab, Erlangen
Heiz-/Magnetrührer	IKA Labortechnik, Stauffen

Mini-Protean Tetra Cell-System	BIO-RAD, Hercules, USA
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
P25 Standard Power Pack	Biometra, Göttingen
Schüttel- & Mischgeräte	Duomax 1030 Heidolph, Schwabach
Sicherheitswerkbank Heraeus HeraSafe	Thermo Scientific, Waltham, USA
Thermostat 5320 Block Heater	Eppendorf, Hamburg
Vortex VF2	IKA-Werke, Staufen
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

3.1.7 Antikörper

3.1.7.1 Primäre Antikörper

β -Actin Antibody, monoclonal, mouse	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
p38 MAPK Antibody, polyclonal, rabbit	CST, Danvers, USA
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), monoclonal, rabbit	CST, Danvers, USA

Tabelle 3: Primäre Antikörperlösungen, nfd: non-fat dried milk

Antikörper	Verdünnung	Puffer	nfd
β -Actin	1:5000	1xRoti®-Block	-
p38 MAPK	1:1000	TBS-T	5%
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	1:1000	TBS-T	5%

3.1.7.2 Sekundäre Antikörper

Goat Anti-Rabbit, polyclonal, Immunoglobulins/HRP	DAKO, Hamburg
Rabbit Anti-Mouse, polyclonal, Immunoglobulins/HRP	DAKO, Hamburg

Die für den Western-Blot benötigten sekundären Antikörper von DAKO wurden jeweils 1:1000 in 2% nfd Milchpulver TBS-T angesetzt.

3.1.8 Puffer und Lösungen

Anoden-/Kathodenpuffer	84 ml dH ₂ O 32 ml EtOH 16 ml 10x RotiBlot A bzw. Roti®-K
Kristallviolett-Lösung	5 mg/ml Kristallviolett 2% Ethanol
Ladepuffer (6x)	350 mM Tris-HCl 34,4% Glycerol 10% SDS 10% β-Mercaptoethanol 0,06% Bromphenolblau eingestellt auf einen pH-Wert von 6,8
Lysepuffer zur Proteinextraktion	500 µl Puffer C (10x) 50 µl DTT (0,5 mM) 50 µl Protease-Inhibitor 50 µl Phosphatase-Inhibitor 4250 µl dH ₂ O
Puffer C (10x)	20 mM HEPES 0,2 M NaCl 0,5 mM MgCl ₂ 0,4 mM EDTA 1% Triton X-100
Puffer nach Weise	1 Puffertablette 1 l dH ₂ O
10x TBS	26 g Tris-HCl 4,24 g Tris 292,7 g NaCl 1 l dH ₂ O

TBS-T	1x TBS 0,1% Tween 20
1x SDS-Laufpuffer	100 ml 10x SDS-Laufpuffer 900 ml dH ₂ O

3.1.9 Computerprogramme

AlphaView SA ProteinSimple, USA
Microsoft Excel Microsoft Corporation

3.1.10 Kontinuierliche Zelllinien

AU565 (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville Maryland)

Diese Zelllinie wurde aus dem malignen Pleuraerguss einer kaukasischen, 43-jährigen Patientin isoliert und stellt somit eine metastatische Absiedelung eines Adenokarzinoms der Mamma dar. Die Zellen exprimieren HER2/neu, aber nicht ER oder PR (Neve et al. 2006).

MCF10A (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville Maryland)

Diese Zellen entstammen aus einer Reduktionsplastik einer 36-jährigen, kaukasischen Frau und sind nicht kanzerös. Sie weisen keine Rezeptorüberexpression auf (Neve et al. 2006).

MCF7 (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville Maryland)

Diese Zellen wurden aus dem malignen Pleuraerguss einer kaukasischen, 69-jährigen Patientin mit einem Adenokarzinom der Mamma gewonnen. Sie exprimieren ER und PR, aber nicht HER2/neu (Neve et al. 2006).

MDA-MB231 (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville Maryland)

Diese Zelllinie entstammt dem malignen Pleuraerguss einer 51-jährigen, kaukasischen Patientin mit einem Adenokarzinom der Mamma. Sie weisen keine Rezeptorüberexpression auf (Neve et al. 2006).

ZR751 (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville Maryland)

Diese Zelllinie wurde aus dem malignen Aszites einer 63-jährigen, kaukasischen Frau mit einem duktalem Adenokarzinom der Mamma isoliert. Die Zellen exprimieren ER, aber nicht PR oder HER2/neu (Neve et al. 2006).

3.2 Methoden

3.2.1 Steriles Arbeiten

Zum Kultivieren der Zellen und zur Versuchsdurchführung wurde an einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Alle verwendeten Materialien wurden steril geliefert oder autoklaviert. Für die Durchführung wurden alle benötigten Medien und Substrate in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt und anschließend vor Überführung auf die Sterilbank mit dem Reinigungsalkohol Terralin liquid desinfiziert, um eine Kontamination zu vermeiden.

3.2.2 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und unter CO₂-Atmosphäre (5%). Für die Zelllinien MCF7, ZR751, MDA-MB231 und AU565 wurde das Nährmedium RPMI 1640 mit Zusatz von 10 % fetalen Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin und Streptomycin (P/S) benutzt. Die Zelllinie MCF10A wurden im Nährmedium DMEM/F12 mit dem Zusatz von 5% FCS, *epidermal growth factor* (EGF) (25 µl einer 20 ng/ml-Lösung auf 500 ml), Hydrocortison (1 ml einer 1,4 x 10⁻⁶ M-Lösung auf 500 ml), Cholera toxin (50 µl einer 100 ng/ml-Lösung auf 500 ml), Insulin (500 µl einer 10 µg/ml-Lösung auf 500 ml) und 1% P/S kultiviert. Sobald die Zellen ein konfluentes Wachstum zeigten, wurden sie gesplittet und unter höheren Passagenummern weiterkultiviert. Dazu wurde nach Absaugen des Mediums der adhärenzte Zellrasen mit 10 ml *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline* (DPBS) gewaschen und durch 1 ml Trypsin-EDTA abgelöst. Um diese Reaktion zu stoppen, wurde nach der Inkubationszeit, die von der jeweiligen Zelllinie abhängt und zwischen 30 und 180 Sekunden liegt, 9 ml FCS-haltiges Medium hinzugefügt. Nach Resuspension konnte ein Teil der Zellen zur weiteren Kultivierung in neue Zellkulturflaschen mit Nährmedium überführt werden. Für die weitere Verwendung in den jeweiligen Versuchen wurde entsprechend mit FCS-freiem Medium gearbeitet.

3.2.3 Zellkonzentrationsbestimmung

Um die Zellkulturen für die Versuche auf die gewünschte Zellkonzentration einzustellen, wurden die Zellen in Suspension mit Hilfe des Systems LUNA™ Automated Cell Counter (logos Biosystems, Südkorea) gezählt. Dazu wurden 15 µl der Zellsuspension, die man nach oben beschriebener Methode erhalten hatte, auf einen speziellen, zu dem System gehörenden Objektträger pipettiert und in die Zählkammer eingebracht. Die Zellkonzentration

der Suspension wurde in der Einheit [Zellzahl/ml] angezeigt. Das entsprechende Volumen, das die benötigte Anzahl von Zellen enthielt, konnte so aus der Suspension entnommen und weiterverarbeitet werden.

3.2.4 Kryo-Konservierung und Rekultivierung

Für die Kryo-Konservierung, die durchgeführt wurde, um das Fortschreiten höherer Passagen zwischen den einzelnen Versuchen zu minimieren, wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt, der Zellrasen anschließend gewaschen mit 10 ml DPBS und mit 1 ml Trypsin-EDTA nach zellkulturspezifischer Inkubationszeit abgelöst. Diese Reaktion wurde durch das Zugabe von 9 ml Nährmedium abgestoppt und die Suspension in einem 15 ml Falcon für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Medium mit 10% DMSO resuspendiert, sodass die Zellkonzentration circa 1×10^6 Zellen/ml betrug. Je 1 ml dieser Suspension wurde in ein Kryogefäß überführt und in einem Isopropylbehälter bei -80°C für 24 Stunden eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert werden konnten.

Um die Zellen weiter kultivieren zu können, wurden die Kryogefäße im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und mit 1 ml Kulturmedium verdünnt. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 300 g. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 3 ml Nährmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt, die das benötigte Volumen an Medium enthielt.

3.2.5 Proteinanalyse

Um die Expression der p38 MAPK und ihrer aktivierten, phosphorylierten Form in den verschiedenen Zelllinien ohne und mit Hinzugabe der Inhibitoren darzustellen, wurden Proteinanalysen durchgeführt. Dazu wurden die Proteine aus den Zellen extrahiert, ihre Konzentration bestimmt, gefällt und mittels SDS-Page und Western-Blot nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt und anschließend detektiert.

3.2.5.1 Proteinextraktion aus Zellkulturen

Zur Gewinnung der Proteine aus den Zellen wurden die Zelllinien in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml in Zellkulturschalen ausgesät, wobei für eine Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren je eine separate Schale vorgesehen war. Nach 24 Stunden im Inkubator wurden die Zellen für einen weiteren Tag auf serumfreies Medium umgesetzt, bevor sie am Versuchstag mit den Inhibitoren in den entsprechenden Konzentrationen für zwei Stunden

behandelt wurden. Anschließend erfolgte die Proteinextraktion. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Das Medium wurde verworfen und die Zellen mit 10 ml pro Schale eiskaltem DPBS gewaschen und mittels 500 µl Lysepuffer, der einen Proteaseinhibitor enthielt, aufgeschlossen. Zusätzlich erfolgte eine mechanische Ablösung mittels Zellschaber. Die Lysate wurde in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 30 Minuten auf Eis gelagert. Zwischenzeitlich wurde durch Vortexen eine Durchmischung gewährleistet. Danach wurde die Suspension für zehn Minuten bei 20000 g und 4°C in der Mikro-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand, der die Proteine enthielt, konnte einer Konzentrationsbestimmung zugeführt werden.

3.2.5.2 Protein-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinmenge der Proteinextrakte aus den Zelllysaten wurde das *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* der Firma Thermo Scientific verwendet. Das Prinzip beruht auf einer Reduktion von zweiwertigen Kupferionen im alkalischen Medium durch Proteine zu einwertigen Kupferionen (Biuret-Reaktion), die wiederum mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex bilden, dessen Absorption bei 562 nm photometrisch detektiert werden kann. Auf diese Weise korreliert die Proteinmenge mit der Absorption. Zur Versuchsdurchführung wurden die Proteinextrakte in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß mit dH₂O im Verhältnis 1:5 verdünnt, in diesem Fall 15 µl Proteinextrakt und 60 µl dH₂O. Daraufhin wurden in jedes Probengefäß 600 µl der Reaktionslösung, die aus den Lösungen A und B im Verhältnis 50:1 zusammengesetzt ist, hinzugefügt. Jeweils 200 µl dieser Proben wurden in dreifachen Ansätzen auf eine 96-Well-Platte überführt. Zudem wurde eine Standardverdünnungsreihe mit bekannten Proteinmengen und ein Blank, die der Erstellung einer Eichkurve dienen, erstellt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ wurde die Absorption bei 562 nm mit dem ELISA Reader bestimmt. Anhand der Eichkurve konnte die Proteinkonzentration mit Microsoft Excel bestimmt werden.

3.2.5.3 Proteinfällung und Lösen von Proteinen

Um für die Analysen im Western-Blot mit einheitlichen Proteinmengen arbeiten zu können, wurden von jeder Probe das Volumen, das 100 µg Protein enthielt, abgenommen und zusammen mit der neunfachen Menge an eiskaltem Aceton in eine 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer gleichmäßigen Durchmischung mittels Vortex wurden die Probengefäße über Nacht bei -20°C gelagert und somit gefällt. Am nächsten Tag erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 20000 g und 4°C in der Kühlzentrifuge. Das überständige Aceton wurde verworfen und das Proteinpellet in 25 µl 2x Ladepuffer resuspendiert. Die Lagerung der Proteine erfolgte bis zu Verwendung bei -20°C.

3.2.5.4 SDS-PAGE

Zur Auftrennung wurden die Proteine nach dem Prinzip der Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem Polyacrylamid-Gel im elektrischen Feld anhand ihrer Größe separiert. Dabei wurde die Eigenladung der Proteine durch das anionische Detergens SDS überdeckt, sodass alle Proteine eine einheitliche negative Ladung aufwiesen und die Auftrennung allein nach dem Molekulargewicht erfolgte. Die dafür notwendige Gelmatrix wurde nach einem Pipettierschema (Tabelle 4) hergestellt.

Tabelle 4: Pipettierschema SDS-PAGE für 2 Gele

Reagenzien	Trenngel 10%	Sammelgel 4%
30% Acrylamid	3,4 ml	830 µl
dH ₂ O	3,8 ml	3,4 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2,6 ml	-
0,5 M Tris-HCl (pH 6.8)	-	630 µl
10% SDS	100 µl	50 µl
TEMED	4 µl	5 µl
10% APS	100 µl	50 µl

Es wurde zunächst der Trenngel-Ansatz zwischen zwei dafür vorgesehene eingespannte Glasplatten gegossen und mit Ethanol bedeckt. Nach 30 Minuten Polymerisation konnte das Ethanol abgegossen werden und der Ansatz für das Sammelgel hinzugefügt werden. Durch Einlage eines Kamms wurden Aussparungen für die Probenaschen geformt. Durch das Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese, das heißt der Verwendung von zwei unterschiedlichen Gelarten, konnte eine einheitliche Proteinauftrennung erfolgen, da die Proteine nach Durchwanderung des Sammelgels einen gemeinsamen Startpunkt erreichten, bevor sie in das Trenngel wanderten. Die ausgehärteten Gele wurden in die Laufkammer von BioRad eingespannt und die Kammer mit 1x SDS-Rotiphorese-Puffer befüllt. Zwischenzeitlich wurden die im Laufpuffer gelösten Proteine für zehn Minuten in einem Heizblock bei 95°C erhitzt, anschließend auf Eis gestellt und kurz auf dem Vortex durchmischt. Der Kamm wurde vorsichtig aus dem Gel entfernt und die erste Tasche mit 5 µl *BenchMark* und 3 µl *MagicMark XP* befüllt, die als Molekulargewichtsmarker eine spätere Zuordnung der Proteinbanden erlaubten. Die anderen Taschen wurden mit je 10 µl der Proben beschickt. Durch Anlage der Spannung wurden die Proteine im elektrischen Feld aufgetrennt. Zunächst wurden 75 V angelegt, und nach Durchlaufen der Sammelgelphase wurde die Spannung auf 110 V erhöht. Die Spannungsquelle wurde abgestellt, sobald die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Direkt im Anschluss wurden die Gele aus der Kammer entnommen und geblottet.

3.2.5.5 Western-Blot

Zur Analyse nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine wiederum durch Stromfluss in Richtung Anode von dem Polyacrylamid-Gel auf die PVDF-Transfermembran überführt, um anschließend mittels Antikörperfärbung detektiert werden zu können. Dafür wurde eine PVDF-Membran und zwölf Filterpapiere auf eine zu dem Gel passende Größe zugeschnitten. Die Membran wurde zur Aktivierung für eine Minute in Ethanol gelegt, danach für zwei Minuten in dH₂O abgewaschen und anschließend für fünf Minuten in Anodenpuffer äquilibriert. Der Aufbau erfolgte entsprechend dem Semidry-Verfahren in der Apparatur Trans Blot Turbo. Auf die mit Anodenpuffer befeuchtete Anodenplatte wurden sechs in Anodenpuffer getränkte Filterpapiere gelegt, darauf die PVDF-Membran und das Gel und anschließend sechs in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere aufgelegt und Luftblasen mittels des blotting rollers entfernt. Abschließend wurde die Kathodenplatte mit Kathodenpuffer befeuchtet und aufgelegt. Die Apparatur wurde angeschlossen und die Proteine aus dem Gel auf die Membran für 30 Minuten bei 25 V und 0,1 A transferiert.

3.2.5.6 Proteindetektion

Als erster Schritt in der Proteindetektion wurden unspezifische Bindungsstellen auf der PVDF-Membran durch eine Behandlung mit 20 ml einer 1% oder 5% nfd Milchpulver-Lösung in 1x TBS-T (je nach Herstellerangabe des später verwendeten primären Antikörpers) für eine Stunde auf dem Inkubationsschüttler geblockt. Anschließend wurden die Membranen in 50 ml Falcons überführt und über Nacht bei 4°C auf einem Rollschüttler mit dem primären Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Reste des primären Antikörpers durch einen dreimalig wiederholten, zehnminütigen Waschschriff mit TBS-T auf dem Inkubationsschüttler entfernt. Es folgte die Inkubation des sekundären Antikörpers für eine Stunde, der in einer 1:1000 Verdünnung in demselben Blockingreagenz wie der primäre Antikörper angesetzt wurde. Abermals wurden die Antikörperreste durch einen dreimaligen Waschschriff mit TBS-T entfernt. Der sekundäre Antikörper war an eine Peroxidase gekoppelt, die nach Zugabe eines Substrats eine Reaktion katalysierte, die durch Chemilumineszenz detektierbar war. Als Substrat diente das *Western Lightning Plus ECL Detektionsreagenz*, bestehend aus gleichen Teilen *Oxidizing Reagent* und *Enhanced Luminol Reagent Plus*, von dem 4 ml für eine Minute auf die Membran gegeben wurden. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt, durch Ausrollen von überschüssigem ECL-Reagenz befreit und die Chemilumineszenz der Proteinbanden mit dem Gerät Fluorchrom Detektor aufgenommen. Die Quantifizierung der Bildinformation erfolgte mit dem Programm *Alpha View* von Protein simple und wurde anschließend mit Microsoft Excel ausgewertet. Die Bilddateien wurden dokumentiert. Falls die Membran ein weiteres Mal verwendet werden sollte, wurden die

Antikörper durch Strippen von der Membran entfernt. Dazu wurde die Membran zunächst fünf Minuten auf dem Inkubationsschüttler in dH₂O gewaschen, für 20 Minuten mit 0,2 M NaOH zur Ablösung behandelt und erneut für fünf Minuten in dH₂O gewaschen.

3.2.6 Migration in der Boyden-Kammer

Ziel des Migrationsversuchs war es, eine aktive Migration der mit unterschiedlichen Konzentrationen der verwendeten Inhibitoren behandelten Zellen hin zu einem Lockstoff nachzuweisen. Der Aufbau der Boyden-Kammer bestand aus einer Grund- und einer Deckplatte, in die jeweils 48 Wells eingelassen waren. Getrennt wurden diese beiden Platten durch eine poröse Polycarbonat-Membran, deren Porengröße von 8 µm es Zellen nicht ermöglicht, sie passiv zu überwinden, sondern eine aktive gerichtete Bewegung zur Durchquerung voraussetzt. Als chemotaktisch wirkender Lockstoff dienten, je nach Zelllinie, Kollagen I in den Konzentrationen 10 µg/ml (ZR751) und 20 µg/ml (MCF7, MCF10A) sowie Kollagen IV in der Konzentration 20 µg/ml (MDA-MB231) in serumfreiem Medium. Von diesen Chemotaxinen wurden jeweils 29 µl in die unteren Wells der Boyden-Kammer eingebracht. Als Negativkontrolle diente serumfreies Medium. Auf diese so befüllte Grundplatte wurde die Membran mit der glänzenden Seite nach unten gelegt, nachdem diese für circa 2 Minuten in DPBS äquilibriert wurde. Darauf wurden ein Dichtungsring und die Deckplatte angebracht. Zur Herstellung der Zellsuspension für die Wells der Deckplatte wurden die Zellen 24 Stunden vor dem Versuch auf FCS-freies Medium umgestellt. Am Versuchstag wurden die Zellen mit einem der beiden Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen für zwei Stunden behandelt, wie oben beschrieben mittels Trypsin-Reaktion abgelöst und die Zellkonzentration bestimmt. Um für den Versuch eine Zellkonzentration von 3×10^5 /ml zu erreichen, wurde das Volumen der Zellsuspension abgenommen, das 6×10^5 Zellen enthielt, und für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml FCS-freiem Medium, das den jeweiligen Inhibitor in der zu untersuchenden Konzentration enthielt, resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde dann die obere Kammer mit 50 µl pro Well beschickt und anschließend mittels 6 Schrauben verschlossen. Das Auftragschema sah 4-fache Ansätze für jede getestete Inhibitorkonzentration vor. Nach dieser Vorbereitung wurde die Migrationskammer für 16 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ belassen, um die Zellen migrieren zu lassen.

Um den Versuch auswerten zu können, mussten die migrierten Zellen fixiert und gefärbt werden. Dazu wurde nach Ablauf der 16 Stunden die Zellsuspension aus der Deckplatte abgekippt und die Migrationskammer vorsichtig auseinandergelöst. Die Membran wurde zwischen zwei Klammern eingespannt und die matte Seite, die vorher der Zellsuspension zugewandt war, wurde durch einen zweimaligen Waschschrift mit dem Puffer nach Weise und anschließend Abziehen über einen Küchenschaber von den nicht migrierten Zellen

gereinigt. Anschließend wurde die Membran mit der glänzenden Seite nach oben gerichtet an der Luft getrocknet. Durch ein einminütiges Bad in Methanol wurden die migrierten Zellen, die sich auf der glänzenden, der vormals den Lockstoffen zugewandten Seite befanden, fixiert. In einem weiteren Schritt wurden die Zellen nach erneuter Trocknung der Membran mittels des Farbe-Kit-Systems *Hemacolor* gefärbt. Dazu wurde die entsprechende Membranseite dreimal mit der rötlichen *Lösung 2* und sechsmal mit der bläulichen *Lösung 3* benetzt. Die Reinigung erfolgte durch Ziehen durch den Puffer nach Weise, bis sich keine Farbschlieren mehr auf der Membran zeigten. Die getrockneten und gefärbten Membranen konnten nun auf einen Objektträger mit Immersionsöl glattgestrichen und durch ein Deckglas bedeckt werden, welches an den Rändern durch Nagellack abgedichtet wurde.

Zur Auswertung wurden die Areale der migrierten Zellen mittels Lochschablone markiert und am Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung durch ein Rasterokular, welches ein Quadrat aufzeigt, das aus 10 x 10 Kleinquadraten mit einer Fläche von je 1 mm² besteht, betrachtet. In jedem Well wurden so 10 Kleinquadrate ausgezählt und der Mittelwert der gezählten, migrierten Zellen aus allen vier Ansätzen einer getesteten Konzentration gebildet und die Standardabweichung berechnet.

Um die Migrationskammer von Resten der Zellsuspension und der Chemotaxine zu reinigen, wurde eine 1% Terg-a-Zyme-Lösung hergestellt, indem die entsprechende Menge an Terg-a-Zyme unter Rühren auf einer Heizplatte bei 40°C in destilliertem Wasser gelöst wurde. Die auseinandergebaute und mit destilliertem Wasser abgespülte Kammer wurden dann über Nacht in der Terg-a-Zyme-Lösung eingelegt. Anschließend wurden die Kammerteile erneut mit destilliertem Wasser abgespült und an der Luft trocknen gelassen.

3.2.7 Adhäsion an Komponenten der Extrazellulärmatrix

Ziel des Adhäsions-Versuchs war es, die Fähigkeit der Tumorzellen, an verschiedenen Komponenten der Extrazellulär-Matrix zu binden, zu untersuchen. Die *Pierce Maleic Anhydride Activated 96-Well-Platte* wurde dafür in vierfachen Ansätzen mit einer Lösung (10 µg/ml DPBS) der Proteine Fibronectin, Kollagen I, Kollagen IV, Vitronectin und Laminin über Nacht bei Raumtemperatur und abgedeckt durch Alufolie auf einer Schüttelplatte beschichtet. Um die überschüssigen Proteine zu entfernen, wurde am nächsten Morgen die Lösungen verworfen und die Platte zweimal mit je 100 µl/Well Waschpuffer, der aus DPBS und 0,05% Tween 20 hergestellt wurde, ausgewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden anschließend mit 200 µl/Well Blockpuffer, bestehend aus DPBS und 0,5% BSA, für eine Stunde im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ gebunden. Im Anschluss wurde der Blockpuffer abgekippt.

Zur Vorbereitung der Zellen wurden diese für 24 Stunden auf FCS-freies Medium umgestellt und anschließend mit einem der beiden Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen für zwei Stunden behandelt. Anschließend wurde, während des Blockierungsschritts der Platte, wie oben beschrieben durch Trypsin-Reaktion, Zellkonzentrationsbestimmung und Zentrifugation eine Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von 4×10^5 Zellen/ml hergestellt, wobei zur Resuspension des Zellpellets FCS-freies Medium mit dem jeweiligen Inhibitor in der entsprechenden Konzentration verwendet wurde. Die Wells wurden mit je 50 μ l der Zellsuspension beschickt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Platten bei 37°C und 5% CO₂ für zwei Stunden, um die Zellen adhären zu lassen. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Zellsuspension abgekippt und nicht-adhären Zellen durch einen zweimaligen Waschschrift mit 100 μ l/Well Waschpuffer entfernt. Die am Boden der beschichteten Wells adhären Zellen wurden mit 4% Paraformaldehyd (100 μ l/Well) für 15 Minuten fixiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit 100 μ l/Well DPBS. Die so fixierten Zellen wurden mittels 100 μ l/Well Kristallviolett-Lösung (5 mg/ml in Ethanol, 2%) für zehn Minuten gefärbt. Überschüssiges Färbemittel wurde abgekippt und durch einen dreifachen Waschschrift mit je 100 μ l/Well Waschpuffer ausgewaschen. Im Anschluss wurden die Platten an der Luft getrocknet und das Kristallviolett durch 100 μ l/Well SDS-Lösung (2%) für 30 Minuten herausgelöst. Durch den ELISA Reader wurde bei 550 nm Wellenlänge die Absorption bestimmt. Die Referenzwellenlänge betrug 650 nm. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel.

3.2.8 Proliferationsassay

Um die Zellteilung der Tumorzellen beurteilen zu können, wurde ein Kit-System der Firma Roche verwendet, welches die Inkorporation von Bromdesoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen misst. Dazu bindet ein spezifischer Antikörper, an den eine Peroxidase gekoppelt ist, an das eingebaute BrdU. Die Peroxidase setzt ein Substrat um und der dadurch entstehende Farbumschlag kann photometrisch gemessen werden. Die Intensität des Signals ist proportional zu Menge des eingebauten BrdUs und damit zur Teilungsrates der Zellen und erlaubt so Rückschlüsse auf die Proliferation.

Für die Versuchsdurchführung wurden die Zellen durch Trypsin-Reaktion, Zellkonzentrationsbestimmung, Zentrifugation und Resuspension in FCS-haltigem Medium auf eine Konzentration von 5×10^4 Zellen/ml gebracht. Jedes Well einer 96-Well-Platte wurde mit 100 μ l dieser Zellsuspension beschickt, sodass circa 5×10^3 Zellen pro Well ausgesät wurden. Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel auf FCS-freies Medium für 24 Stunden. Anschließend erfolgte die Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren in den zu untersuchenden Konzentrationen für zwei Stunden in vierfachen Ansätzen. Nach der

Inkubationszeit der Inhibitoren erfolgte der Assay. Dazu wurde zu den Zellen 10 µl einer BrdU-Arbeitslösung zugegeben, welche aus der 1:100fach in DPBS verdünnten *BrdU-Labeling-Solution* bestand. Die Platten wurden für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In dieser Zeit wurde das BrdU in die DNA der proliferierenden Zellen eingebaut. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Lösung abgekippt und die Zellen mit 200 µl/Well Fix-Denat-Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur denaturiert und fixiert. Nachdem diese Lösung entfernt wurde, wurde der Antikörper mit der gekoppelten Peroxidase zu den Zellen (100 µl Antikörper-Lösung/Well) gegeben. Für diese Lösung wurde der Antikörper mit der *Dilution Solution* 1:100 verdünnt. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Antikörper-Lösung abgekippt und überschüssiger Antikörper durch einen dreimaligen Waschschrift mit 200 µl/Well Washing Solution (*Washing Buffer* 1:10 verdünnt mit destilliertem Wasser) entfernt. Danach wurde das Substrat für die Peroxidase-Reaktion zugegeben (100 µl Substrat-Lösung/Well), welches für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl/Well einer 1 M H₂SO₄ gestoppt, erkennbar an einem Farbumschlag von blau zu gelb. Zur besseren Durchmischung wurden die Platten für eine Minute auf einer Schüttelplatte bei 300 rpm positioniert. Die Absorption wurde im ELISA Reader bei 450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) gemessen und die gewonnenen Daten wurden mit Microsoft Excel ausgewertet.

3.2.9 Viabilitätsassay

Mit dem Assay *RealTime-Glo™* der Firma Promega konnte die Anzahl vitaler Zellen durch Messung des zellulären Reduktionspotentials im Zeitverlauf bestimmt werden. Das Testprinzip bestand darin, dass nur metabolisch aktive und damit vitale Zellen ein Substrat durch Reduktion in ein anderes, für ein Test-Enzym passendes Substrat umsetzen können. Diese letzte Reaktion war dann als Lumineszenz-Signal messbar. Zur Versuchsdurchführung wurden die Zellen wie oben beschrieben auf eine Zellkonzentration von 5 x 10⁴ Zellen/ml eingestellt und je 5000 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte ausplattiert. Nach 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen für einen weiteren Tag auf serumfreies Medium umgestellt. Am Versuchstag wurden die Zellen auf das Assay-Medium umgestellt, welches das umzusetzende Substrat und das Enzym für den Viabilitätsassay im serumfreien Medium enthielt. Nach einer einstündigen Inkubation erfolgte die Messung der Lumineszenz im GloMax Multi-Detektionssystem (Zeitpunkt t₀). Im Anschluss wurden die beiden Inhibitoren in den entsprechenden Konzentrationen in jeweils vierfachen Ansätzen mit einer Inkubationszeit von zwei Stunden hinzugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit (t₁) sowie nach jeweils einer weiteren Stunde (t₂ und t₃) wurde die Lumineszenz erneut ermittelt. Die Auswertung des Assay erfolgte mit Microsoft Excel.

3.3 Statistische Auswertung

Von den beschriebenen Experimenten wurden jeweils drei unabhängige Versuche mit je vier mitgeführten Ansätzen pro Probe (Migrations-, Adhäsions-, Poliferations- und Viabilitätsassays), beziehungsweise drei unabhängige Western-Blots durchgeführt. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Microsoft Excel verwendet. Zur Ermittlung der Signifikanz wurde ein student's t-Test durchgeführt, wobei statistische Signifikanz bei einem P-Wert $<0,05$ angenommen wurde.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L auf das funktionelle Verhalten von Mammakarzinomzelllinien untersucht. Dabei wurde die Expression und der Aktivierungszustand der p38 MAPK mittels Western-Blot-Analysen bestimmt sowie die Auswirkungen der Inhibitoren auf das Migrations- und Adhäsionsverhalten und auf die Proliferation und die Viabilität der Zellen betrachtet.

4.1 Expression und Aktivität der p38 MAPK unter Inhibition

Zum Verständnis der Effekte der p38 MAPK-Inhibition auf molekularer Ebene wurde mittels Western-Blot das Expressionsniveau der gesamten (inaktiven und aktiven) p38 MAPK bestimmt. Daneben wurde auch die Auswirkungen der beiden Inhibitoren in steigenden Konzentrationen auf das Expressionslevel der phosphorylierten und damit aktivierten Kinase untersucht.

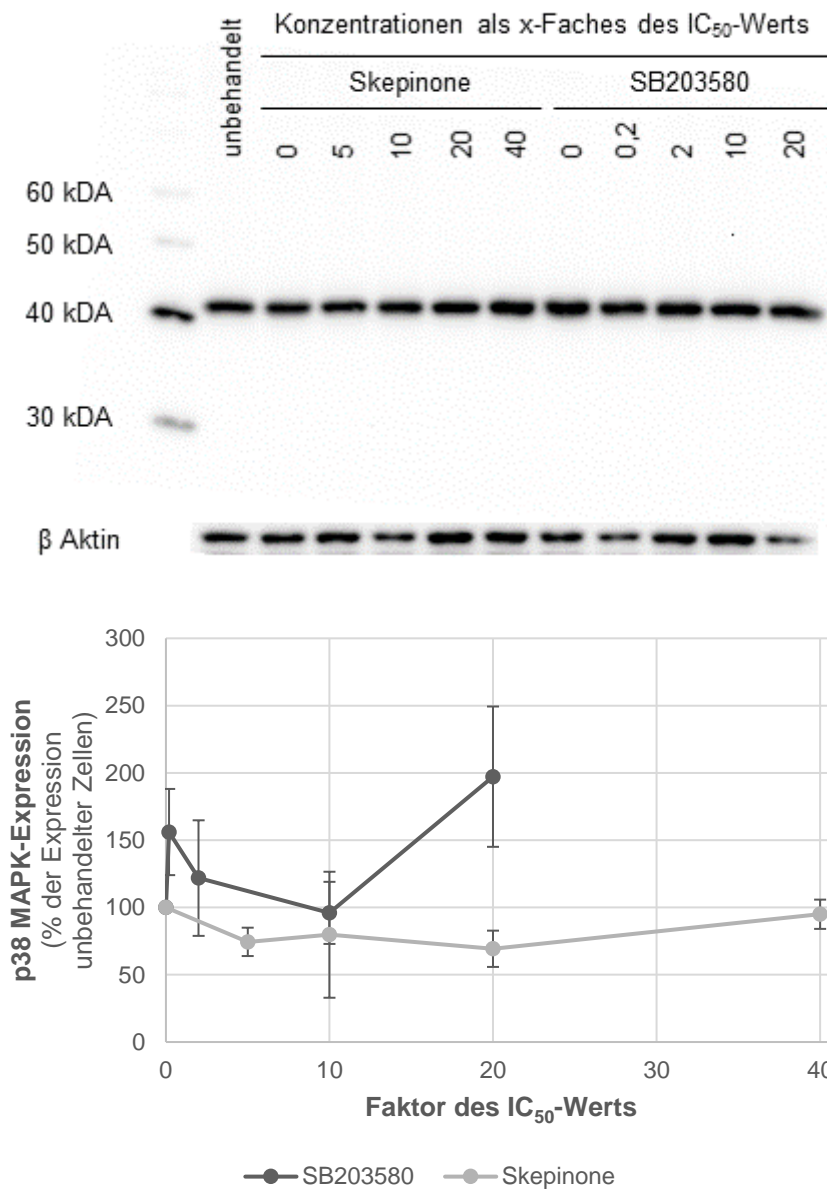


Abbildung 5: Expression von p38 MAPK unter Einfluss steigender Konzentrationen der p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L in der Zelllinie AU565.

Die p38 MAPK-Inhibitoren wurden in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet (SB203580: 0,1, 1, 5, 10 μ M; Skepinone-L: 25, 50, 100, 200 nM), dargestellt als Faktoren ihres jeweiligen IC₅₀-Werts (SB203580: 0,5 μ M, entsprechend Faktor 0,2, 2, 10, 20; Skepinone-L: 5 nM, entsprechend Faktor 5, 10, 20, 40). Die Inhibitoren wurden in serumfreien Nährmedium gelöst. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden. Im oberen Teil der Abbildung ist ein repräsentatives Western-Blot-Ergebnis abgebildet. Proteinmenge 50 μ g, 10%iges Agarose-Gel. Als Ladekontrolle diente im Anschluss an die Detektion ein β -Actin Antibody, monoclonal, mouse. Im unteren Teil der Abbildung sind die Ergebnisse der Computer-gestützten Quantifizierung dreier unabhängiger Versuche dargestellt, die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen. Die Werte der unbehandelten Zellen wurden auf 100% gesetzt, alle anderen Werte beziehen sich auf diesen Wert.

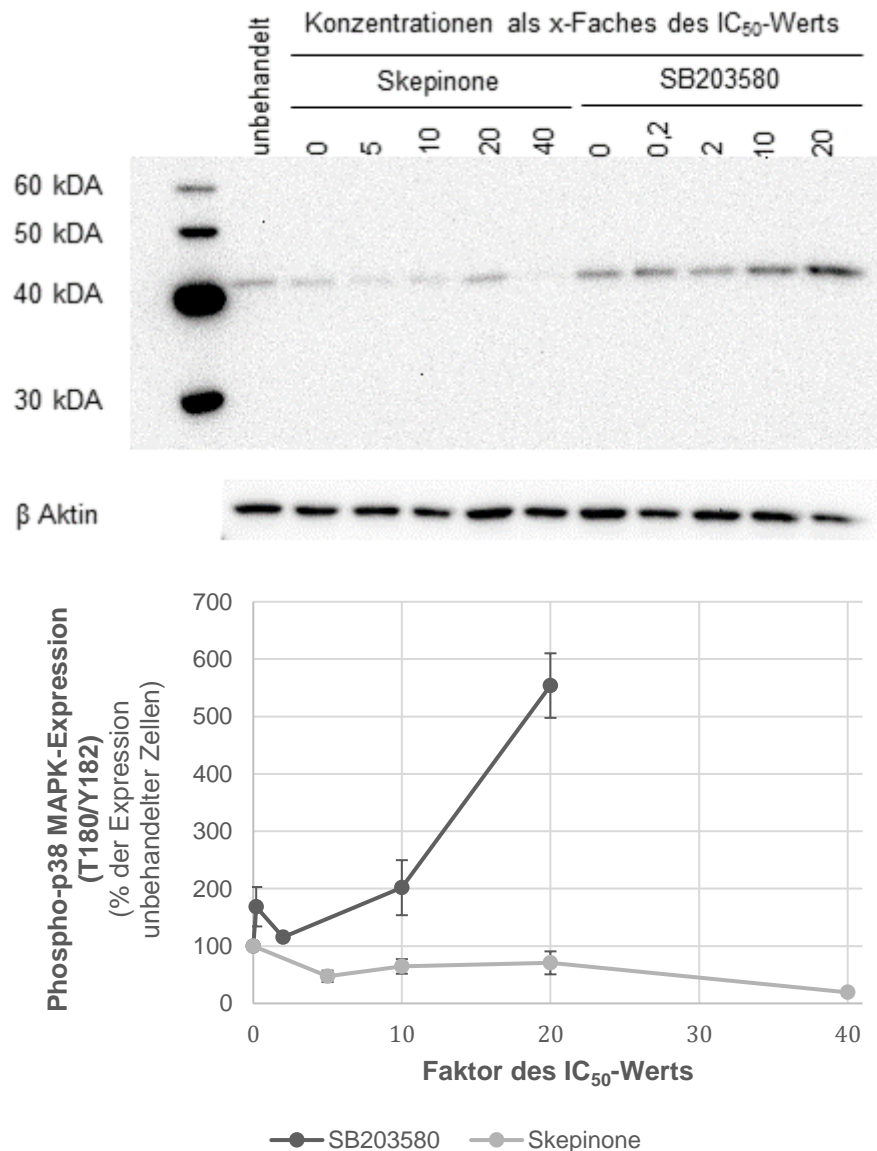


Abbildung 6: Expression von phosphorylierter p38 MAPK (Thr180/Tyr182) unter Einfluss steigender Konzentrationen der p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L in der Zelllinie AU565.

Die p38 MAPK-Inhibitoren wurden in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet (SB203580: 0,1, 1, 5, 10 μ M; Skepinone-L: 25, 50, 100, 200 nM), dargestellt als Faktoren ihres jeweiligen IC₅₀-Werts (SB203580: 0,5 μ M, entsprechend Faktor 0,2, 2, 10, 20; Skepinone-L: 5 nM, entsprechend Faktor 5, 10, 20, 40). Die Inhibitoren wurden in serumfreien Nährmedium gelöst. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden. Im oberen Teil der Abbildung ist ein repräsentatives Western-Blot-Ergebnis abgebildet. Proteinmenge 50 μ g, 10%iges Agarose-Gel. Als Ladekontrolle diente im Anschluss an die Detektion ein β -Actin Antibody, monoclonal, mouse. Im unteren Teil der Abbildung sind die Ergebnisse der Computer-gestützten Quantifizierung dreier unabhängiger Versuche dargestellt, die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen. Die Werte der unbehandelten Zellen wurden auf 100% gesetzt, alle anderen Werte beziehen sich auf diesen Wert.

Die Zelllinie AU565 reagierte auf die Behandlung mit dem Inhibitor SB203580 insgesamt mit einem Anstieg der Expression der p38 MAPK (Abbildung 5). Am stärksten ausgeprägt war dieser Effekt bei der höchsten getesteten Konzentration (Faktor IC_{50} -Wert = 20, entsprechend 10 μ M) und erreichte dabei eine Steigerung um 97%. Dahingegen kam es unter der Behandlung mit steigenden Konzentrationen von Skepinone-L zunächst zu einer Reduktion der p38 MAPK-Expression, beispielsweise auf 69% des Expressionsniveaus un behandelter Zellen bei Faktor IC_{50} -Wert = 20, entsprechend 100 nM ($p = 0,03$). Jedoch wurde bei weiterer Steigerung der Skepinone-L-Konzentration (Faktor IC_{50} -Wert = 40, entsprechend 200 nM) eine Annäherung an den Kontrollwert beobachtet (95%). Bei der Betrachtung der phosphorylierten p38 MAPK (Abbildung 6) wurde eine deutliche Divergenz zwischen den Auswirkungen der beiden Inhibitoren gefunden: Während es durch die Behandlung mit steigenden Konzentrationen von SB203580 zu einer annähernd exponentiellen Zunahme der Expression der phosphorylierten p38 MAPK kam (um 454% der Kontrolle bei Faktor IC_{50} -Wert = 20, entsprechend 10 μ M, $p < 0,01$), führte Skepinone-L zunächst zu einer moderaten (Reduktion auf 70% bei Faktor IC_{50} -Wert = 20, entsprechend 100 nM), bei der höchsten getesteten Konzentration jedoch zu einer starken Abnahme auf 19% der Kontrolle (Faktor IC_{50} -Wert = 40, entsprechend 200 nM).

Tabelle 5: Veränderung der Expression von p38 MAPK und Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) in den Zelllinien AU565, MCF7, MCF10A, MDA-MB231 und ZR751.

Dargestellt sind die Änderungen der Expression der genannten Proteine unter Behandlung mit den Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L bei Faktor IC_{50} -Wert = 20 ($n = 3$), verglichen mit unbehandelten Zellen, deren Wert auf 100% gesetzt wurde. Die Inhibitoren wurden in serumfreien Nährmedium gelöst. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden. („=": +/- 15%, „+": +15 – 10%, „++": +100 – 200%, „+++": > +200%, „-": -15 – 30%, „--": -30 - 50%, „---": > -50%)

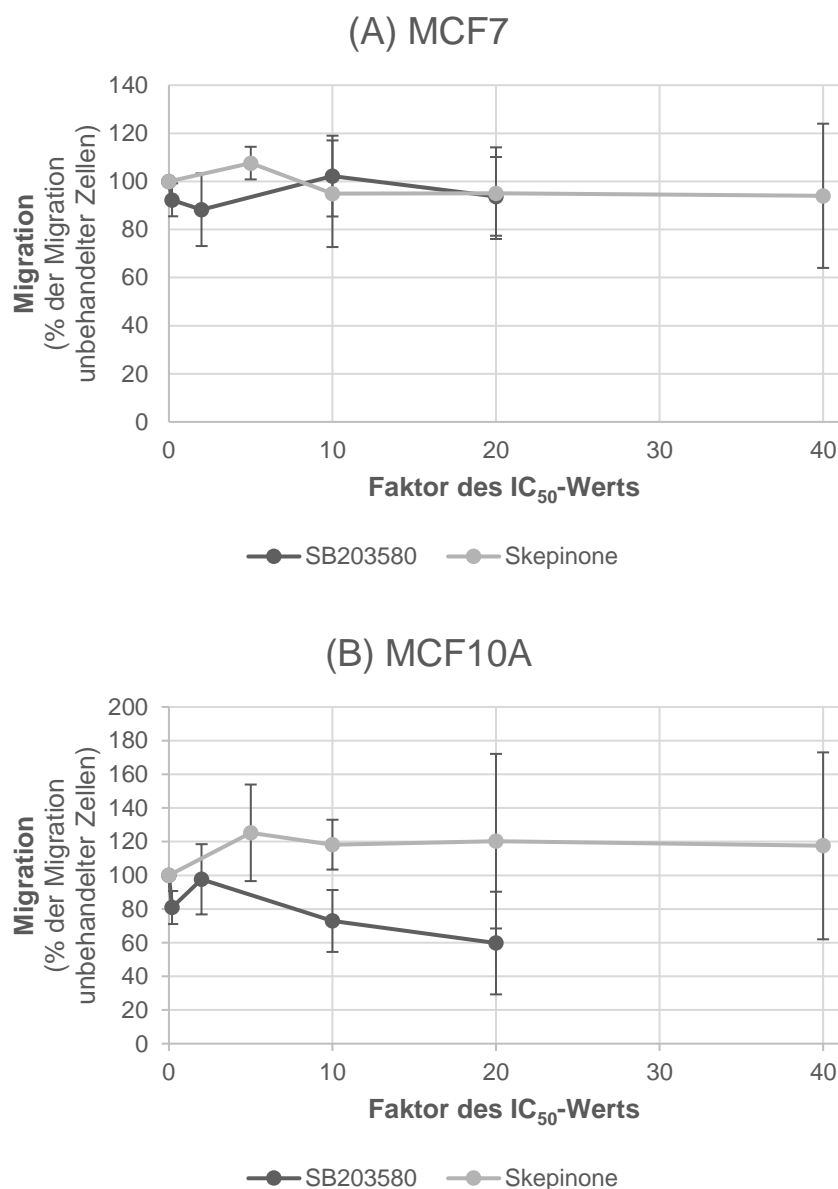
Zelllinie	p38 MAPK-Expression		Phospho-p38 MAPK-Expression (T180/Y182)	
	SB203580	Skepinone-L	SB203580	Skepinone-L
AU565	+	--	+++	-
MCF7	+	=	+	--
MCF10A	++	=	+++	--
MDA-MB231	=	=	--	=
ZR751	+	-	+	=

Ähnliche, wenn auch weniger deutlich divergente Auswirkungen der beiden Inhibitoren wie für die Zelllinie AU565 finden sich für beide getesteten Expressionsniveaus auch für MCF7, MCF10A und ZR751. Eine Ausnahme bildet die Zelllinie MDA-MB231. Hier zeigte weder die Behandlung mit SB203580, noch mit Skepinone-L eine Auswirkung auf die Expression der p38 MAPK. Bei Betrachtung der Phospho-p38 MAPK zeigte allein die Behandlung mit

SB203580 einen Effekt: Hierbei kam es im Gegensatz zu den anderen Zelllinien nicht zu einer Zu- sondern zu einer Abnahme des Expressionslevels (Tabelle 5)

4.2 Chemotaktische Zellmigration unter p38 MAPK-Inhibition

Als ein wichtiger Aspekt des funktionellen Verhaltens von Tumorzellen, der die Dissemination und Metastasierung ermöglicht, wurde die Migration und der Effekt der p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L untersucht, um die Rolle des Signalwegs bei diesem Prozess näher zu charakterisieren.



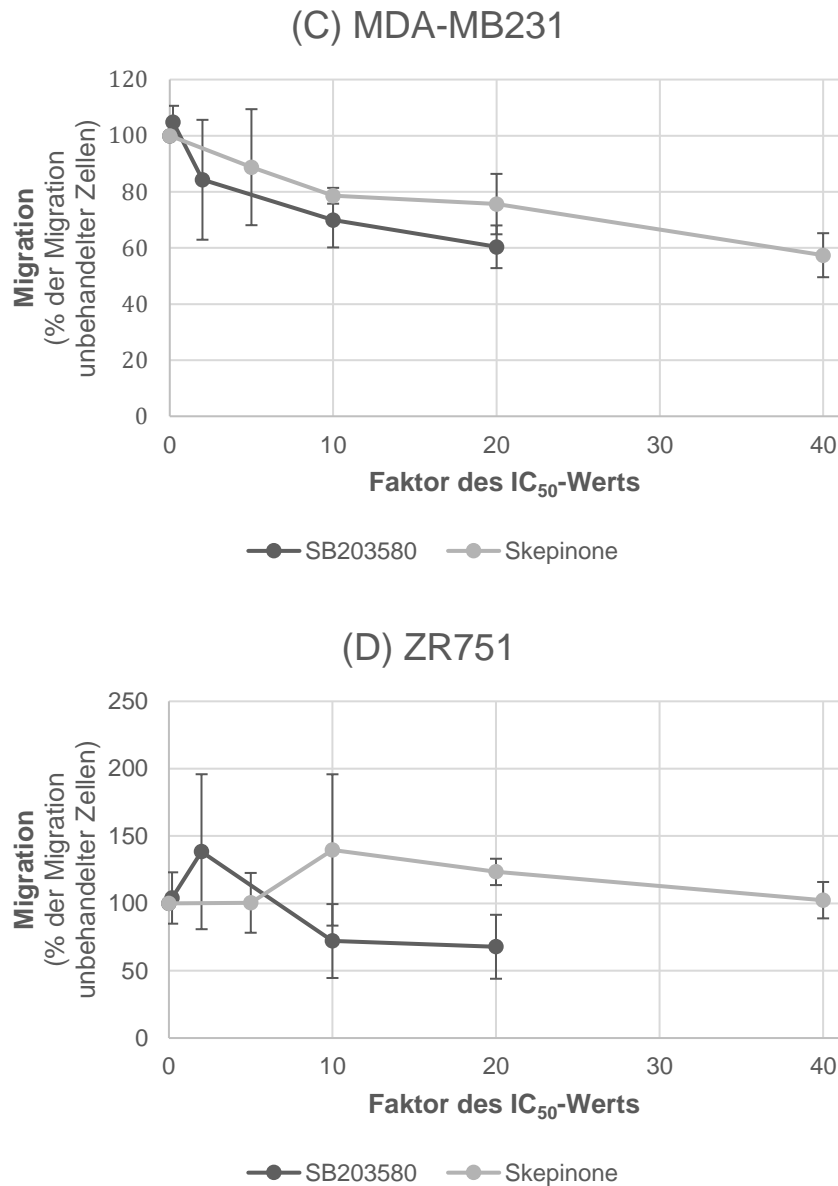


Abbildung 7: Einfluss steigender Konzentrationen der p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L auf die chemotaktische Migration der Zelllinien MCF7 (A), MCF10A (B), MDA-MB231 (C) und ZR751 (D).

Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen. Die p38 MAPK-Inhibitoren wurden in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet (SB203580: 0,1, 1, 5, 10 μM ; Skepinone-L: 25, 50, 100, 200 nM), dargestellt als Faktoren ihres jeweiligen IC₅₀-Werts (SB203580: 0,5 μM , entsprechend Faktor 0,2, 2, 10, 20; Skepinone-L: 5 nM, entsprechend Faktor 5, 10, 20, 40). Die Inhibitoren wurden in serumfreiem Nährmedium gelöst. Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden, die Migrationszeit in der Boyden-Kammer betrug 16 Stunden. Als Chemotaxin dienten Kollagen I in den Konzentrationen 10 $\mu\text{g/ml}$ (ZR751) und 20 $\mu\text{g/ml}$ (MCF7, MCF10A) sowie Kollagen IV in der Konzentration 20 $\mu\text{g/ml}$ (MDA-MB231). Die Werte der unbehandelten Zellen wurden auf 100% gesetzt, alle anderen Werte beziehen sich auf diesen Wert.

Die MCF7-Zellen (Abbildung 7(A)) migrierten sowohl unter der Behandlung mit SB203580, als auch mit Skepinone-L in steigenden Konzentrationen vermindert verglichen mit der

unbehandelten Kontrollgruppe. So sank die Migration bei den äquipotenten Konzentrationen von Faktor IC_{50} -Wert = 20 (entsprechend 10 μ M SB203580 und 100 nM Skepinone-L) zu einer Abnahme auf 94%, bzw. 95% der Kontrolle. Eine Ausnahme hiervon fand sich für Skepinone-L in der Konzentration von Faktor IC_{50} -Wert = 5 (entsprechend 25 nM), bei der es zu einem leichten Anstieg der Migration um 7% kam.

Dahingegen migrierten Zellen der Linie MCF10A (Abbildung 7 (B)) unter Behandlung mit SB203580 geringer. So sank die Migration bei der höchsten getesteten Konzentration (Faktor IC_{50} -Wert = 20, entsprechend 10 μ M) auf knapp 60% der Kontrolle. Im Gegensatz dazu kam es durch die Behandlung mit Skepinone-L zu einer Zunahme der Migration, die ab einer Konzentration von Faktor IC_{50} -Wert = 5, entsprechend 25 nM, ein Plateau erreichte (Zunahme um circa 20%).

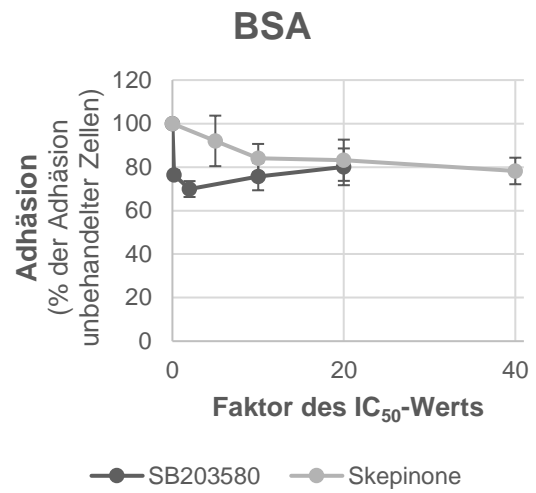
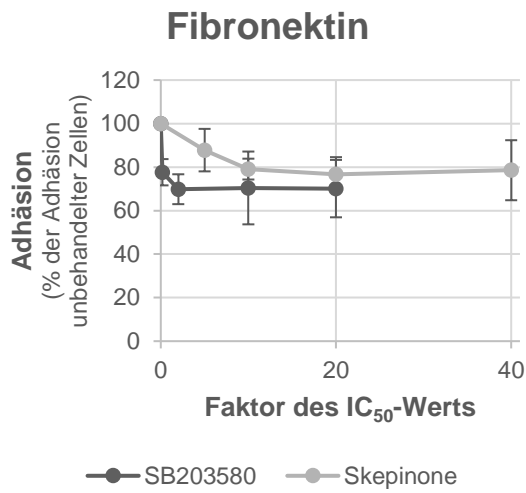
Die Zelllinie MDA-MB231 (Abbildung 7 (C)) reagierte auf die Behandlung mit sowohl SB203580 als auch mit Skepinone-L mit einer Abnahme der Migration. Dabei war der beobachtete Effekt unter SB203580 stärker ausgeprägt: In den vergleichbaren getesteten Konzentrationen (SB203580: Faktor IC_{50} -Wert = 20, entsprechend 10 μ M; Skepinone-L: Faktor IC_{50} -Wert = 20, entsprechend 100 nM) betrug die Migration unter SB 203580 circa 60% ($p < 0,01$), unter Skepinone-L 75% der Kontrolle.

Zellen der Linie ZR751 (Abbildung 7 (D)) migrierten unter SB203580 in steigenden Konzentrationen zunächst verstärkt, dann jedoch vermindert (138% der Kontrolle bei Faktor IC_{50} -Wert = 2, entsprechend 2 μ M; 68% der Kontrolle bei Faktor IC_{50} -Wert = 20, entsprechend 10 μ M). Dahingegen blieb die Migration unter niedrigen Konzentrationen von Skepinone-L gleich (100% der Kontrolle bei Faktor IC_{50} -Wert = 5, entsprechend 25 nM), nahm bei steigenden Konzentrationen zu (Faktor IC_{50} -Wert = 10, entsprechend 50 nM) und näherte sich bei der höchsten Konzentration (Faktor IC_{50} -Wert = 40, entsprechend 200 nM) wieder dem Wert der Kontrolle an.

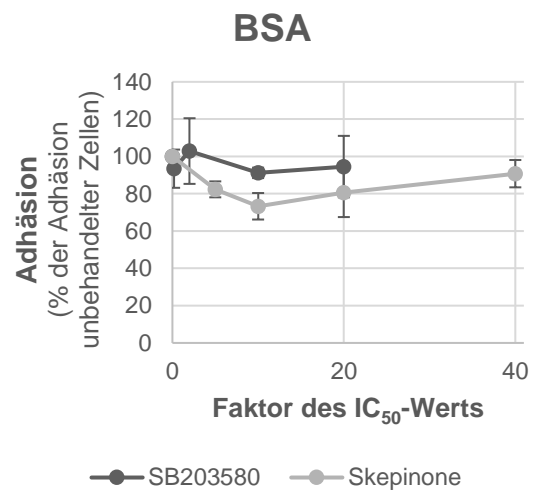
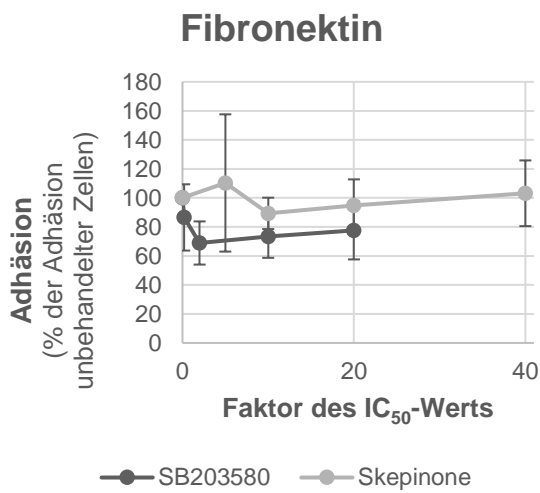
Abschließend soll erwähnt werden, dass der Migrationsversuch aufgrund der geringen Anzahl migrierter Zellen der Zelllinie AU565 nicht durchgeführt werden konnte. Eine Erklärung hierfür ist das vermehrte Wachstum in Suspension, während die anderen Zelllinien ein vornehmlich adhärentes Wachstum aufweisen.

4.3 Zelladhäsion unter p38 MAPK-Inhibition

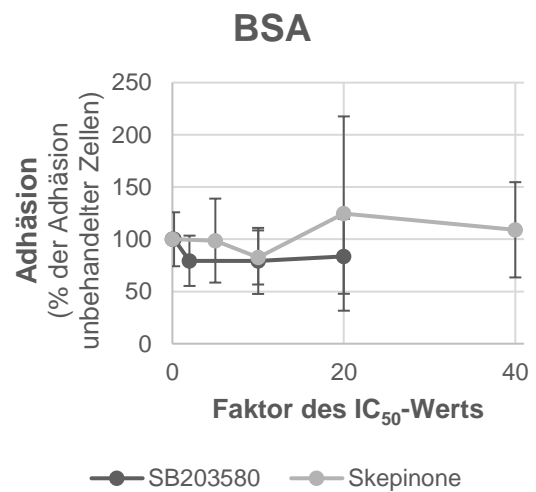
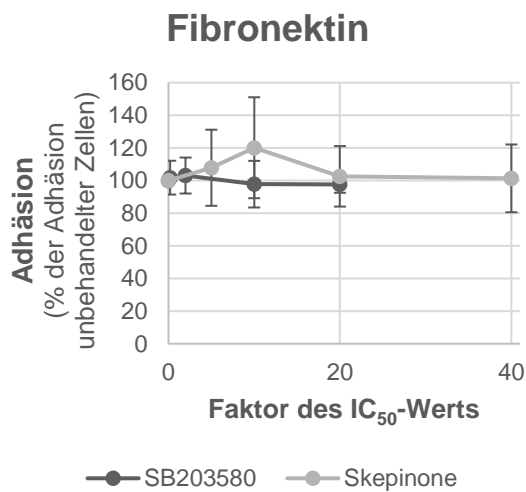
(A) AU565



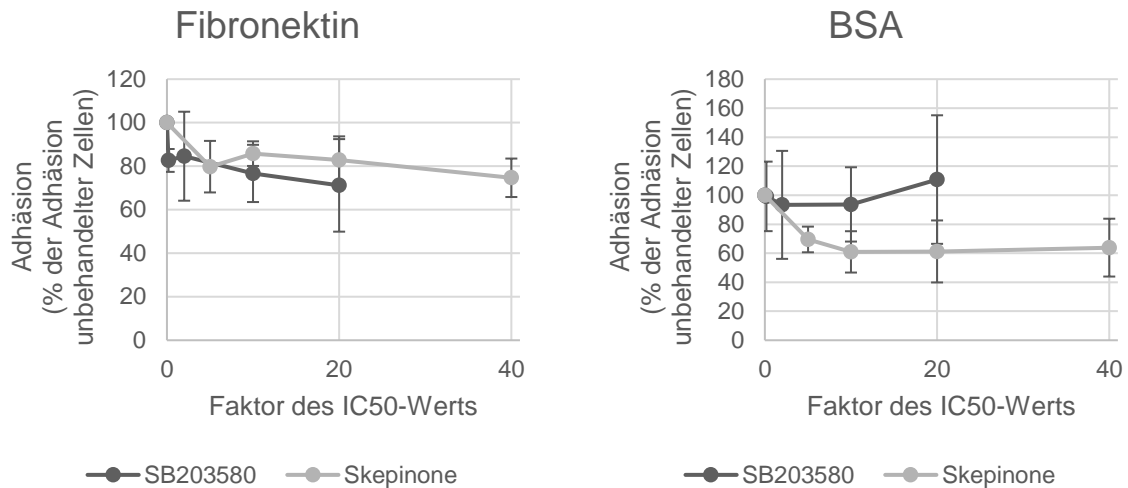
(B) MCF7



(C) MCF10A



(D) MDA-MB231



(E) ZR751

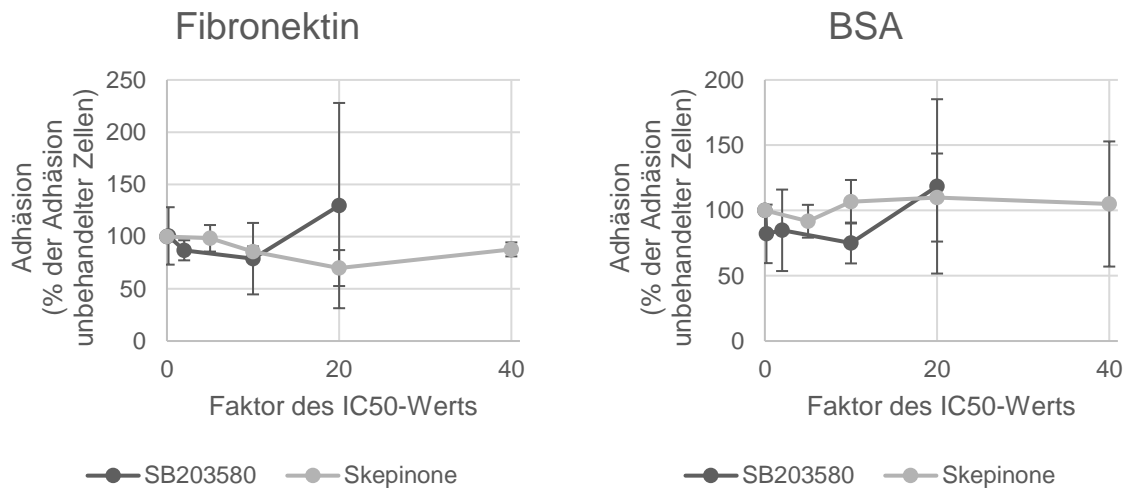


Abbildung 8: Adhäsion der Mammakarzinom-Zelllinien AU565 (A), MCF7 (B), MCF10A (C), MDA-MB231 (D) und ZR751 (E) unter Einfluss steigender Konzentrationen der p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L an Fibronectin und BSA.

Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen. Die p38 MAPK-Inhibitoren wurden in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet (SB203580: 0,1, 1, 5, 10 μM ; Skepinone-L: 25, 50, 100, 200 nM), dargestellt als Faktoren ihres jeweiligen IC_{50} -Werts (SB203580: 0,5 μM , entsprechend Faktor 0,2, 2, 10, 20; Skepinone-L: 5 nM, entsprechend Faktor 5, 10, 20, 40). Die Inhibitoren wurden in serumfreien Nährmedium gelöst. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden. Unbehandelte Zellen wurden auf 100% gesetzt, alle anderen Werte beziehen sich auf diesen Wert.

Ein weiterer, wichtiger Aspekt des funktionellen Verhaltens von Tumorzellen ist die Fähigkeit zur Adhäsion an Komponenten der Extrazellulärmatrix. Hierbei wurde die Adhäsion an Fibronectin untersucht, wobei BSA als Kontrolle diente.

Die Zelllinie AU565 (Abbildung 8 (A)) reagierte durch die Behandlung sowohl mit SB203580, als auch mit Skepinone-L mit einer Reduktion des Adhäsionsverhaltens. Jedoch konnte nach der Behandlung mit SB203580 sowohl eine bei geringeren Konzentrationen einsetzende, als auch eine insgesamt stärkere Reduktion festgestellt werden. So kam es bei der äquipotenten Konzentration von bei Faktor IC_{50} -Wert = 10 (entsprechend 5 μ M SB 203580 und 50 nM Skepinone-L) bei der Behandlung mit SB203580 zu einer Reduktion auf 70% der Kontrolle und bei Skepinone-L auf 79% ($p < 0,01$).

Ähnlich reagierten die Zellen der Linien MDA-MB231 (Abbildung 8 (D)) und ZR751 (Abbildung 8 (E)): Auch MDA-MB231-Zellen zeigten unter der Behandlung mit SB203580 eine frühere und stärkere Reduktion der Adhäsion als unter Skepinone-L, beispielsweise wurde bei der äquipotenten Konzentration von bei Faktor IC_{50} -Wert = 20 entsprechend 20 μ M SB203580 und 100 nM Skepinone-L eine Abnahme der Adhäsion auf 71%, bzw. 82% der Kontrolle festgestellt. Die ZR751-Zellen zeigten unter der Behandlung sowohl mit SB203580 als auch mit Skepinone-L eine reduzierte Adhäsion. Allerdings waren die Unterschiede zwischen den Inhibitoren geringer ausgeprägt. So wurde bei der äquipotenten Konzentration von Faktor IC_{50} -Wert = 10 entsprechend 5 μ M SB203580 und 50 nM Skepinone-L eine Abnahme der Adhäsion auf 79%, bzw. 86% ($p < 0,01$) der Kontrolle festgestellt. Eine Ausnahme von diesem Bild stellte die Konzentration Faktor IC_{50} -Wert = 20 entsprechend 10 μ M SB203580, unter der es zu einer Zunahme der Adhäsion um circa 30% kam.

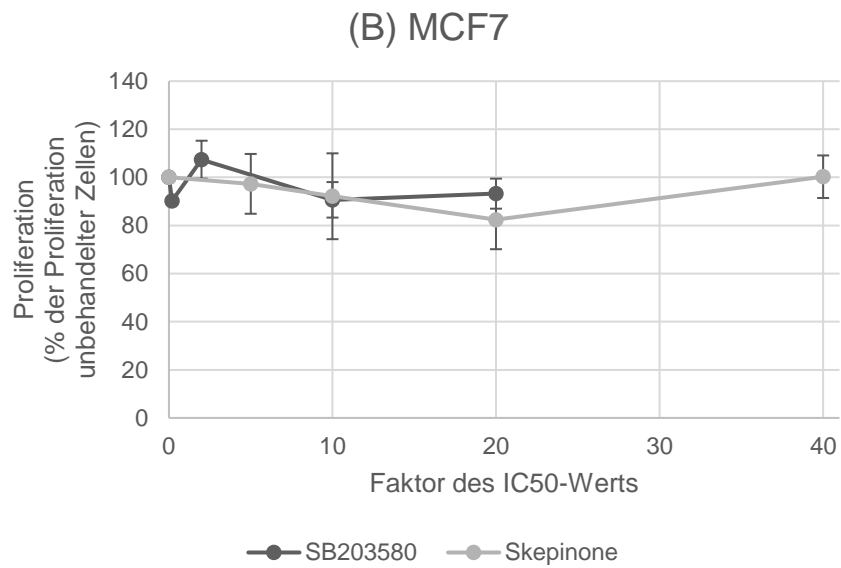
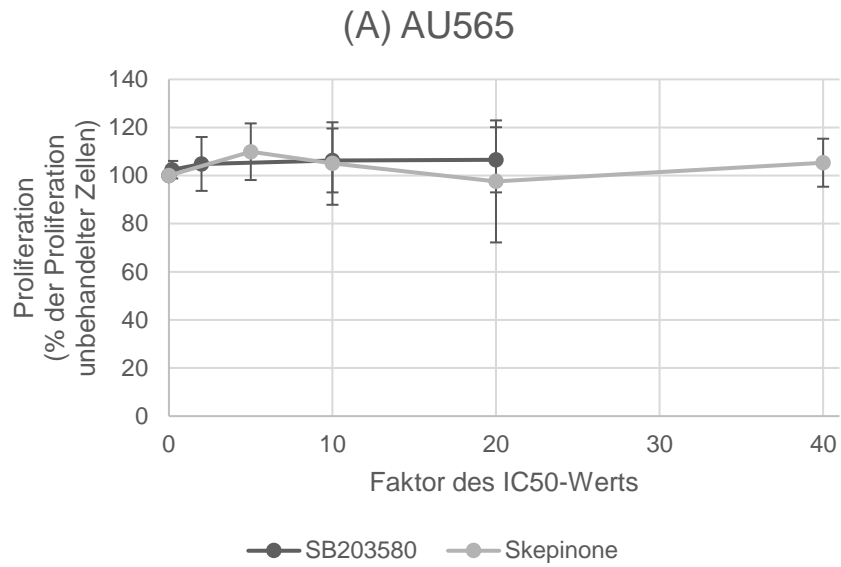
Die MCF7-Zellen (Abbildung 8 (B)) reagierten auf die Behandlung mit SB203580 ebenfalls mit einer Reduktion der Adhäsion (beispielsweise bei Faktor IC_{50} -Wert = 2, entsprechend 1 μ M auf 69% der Kontrolle, $p = 0,04$). Dahingegen wurden unter Skepinone-L ein ähnliches Adhäsionsverhalten wie in der Kontrolle beobachtet.

Die Zellen der Linie MCF10A (Abbildung 8 (C)) reagierten auf die Behandlung mit beiden Inhibitoren mit keiner signifikanten Veränderung der Adhäsion. Lediglich bei niedrigen und mittleren Konzentrationen von Skepinone-L (Faktor IC_{50} -Wert = 5, entsprechend 25 nM und Faktor IC_{50} -Wert = 10, entsprechend 50 nM) kam es zu einer leichten Zunahme der Adhäsion um 8%, bzw. um 20% im Vergleich zur Kontrolle.

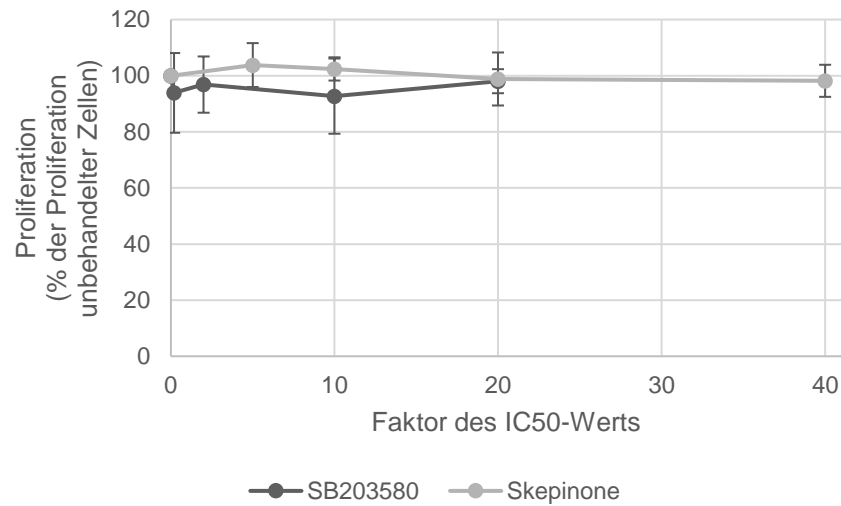
4.4 Zellproliferation unter p38 MAPK-Inhibition

Um die Auswirkungen steigender Konzentrationen der beiden p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L auf die Zellteilungsrate zu untersuchen, wurden BrdU-Assays durchgeführt. Die gesteigerte Proliferation gegenüber den Zellen des gesunden Gewebes

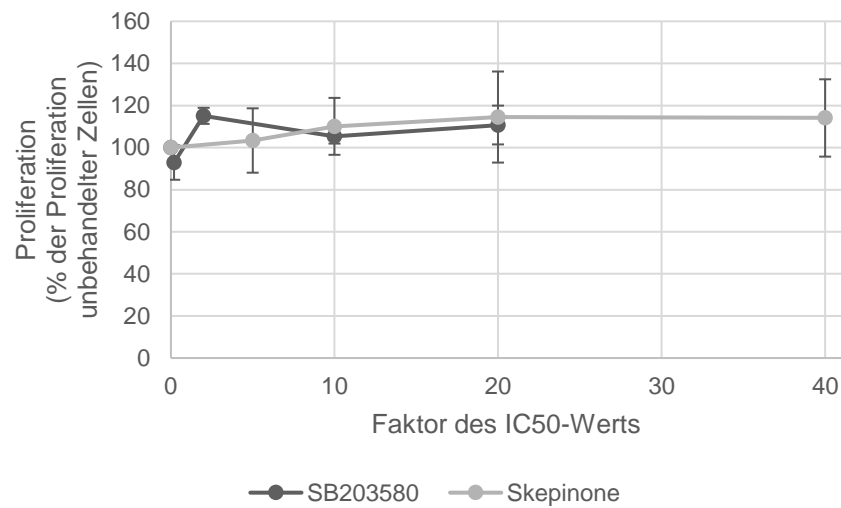
ermöglicht Wachstum des Primarius oder der Metastasen und ist damit ein grundlegender Aspekt des funktionellen Verhaltens von Tumorzellen.



(C) MCF10A



(D) MDA-MB231



(E) ZR751

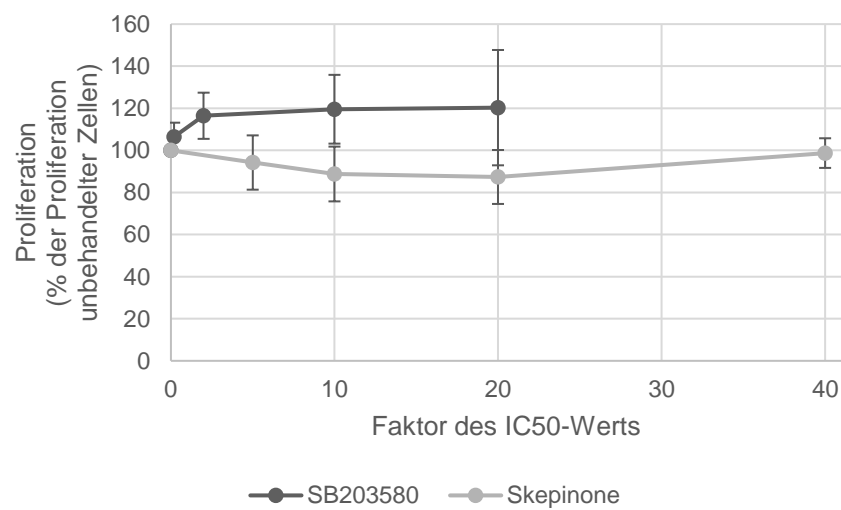


Abbildung 9: Proliferation der Mammakarzinom-Zelllinien AU565 (A), MCF7 (B), MCF10A (C), MDA-MB231 (D) und ZR751 (E) unter Einfluss steigender Konzentrationen der p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L, quantifiziert mittels BrdU-ELISA.

Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen. Die p38 MAPK-Inhibitoren wurden in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet (SB203580: 0,1, 1, 5, 10 μM ; Skepinone-L: 25, 50, 100, 200 nM), dargestellt als Faktoren ihres jeweiligen IC_{50} -Werts (SB203580: 0,5 μM , entsprechend Faktor 0,2, 2, 10, 20; Skepinone-L: 5 nM, entsprechend Faktor 5, 10, 20, 40). Die Inhibitoren wurden in serumfreien Nährmedium gelöst. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden. Werte der unbehandelten Zellen wurden auf 100% gesetzt, alle anderen Werte beziehen sich auf diesen Wert.

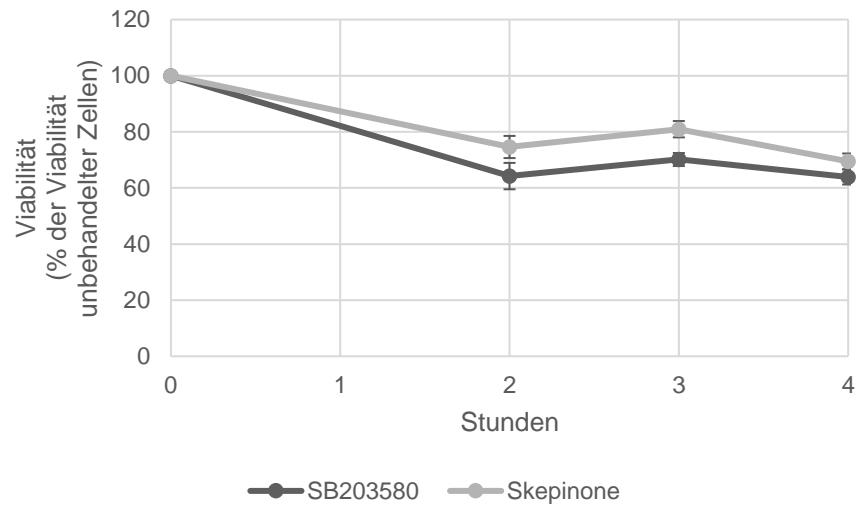
Die beobachteten Effekte steigender Konzentrationen der beiden Inhibitoren auf die Proliferation der Zelllinien AU565, MCF7 und MCF10A (Abbildung 9 (A), (B), (C)) fielen insgesamt gering aus und schwankten um den Wert der Kontrolle.

Dahingegen kam zeigten die Zellen der Linie MDA-MB231 (Abbildung 9 (D)) unter der Behandlung sowohl mit SB203580 als auch mit Skepinone-L eine leichte Zunahme der Zellteilung um circa 10 bis 15% verglichen mit der Kontrolle. ZR751-Zellen (Abbildung 9 (E)) reagierten auf die beiden Inhibitoren gegensätzlich: Während die Behandlung mit SB203580 ebenfalls zu einer Zunahme der Proliferation führte (beispielsweise um 20% bei Faktor IC_{50} -Wert = 20, entsprechend 10 μM), kam es unter Skepinone-L zu einem Abfall der Zellteilung (beispielsweise auf 87% der Kontrolle bei Faktor IC_{50} -Wert = 20, entsprechend 100 nM).

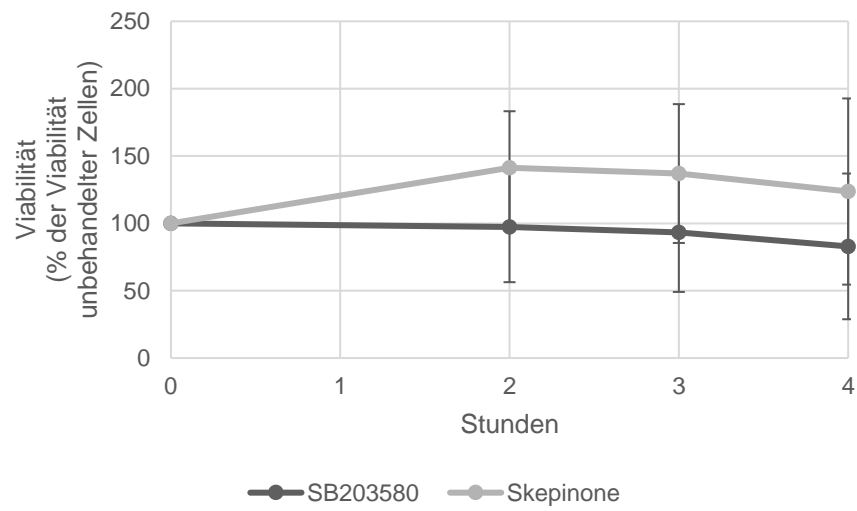
4.5 Zellviabilität unter p38 MAPK-Inhibition

Zur Beurteilung der Viabilität der Tumorzellen unter der Behandlung mit steigenden Konzentrationen der p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L, wurde mit dem Assay *RealTime-GloTM* der Firma Promega gearbeitet.

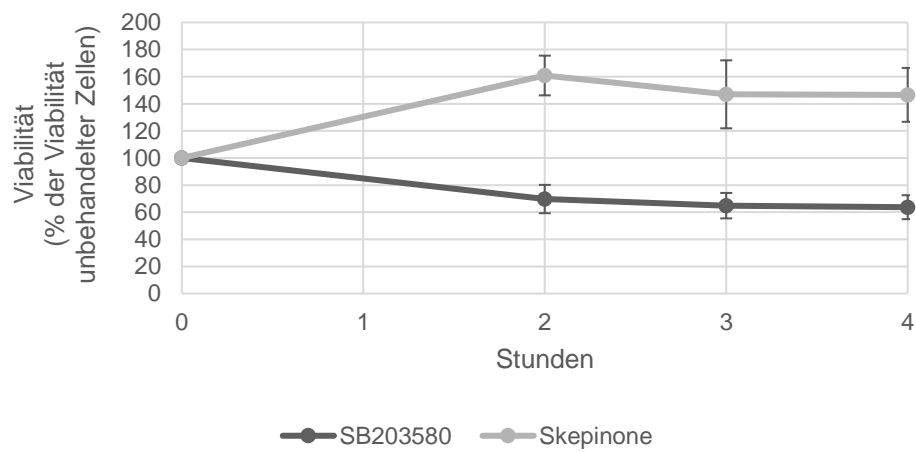
(A) AU565



(B) MCF7



(C) MCF10A



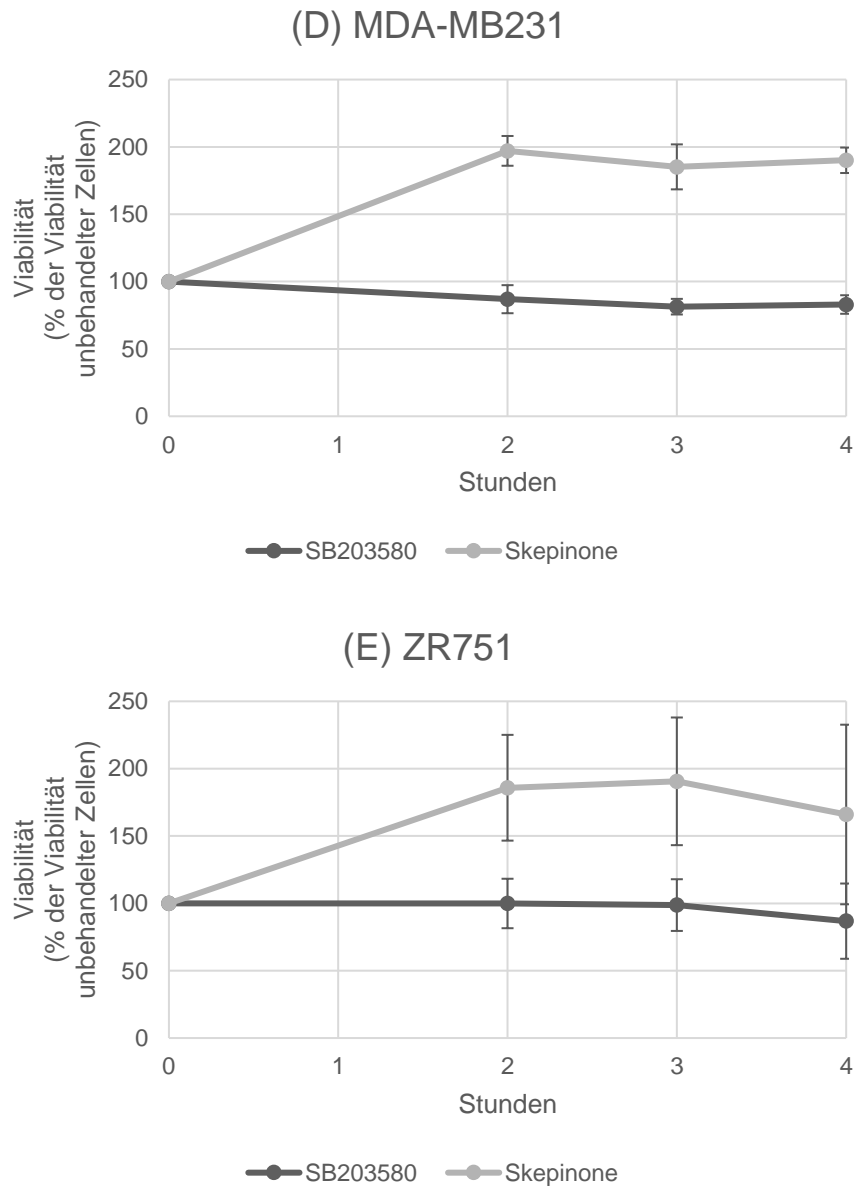


Abbildung 10: Zellviabilität der Mammakarzinom-Zelllinien AU565 (A), MCF7 (B), MCF10A (C), MDA-MB231 (D) und ZR751 (E) nach der Behandlung mit den p38 MAPK-Inhibitoren SB 203580 und Skepinone-L.

Dargestellt ist der Verlauf der Zellviabilität zu den Zeitpunkten vor Zugabe der Inhibitoren, nach zwei Stunden Inkubationszeit, sowie nach insgesamt drei und vier Stunden nach Zugabe der Inhibitoren. Die Konzentration der Inhibitoren betrug Faktor IC_{50} -Wert = 20 (SB203580 10 μ M, Skepinone-L 100 nM). Die Werte der unbehandelten Zellen wurden auf 100% gesetzt, alle anderen Werte beziehen sich auf diesen Wert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen, sowie die Standardabweichungen.

Die AU565-Zellen (Abbildung 10 (A)) reagierten auf die Behandlung sowohl mit SB203580 als auch mit Skepinone-L mit einer Reduktion der Viabilität. Dabei war die Abnahme unter SB203580 jedoch ausgeprägter als unter Skepinone-L, beispielsweise zwei Stunden nach

Zugabe der Inhibitoren lag die Viabilität der mit SB203580 behandelten Zellen bei 64% ($p < 0,01$) der Kontrolle, während sie bei den mit Skepinone-L behandelten Zellen bei 75% lag.

Die Zelllinien MCF7, MDA-MB231 und ZR751 (Abbildung 10 (B), (D), (E)) wiesen ein ähnliches Verhalten auf: Während die Behandlung mit SB203580 im Zeitverlauf nur einen minimalen reduzierenden Effekt auf die Viabilität zeigte, kam es unter der Behandlung mit Skepinone-L zu einer Zunahme der Viabilität. Dabei verdoppelten die MDA-MB231- und ZR751-Zellen den Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

Die Zellen der Linie MCF10A reagierten auf die Zugabe der beiden Inhibitoren mit einer entgegengesetzten Entwicklung der Viabilität: Während es unter SB203580 nach vier Stunden zu einer Abnahme der Zellviabilität auf 64% ($p < 0,01$) der Kontrolle kam, führte eine vierstündige Behandlung einer äquivalenten Konzentration von Skepinone-L zu einer Steigerung der Viabilität um 47%.

5 Diskussion

5.1 Unterschiedliche Selektivität der verwendeten Inhibitoren:

Skepinone-L hemmt selektiv p38 α und β MAPK

Als neu eingeführter Inhibitor der p38 MAPK bietet Skepinone-L zwei bemerkenswerte Vorteile: Zum einen zeigt es eine verbesserte Wirksamkeit *in vivo*, zum anderen zeichnet es sich durch eine hohe Selektivität der Hemmung aus (Koeberle et al. 2011). Als ATP-kompetitive Hemmstoffe binden etablierte Typ I-Inhibitoren an die ATP-Bindungsstelle des Enzyms. Diese ist als gemeinsames Strukturmerkmal aller Enzyme mit Kinasefunktion hochkonserviert und dementsprechend nicht spezifisch für ein bestimmtes Protein. Daraus resultiert eine unspezifische Hemmung verschiedenster Kinasen (Abbildung 11). Als seit vielen Jahren bekannter und genutzter Inhibitor hemmt SB203580 zahlreiche Kinasen. Dazu zählen nicht nur alle Isoformen der p38 MAPK, sondern auch andere MAPK wie beispielsweise JNK, aber auch Kinasen anderer Familien, wie etwa EGFR als Rezeptortyrosinkinase (RTK) oder GAK als CDK (Fabian et al. 2005). Dahingegen finden sich im Dendrogramm von Skepinone-L nur zwei eng beieinander liegende Markierungen: Skepinone-L ist spezifisch für p38 α und β MAPK.

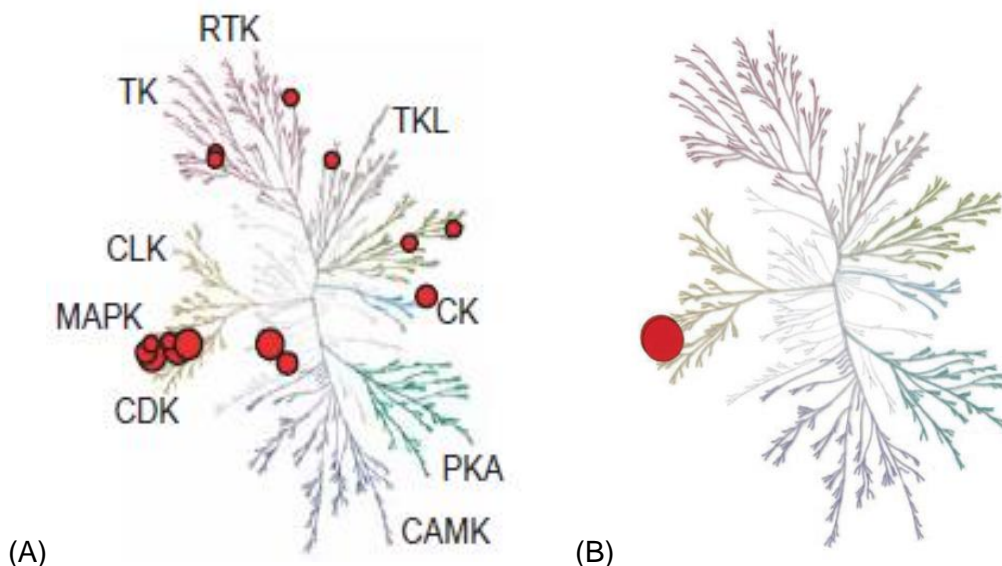


Abbildung 11 Dendrogramme der durch SB203580 (A) und Skepinone-L (B) inhibierten Kinasen, (A) (Fabian et al. 2005), (B) (Koeberle et al. 2011).

Abgebildet ist die Gesamtheit aller humanen Kinasen, aufgeteilt in die entsprechenden Familien. Die roten Kreise entsprechen dabei je einer durch die entsprechende Substanz gehemmte Kinase, wobei die Größe des Kreises mit der Effektivität der Hemmung korreliert.

Dies wurde von Koeberle et al. durch Modifikation der Molekülstruktur erreicht. Dazu zählt das sogenannte *gatekeeper residue*, welches eine lineare Anordnung der aromatischen Ringe des Inhibitors und damit eine stabile Bindung mit der *hinge*-Region der Kinase ermöglicht, und die Fähigkeit, bei der Kinase einen so genannten *glycine flip* zu induzieren und so zwei anstatt eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Protein einzugehen (Koeberle et al. 2011).

Bisherige Studien, die auf eine genauere Charakterisierung des p38 MAPK-Signalwegs abzielten, haben vielfach die älteren, etablierteren Inhibitoren wie beispielsweise SB203580 verwendet. Daraus resultiert eine eingeschränkte Aussagekraft der Ergebnisse, denn ob die beobachtete Effekte tatsächlich auf die Hemmung der p38 α und β MAPK oder vielleicht auf einen weiteren, unspezifisch gehemmten Signalweg zurückgeführt werden können, lässt sich nicht abschließend beantworten (Koeberle et al. 2011). Der Vergleich der Auswirkungen einer ungezielten (mit SB203580) gegenüber einer gezielten Hemmung (mit Skepinone-L) in der vorliegenden Arbeit erlaubt nun genauere Rückschlüsse auf die Rolle der p38 α und β MAPK beim Mammakarzinom.

5.2 Auswirkungen der Inhibitoren auf die Expression von p38

MAPK und Phospho-p38 MAPK in Mammakarzinomzellen

Signalwege wie der p38 MAPK-*pathway* wirken nicht isoliert, sondern sind in ein komplexes Netzwerk eingeflochten und stehen im Austausch mit einer Vielzahl anderer Signalkaskaden und Molekülen (Wagner und Nebreda 2009). Daher erlaubt die Analyse der Expressionslevels des Enzyms unter Inhibition Rückschlüsse auf dessen Integration in andere regulatorische Systeme.

Die beiden untersuchten Inhibitoren zeigten unterschiedliche Auswirkungen auf die Gesamt-Expression der (aktiven und inaktiven) p38 MAPK: Während es unter SB203580 in fast allen Zelllinien zu einem Anstieg der p38 MAPK kam, wurde unter Skepinone-L keine oder eher negative Auswirkungen auf das Expressionsniveau der Kinase beobachtet (Tabelle 6). Durch die Hemmung weiterer Kinasen durch SB203580 scheint gegenregulatorisch die Expression von p38 MAPK erhöht zu werden.

Tabelle 6: Übersicht über die Effekte der beiden Inhibitoren auf die Expression der p38 MAPK in den untersuchten Zelllinien.

Die Veränderungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle sind semiquantitativ dargestellt.

	SB203580	Skepinone-L
AU565	+	--
MCF7	+	=
MCF10A	++	=
MDA-MB231	=	=
ZR751	+	-

Der Inhibitor SB203580 induzierte bei fast allen untersuchten Zelllinien, mit Ausnahme von MDA-MB231, eine Zunahme des Levels an phosphorylierter p38 MAPK (Tabelle 7). Als Typ I-Inhibitor verhindert SB203580 zwar die Aktivität der p38 MAPK durch Blockade der ATP-Bindungsstelle des Enzyms, jedoch nicht deren Phosphorylierung durch vorgeschaltete Kinasen (Kumar et al. 1999). Daher erlaubt das erhöhte Vorkommen von Phospho-p38 MAPK keinen Rückschluss auf eine erhöhte Aktivität des Signalwegs.

Tabelle 7: Übersicht über die Effekte der beiden Inhibitoren auf die Expression der phosphorylierten p38 MAPK (T180/Y182) in den untersuchten Zelllinien.

Die Veränderungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle sind semiquantitativ dargestellt.

	SB203580	Skepinone-L
AU 565	+++	-
MCF 7	+	--
MCF 10A	+++	--
MDA MB 231	--	=
ZR 751	+	=

Auch andere Studien berichten über erhöhte Werte der phosphorylierten Kinase nach Behandlung mit SB203580, besonders im Bereich hoher Dosierungen (50 μ M) (Düzgün et al. 2017). Möglicherweise beruht diese vermehrte Phosphorylierung der p38 MAPK auf einer verminderten Aktivität von Phosphatasen, die physiologisch die Kinase dephosphorylieren und damit inaktivieren, wie beispielsweise DUSP (Owens und Keyse 2007). Andererseits könnte SB203580 durch eine unselektive Hemmung der JNK in den p38-JNK-Crosstalk eingreifen: Es wurde berichtet, dass murine, *Jun*-defiziente Hepatozyten vermehrt phosphorylierte p38 MAPK aufweisen (Stepniak et al. 2006). Wenn also, wie in 5.1 beschrieben, SB203580 JNK hemmt, wären verminderte Spiegel an deren *downstream-target* Jun zu erwarten. Damit

würde die Phosphorylierung der p38 MAPK enthemmt und erhöhte Spiegel der phosphorylierten Kinase zu erwarten, wie im vorliegenden Fall.

Eine weitere mögliche Erklärung für das erhöhte Level der Phospho-p38 MAPK unter SB203580 findet sich ebenfalls begründet in der Unselektivität dieses Inhibitors. So wurde beschrieben, dass SB203580 auch AKT hemmt (Lali et al. 2000). AKT wiederum unterbindet die Phosphorylierung der p38 MAPK (Yuan et al. 2016a). Demnach wären bei einer Hemmung von AKT durch SB203580 erhöhte Spiegel an phosphorylierter p38 MAPK zu erwarten.

Dahingegen hat Skepinone-L keinen (MDA-MB231, ZR751) oder einen eher negativen Effekt (AU565, MCF7, MCF10A) auf die Expression der Phospho-p38 MAPK (Tabelle 7). Da Skepinone-L selektiv auf p38 α und β MAPK wirkt, muss der beobachtete Effekt über eine alleinige Inhibition dieser Kinasen erklärbar sein. Tatsächlich gibt es Hinweise auf positive Feedback-Schleifen in der Aktivierung dieses Signalwegs (Matsuyama und Kawahara 2011). Dies würde erklären, warum bei unterbundener Aktivität der p38 MAPK auch geringere Spiegel des aktivierten Enzyms beobachtet werden können.

5.3 Bedeutung der p38 MAPK für die Migration von Mammakarzinomzellen

Ein wesentliches Merkmal von Tumorzellen ist die Fähigkeit, sich aus Zellverbänden loszulösen, in das umgebende Stroma einzuwandern und über die Invasion von Blut- und Lymphgefäßen zu anderen Lokalisationen zu wandern und dort Metastasen zu bilden. Dafür ist ein Prozess notwendig, durch den differenzierte Epithelzellen die Eigenschaften mesenchymaler Zellen annehmen. Diesen Ablauf bezeichnet man als Epithelial-Mesenchymale Transition (Hanahan und Weinberg 2011).

Die Untersuchung der Auswirkung der unterschiedlich selektiven Hemmung der p38 MAPK zeigt, dass die unspezifische Hemmung mittels SB203580 bei allen Zelllinien zu einer Reduktion der Migration führt (Tabelle 8). Dahingegen führt eine spezifische Hemmung der p38 α und β MAPK durch Skepinone-L insbesondere bei der Zelllinie MCF10A zu einer Steigerung der Migrationsfähigkeit. Da es sich dabei um nicht-kanzeröse Zellen handelt, lässt sich daraus schließen, dass die physiologische Funktion der p38 α und β MAPK die Unterdrückung der Zellmobilität ist und somit tumorsuppressive Eigenschaften aufweist (vgl. 3.1.10). Interessanterweise bestätigen Studien, die mit *knockdown* der p38 MAPK in Krebszellen arbeiten, eine ähnliche, migrationshemmende Rolle dieser Kinase (Hong et al. 2015). Dahingegen wird in der Literatur, wenn SB203580 verwendet wurde, der p38 MAPK

ein migrationssteigernder Effekt zugesprochen (Zhang et al. 2005; Naldini et al. 2010; Yang et al. 2015). Dies lässt vermuten, dass der unter SB203580-Behandlung beobachtete Effekt nicht durch die p38 α und β MAPK, sondern durch einen anderen, unselektiv inhibierten Signalweg hervorgerufen sein könnte. So wird beispielsweise JNK, die ebenfalls durch SB203580 gehemmt wird, vielfach mit der Migration von Karzinomzellen in Verbindung gebracht (Lin et al. 2020).

Einen ähnlichen Trend wie MCF10A zeigen die kanzerösen Zelllinien MCF7 und ZR751. Hierbei kam es erst im Bereich hoher Dosen von Skepinone-L, in denen die Selektivität nicht mehr garantiert ist, zu eine Abnahme, beziehungsweise Angleich der Migration an die Kontrolle. Dahingegen reagieren die MDA-MB231-Zellen auch auf Skepinone-L mit einer Abnahme der Migrationsfähigkeit. Als hoch aggressive kanzeröse Zelllinie verfügt MDA-MB231 über die höchsten Level der p38 MAPK (Chen et al. 2009). Eine mögliche Erklärung für den abweichenden beobachteten Effekt der Hemmung auf die Migrationsfähigkeit wäre eine potenzielle tumorfördernde Mutation dieser Zellen im p38 MAPK-Signalweg. MDA-MB231 exprimiert weder Hormonrezeptoren, noch HER2/neu (vgl. 3.1.10). Interessanterweise wurde in TNBC die Aktivität der p38 α MAPK bereits mit einer gesteigerten Migrationsfähigkeit in Verbindung gebracht (Hedrick und Safe 2017). Auch weitere Studien beschreiben eine migrationssteigernde Rolle der p38 MAPK in der Zelllinie MDA-MB231 (Hsieh et al. 2010; Sharaf et al. 2015). Demnach ist eine migrationsfördernde und damit tumorfördernde Bedeutung der p38 α und β MAPK in TNBC anzunehmen (Zhao et al. 2017). Desweiteren weist die Zelllinie MDA-MB231 auch eine *missense mutation* des *TP53*-Gens auf (The Institute of Cancer Research London 2020), dessen Genprodukt P53 *downstream* in Signalkaskade der p38 MAPK liegt (Weizmann Institute of Science 2020). Chen et al. konnten zeigen, dass die induzierte Migration in MDA-MB231-Zellen durch die Aktivität von P53 reguliert wird (Chen und Chiu 2015). Demnach kann die Hemmung der p38 α und β MAPK durch Skepinone-L über eine reduzierte Aktivität von P53 die verminderte Migration der MDA-MB231-Zellen erklären. Wie bereits in 4.2 erwähnt, zeigten die in vornehmlich nicht-adhären wachsenden Zellen der Linie AU565 keine Migrationstendenz, weswegen in diesem Versuch keine Aussage hierüber getroffen werden kann.

Tabelle 8: Übersicht über die Effekte der beiden Inhibitoren auf das chemotaktische Migrationsverhalten der untersuchten Zelllinien.

Die Veränderungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle sind semiquantitativ dargestellt.

	SB203580	Skepinone-L
AU565	o	o
MCF7	-	+ → -
MCF10A	---	++
MDA-MB231	---	--
ZR751	+ → --	+ → =

5.4 Bedeutung der p38 MAPK für die Adhäsion von Mammakarzinomzellen

Entgegen der Eigenschaften des epithelialen Ursprungsgewebes sind Karzinomzellen in der Lage, ihre initiale Lokalisation zu verlassen und systemisch wirksame Filiae oder Metastasen zu bilden. Die Grundlage hierfür bildet die Epithelial-Mesenchymale Transition, bei der es zu einer Herabregulation von Zelladhäsionsmolekülen wie E-Cadherin kommt (vgl. 2.1.5). Es finden sich zahlreiche Hinweise dafür, dass in diesem Prozess die Aktivität der p38 MAPK eine wichtige Rolle spielt (del Barco Barrantes und Nebreda 2012). Andererseits existieren auch Hinweise, dass eine Verminderung der Adhäsionsfähigkeit protektiv gegenüber einer Tumorprogression wirken kann. So konnte in MCF7-Zellen durch Induktion einer Ablösung der Zellen durch p38 MAPK-Aktivität der programmierte Zelltod, in diesem Fall Anoikis genannt, eingeleitet werden (Saranya et al. 2017).

Die vorliegende Arbeit hat die Auswirkungen der beiden p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L auf die Fähigkeit der Mammakarzinomzelllinien zur Adhäsion untersucht (Tabelle 9). Dabei zeigt sich, dass sowohl eine spezifische (Skepinone-L) als auch unspezifische Hemmung (SB203580) der p38 MAPK bei der nicht kanzerösen Zelllinie MCF10A zu keiner Veränderung der Adhäsion führt. Dahingegen finden sich bei den Krebszellen tendenziell eine Verminderung des Adhäsionsverhaltens. Dies lässt darauf schließen, dass der p38 MAPK in den untersuchten Karzinomzelllinien eine adhäsionsfördernde Rolle zukommt. Da die Hemmung der Adhäsion unter dem unselektiven SB203580 stärker ausfällt als unter dem selektiven Skepinone-L, scheinen weitere, unselektiv inhibierte Signalwege ebenfalls an der Adhäsionsfähigkeit der Zellen beteiligt zu sein. Allerdings wird eine erhöhte Aktivität der ebenfalls durch SB203580 gehemmten JNK mit

verminderter Adhäsion von Brustkrebszellen in Verbindung gebracht (Foldynová-Trantírková et al. 2010). In Zellen des Ovarialkarzinoms jedoch scheint JNK eine adhäsionssteigernde Wirkung zu haben (Siu et al. 2020), welche eine Abnahme der Zelladhäsion unter Behandlung mit SB203580 in der vorliegenden Arbeit erklären könnte. Das deutet auf eine entitätsspezifische Wirkweise der p38^oMAPK hin.

Tabelle 9 Übersicht über die Effekte der beiden Inhibitoren auf das Adhäsionsverhalten der untersuchten Zelllinien.

Die Veränderungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle sind semiquantitativ dargestellt.

	SB203580	Skepinone-L
AU565	--	-
MCF7	--	=
MCF10A	=	=
MDA-MB231	--	-
ZR751	-	-

Ähnliche adhäsionssteigernde Effekte der p38 MAPK beim Brustkrebs wurden auch von Carrascal et al. beschrieben. Jedoch werden dadurch keine tumorsuppressiven Eigenschaften erreicht, entgegen der von der EMT-Theorie abgeleiteten Vermutungen. Haben die Karzinomzellen erst einmal die Blutbahn erreicht und zirkulieren systemisch, ermöglichen spezielle Oberflächen-Glykane, vermittelt über den p38 MAPK-Signalweg, eine erhöhte Affinität zu endothelialen Selektinen, was eine Extravasation und Metastasenbildung begünstigt (Carrascal et al. 2018). Auch die Expression von ICAM-1, einem Glykoprotein, welches die tumor-mesotheliale Adhäsion vermittelt, wird durch die p38 MAPK induziert (Chung et al. 2017). Ebenso wurde die p38 MAPK mit einer gesteigerten Adhäsion von Ovarialkarzinomzellen an den Zellen des Peritoneums in Verbindung gebracht, was eine Peritonealkarzinose begünstigt und somit die Prognose erheblich verschlechtert (Mikula-Pietrasik et al. 2017; Nakamura et al. 2017).

5.5 Bedeutung der p38 MAPK für die Proliferation von

Mammakarzinomzellen

Die physiologische Rolle der p38 MAPK in gesunden Körperzellen wurde vielfach beschrieben als negativer Regulator des Zellzyklus. So konnte gezeigt werden, dass in Fibroblasten nach Exposition gegenüber osmotischen Stress der Tumorsuppressor p53 über p38 MAPK aktiviert und somit der Zellzyklus arretiert wird (Kishi et al. 2001). Ebenso induziert die p38 MAPK nach Aktivierung von Onkoproteinen wie Ras einen zellulären Zustand, den man als Seneszenz

bezeichnet, und der eine weitere Proliferation potenziell entarteter Zellen unterbindet (Kwong et al. 2009). Auch der Tumorsuppressor Rb, der vor allem bei DNA-Schäden aktiviert wird, wird in seiner Funktion durch p38 MAPK stabilisiert (Gubern et al. 2016).

Doch abhängig von dem eingehenden Signal kann der p38 MAPK-Signalweg auch entgegengesetzte, proliferationsfördernde Effekte erreichen. Faust et al. konnten zeigen, dass die Aktivierung der Kinase durch zelluläre Stresssignale zu einer verringerten Proliferation führt, wohingegen mitogene Signale ebenfalls durch p38 MAPK die Zellteilung fördern (Faust et al. 2012). Auch bei Brustkrebszellen wurde die p38 MAPK-Aktivität mit einer gesteigerten Proliferationsrate in Verbindung gebracht: Über die Aktivierung von CDK (Lee et al. 1999) oder als Teil der dem HER2/neu-Rezeptor nachgeschalteten Kaskade (Neve et al. 2002). Aber auch die basale oder induzierte Proliferation von Mammakarzinomzellen soll durch die Blockade der p38 MAPK unterbunden werden (Doğaner et al. 2014; Huth et al. 2017).

In der vorliegenden Arbeit führte sowohl die unspezifische Inhibition der p38 MAPK mit SB203580 als auch die spezifische Hemmung mit Skepinone-L bei der nicht-kanzerösen Zelllinie MCF10A zu keiner Änderung der Proliferation (Tabelle 10: Übersicht über die Effekte der beiden Inhibitoren auf die Proliferation der untersuchten Zelllinien).

Die Veränderungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle sind semiquantitativ dargestellt.) Ähnliche Ergebnisse zeigten sich die Zelllinien AU565 und MCF7. Lediglich bei der Zelllinie MDA-MB231 konnte eine Zunahme der Proliferation beobachtet werden. MDA-MB231 ist eine triple-negative Zelllinie, die weder Hormonrezeptoren, noch HER2/neu exprimiert (vgl. 3.1.10). Dahingegen konnte im Mausmodell unter der Behandlung mit dem Inhibitor LY2228820, der ebenfalls selektiv die α - und β -Isoform der p38 MAPK hemmt, eine Reduktion des Größenwachstums von *xenografts* der triple-negativen Zelllinie MDA-MB468 beobachtet werden, was eine proliferationsfördernde Wirkung dieser Isoformen vermuten lässt (Campbell et al. 2014; Neve et al. 2006). Jedoch konnten auch Jiang et al. zeigen, dass die p38 MAPK-Aktivität in TNBC mit einer reduzierten Proliferation und erhöhten Apoptose der Zellen korreliert (Jiang et al. 2018). Dies lässt vermuten, dass der p38 MAPK in normalem Brustdrüsengewebe ein geringer Einfluss in Bezug auf die Regulation der Zellteilung zukommt, während sie in malignen Zellen, besonders TNBC; insgesamt eher schwach antiproliferativ zu wirken scheint. Daher erscheint eine Inhibition der p38 MAPK in therapeutischer Absicht insbesondere bei triple-negativen Karzinomen nicht sinnvoll; zur genauen Klärung dieser Fragestellung bedarf es weiterer Analysen.

Tabelle 10: Übersicht über die Effekte der beiden Inhibitoren auf die Proliferation der untersuchten Zelllinien.

Die Veränderungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle sind semiquantitativ dargestellt.

	SB203580	Skepinone-L
AU565	=	=
MCF7	=	=
MCF10A	=	=
MDA-MB231	+	+
ZR751	+	-

5.6 Bedeutung der p38 MAPK für die Viabilität von Mammakarzinomzellen

Wie zuvor erwähnt, finden sich in der Literatur Hinweise auf die Beteiligung vor allem der p38 α MAPK an der Apoptoseinduktion nach zellulärem Stress (Wagner und Nebreda 2009). Jedoch scheint dieser Effekt zellspezifisch zu sein: So bestehen Hinweise bei Satellitenzellen der Skelettmuskulatur, dass die α - und β -Isoform der p38 MAPK anti-apoptotisch wirken und die Zellviabilität fördern, während die γ -Isoform pro-apoptotisch wirkt (Lovett et al. 2010). Auch in der HeLa-Zelllinie, die sich vom Zervixkarzinom ableitet, wird der p38 MAPK eine anti-apoptotische Wirkung zugesprochen (Nemoto et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte in fast allen untersuchten Zelllinien durch eine unselektive Inhibition der p38 MAPK mit SB203580 eine Reduktion der Zellviabilität beobachtet werden (Tabelle 11). Dahingegen findet sich unter der Behandlung mit Skepinone-L eine Zunahme der Viabilität, was darauf schließen lässt, dass der p38 α und β MAPK eine tumorsuppressive Wirkung zukommt.

Tabelle 11: Übersicht über die Effekte der beiden Inhibitoren auf die Viabilität der untersuchten Zelllinien.

Die Veränderungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle sind semiquantitativ dargestellt.

	SB203580	Skepinone-L
AU565	--	--
MCF7	-	++
MCF10A	-	++
MDA-MB231	-	++
ZR751	-	++

Tatsächlich verwenden viele Studien, die der p38 MAPK eine viabilitätssteigernde Rolle bei Krebszellen zusprechen, unselektive Inhibitoren (Toraskar et al. 2018). Pei et al. konnten zeigen, dass die durch eine bestimmte Substanz, 14,15 β -Dihydroxyklaineanone, induzierte Reduktion der Viabilität in HCC-Zellen durch Blockade der p38 MAPK mittels siRNA aufgehoben wird (Pei et al. 2020). Demnach wird durch gesteigerte p38 MAPK-Aktivität eine verminderte Tumorzellviabilität beobachtet, vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Interessanterweise konnten Yuan et al. zeigen, dass eine Substanz, Annosquacin B, die Zellviabilität der Zelllinie MCF7 herabsetzt, was mit erhöhtem Aktivierungsgrad der p38 MAPK korrelierte, während die Phosphorylierung der JNK abnahm (Yuan et al. 2016b). Eine mögliche Erklärung für die viabilitätsreduzierenden Effekte der Behandlung mit SB203580 wäre demnach eine Inhibition der JNK, nicht der p38 MAPK. Tatsächlich wird die Aktivität des JNK-Signalwegs mit einem gesteigerten Überleben von Krebszellen in Verbindung gebracht (Wu et al. 2020).

Als einzige Ausnahme hiervon findet sich in der Zelllinie AU565 unter der Behandlung mit Skepinone-L eine Reduktion der Viabilität, sodass hierbei auf einen viabilitätssteigernden Effekt der p38 α und β MAPK ausgegangen werden kann. Die Karzinomzellen der Linie AU565 exprimieren keine Hormonrezeptoren, sind jedoch HER2/neu positiv (vgl. 3.1.10). Do et al. konnten ebenfalls zeigen, dass eine induzierte Zytotoxizität, also eine verminderte Viabilität der Zellen, bei HER2/neu-positiven Mammakarzinomzellen mit reduzierter p38 MAPK-Aktivität einhergeht (Do et al. 2013). Demnach wäre eine viabilitätssteigernde und damit tumorfördernde Rolle der p38 α und β MAPK bei HER2/neu-überexprimierenden Mammakarzinomzellen denkbar.

5.7 p38 MAPK als Tumorsuppressor

In der vorliegenden Arbeit führte eine Hemmung der p38 MAPK mit dem unselektiven Inhibitor SB203580 zu einer ausgeprägteren Reduktion der Tumorzellmigration als die Behandlung mit dem selektiven Skepinone-L. Die Zelladhäsion wurde durch beide Inhibitoren nicht wesentlich oder leicht negativ beeinflusst. Beide Substanzen hatten einen geringen, eher steigernden Effekt auf die Tumorzellproliferation. Unter SB203580 war die Viabilität der Tumorzellen reduziert, während sie unter Skepinone-L gesteigert war. Die teils entgegengesetzten Auswirkungen des unselektiven Inhibitors SB203580 gegenüber dem selektiven Hemmstoff Skepinone-L erlauben eine genauere Zuordnung der Bedeutung der p38 α und β MAPK im Mammakarzinom. Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf einen eher tumorsuppressiven Effekt der p38 α und β MAPK hin.

Tatsächlich sind negative Regulatoren des p38 MAPK-Signalwegs, wie das Gen *PPM1D*, in Brustkrebszelllinien, aber auch in Primärtumoren, amplifiziert (Li et al. 2002; Bulavin et al. 2002). Es ist belegt, dass die Disruption dieses Gens mit folgendem Wegfall dessen Genprodukts, der Phosphatase Wip1, die maligne Zelltransformation durch Onkogene unterbindet. Dies wird erreicht durch die p38 MAPK-abhängige Aktivierung von Tumorsuppressoren wie p53 (Bulavin et al. 2004). Entsprechend scheint die tumorsuppressive Wirkung der p38 MAPK in Zellen mit *PPM1D*-Amplifikation wegzufallen. Von den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien weist die MCF7-Zelllinie eine erhöhte Expression von *PPM1D* auf (Li et al. 2002). Insgesamt finden sich zahlreiche Hinweise auf die wichtige Rolle der p38 MAPK in der Verhinderung der Tumorentstehung durch die Apoptoseinduktion und konsekutiver Unterbindung des Wachstums genetisch alterierter Zellen. So konnten Dolado et al. zeigen, dass in Zellen in Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies, die eine DNA-Schädigung und damit eine maligne Transformation auslösen können, die Apoptose über den p38 MAPK-Signalweg eingeleitet wird (Dolado et al. 2007). Auch beim Mammakarzinom konnte die Apoptoseinduktion durch verschiedene Substanzen auf eine Aktivierung der p38 MAPK zurückgeführt werden (Zhang et al. 2015; Li et al. 2015). Ein weiterer Auslöser der p38 MAPK-gesteuerten Apoptose scheinen Schäden während der DNA-Replikation zu sein, welche potentiell tumorinitiierende Mutationen nach sich ziehen können (Im und Lee 2008).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Aktivierung des p38 MAPK-Signalwegs auch in bereits transformierten, malignen Tumorzellen zu einer Reduktion des metastatischen Potentials führt, indem Zellen aus der Tumorumgebung, sogenannte mesenchymale Stammzellen, gehemmt werden (Hong et al. 2015). Eine ähnliche Wirkung konnte auch für Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden: Durch eine Aktivierung des p38 MAPK-Signalwegs wird eine Expression von receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) verhindert und so die ossäre Metastasierung unterbunden (Yao et al. 2012). Auch andere typische Eigenschaften maligner Zellen, wie eine gesteigerte Proliferation, können durch p38 MAPK reduziert werden, beispielsweise durch eine Antagonisierung des JNK-Signalwegs, sowohl in normalen Körperzellen, als auch in Zellen des Hepatozellulären Karzinoms (Hui et al. 2007). Die Selbsterneuerung von Krebsstammzellen, untersucht für Pankreas-, Kolon- und Mammamalignome, kann durch p38 MAPK unterbunden werden und so das Wachstum des Tumors verhindern (Patel et al. 2016).

Des Weiteren ist die p38 MAPK-Aktivität auch aus therapeutischer Sicht wichtig. Die Überwindung einer Resistenz gegenüber Doxorubicin in multiresistenten Mammakarzinomzellen wird durch die Aktivierung der p38 MAPK erreicht (Fan et al. 2020).

Abschließend weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, unterstützt durch Belege der vorhandenen Literatur, darauf hin, dass aufgrund der tumorsuppressiven Wirkung der p38 α und β MAPK in humanen Mammakarzinomzellen eine Blockade dieses Enzyms in therapeutischer Absicht kritisch hinterfragt werden sollte. Eine Ausnahme hiervon stellen die beobachteten Effekte auf zwei verschiedene Subtypen des Mammakarzinoms dar: In der triple-negativen Zelllinie MDA-MB231 vermittelt die p38 α und β MAPK migrationssteigernde Effekte (vgl. 5.3), und erhöht die Viabilität HER2/neu-überexprimierender Zellen der Linie AU565 (vgl. 5.6). Demnach scheint der p38 α und β MAPK zumindest kontext- und Subtypspezifisch auch tumorfördernde Eigenschaften zuzukommen.

5.8 Ausblick

Als zentrales Element eines intrazellulären Signalwegs ist die p38 MAPK in ein komplexes Netzwerk eingeflochten, dessen Umfang in der Charakterisierung des Signalwegs eine besondere Herausforderung darstellt. Die Einführung neuer Substanzen, wie dem Inhibitor Skepinone-L, der selektiv die p38 α und β MAPK hemmt, bietet neue Möglichkeiten, diesen Signalweg und dessen Bedeutung im Mammakarzinom besser zu verstehen.

Neben der Hemmung auf Ebene des Proteins bestehen weitere Optionen der gezielten Inhibition. So wäre ebenfalls eine Ausschaltung der p38 MAPK-Funktion bei der Translation durch den Einsatz von siRNA denkbar. Auf diese Weise ließen sich ebenfalls die Effekte der p38 MAPK in ihrer jeweiligen Isoform selektiv darstellen.

Da der bisher vielfach eingesetzte Inhibitor SB203580 nicht nur die p38 MAPK, sondern auch zahlreiche andere Kinasen hemmt, wäre eine genaue Betrachtung dieser anderen Signalwege von Interesse. Dazu zählt die Frage, welche anderen Kinasen im Mammakarzinom ebenfalls durch SB203580 inhibiert und welche Effekte durch diese vermittelt werden. Auf diese Weise kann möglicherweise die Doppelrolle der p38 MAPK, die in der bisherigen Literatur durch Einsatz unselektiver Hemmstoffe beschrieben wurde, aufgeklärt werden.

Da die Ergebnisse dieser Arbeit auf teilweise tumorfördernde Eigenschaften der p38 α und β MAPK, zumindest bei speziellen Subtypen des Mammakarzinoms und bestimmten Aspekten des funktionellen Zellverhaltens, schließen lassen, wäre eine genauere Betrachtung der oben genannten Punkte in diesen Fällen von besonderem Interesse. Dadurch könnte eine Subtypspezifische Rolle der p38 MAPK im Mammakarzinom aufgeklärt werden, zusätzlich zu dem angenommenen tumorstadienabhängigen Charakter dieser Kinase, die bereits vermutet wurde (Gupta et al. 2014; Igea und Nebreda 2015).

6 Zusammenfassung

Auf der Suche nach neuen molekularen Zielen zur Behandlung des Mammakarzinoms stellt die p38 MAPK aufgrund ihrer tragenden Rolle bei vielfältigen zellulären Prozessen, wie Proliferation, Differenzierung und Migration, ein potenziell therapeutisch nutzbares *target* dar. Die Frage, ob diesem Enzym dabei eine tumorsuppressive oder -fördernde Bedeutung zukommt, hat sich jedoch bisher noch nicht eindeutig klären lassen (Igea und Nebreda 2015). Grund dafür ist auch die eingeschränkte Aussagekraft von Studien, die zur Klärung dieser Fragestellung etablierte, aber unselektive p38 MAPK-Inhibitoren wie SB203580 verwendet haben. Mit dem neuartigen Skepinone-L, welches ausschließlich p38 α und β MAPK hemmt, steht seit kurzem erstmals ein selektiver Inhibitor zur Verfügung.

Zur genaueren Charakterisierung des p38 MAPK-Signalwegs wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen der beiden Hemmstoffe SB203580 und Skepinone-L auf das funktionelle Verhalten von Mammakarzinomzellen betrachtet. Dabei wurden die Expression der Kinase, sowie die chemotaktische Zellmigration, Adhäsion an EZM-Komponenten sowie Proliferation und Viabilität der Karzinomzellen untersucht.

Es zeigte sich, dass die Hemmung der p38 α und β MAPK mit dem unselektiven Inhibitor SB203580 zu einer ausgeprägteren Reduktion der Tumorzellmigration führt als die Behandlung mit dem selektiven Skepinone-L. Die Zelladhäsion wurde durch beide Inhibitoren nicht wesentlich oder nur leicht negativ beeinflusst. Beide Substanzen hatten einen geringen, eher steigernden Effekt auf die Tumorzellproliferation. Unter SB203580 war die Viabilität der Tumorzellen reduziert, während sie unter Skepinone-L gesteigert war. Als Ausnahme von dieser ansonsten eher tumorsuppressiven Rolle der p38 α und β MAPK finden sich tumorfördernde Eigenschaften abhängig vom Rezeptorprofil der Zellen und betrachtetem Aspekt: So scheint die p38 α und β MAPK die Migration triple-negativer Mammakarzinomzellen zu steigern und erhöht die Viabilität HER2/neu-überexprimierender Brustkrebszellen.

Die teils entgegengesetzten Auswirkungen des unselektiven Inhibitors SB203580 gegenüber dem selektiven Hemmstoff Skepinone-L erlauben eine genauere Zuordnung der Bedeutung der p38 α und β MAPK im Mammakarzinom. Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf einen eher tumorsuppressiven Effekt der p38 α und β MAPK hin. Demnach sollte eine Hemmung der p38 MAPK in therapeutischer Absicht, zumindest ohne die Betrachtung des Hormonrezeptorstatus, in Frage gestellt werden.

7 Referenzen

Literatur

- Aesoy R, Sanchez BC, Norum JH, Lewensohn R, Viktorsson K, Linderholm B (2008) An autocrine VEGF/VEGFR2 and p38 signaling loop confers resistance to 4-hydroxytamoxifen in MCF-7 breast cancer cells. *Molecular cancer research : MCR* 6:1630–1638.
doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-2172
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (2015) *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York
- Astolfi A, Iraci N, Manfroni G, Barreca ML, Cecchetti V (2015) A Comprehensive Structural Overview of p38 α MAPK in Complex with Type I Inhibitors. *ChemMedChem* 10:957–969.
doi:10.1002/cmdc.201500030
- Barnard ME, Boeke CE, Tamimi RM (2015) Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. *Biochimica et biophysica acta* 1856:73–85.
doi:10.1016/j.bbcan.2015.06.002
- Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, Wolf U (2016) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016 [Internet].
<https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/3264/28oaKVmif0wDk.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Zugegriffen: 12. Juli 2020
- Bendell JC, Rodon J, Burris HA, Jonge M de, Verweij J, Birlle D, Demanse D, Buck SS de, Ru QC, Peters M, Goldbrunner M, Baselga J (2012) Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30:282–290.
doi:10.1200/JCO.2011.36.1360
- Bhatt S, Xiao Z, Meng Z, Katzenellenbogen BS (2012) Phosphorylation by p38 mitogen-activated protein kinase promotes estrogen receptor α turnover and functional activity via the SCF(Skp2) proteasomal complex. *Molecular and cellular biology* 32:1928–1943.
doi:10.1128/MCB.06561-11
- Böcker W, Kreipe HH (2012) Mamma. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe HH, Moch H (Hrsg) *Pathologie*. Mit rund 150 Tabellen ; [Plus im Web, mediscript. Elsevier Urban & Fischer, München, S 811–826
- Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C (Hrsg) (2017) *TNM classification of malignant tumours*. John Wiley & Sons Inc, Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ

- Bulavin DV, Demidov ON, Saito S'i, Kauraniemi P, Phillips C, Amundson SA, Ambrosino C, Sauter G, Nebreda AR, Anderson CW, Kallioniemi A, Fornace AJ, Appella E (2002) Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nature genetics* 31:210–215. doi:10.1038/ng894
- Bulavin DV, Phillips C, Nannenga B, Timofeev O, Donehower LA, Anderson CW, Appella E, Fornace AJ (2004) Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nature genetics* 36:343–350. doi:10.1038/ng1317
- Campbell RM, Anderson BD, Brooks NA, Brooks HB, Chan EM, Dios A de, Gilmour R, Graff JR, Jambrina E, Mader M, McCann D, Na S, Parsons SH, Pratt SE, Shih C, Stancato LF, Starling JJ, Tate C, Velasco JA, Wang Y, Ye XS (2014) Characterization of LY2228820 dimesylate, a potent and selective inhibitor of p38 MAPK with antitumor activity. *Molecular cancer therapeutics* 13:364–374. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0513
- Cánovas B, Igea A, Sartori AA, Gomis RR, Paull TT, Isoda M, Pérez-Montoyo H, Serra V, González-Suárez E, Stracker TH, Nebreda AR (2018) Targeting p38 α Increases DNA Damage, Chromosome Instability, and the Anti-tumoral Response to Taxanes in Breast Cancer Cells. *Cancer cell* 33:1094-1110.e8. doi:10.1016/j.ccell.2018.04.010
- Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 75:50–83. doi:10.1128/MMBR.00031-10
- Carrascal MA, Silva M, Ramalho JS, Pen C, Martins M, Pascoal C, Amaral C, Serrano I, Oliveira MJ, Sackstein R, Videira PA (2018) Inhibition of fucosylation in human invasive ductal carcinoma reduces E-selectin ligand expression, cell proliferation, and ERK1/2 and p38 MAPK activation. *Molecular oncology* 12:579–593. doi:10.1002/1878-0261.12163
- Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37–40. doi:10.1038/35065000
- Chen L, Mayer JA, Krisko TI, Speers CW, Wang T, Hilsenbeck SG, Brown PH (2009) Inhibition of the p38 kinase suppresses the proliferation of human ER-negative breast cancer cells. *Cancer research* 69:8853–8861. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1636
- Chen S, Chiu S-K (2015) AP4 activates cell migration and EMT mediated by p53 in MDA-MB-231 breast carcinoma cells. *Molecular and cellular biochemistry* 407:57–68. doi:10.1007/s11010-015-2454-7
- Cheng F, Twardowski L, Fehr S, Aner C, Schaeffeler E, Joos T, Knorpp T, Dorweiler B, Laufer S, Schwab M, Torzewski M (2017) Selective p38 α MAP kinase/MAPK14 inhibition in enzymatically modified LDL-stimulated human monocytes; Implications for atherosclerosis.

- FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 31:674–686. doi:10.1096/fj.201600669R
- Cheskis BJ, Greger JG, Nagpal S, Freedman LP (2007) Signaling by estrogens. *Journal of cellular physiology* 213:610–617. doi:10.1002/jcp.21253
- Chung T-W, Choi H, Lee J-M, Ha S-H, Kwak C-H, Abekura F, Park J-Y, Chang Y-C, Ha K-T, Cho S-H, Chang HW, Lee Y-C, Kim C-H (2017) *Oldenlandia diffusa* suppresses metastatic potential through inhibiting matrix metalloproteinase-9 and intercellular adhesion molecule-1 expression via p38 and ERK1/2 MAPK pathways and induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of ethnopharmacology* 195:309–317. doi:10.1016/j.jep.2016.11.036
- Cicatiello L, Addeo R, Sasso A, Altucci L, Petrizzi VB, Borgo R, Cancemi M, Caporali S, Caristi S, Scafoglio C, Teti D, Bresciani F, Perillo B, Weisz A (2004) Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter. *Molecular and cellular biology* 24:7260–7274. doi:10.1128/MCB.24.16.7260-7274.2004
- Colditz GA, Kaphingst KA, Hankinson SE, Rosner B (2012) Family history and risk of breast cancer: nurses' health study. *Breast cancer research and treatment* 133:1097–1104. doi:10.1007/s10549-012-1985-9
- Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz J-M, Angelis R de, Capocaccia R, Baili P, Rachet B, Gatta G, Hakulinen T, Micheli A, Sant M, Weir HK, Elwood JM, Tsukuma H, Koifman S, e Silva GA, Francisci S, Santaquilani M, Verdecchia A, Storm HH, Young JL (2008) Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *The Lancet Oncology* 9:730–756. doi:10.1016/S1470-2045(08)70179-7
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2001) Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. *The Lancet* 358:1389–1399. doi:10.1016/S0140-6736(01)06524-2
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2019) Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence. *The Lancet* 394:1159–1168. doi:10.1016/S0140-6736(19)31709-X
- Coulthard LR, White DE, Jones DL, McDermott MF, Burchill SA (2009) p38(MAPK); Stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends in molecular medicine* 15:369–379. doi:10.1016/j.molmed.2009.06.005

- Cuadrado A, Nebreda AR (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *The Biochemical journal* 429:403–417. doi:10.1042/BJ20100323
- Cuenda A, Rousseau S (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et biophysica acta* 1773:1358–1375. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.03.010
- Cuenda A, Rouse, Doza, Meier, Cohen, Gallagher, Young, Lee (1995) SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Letters* 364:229–233. doi:10.1016/0014-5793(95)00357-F
- del Barco Barrantes I, Nebreda AR (2012) Roles of p38 MAPKs in invasion and metastasis. *Biochemical Society transactions* 40:79–84. doi:10.1042/BST20110676
- del Barco Barrantes I, Coya JM, Maina F, Arthur JSC, Nebreda AR (2011) Genetic analysis of specific and redundant roles for p38alpha and p38beta MAPKs during mouse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:12764–12769. doi:10.1073/pnas.1015013108
- del Barco Barrantes I, Stephan-Otto Attolini C, Slobodnyuk K, Igea A, Gregorio S, Gawrzak S, Gomis RR, Nebreda AR (2018) Regulation of Mammary Luminal Cell Fate and Tumorigenesis by p38 α . *Stem cell reports* 10:257–271. doi:10.1016/j.stemcr.2017.11.021
- Dérjard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995) Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science (New York, N.Y.)* 267:682–685. doi:10.1126/science.7839144
- Do MT, Kim HG, Choi JH, Khanal T, Park BH, Tran TP, Jeong TC, Jeong HG (2013) Antitumor efficacy of piperine in the treatment of human HER2-overexpressing breast cancer cells. *Food chemistry* 141:2591–2599. doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.125
- Doğaner F, Turgut Coşan D, Güneş HV, Değirmenci I, Bal C (2014) The effects of p38 gene silencing on breast cancer cells. *Molecular biology reports* 41:2923–2927. doi:10.1007/s11033-014-3148-z
- Dolado I, Swat A, Ajenjo N, Vita G de, Cuadrado A, Nebreda AR (2007) p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer cell* 11:191–205. doi:10.1016/j.ccr.2006.12.013
- Donnelly SM, Paplomata E, Peake BM, Sanabria E, Chen Z, Nahta R (2014) P38 MAPK contributes to resistance and invasiveness of HER2- overexpressing breast cancer. *Current medicinal chemistry* 21:501–510. doi:10.2174/0929867320666131119155023
- Doza YN, Cuenda A, Thomas GM, Cohen P, Nebreda AR (1995) Activation of the MAP kinase homologue RK requires the phosphorylation of Thr-180 and Tyr-182 and both

residues are phosphorylated in chemically stressed KB cells. *FEBS Letters* 364:223–228. doi:10.1016/0014-5793(95)00346-B

Düzgün ŞA, Yerlikaya A, Zeren S, Bayhan Z, Okur E, Boyacı İ (2017) Differential effects of p38 MAP kinase inhibitors SB203580 and SB202190 on growth and migration of human MDA-MB-231 cancer cell line. *Cytotechnology* 69:711–724. doi:10.1007/s10616-017-0079-2

Eberl MM, Sunga AY, Farrell CD, Mahoney MC (2005) Patients with a family history of cancer: identification and management. *The Journal of the American Board of Family Practice* 18:211–217. doi:10.3122/jabfm.18.3.211

Esteva FJ, Sahin AA, Smith TL, Yang Y, Pusztai L, Nahta R, Buchholz TA, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Bacus SS (2004) Prognostic significance of phosphorylated P38 mitogen-activated protein kinase and HER-2 expression in lymph node-positive breast carcinoma. *Cancer* 100:499–506. doi:10.1002/cncr.11940

Fabian MA, Biggs WH, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, Carter TA, Ciceri P, Edeen PT, Floyd M, Ford JM, Galvin M, Gerlach JL, Grotzfeld RM, Herrgard S, Insko DE, Insko MA, Lai AG, Lélías J-M, Mehta SA, Milanov ZV, Velasco AM, Wodicka LM, Patel HK, Zarrinkar PP, Lockhart DJ (2005) A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nature biotechnology* 23:329–336. doi:10.1038/nbt1068

Fan Y, Ma K, Jing J, Wang C, Hu Y, Shi Y, Li E, Geng Q (2020) Recombinant Dual-target MDM2/MDMX Inhibitor Reverses Doxorubicin Resistance through Activation of the TAB1/TAK1/p38 MAPK Pathway in Wild-type p53 Multidrug-resistant Breast Cancer Cells. *Journal of Cancer* 11:25–40. doi:10.7150/jca.32765

Faust D, Schmitt C, Oesch F, Oesch-Bartlomowicz B, Schreck I, Weiss C, Dietrich C (2012) Differential p38-dependent signalling in response to cellular stress and mitogenic stimulation in fibroblasts. *Cell communication and signaling : CCS* 10:6. doi:10.1186/1478-811X-10-6

Ferreiro I, Joaquin M, Islam A, Gomez-Lopez G, Barragan M, Lombardía L, Domínguez O, Pisano DG, Lopez-Bigas N, Nebreda AR, Posas F (2010) Whole genome analysis of p38 SAPK-mediated gene expression upon stress. *BMC genomics* 11:144. doi:10.1186/1471-2164-11-144

Fishman J, Nisselbaum JS, Menendez-Botet CJ, Schwartz MK (1977) Estrone and estradiol content in human breast tumors: Relationship to estradiol receptors. *Journal of Steroid Biochemistry* 8:893–896. doi:10.1016/0022-4731(77)90100-5

Foldynová-Trantírková S, Sekyrová P, Tmejová K, Brumovská E, Bernatík O, Blankenfeldt W, Krejčí P, Kozubík A, Dolezal T, Trantírek L, Bryja V (2010) Breast cancer-specific mutations in CK1epsilon inhibit Wnt/beta-catenin and activate the Wnt/Rac1/JNK and NFAT

pathways to decrease cell adhesion and promote cell migration. *Breast cancer research* : BCR 12:R30. doi:10.1186/bcr2581

Fox EM, Miller TW, Balko JM, Kuba MG, Sánchez V, Smith RA, Liu S, González-Angulo AM, Mills GB, Ye F, Shyr Y, Manning HC, Buck E, Arteaga CL (2011) A kinome-wide screen identifies the insulin/IGF-I receptor pathway as a mechanism of escape from hormone dependence in breast cancer. *Cancer research* 71:6773–6784. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1295

Gangwal RP, Bhadauriya A, Damre MV, Dhoke GV, Sangamwar AT (2013) p38 Mitogen-activated protein kinase inhibitors: a review on pharmacophore mapping and QSAR studies. *Current topics in medicinal chemistry* 13:1015–1035. doi:10.2174/1568026611313090005

Gubern A, Joaquin M, Marquès M, Maseres P, Garcia-Garcia J, Amat R, González-Nuñez D, Oliva B, Real FX, Nadal E de, Posas F (2016) The N-Terminal Phosphorylation of RB by p38 Bypasses Its Inactivation by CDKs and Prevents Proliferation in Cancer Cells. *Molecular cell* 64:25–36. doi:10.1016/j.molcel.2016.08.015

Gupta J, del BBI, Igea A, Sakellariou S, Pateras IS, Gorgoulis VG, Nebreda AR (2014) Dual Function of p38 α MAPK in Colon Cancer: Suppression of Colitis-Associated Tumor Initiation but Requirement for Cancer Cell Survival. *Cancer cell* 25. doi:10.1016/j.ccr.2014.02.019

Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, Mohsin SK, Shou J, Allred DC, Schiff R, Osborne CK, Dowsett M (2005) Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer; Relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23:2469–2476. doi:10.1200/JCO.2005.01.172

Haakensen VD, Lingjaerde OC, Lüders T, Riis M, Prat A, Troester MA, Holmen MM, Frantzen JO, Romundstad L, Navjord D, Bukholm IK, Johannesen TB, Perou CM, Ursin G, Kristensen VN, Børresen-Dale A-L, Helland A (2011) Gene expression profiles of breast biopsies from healthy women identify a group with claudin-low features. *BMC medical genomics* 4:77. doi:10.1186/1755-8794-4-77

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer; The next generation. *Cell* 144:646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

Hedrick E, Safe S (2017) Transforming Growth Factor β /NR4A1-Inducible Breast Cancer Cell Migration and Epithelial-to-Mesenchymal Transition Is p38 α (Mitogen-Activated Protein Kinase 14) Dependent. *Molecular and cellular biology* 37. doi:10.1128/MCB.00306-17

Hong B, Li H, Zhang M, Xu J, Lu Y, Zheng Y, Qian J, Chang JT, Yang J, Yi Q (2015) p38 MAPK inhibits breast cancer metastasis through regulation of stromal expansion. *International journal of cancer* 136:34–43. doi:10.1002/ijc.28958

- Hsieh M-J, Chen K-S, Chiou H-L, Hsieh Y-S (2010) Carbonic anhydrase XII promotes invasion and migration ability of MDA-MB-231 breast cancer cells through the p38 MAPK signaling pathway. *European journal of cell biology* 89:598–606. doi:10.1016/j.ejcb.2010.03.004
- Huang S, New L, Pan Z, Han J, Nemerow GR (2000) Urokinase Plasminogen Activator/Urokinase-specific Surface Receptor Expression and Matrix Invasion by Breast Cancer Cells Requires Constitutive p38 α Mitogen-activated Protein Kinase Activity. *The Journal of biological chemistry* 275:12266–12272. doi:10.1074/jbc.275.16.12266
- Huber MA, Kraut N, Beug H (2005) Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Current opinion in cell biology* 17:548–558. doi:10.1016/j.ceb.2005.08.001
- Hui L, Bakiri L, Mairhorfer A, Schweifer N, Haslinger C, Kenner L, Komnenovic V, Scheuch H, Beug H, Wagner EF (2007) p38 α suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nature genetics* 39:741–749. doi:10.1038/ng2033
- Huth HW, Santos DM, Gravina HD, Resende JM, Goes AM, Lima ME de, Ropert C (2017) Upregulation of p38 pathway accelerates proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Oncology reports* 37:2497–2505. doi:10.3892/or.2017.5452
- Igea A, Nebreda AR (2015) The Stress Kinase p38 α as a Target for Cancer Therapy. *Cancer research* 75:3997–4002. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0173
- Im J-S, Lee J-K (2008) ATR-dependent activation of p38 MAP kinase is responsible for apoptotic cell death in cells depleted of Cdc7. *The Journal of biological chemistry* 283:25171–25177. doi:10.1074/jbc.M802851200
- International Agency for Research on Cancer (Hrsg) (2019) Global Cancer Observatory; Cancer Today, Fact Sheet Germany [Internet]. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/276-germany-fact-sheets.pdf>. Zugegriffen: 04. Januar 2020
- Jagannathan NR, Sharma U (2017) Breast Tissue Metabolism by Magnetic Resonance Spectroscopy. *Metabolites* 7:25. doi:10.3390/metabo7020025
- Jeng MH, Yue W, Eischeid A, Wang JP, Santen RJ (2000) Role of MAP kinase in the enhanced cell proliferation of long term estrogen deprived human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* 62:167–175. doi:10.1023/a:1006406030612
- Jiang L, Wang Y, Liu G, Liu H, Zhu F, Ji H, Li B (2018) C-Phycocyanin exerts anti-cancer effects via the MAPK signaling pathway in MDA-MB-231 cells. *Cancer cell international* 18:12. doi:10.1186/s12935-018-0511-5

- Katalinic A, Eisemann N, Kraywinkel K, Noftz MR, Hübner J (2019) Breast cancer incidence and mortality before and after implementation of the German mammography screening program. *International journal of cancer*. doi:10.1002/ijc.32767
- Kishi H, Nakagawa K, Matsumoto M, Suga M, Ando M, Taya Y, Yamaizumi M (2001) Osmotic shock induces G1 arrest through p53 phosphorylation at Ser33 by activated p38MAPK without phosphorylation at Ser15 and Ser20. *The Journal of biological chemistry* 276:39115–39122. doi:10.1074/jbc.M105134200
- Koeberle SC, Romir J, Fischer S, Koeberle A, Schattel V, Albrecht W, Grütter C, Werz O, Rauh D, Stehle T, Laufer SA (2011) Skepinone-L is a selective p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor. *Nature chemical biology* 8:141–143. doi:10.1038/nchembio.761
- Koul HK, Pal M, Koul S (2013) Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Genes & cancer* 4:342–359. doi:10.1177/1947601913507951
- Kulbe H, Thompson R, Wilson JL, Robinson S, Hagemann T, Fatah R, Gould D, Ayhan A, Balkwill F (2007) The Inflammatory Cytokine Tumor Necrosis Factor- α Generates an Autocrine Tumor-Promoting Network in Epithelial Ovarian Cancer Cells. *Cancer research* 67:585–592. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2941
- Kumar S, Jiang MS, Adams JL, Lee JC (1999) Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochemical and biophysical research communications* 263:825–831. doi:10.1006/bbrc.1999.1454
- Kwong J, Hong L, Liao R, Deng Q, Han J, Sun P (2009) p38alpha and p38gamma mediate oncogenic ras-induced senescence through differential mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 284:11237–11246. doi:10.1074/jbc.M808327200
- Kyriakis JM, Avruch J (2012) Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiological reviews* 92:689–737. doi:10.1152/physrev.00028.2011
- Lali FV, Hunt AE, Turner SJ, Foxwell BM (2000) The pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 blocks phosphoinositide-dependent protein kinase activity, protein kinase B phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in interleukin-2-stimulated T cells independently of p38 mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 275:7395–7402. doi:10.1074/jbc.275.10.7395
- Lee A, Djamgoz MBA (2018) Triple negative breast cancer: Emerging therapeutic modalities and novel combination therapies. *Cancer treatment reviews* 62:110–122. doi:10.1016/j.ctrv.2017.11.003

- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, Strickler JE, McLaughlin MM, Siemens IR, Fisher SM, Livi GP, White JR, Adams JL, Young PR (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372:739–746. doi:10.1038/372739a0
- Lee RJ, Albanese C, Stenger RJ, Watanabe G, Inghirami G, Haines GK, Webster M, Muller WJ, Brugge JS, Davis RJ, Pestell RG (1999) pp60 v-src Induction of Cyclin D1 Requires Collaborative Interactions between the Extracellular Signal-regulated Kinase, p38, and Jun Kinase Pathways. *The Journal of biological chemistry* 274:7341–7350. doi:10.1074/jbc.274.11.7341
- Leitlinienprogramm Onkologie L (Hrsg) (2018) Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms; Langversion 4.1, September 2018. Zuckschwerdt, Germering
- Leong KG, Niessen K, Kulic I, Raouf A, Eaves C, Pollet I, Karsan A (2007) Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *The Journal of experimental medicine* 204:2935–2948. doi:10.1084/jem.20071082
- Li J, Yang Y, Peng Y, Austin RJ, van Eyndhoven WG, Nguyen KCQ, Gabriele T, McCurrach ME, Marks JR, Hoey T, Lowe SW, Powers S (2002) Oncogenic properties of PPM1D located within a breast cancer amplification epicenter at 17q23. *Nature genetics* 31:133–134. doi:10.1038/ng888
- Li J-P, Yang Y-X, Liu Q-L, Pan S-T, He Z-X, Zhang X, Yang T, Chen X-W, Wang D, Qiu J-X, Zhou S-F (2015) The investigational Aurora kinase A inhibitor alisertib (MLN8237) induces cell cycle G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via p38 MAPK and Akt/mTOR signaling pathways in human breast cancer cells. *Drug design, development and therapy* 9:1627–1652. doi:10.2147/DDDT.S75378
- Li X, Oprea-Ilie GM, Krishnamurti U (2017) New Developments in Breast Cancer and Their Impact on Daily Practice in Pathology. *Archives of pathology & laboratory medicine* 141:490–498. doi:10.5858/arpa.2016-0288-SA
- Lin S-C, Lin C-H, Shih N-C, Liu H-L, Wang W-C, Lin K-Y, Liu Z-Y, Tseng Y-J, Chang H-K, Lin Y-C, Yeh Y-C, Minato H, Fujii T, Wu Y-C, Chen M-Y, Chou T-Y (2020) Cellular prion protein transcriptionally regulated by NFIL3 enhances lung cancer cell lamellipodium formation and migration through JNK signaling. *Oncogene* 39:385–398. doi:10.1038/s41388-019-0994-0
- Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U, Skoog L, Lehtiö J (2011) Vascular endothelial growth factor receptor 2 and downstream p38 mitogen-activated protein kinase are possible

- candidate markers of intrinsic resistance to adjuvant endocrine treatment in steroid receptor positive breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 125:457–465. doi:10.1007/s10549-010-1252-x
- Lovett FA, Cosgrove RA, Gonzalez I, Pell JM (2010) Essential role for p38alpha MAPK but not p38gamma MAPK in Igf2 expression and myoblast differentiation. *Endocrinology* 151:4368–4380. doi:10.1210/en.2010-0209
- Lüllmann-Rauch R, Paulsen F (2012) *Taschenlehrbuch Histologie; 10 Tabellen*. Thieme, Stuttgart
- Lupien M, Meyer CA, Bailey ST, Eeckhoutte J, Cook J, Westerling T, Zhang X, Carroll JS, Rhodes DR, Liu XS, Brown M (2010) Growth factor stimulation induces a distinct ER(alpha) cistrome underlying breast cancer endocrine resistance. *Genes & development* 24:2219–2227. doi:10.1101/gad.1944810
- Lyons TG (2019) Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. *Current treatment options in oncology* 20:82. doi:10.1007/s11864-019-0682-x
- Marshall CJ (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179–185. doi:10.1016/0092-8674(95)90401-8
- Masià J, Merchán-Galvis Á, Salas K, Requeijo C, Cánovas E, Quintana MJ, Bonfill X (2019) Socio-economic impact on women diagnosed and treated for breast cancer: a cross-sectional study. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 21:1736–1745. doi:10.1007/s12094-019-02185-w
- Matsuyama D, Kawahara K (2011) Oxidative stress-induced formation of a positive-feedback loop for the sustained activation of p38 MAPK leading to the loss of cell division in cardiomyocytes soon after birth. *Basic research in cardiology* 106:815–828. doi:10.1007/s00395-011-0178-8
- Merlin J-L, Harlé A, Lion M, Ramacci C, Leroux A (2013) Expression and activation of P38 MAP kinase in invasive ductal breast cancers; Correlation with expression of the estrogen receptor, HER2 and downstream signaling phosphorylated proteins. *Oncology reports* 30:1943–1948. doi:10.3892/or.2013.2645
- Mikuła-Pietrasik J, Uruski P, Pakuła M, Maksin K, Szubert S, Woźniak A, Naumowicz E, Szperek D, Tykarski A, Książek K (2017) Oxidative stress contributes to hepatocyte growth factor-dependent pro-senescence activity of ovarian cancer cells. *Free radical biology & medicine* 110:270–279. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.06.015

- Miller TW, Hennessy BT, González-Angulo AM, Fox EM, Mills GB, Chen H, Higham C, García-Echeverría C, Shyr Y, Arteaga CL (2010) Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer. *The Journal of clinical investigation* 120:2406–2413. doi:10.1172/JCI41680
- Morrison DK, Davis RJ (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annual review of cell and developmental biology* 19:91–118. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.111401.091942
- Mudgett JS, Ding J, Guh-Siesel L, Chartrain NA, Yang L, Gopal S, Shen MM (2000) Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:10454–10459. doi:10.1073/pnas.180316397
- Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR (2005) Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *American journal of clinical pathology* 123:21–27. doi:10.1309/4wv79n2ghj3x1841
- Nakamura K, Peng Y, Utsumi F, Tanaka H, Mizuno M, Toyokuni S, Hori M, Kikkawa F, Kajiyama H (2017) Novel Intraperitoneal Treatment With Non-Thermal Plasma-Activated Medium Inhibits Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells. *Scientific reports* 7:6085. doi:10.1038/s41598-017-05620-6
- Naldini A, Filippi I, Miglietta D, Moschetta M, Giavazzi R, Carraro F (2010) Interleukin-1 β regulates the migratory potential of MDAMB231 breast cancer cells through the hypoxia-inducible factor-1 α . *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 46:3400–3408. doi:10.1016/j.ejca.2010.07.044
- Nemoto S, Xiang J, Huang S, Lin A (1998) Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 273:16415–16420. doi:10.1074/jbc.273.26.16415
- Neve RM, Holbro T, Hynes NE (2002) Distinct roles for phosphoinositide 3-kinase, mitogen-activated protein kinase and p38 MAPK in mediating cell cycle progression of breast cancer cells. *Oncogene* 21:4567–4576. doi:10.1038/sj.onc.1205555
- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe J-P, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo W-L, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW (2006) A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell* 10:515–527. doi:10.1016/j.ccr.2006.10.008

- Oh AS, Lorant LA, Holloway JN, Miller DL, Kern FG, El-Ashry D (2001) Hyperactivation of MAPK induces loss of ERalpha expression in breast cancer cells. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.) 15:1344–1359. doi:10.1210/mend.15.8.0678
- Owens DM, Keyse SM (2007) Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* 26:3203–3213. doi:10.1038/sj.onc.1210412
- Park S, Han S-H, Kim H-G, Jeong J, Choi M, Kim H-Y, Kim M-G, Park J-K, Han JE, Cho G-J, Kim MO, Ryoo ZY, Choi S-K (2019) PRPF4 is a novel therapeutic target for the treatment of breast cancer by influencing growth, migration, invasion, and apoptosis of breast cancer cells via p38 MAPK signaling pathway. *Molecular and cellular probes* 47:101440. doi:10.1016/j.mcp.2019.101440
- Patel NJ, Sharon C, Baranwal S, Boothello RS, Desai UR, Patel BB (2016) Heparan sulfate hexasaccharide selectively inhibits cancer stem cells self-renewal by activating p38 MAP kinase. *Oncotarget* 7:84608–84622. doi:10.18632/oncotarget.12358
- Pei X-D, He S-Q, Shen L-Q, Wei J-C, Li X-S, Wei Y-Y, Zhang Y-M, Wang X-Y, Lin F, He Z-L, Jiang L-H (2020) 14,15 β -dihydroxyklinganeone inhibits HepG2 cell proliferation and migration through p38MAPK pathway. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. doi:10.1111/jphp.13289
- Peng Y-H, Shiao H-Y, Tu C-H, Liu P-M, Hsu JT-A, Amancha PK, Wu J-S, Coumar MS, Chen C-H, Wang S-Y, Lin W-H, Sun H-Y, Chao Y-S, Lyu P-C, Hsieh H-P, Wu S-Y (2013) Protein kinase inhibitor design by targeting the Asp-Phe-Gly (DFG) motif: the role of the DFG motif in the design of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* 56:3889–3903. doi:10.1021/jm400072p
- Pereira L, Igea A, Canovas B, Dolado I, Nebreda AR (2013) Inhibition of p38 MAPK sensitizes tumour cells to cisplatin-induced apoptosis mediated by reactive oxygen species and JNK. *EMBO molecular medicine* 5:1759–1774. doi:10.1002/emmm.201302732
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge Ø, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale A-L, Brown PO, Botstein D (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747–752. doi:10.1038/35021093
- Robert Koch-Institut (Hrsg) (2019) Krebs in Deutschland für 2015/2016 [Internet]. <https://edoc.rki.de/handle/176904/6012>. Zugegriffen: 12. Juli 2020
- Rocca A, Farolfi A, Bravaccini S, Schirone A, Amadori D (2014) Palbociclib (PD 0332991) : targeting the cell cycle machinery in breast cancer. *Expert opinion on pharmacotherapy* 15:407–420. doi:10.1517/14656566.2014.870555

- Salvador JM, Mittelstadt PR, Guszczynski T, Copeland TD, Yamaguchi H, Appella E, Fornace AJ, Ashwell JD (2005) Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nature immunology* 6:390–395. doi:10.1038/ni1177
- Saranya J, Shilpa G, Raghu KG, Priya S (2017) *Morus alba* Leaf Lectin (MLL) Sensitizes MCF-7 Cells to Anoikis by Inhibiting Fibronectin Mediated Integrin-FAK Signaling through Ras and Activation of P38 MAPK. *Frontiers in pharmacology* 8:34. doi:10.3389/fphar.2017.00034
- Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, Matsumoto K, Takeuchi O, Akira S (2005) Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nature immunology* 6:1087–1095. doi:10.1038/ni1255
- Schmid P, Rugo HS, Adams S, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, Diéras V, Henschel V, Molinero L, Chui SY, Maiya V, Husain A, Winer EP, Loi S, Emens LA (2020) Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 21:44–59. doi:10.1016/S1470-2045(19)30689-8
- Schnell MW, Schulz C (2012) *Basiswissen Palliativmedizin*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Sharaf H, Matou-Nasri S, Wang Q, Rabhan Z, Al-Eidi H, Al Abdulrahman A, Ahmed N (2015) Advanced glycation endproducts increase proliferation, migration and invasion of the breast cancer cell line MDA-MB-231. *Biochimica et biophysica acta* 1852:429–441. doi:10.1016/j.bbadis.2014.12.009
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2019) Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians* 69:7–34. doi:10.3322/caac.21551
- Sinn H-P, Kreipe H (2013) A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast care (Basel, Switzerland)* 8:149–154. doi:10.1159/000350774
- Siu MKY, Jiang Y-X, Wang J-J, Leung THY, Ngu SF, Cheung ANY, Ngan HYS, Chan KKL (2020) PDK1 promotes ovarian cancer metastasis by modulating tumor-mesothelial adhesion, invasion, and angiogenesis via $\alpha 5\beta 1$ integrin and JNK/IL-8 signaling. *Oncogenesis* 9:24. doi:10.1038/s41389-020-0209-0
- Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor

subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:10869–10874. doi:10.1073/pnas.191367098

Stepniak E, Ricci R, Eferl R, Sumara G, Sumara I, Rath M, Hui L, Wagner EF (2006) c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity. *Genes & development* 20:2306–2314. doi:10.1101/gad.390506

Stingl J, Raouf A, Eirew P, Eaves CJ (2006) Deciphering the mammary epithelial cell hierarchy. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 5:1519–1522. doi:10.4161/cc.5.14.2983

Suarez-Cuervo C, Merrell MA, Watson L, Harris KW, Rosenthal EL, Väänänen HK, Selander KS (2004) Breast Cancer Cells With Inhibition of p38alpha Have Decreased MMP-9 Activity and Exhibit Decreased Bone Metastasis in Mice. *Clinical & experimental metastasis* 21. doi:10.1007/s10585-004-3503-x

Sukhtankar D, Okun A, Chandramouli A, Nelson MA, Vanderah TW, Cress AE, Porreca F, King T (2011) Inhibition of p38-MAPK signaling pathway attenuates breast cancer induced bone pain and disease progression in a murine model of cancer-induced bone pain. *Molecular pain* 7:81. doi:10.1186/1744-8069-7-81

Sumara G, Formentini I, Collins S, Sumara I, Windak R, Bodenmiller B, Ramracheya R, Caille D, Jiang H, Platt KA, Meda P, Aebersold R, Rorsman P, Ricci R (2009) Regulation of PKD by the MAPK p38delta in insulin secretion and glucose homeostasis. *Cell* 136:235–248. doi:10.1016/j.cell.2008.11.018

Sun Y-S, Zhao Z, Yang Z-N, Xu F, Lu H-J, Zhu Z-Y, Shi W, Jiang J, Yao P-P, Zhu H-P (2017) Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International journal of biological sciences* 13:1387–1397. doi:10.7150/ijbs.21635

The Institute of Cancer Research London (Hrsg) (2020) canSAR; MDAMB231 | breast, adenocarcinoma, cancer, carcinoma | Mutations | Cell Line overview | Cancer [Internet]. <https://cansarblack.icr.ac.uk/cell-line/MDA-MB-231/mutations>. Zugegriffen: 11. Juli 2020

Theodosiou A, Ashworth A (2002) MAP kinase phosphatases. *Genome biology* 3:REVIEWS3009. doi:10.1186/gb-2002-3-7-reviews3009

Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139:871–890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007

Tolaney SM, Barry WT, Dang CT, Yardley DA, Moy B, Marcom PK, Albain KS, Rugo HS, Ellis M, Shapira I, Wolff AC, Carey LA, Overmoyer BA, Partridge AH, Guo H, Hudis CA, Krop IE, Burstein HJ, Winer EP (2015) Adjuvant paclitaxel and trastuzumab for node-negative, HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine* 372:134–141. doi:10.1056/NEJMoa1406281

- Toraskar J, Magnussen SN, Chawla K, Svineng G, Steigedal TS (2018) Nephronectin mediates p38 MAPK-induced cell viability via its integrin-binding enhancer motif. *FEBS open bio* 8:1992–2001. doi:10.1002/2211-5463.12544
- Trempelec N, Dave-Coll N, Nebreda AR (2013) SnapShot: p38 MAPK Substrates. *Cell* 152:924-924.e1. doi:10.1016/j.cell.2013.01.047
- Turner N, Pearson A, Sharpe R, Lambros M, Geyer F, Lopez-Garcia MA, Natrajan R, Marchio C, Iorns E, Mackay A, Gillett C, Grigoriadis A, Tutt A, Reis-Filho JS, Ashworth A (2010) FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer research* 70:2085–2094. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3746
- Vergote I, Heitz F, Buderath P, Powell M, Sehouli J, Lee CM, Hamilton A, Fiorica J, Moore KN, Teneriello M, Golden L, Zhang W, Pitou C, Bell R, Campbell R, Farrington DL, Bell-McGuinn K, Wenham RM (2020) A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 1b/2 Study of Ralimetinib, a p38 MAPK Inhibitor, Plus Gemcitabine and Carboplatin Versus Gemcitabine and Carboplatin for Women With Recurrent Platinum-Sensitive Ovarian Cancer. *Gynecologic oncology* 156. doi:10.1016/j.ygyno.2019.11.006
- Wada M, Canals D, Adada M, Coant N, Salama MF, Helke KL, Arthur JS, Shroyer KR, Kitatani K, Obeid LM, Hannun YA (2017) P38 delta MAPK promotes breast cancer progression and lung metastasis by enhancing cell proliferation and cell detachment. *Oncogene* 36:6649–6657. doi:10.1038/onc.2017.274
- Wagner EF, Nebreda AR (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature reviews. Cancer* 9:537–549. doi:10.1038/nrc2694
- Walter M, Liang S, Ghosh S, Hornsby PJ, Li R (2009) Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 28:2745–2755. doi:10.1038/onc.2009.130
- Wang Z, Harkins PC, Ulevitch RJ, Han J, Cobb MH, Goldsmith EJ (1997) The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:2327–2332. doi:10.1073/pnas.94.6.2327
- Wang R, Li Z-Q, Han X, Li B-L, Mi X-Y, Sun L-M, Song M, Han Y-C, Zhao Y, Wang E-H (2010) Integrin β 3 and its ligand regulate the expression of uPA through p38 MAPK in breast cancer. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 118:909–917. doi:10.1111/j.1600-0463.2010.02687.x
- Wang X-F, Zhou Q-M, Du J, Zhang H, Lu Y-Y, Su S-B (2013) Baicalin suppresses migration, invasion and metastasis of breast cancer via p38MAPK signaling pathway. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 13:923–931. doi:10.2174/18715206113139990143

- Wang L-P, Cao J, Zhang J, Wang B-Y, Hu X-C, Shao Z-M, Wang Z-H, Ou Z-L (2015) The human chemokine receptor CCRL2 suppresses chemotaxis and invasion by blocking CCL2-induced phosphorylation of p38 MAPK in human breast cancer cells. *Medical oncology* (Northwood, London, England) 32:254. doi:10.1007/s12032-015-0696-6
- Wang B, Jiang H, Ma N, Wang Y (2016) Phosphorylated-p38 mitogen-activated protein kinase expression is associated with clinical factors in invasive breast cancer. *SpringerPlus* 5:934. doi:10.1186/s40064-016-2636-0
- Wee ZN, Yatim SMJM, Kohlbauer VK, Feng M, Goh JY, Bao Y, Yi B, Lee PL, Zhang S, Wang PP, Lim E, Tam WL, Cai Y, Ditzel HJ, Hoon DSB, Tan EY, Yu Q (2015) IRAK1 is a therapeutic target that drives breast cancer metastasis and resistance to paclitaxel. *Nature communications* 6:8746. doi:10.1038/ncomms9746
- Weizmann Institute of Science (Hrsg) (2020) PathCards :: Pathway; Signaling mediated by p38-alpha and p38-beta [Internet]. <https://pathcards.genecards.org/Pathway/78>. Zugegriffen: 10. Juli 2020
- Wu X, Zhang W, Font-Burgada J, Palmer T, Hamil AS, Biswas SK, Poidinger M, Borcherding N, Xie Q, Ellies LG, Lytle NK, Wu L-W, Fox RG, Yang J, Dowdy SF, Reya T, Karin M (2014) Ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 controls breast cancer metastasis through a TAK1-p38 MAP kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:13870–13875. doi:10.1073/pnas.1414358111
- Wu M-Z, Chen S-F, Nieh S, Benner C, Ger L-P, Jan C-I, Ma L, Chen C-H, Hishida T, Chang H-T, Lin Y-S, Montserrat N, Gascon P, Sancho-Martinez I, Izpisua Belmonte JC (2015) Hypoxia Drives Breast Tumor Malignancy through a TET-TNF α -p38-MAPK Signaling Axis. *Cancer research* 75:3912–3924. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3208
- Wu Q, Wu W, Jacevic V, Franca TCC, Wang X, Kuca K (2020) Selective inhibitors for JNK signalling: a potential targeted therapy in cancer. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 35:574–583. doi:10.1080/14756366.2020.1720013
- Yang Y, Cheon S, Jung MK, Song SB, Kim D, Kim HJ, Park H, Bang SI, Cho D (2015) Interleukin-18 enhances breast cancer cell migration via down-regulation of claudin-12 and induction of the p38 MAPK pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 459:379–386. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.108
- Yao Y, Fang Z-P, Chen H, Yue L, Min D-I, Tang L-N, Yu W-X, Kung HF, Lin MC, Shen Z (2012) HGFK1 inhibits bone metastasis in breast cancer through the TAK1/p38 MAPK signaling pathway. *Cancer gene therapy* 19:601–608. doi:10.1038/cgt.2012.38

- Yates LR, Gerstung M, Knappskog S et al (2015) Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multiregion sequencing. *Nature medicine* 21:751–759. doi:10.1038/nm.3886
- Yuan Z-Q, Feldman RI, Sussman GE, Coppola D, Nicosia SV, Cheng JQ (2016a) AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1. IMPLICATION OF AKT2 IN CHEMORESISTANCE. *The Journal of biological chemistry* 291:22847. doi:10.1074/jbc.A116.302674
- Yuan F, Bai G, Miao Y, Chen Y, Li X, Chen J (2016b) Annosquacin B induces mitochondrial apoptosis in multidrug resistant human breast cancer cell line MCF-7/ADR through selectively modulating MAPKs pathways. *Pharmaceutical biology* 54:3040–3045. doi:10.1080/13880209.2016.1200634
- Zhang X, Lin M, van Golen KL, Yoshioka K, Itoh K, Yee D (2005) Multiple signaling pathways are activated during insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulated breast cancer cell migration. *Breast cancer research and treatment* 93:159–168. doi:10.1007/s10549-005-4626-8
- Zhang X, Wang X, Wu T, Li B, Liu T, Wang R, Liu Q, Liu Z, Gong Y, Shao C (2015) Isoliensinine induces apoptosis in triple-negative human breast cancer cells through ROS generation and p38 MAPK/JNK activation. *Scientific reports* 5:12579. doi:10.1038/srep12579
- Zhao M, Howard EW, Parris AB, Guo Z, Zhao Q, Yang X (2017) Alcohol promotes migration and invasion of triple-negative breast cancer cells through activation of p38 MAPK and JNK. *Molecular carcinogenesis* 56:849–862. doi:10.1002/mc.22538

8 Anhang: Werte zu den Abbildungen und Tabellen

Werte zu Abbildung 5: Expression von p38 MAPK unter Einfluss steigender Konzentrationen der p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L in der Zelllinie AU565.

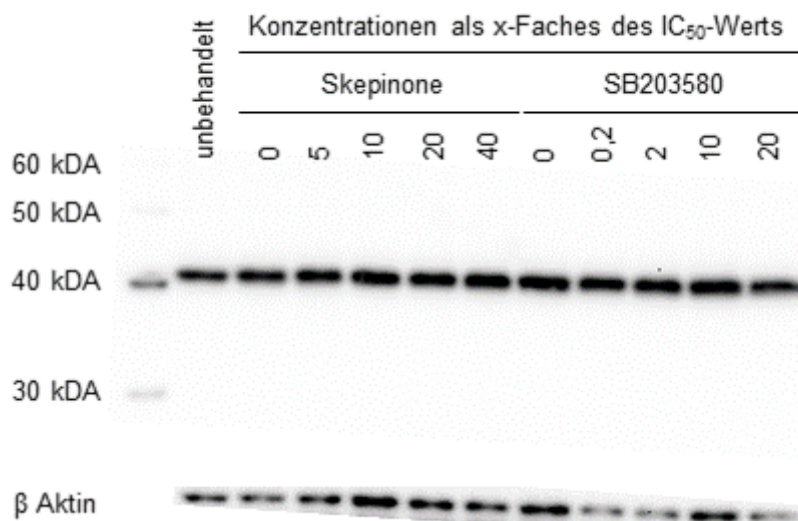
SB203580

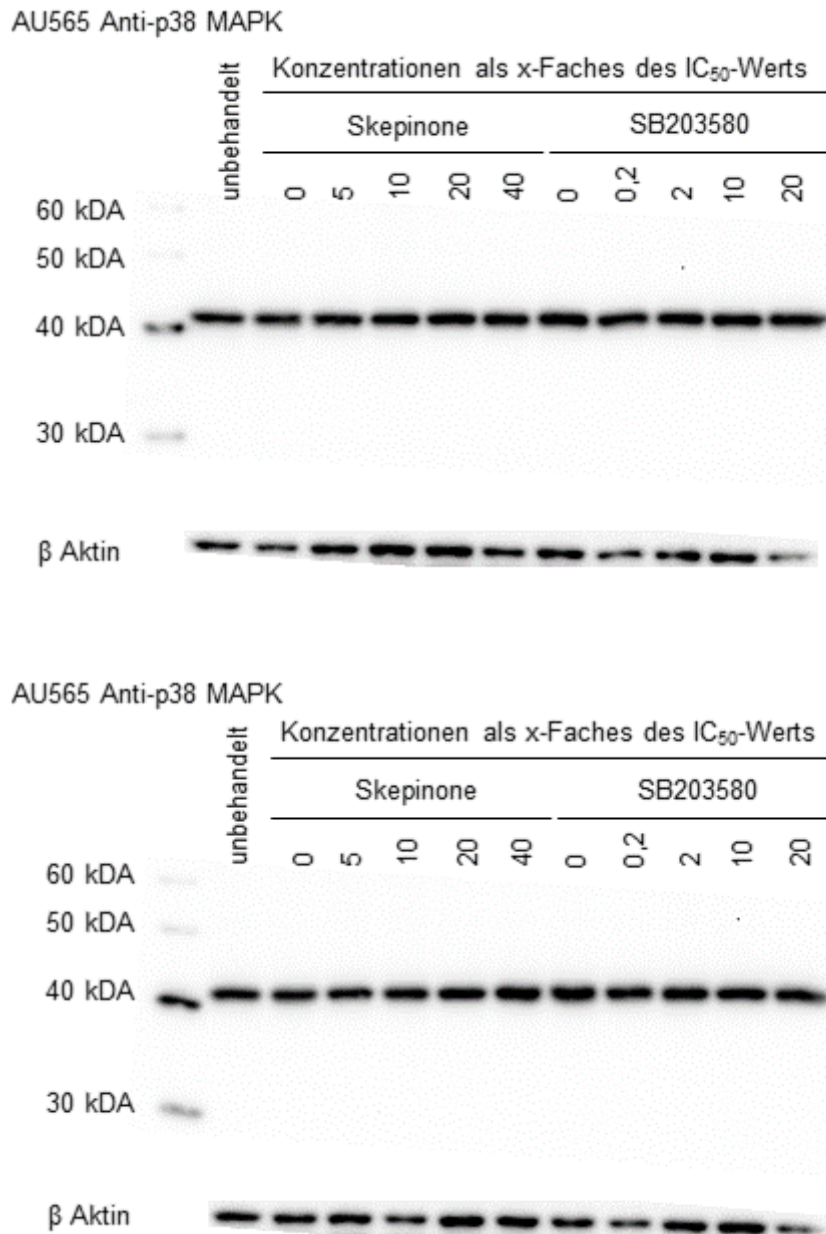
Faktor IC50	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	149,35558	198,192846	120,619634	156,05602	32,0215836	0,06852784
2	98,6069795	182,035864	84,8232631	121,822035	42,9478486	0,51214309
10	109,402284	115,010807	63,4967869	95,9699591	23,0758758	0,81708007
20	266,917999	183,121503	141,55748	197,198994	52,1372977	0,05779141

Skepinone-L

Faktor IC50	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	62,091901	73,3683509	87,8444129	74,4348883	10,5404331	0,02653369
10	48,555668	44,7067556	145,906573	79,7229988	46,8252257	0,57337263
20	54,7605957	65,8555211	87,2402442	69,2854537	13,4797433	0,03220745
40	82,8746764	92,7612771	109,222619	94,9528576	10,86756	0,54718122

AU565 Anti-p38 MAPK





Werte zu Abbildung 6: Expression von phosphorylierter p38 MAPK (Thr180/Tyr182) unter Einfluss steigender Konzentrationen der p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L in der Zelllinie AU565.

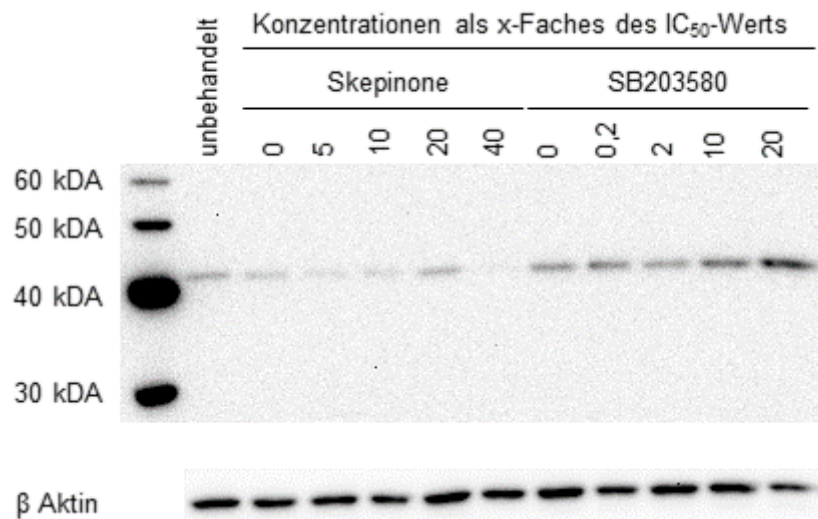
SB203580

Faktor IC ₅₀	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	132,572945	214,769173	158,136033	168,492717	34,3462822	0,04781849
2	115,299128	111,718683	119,470734	115,496182	3,16782763	0,00229107
10	135,386021	222,413989	247,275674	201,691895	47,9713626	0,0400242
20	567,348358	615,120003	479,319268	553,92921	56,2465704	0,00033621

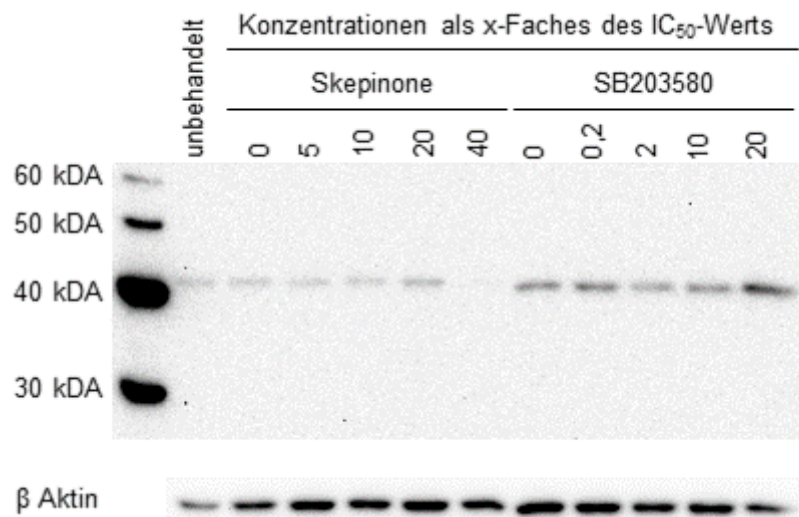
Skepinone-L

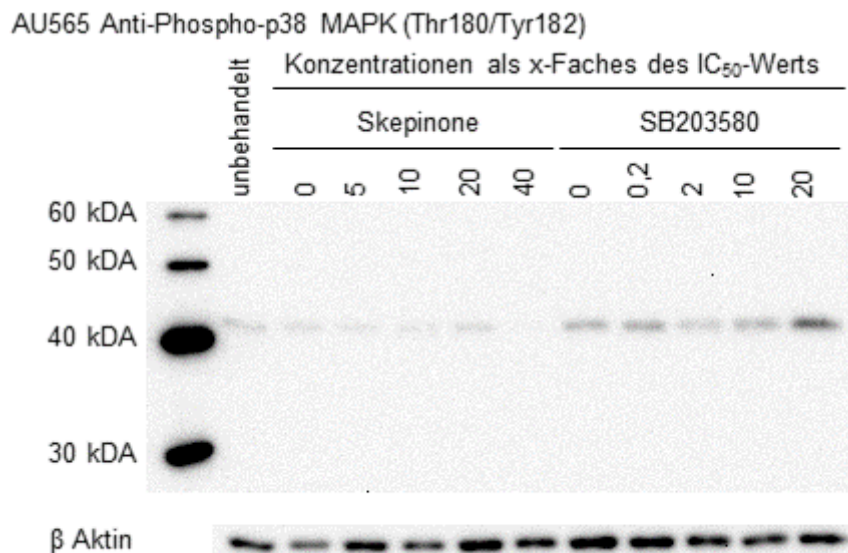
Faktor IC50	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	55,4800362	52,9111937	33,1600972	47,1837757	9,97153972	0,00169885
10	70,0225289	76,4602909	46,8858737	64,4562312	12,6990627	0,01670165
20	76,1991423	91,9449139	43,8291674	70,6577412	20,0301707	0,10702558
40	13,043792	25,6518805	18,9191255	19,2049327	5,15119648	2,4452E-05

AU565 Anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)



AU565 Anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)





Werte zu Tabelle 5: Veränderung der Expression von p38 MAPK und Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) in den Zelllinien AU565, MCF7, MCF10A, MDA-MB231 und ZR751.

MCF 7

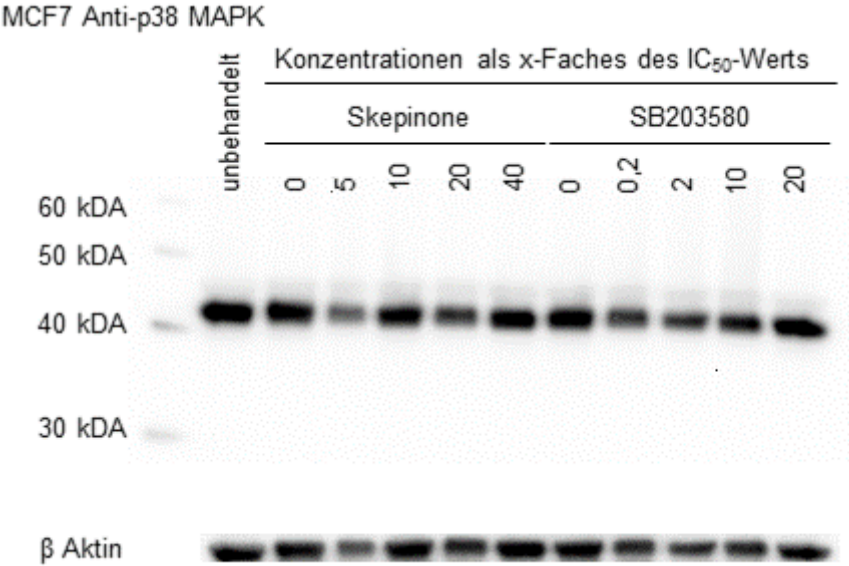
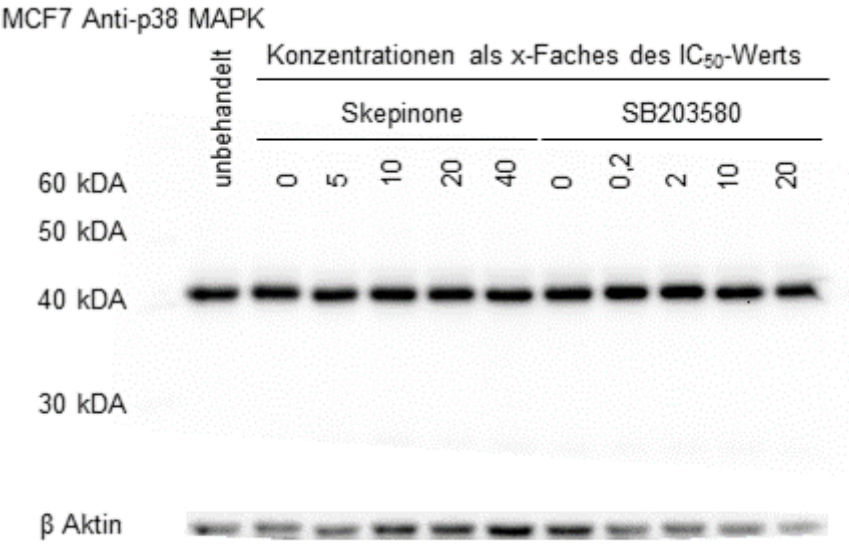
p38 MAPK

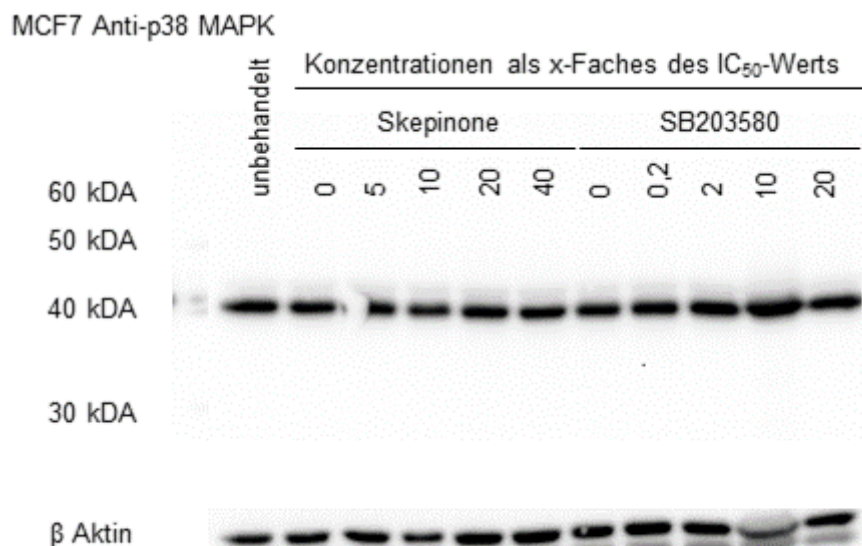
SB 203580

Faktor IC50	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	136,765909	159,486696	182,36458	159,539062	18,6156165	0,01063286
2	79,7477098	177,782874	146,097894	134,542826	40,8481992	0,29777533
10	142,48483	168,493787	152,946963	154,64186	10,6855345	0,00193975
20	177,357977	169,541211	111,818811	152,906	29,2277636	0,06264419

Skepinone-L

Faktor IC50	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	68,5894177	78,2567089	192,367438	113,071188	56,2096408	0,75875448
10	50,6264349	82,6291131	96,2599524	76,5051668	19,126448	0,15734984
20	63,5835682	67,441321	164,514193	98,5130273	46,6964377	0,96623925
40	47,2796704	62,647837	95,5384004	68,488636	20,1297865	0,09123696





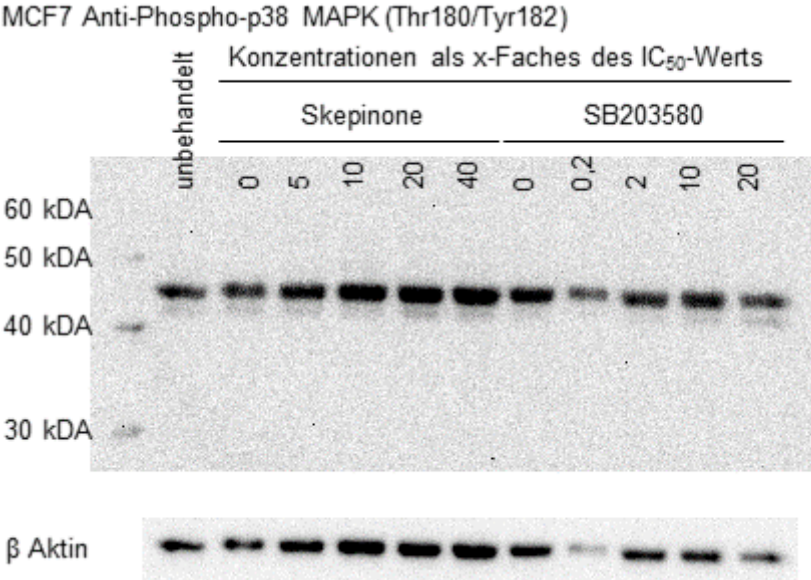
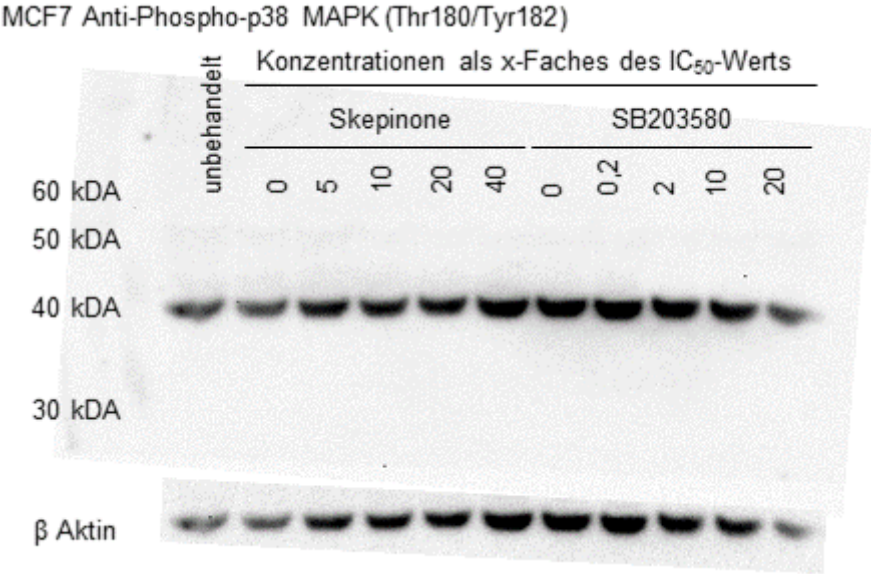
Phospho-p38 MAPK (T180/Y182)

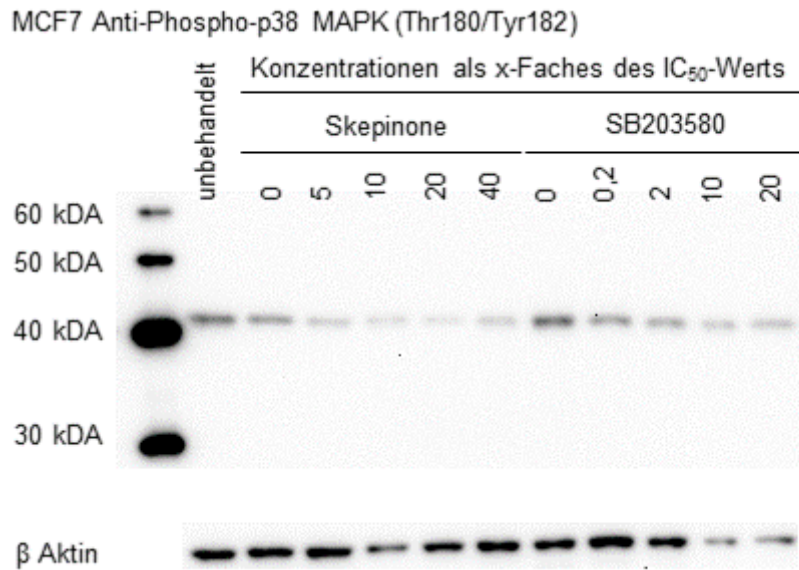
SB 203580

Faktor IC50	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	93,1580256	207,34538	51,2814531	117,261619	65,9531385	0,73004656
2	109,480361	97,2348327	54,7700639	87,1617524	23,4436111	0,48189229
10	114,76884	119,681071	122,632687	119,027533	3,24349155	0,00115259
20	122,524107	134,874233	101,452124	119,616821	13,7985165	0,11472917

Skepinone-L

Faktor IC50	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	89,5113886	87,6951679	42,633812	73,2801228	21,6828956	0,15633692
10	83,4908679	91,1039948	61,6769095	78,7572574	12,4711304	0,07364204
20	74,5797637	103,232134	27,8344573	68,5487849	31,0749838	0,22558634
40	76,0518267	91,2159015	40,7585652	69,3420978	21,1384491	0,10955487



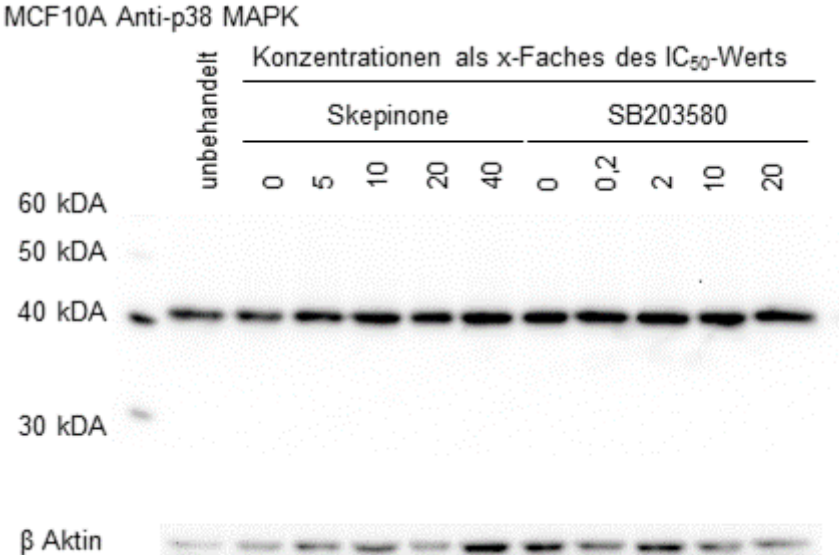
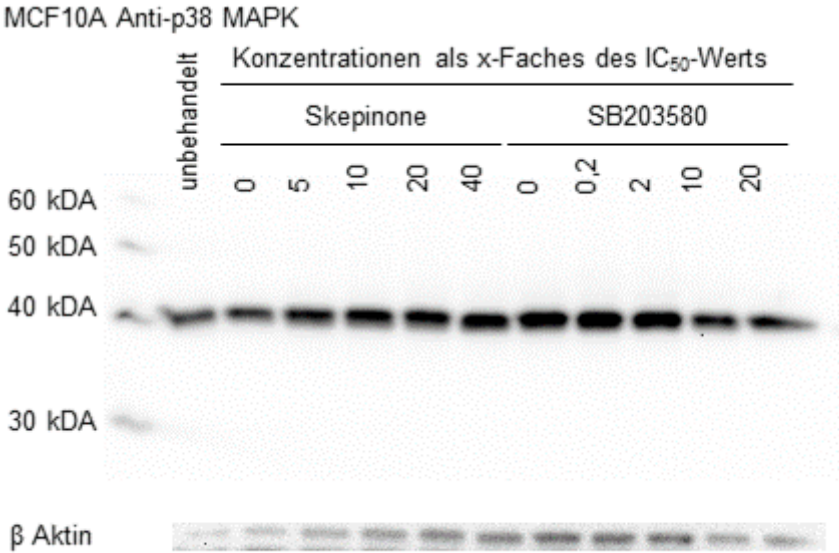
**MCF 10A***p38 MAPK*

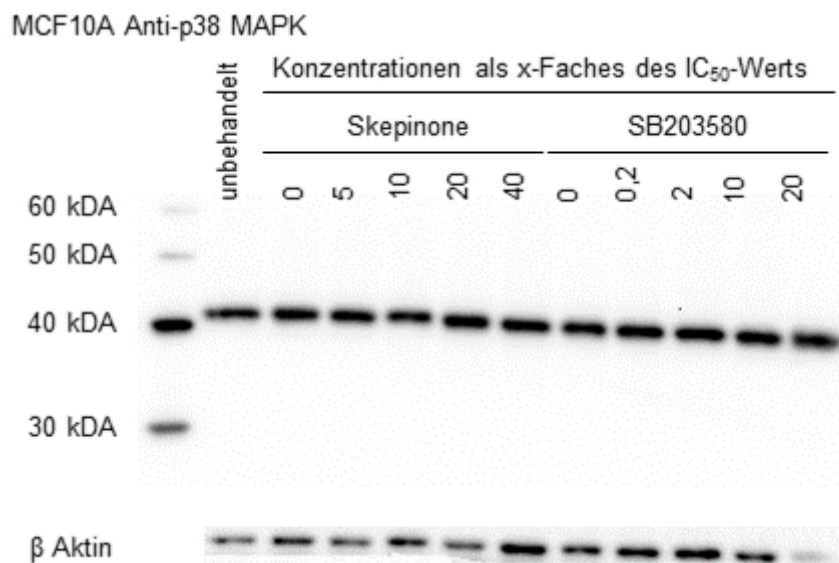
SB 203580

Faktor IC50	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	125,640347	138,298975	91,9042958	118,614539	19,5812503	0,25000077
2	127,760624	113,311474	72,1206552	104,397584	23,5732136	0,80495146
10	130,186825	162,987532	100,343641	131,172666	25,5837602	0,1599582
20	147,45554	201,270376	345,674343	231,466753	83,692052	0,09046105

Skepinone-L

Faktor IC50	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	57,8290104	83,5677209	119,304428	86,9003865	25,2076278	0,50314814
10	50,8466835	68,8703085	81,8620097	67,1930006	12,7173802	0,02180525
20	37,6852173	105,94428	142,670871	95,433456	43,4998462	0,88916194
40	41,0801495	52,8291721	60,3613367	51,4235527	7,93401409	0,0009788





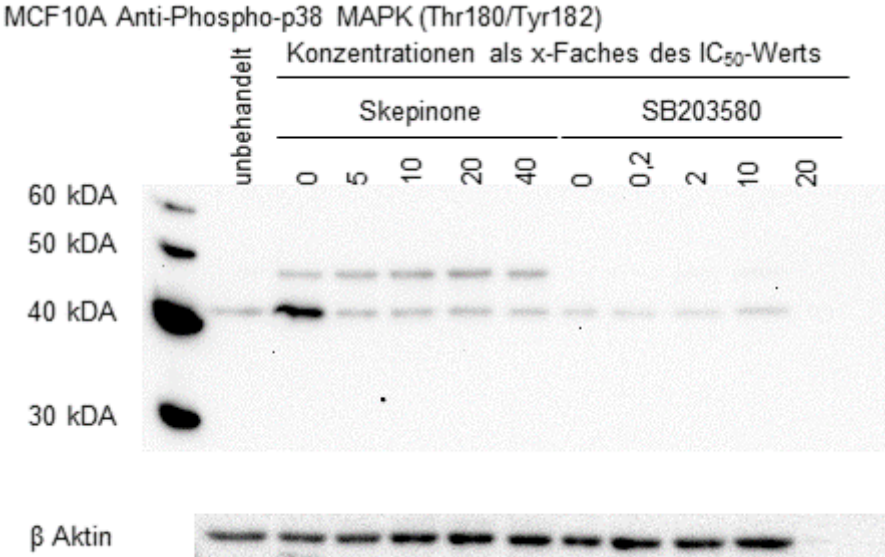
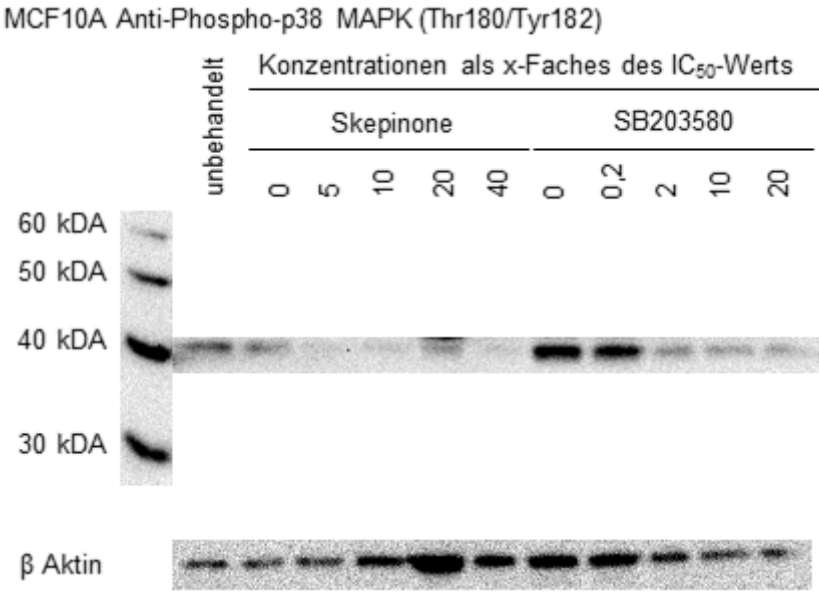
Phospho-p38 MAPK (T180/Y182)

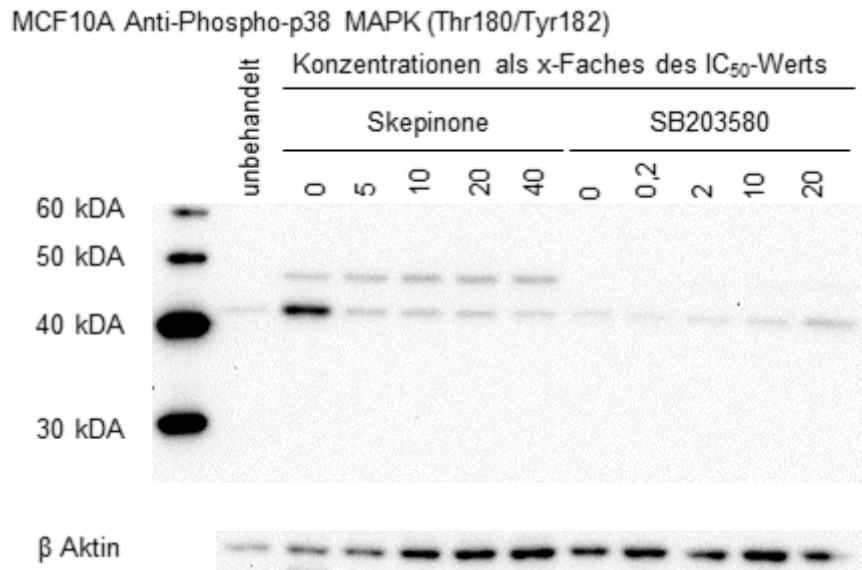
SB 203580

Faktor IC50	Membran A	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	0	
0,2	96,7019048	60,4497463	78,5758256	18,1260793	0,35871421
2	63,9919441	220,445978	142,218961	78,2270171	0,64345671
10	60,3242026	270,691018	165,50761	105,183408	0,59696854
20	65,6107735	601,039763	333,325268	267,714495	0,47535259

Skepinone-L

Faktor IC50	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	50,7474043	106,342744	96,0155086	84,3685524	24,1446909	0,41169373
10	63,6118731	93,9195389	57,1150231	71,5488117	16,039313	0,06615685
20	55,0006307	87,901799	49,668611	64,1903469	16,9072436	0,04012705
40	53,3261405	76,569178	42,0592099	57,3181761	14,3686403	0,0136859



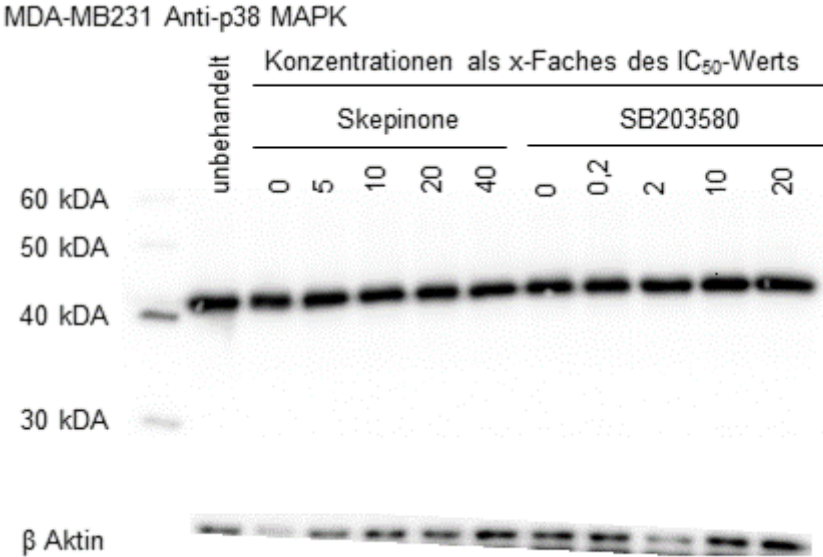
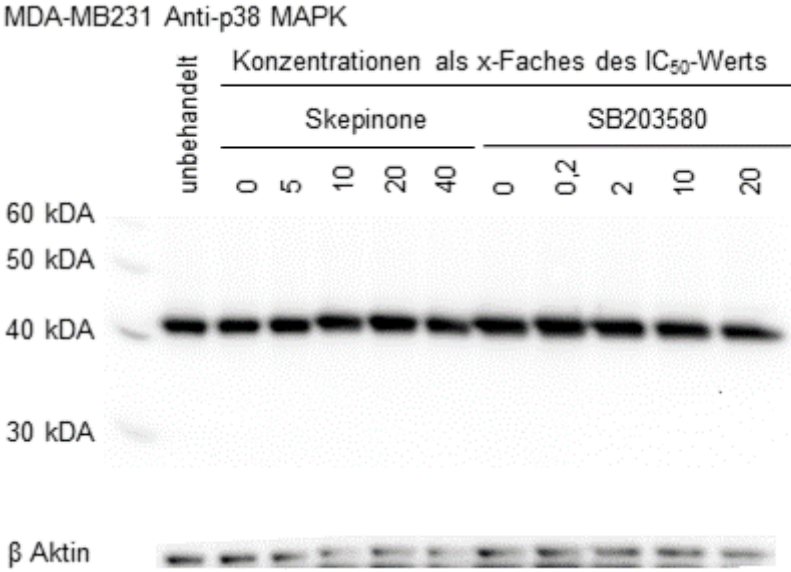
**MDA MB 231***p38 MAPK*

SB 203580

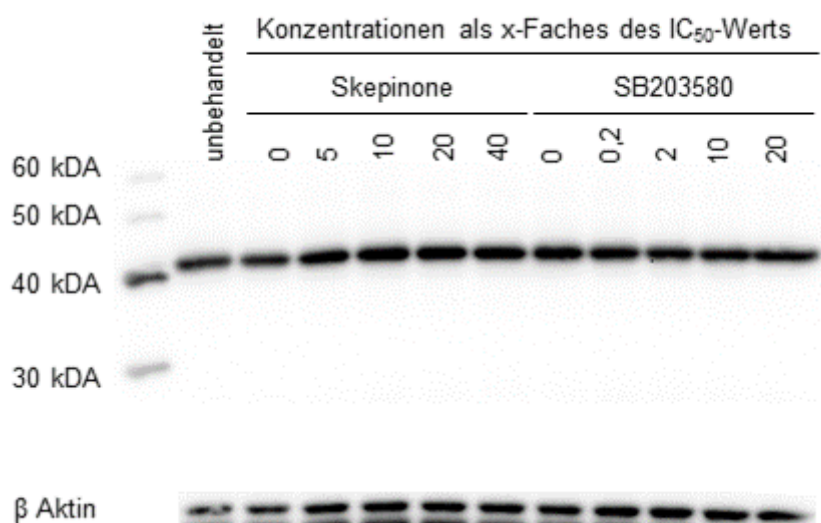
Faktor IC50	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	116,674555	101,067276	77,0852825	98,2757045	16,2823478	0,88819822
2	109,990572	208,583039	62,1530261	126,908879	60,9650665	0,56632648
10	102,488629	93,3593884	79,6928207	91,8469461	9,36759785	0,28580392
20	122,037348	106,849966	98,1454991	109,010938	9,87277277	0,26633792

Skepinone-L

Faktor IC50	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	140,876227	54,009786	105,597378	100,16113	35,6708027	0,99520888
10	196,438529	36,2190839	109,226756	113,961456	65,4949396	0,77808188
20	160,810725	40,3308131	98,9913013	100,04428	49,1913531	0,99904525
40	177,279797	26,9626538	98,8848474	101,042433	61,3856783	0,98199036



MDA-MB231 Anti-p38 MAPK



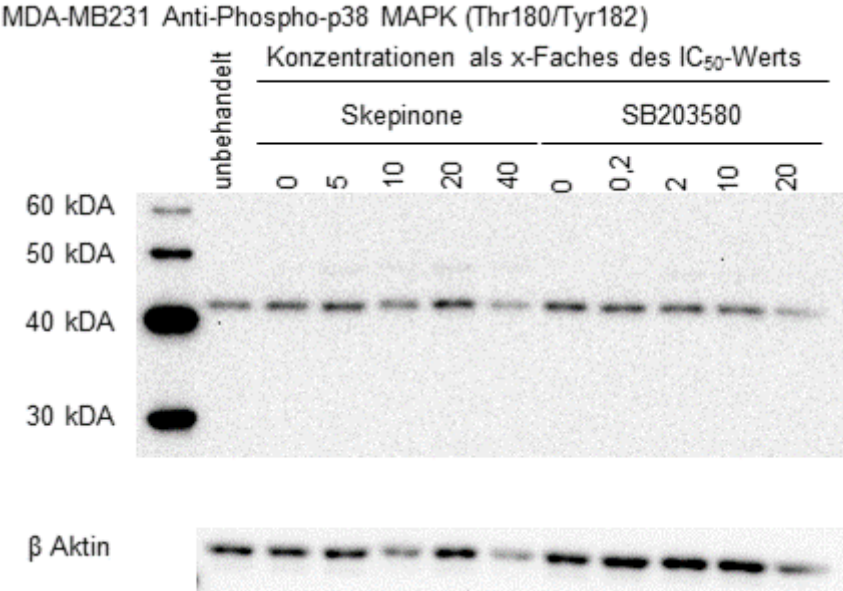
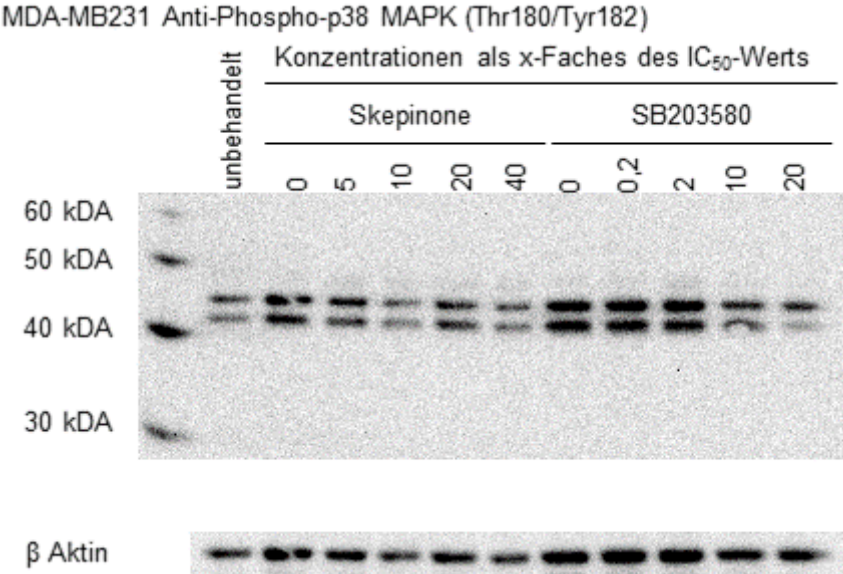
Phospho-p38 MAPK (T180/Y182)

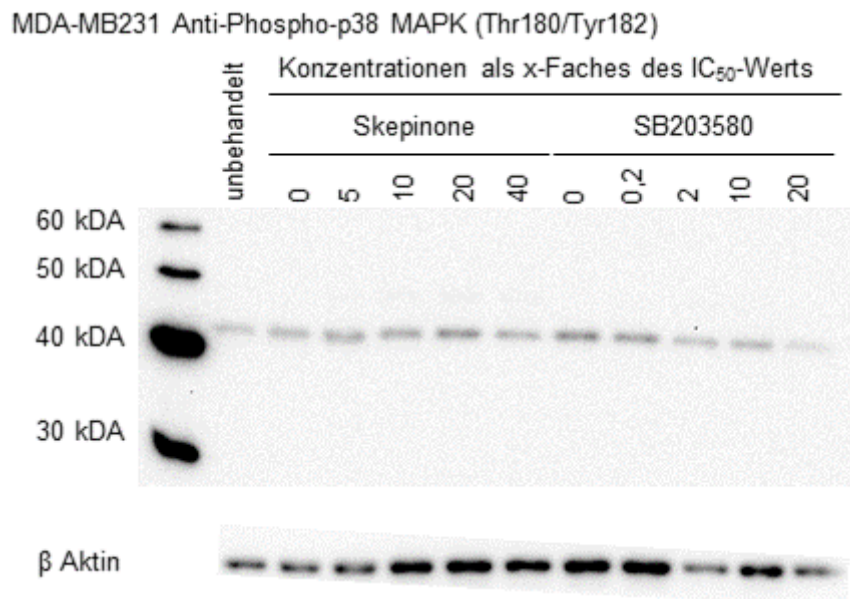
SB 203580

Faktor IC50	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	85,3703515	65,7739899	78,7108428	76,6183948	8,13585075	0,01529441
2	76,4581773	57,4502541	259,777983	131,228805	91,2286275	0,65362251
10	59,8676008	55,6431437	89,5820598	68,3642681	15,1020423	0,04145178
20	29,1586435	58,3567255	77,3911617	54,9688436	19,8360322	0,03257328

Skepinone-L

Faktor IC50	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	100,448839	99,0496804	103,308753	100,935757	1,77252043	0,49679806
10	88,8723716	118,028028	50,7092189	85,8698727	27,5646725	0,50861932
20	118,179774	97,1041094	57,5819414	90,955275	25,1181271	0,63739036
40	104,195285	90,729793	43,3086229	79,4112335	26,1135818	0,32731516



**ZR 75 1***p38 MAPK*

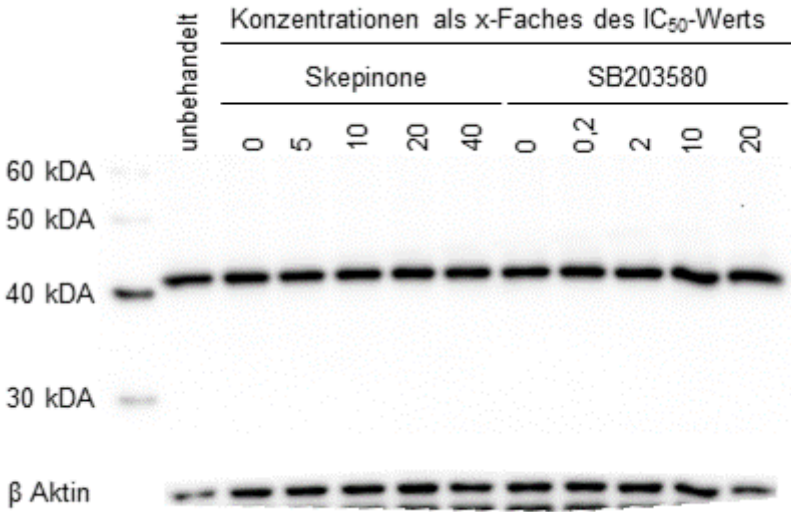
SB 203580

Faktor IC50	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	104,40769	82,7213816	53,9633825	80,3641513	20,6611462	0,25010737
2	89,5111252	80,5755892	95,9446049	88,6771065	6,30202884	0,063918
10	121,042796	84,5083507	93,9117803	99,8209756	15,489359	0,98774168
20	181,677757	89,1367196	154,812834	141,87577	38,8714686	0,20230174

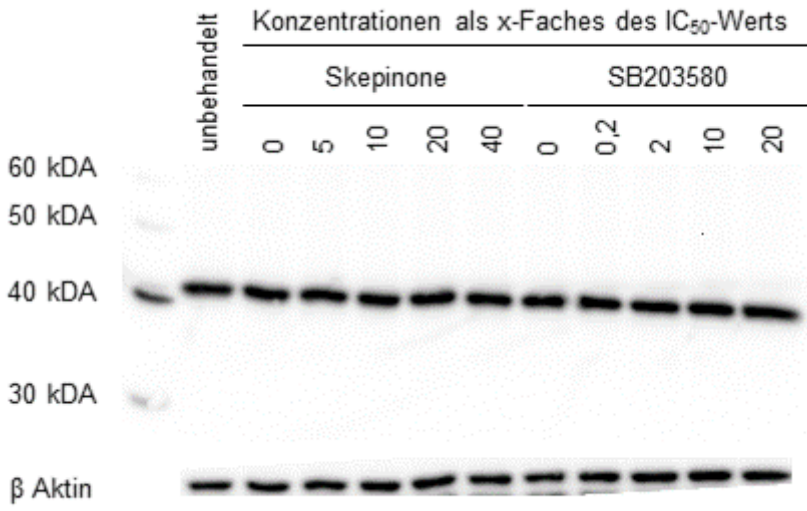
Skepinone-L

Faktor IC50	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	92,8336636	101,372683	95,5167307	96,5743592	3,56535631	0,24578384
10	89,2113898	83,9019659	138,61977	103,911042	24,6383085	0,83337729
20	76,9260625	90,6717175	75,6924276	81,0967359	6,78923995	0,01699415
40	100,310631	93,8831248	93,7781551	95,990637	3,0549977	0,13703266

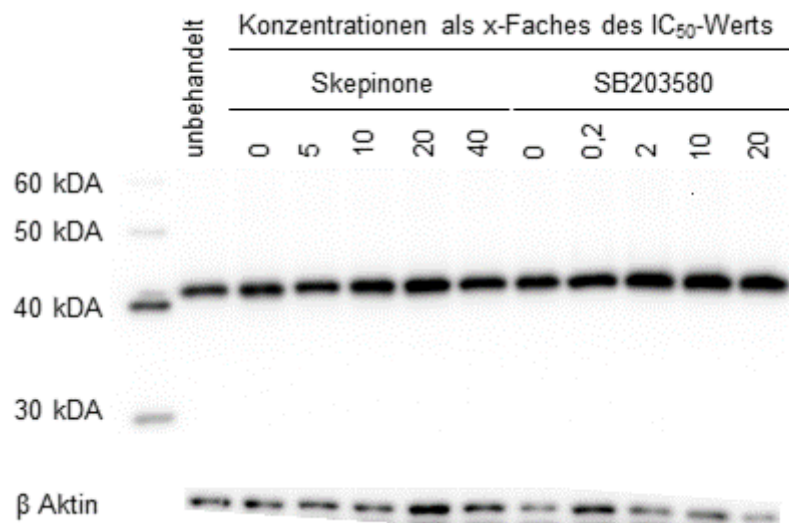
ZR751 Anti-p38 MAPK



ZR751 Anti-p38 MAPK



ZR751 Anti-p38 MAPK



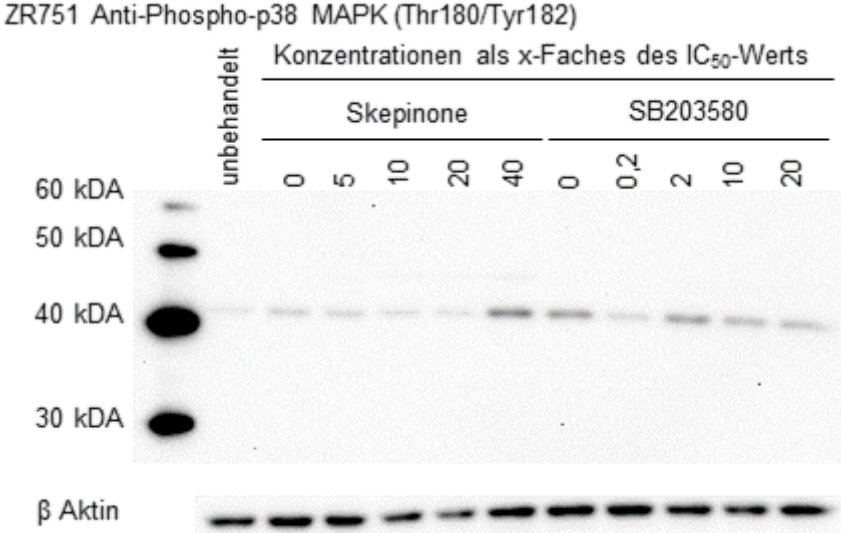
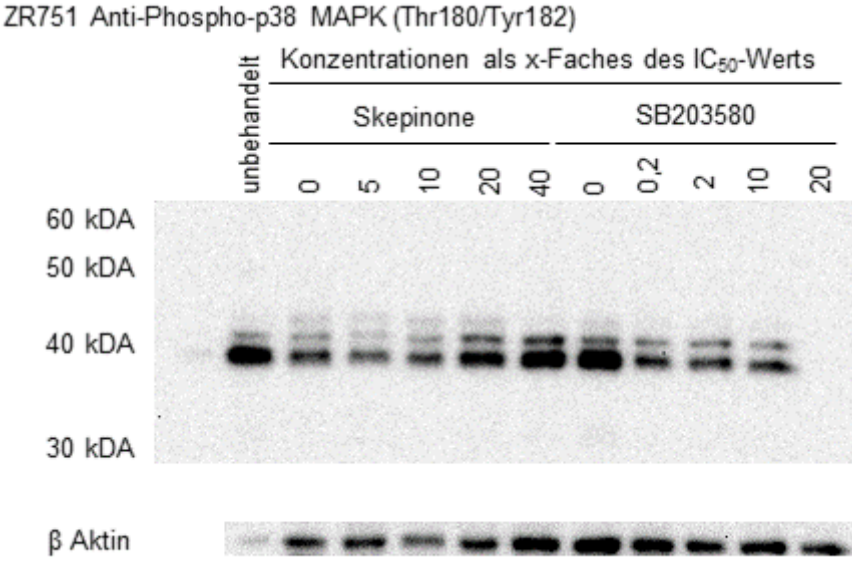
Phospho-p38 MAPK (T180/Y182)

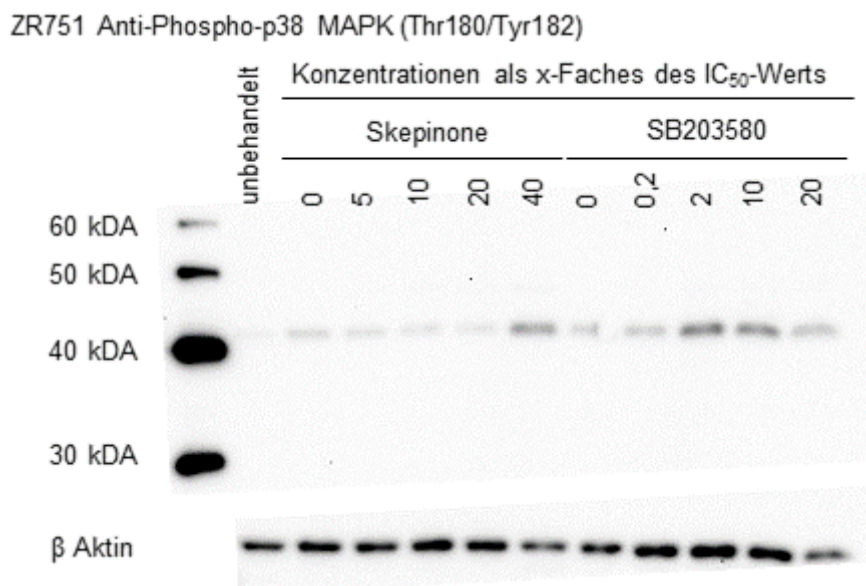
SB 203580

Faktor IC50	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	108,864455	33,1019	98,2156109	80,0606554	33,4882368	0,44716462
2	98,1647551	139,983056	220,526239	152,89135	50,7809098	0,21474708
10	108,406937	111,84759	250,039988	156,764838	65,9704462	0,29053916
20		70,331825	286,539133	178,435479	108,103654	0,40213189

Skepinone-L

Faktor IC50	Membran A	Membran B	Membran C	Mittelwert	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	120,699176	92,9031445	77,9183166	97,1735455	17,7243282	0,83262774
10	82,3952681	94,292666	54,995099	77,2276777	16,4540306	0,12193625
20	94,3029671	106,99883	63,0552362	88,1190112	18,4651175	0,41432318
40	108,749647	354,644734	516,05898	326,484454	167,47134	0,12836812





Werte zu Abbildung 7: Einfluss steigender Konzentrationen der p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L auf die chemotaktische Migration der Zelllinien MCF7 (A), MCF10A (B), MDA-MB231 (C) und ZR751 (D).

MCF 7

SB 203580

Faktor IC ₅₀	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	MW gesamt	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	97,2795805	82,6558266	97,0219436	92,3191169	6,83378757	0,18714683
2	69,0265487	105,945122	89,6943574	88,2220093	15,1078593	0,33211194
10	94,9852507	125,406504	86,2068966	102,19955	16,7965651	0,8620876
20	76,9911504	115,955285	88,3490073	93,7651474	16,3615783	0,61854297

Skepinone-L

Faktor IC ₅₀	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	MW gesamt	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	107,335907	99,421343	116,033755	107,597002	6,78450136	0,18846113
10	69,2084942	92,0872023	123,291139	94,8622786	22,1661741	0,7595102
20	70,6563707	97,5373436	117,130802	95,108172	19,0507015	0,7348766
40	62,1621622	85,668147	134,177215	94,0025081	29,9848645	0,79131334

MCF 10A

SB 203580

Faktor IC50	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	MW gesamt	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	66,994701	88,0263158	87,5656743	80,8622303	9,80762715	0,05087174
2	125,662377	75,6376518	91,5936953	97,6312414	20,8639602	0,88022193
10	93,9818319	49,159919	75,5107998	72,8841836	18,3924859	0,10543001
20	72,1801665	17,7935223	89,2877992	59,7538293	30,4813418	0,1352587

Skepinone-L

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	MW gesamt	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	165,750997	106,68942	103,293085	125,2445	28,6759593	0,28109391
10	138,546743	112,286689	103,759605	118,197679	14,8040784	0,15713169
20	188,435977	62,7986348	109,586535	120,273716	51,8449439	0,6096999
40	193,265397	61,8088737	97,4204171	117,498229	55,513021	0,67882525

MDA MB 231

SB 203580

Faktor IC50	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	MW gesamt	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	99,1713912	102,659574	112,78626	104,872408	5,77428989	0,29867959
2	72,1616514	66,3753799	114,312977	84,2833361	21,3651544	0,35693526
10	62,1456607	63,943769	83,6354962	69,9083086	9,73430556	0,01195159
20	56,694287	71,0106383	53,5305344	60,4118199	7,60497849	0,00181385

Skepinone-L

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	MW gesamt	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	64,871612	115,300307	86,1429135	88,7716108	20,6711692	0,48521576
10	74,9405611	81,8062253	78,9972365	78,581341	2,81828117	0,00042482
20	64,8597242		86,3797868	75,6197555	10,7600313	0,05587127
40	62,0542083	46,3539383	63,7978681	57,4020049	7,84452756	0,0015461

ZR 75 1

SB 203580

Faktor IC50	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	MW gesamt	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	81,6570486	102,050581	128,2342	103,980604	19,0639469	0,78246449
2	74,649629	126,384142	214,0227	138,352145	57,524693	0,39913539
10	70,0329761	74,025974	a130,1228	72,0294751	1,99649897	0,00032875
20	67,9307502	67,6236045	a118,1303	67,7771773	0,15357287	9,8854E-08

Skepinone-L

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	MW gesamt	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	73,8947368	99,0524781	128,234183	100,393799	22,2042521	0,98119132
10	78,2690058	126,676385	214,022663	139,656018	56,1760151	0,37461948
20	109,54386	130,417881	130,122757	123,361499	9,77128965	0,02775606
40	103,859649	85,1311953	118,130312	102,373719	13,5127449	0,81603641

Werte zu Abbildung 8: Adhäsion der Mammakarzinom-Zelllinien AU565 (A), MCF7 (B), MCF10A (C), MDA-MB231 (D) und ZR751 (E) unter Einfluss steigender Konzentrationen der p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L an Fibronektin und BSA.

AU 565

SB203580

Fibronektin

Faktor IC50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	69,1104156	82,0622049	81,7580855	77,6435687	6,03512763	0,0063455
2	61,8168183	78,5987594	69,1108284	69,8421354	6,87068626	0,00342652
10	57,5746787	59,6529885	94,0588616	70,428843	16,7304748	0,06679323
20	56,2514533	66,257429	87,8599595	70,1229473	13,1904281	0,03279836

BSA

Faktor IC50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	73,5097293	78,3615073	77,5059346	76,4590571	2,11453728	9,5075E-05
2	67,4066864	67,2484004	75,0827352	69,9126073	3,65640352	0,00031166
10	73,4112798	69,3321785	84,4320615	75,7251733	6,37794084	0,0057587
20	88,5667205	68,5776188	83,2610095	80,1351163	8,454563	0,02930064

Skepinone-L

Fibronektin

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	101,168379	84,1438883	78,1179965	87,8100879	9,760833241	0,15212043
10	85,4416814	77,9462601	73,8802886	79,08941	4,788635501	0,00349242
20	87,7125669	72,7096699	69,5793938	76,6672102	7,914104941	0,01403731
40	96,9078304	75,1534853	63,645796	78,5690372	13,79227391	0,09291555

BSA

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	83,9340555	83,7263445	108,463536	92,0413121	11,61257566	0,38731429
10	79,5430715	79,4392005	93,3568001	84,113024	6,536474299	0,02635971
20	74,1669386	79,0300353	96,2606732	83,152549	9,479086349	0,06580963
40	80,0420712	70,0182394	84,6108718	78,2237275	6,094588362	0,00721559

MCF 7

SB203580

Fibronektin

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	81,2850543	61,5241144	116,757419	86,5221958	22,8509696	0,4511286
2	79,8959403	47,8618107	78,9556272	68,9044594	14,8843508	0,04178227
10	82,9824992	52,5781412	84,6762948	73,4123117	14,7482029	0,06333842
20	93,9618568	49,4768156	89,078632	77,5057681	19,919473	0,18550084

BSA

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	98,3013738	69,1615621	86,3624432	84,6084597	11,9607553	0,14289999
2	79,4281904	68,2155961	72,4656729	73,3698198	4,62195334	0,00123453
10	82,3228847	74,6805978	57,0045074	71,3359967	10,6032959	0,01872912
20	73,2121934	81,141643	61,1306803	71,8281722	8,22785081	0,00838663

Skepinone-L

Fibronektin

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	71,6680616	82,2781868	176,919829	110,288693	47,3140217	0,77378801
10	77,318198	87,1002741	103,542434	89,320302	10,8204753	0,2352619
20	79,4235572	84,8584951	120,011895	94,7646491	17,9898528	0,701759
40	88,3430927	85,9919041	135,18447	103,173155	22,65576	0,85264628

BSA

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	87,3905468	76,9354122	82,7243687	82,3501092	4,27648703	0,00429465
10	76,1716796	80,1563538	63,4910739	73,2730358	7,10560766	0,00600796
20	88,02574	91,4553981	62,1878959	80,5563447	13,0637047	0,10308446
40	93,789202	97,833943	80,6614921	90,7615457	7,33022483	0,14927206

MCF 10A

SB203580

Fibronektin

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	87,7695579	104,888003	112,604067	101,753876	10,3780307	0,82285117
2	88,6623179	105,028869	115,455726	103,048971	11,0275918	0,71572333
10	96,9220836	80,6771515	115,647095	97,7487767	14,2883822	0,83459268
20	101,149221	90,3573807	101,264875	97,5904922	5,11480016	0,54172987

BSA

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	71,7407511	94,0088993	134,183446	99,9776988	25,8391494	0,99908457
2	53,8331733	72,6400493	111,663206	79,3788095	24,0850761	0,29261051
10	51,1820455	63,160438	123,450891	79,2644583	31,6248965	0,40627626
20	51,0775695	66,247488	133,595468	83,6401752	35,862516	0,55397685

*Skepinone-L**Fibronektin*

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	81,374687	138,120081	103,961473	107,818747	23,3262206	0,66019337
10	120,935823	157,538157	81,7639236	120,079301	30,9406294	0,41066975
20	96,2879773	127,7183	83,6542133	102,553497	18,5266202	0,85495648
40	77,9942077	128,433824	97,5394248	101,322485	20,7649124	0,93256211

BSA

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	46,3188634	144,062357	105,764607	98,7152758	40,213741	0,96612908
10	46,3382004	95,9736635	105,40252	82,5714612	25,9083348	0,39530262
20	24,7017898	248,670358	100,426089	124,599412	93,0187867	0,72738622
40	62,0094717	170,781878	94,371401	109,05425	45,603718	0,79280315

MDA MB 231

SB203580

Fibronektin

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	86,7105143	86,0117563	75,2362417	82,6528374	5,25207801	0,00951104
2	74,4278327	113,127416	66,2182415	84,5911635	20,4546268	0,34675184
10	88,8608816	82,7659424	58,4177814	76,6815351	13,1519478	0,06624041
20	97,6519923	70,3253898	45,5842222	71,1872014	21,2653115	0,1278375

BSA

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	87,2409443	132,633147	77,7097204	99,1946039	23,9626541	0,96436748
2	74,0431763	145,415226	60,5789641	93,3457889	37,2267018	0,81289114
10	77,1804611	129,810059	73,9891371	93,6598857	25,5952132	0,7437746
20	86,6810791	172,933976	72,7372174	110,784091	44,3137601	0,74805774

*Skepinone-L**Fibronektin*

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	84,9299799	91,0234908	63,4035886	79,7856864	11,8479974	0,07332872
10	93,7691484	81,5050846	82,057614	85,7772823	5,65560278	0,02366089
20	95,7857061	69,2850392	83,5853842	82,8853765	10,8301691	0,08913037
40	86,8031385	65,9923895	71,2352035	74,6769105	8,83764026	0,01544714

BSA

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	77,8325099	57,2430855	73,4318503	69,5024819	8,85291106	0,00820876
10	76,8287765	42,2655922	63,6870012	60,9271233	14,2446744	0,01785398
20	90,2821582	39,4746961	53,9471632	61,2346725	21,3725742	0,06230188
40	91,1883175	44,1950983	56,2066255	63,8633471	19,9342202	0,06239458

ZR 751

SB203580

Fibronektin

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	90,4391426	103,07381	111,265267	101,59274	8,56648655	0,80558467
2	69,6746753	98,145174	83,5005607	83,77347	11,6246343	0,11961145
10	61,6306596	85,5212346	110,120106	85,7573335	19,7964377	0,36646835
20	55,8646062	92,8303732	117,245722	88,6469004	25,2327356	0,55916639

BSA

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	96,3124452	50,4420431	99,4883396	82,0809426	22,4096192	0,32133607
2	63,2002372	62,2775791	128,936982	84,8049328	31,2083447	0,5289514
10	76,9765359	55,0537428	93,2401773	75,090152	15,6465071	0,08750135
20	123,144931	34,4305636	197,781056	118,452183	66,7700644	0,71585034

Skepinone-L

Fibronektin

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	93,8854037	85,4840316	115,657998	98,3424779	12,7152455	0,86270576
10	92,2128684	84,4696573	80,38722	85,6899152	4,90430166	0,01453546
20	58,6444288	94,19717	56,7764858	69,8726949	17,2168981	0,06860081
40	93,0711603	78,3153196	91,8475406	87,7446735	6,68624695	0,06054758

BSA

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	109,484413	83,8830699	81,9018471	91,7564433	12,5616345	0,40590008
10	97,8077925	92,2945109	130,053426	106,718576	16,653037	0,59882272
20	78,8044581	94,137763	156,783644	109,908622	33,7315713	0,69914888
40	83,0182011	60,4023266	171,484431	104,96832	47,9316475	0,89054747

Werte zu Abbildung 9: Proliferation der Mammakarzinom-Zelllinien AU565 (A), MCF7 (B), MCF10A (C), MDA-MB231 (D) und ZR751 (E) unter Einfluss steigender Konzentrationen der p38 MAPK-Inhibitoren SB203580 und Skepinone-L, quantifiziert mittels BrdU-ELISA.

AU 565

SB 203580

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	97,3920709	104,223495	105,768833	102,461466	3,63969714	0,39302588
2	89,2548714	115,09472	110,197223	104,848938	11,206473	0,57366518
10	87,8724712	112,314929	118,716211	106,301204	13,2905415	0,53926628
20	88,4428358	110,290004	120,967966	106,566935	13,5367882	0,53037439

Skepinone-L

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	121,435584	93,7544365	114,617758	109,935926	11,7757135	0,29870267
10	125,391386	106,260299	83,4211039	105,024263	17,1565729	0,70000949
20	122,43295	107,580507	62,7546352	97,5893642	25,3672035	0,89958334
40	115,510936	108,782488	91,7825696	105,358665	9,98501441	0,49013723

MCF 7

SB 203580

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	91,940309	89,2970702	89,5303244	90,2559012	1,1948568	0,0003228
2	115,60623	109,743034	96,7669691	107,372078	7,87170089	0,25595813
10	100,713075	83,1878786	88,0898668	90,6636066	7,38246689	0,14820668
20	101,877681	87,36667	90,4438786	93,22941	6,24295613	0,19987444

Skepinone-L

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	103,868705	108,168326	79,9098376	97,3156232	12,432289	0,77532507
10	117,369756	80,5652025	78,5338016	92,1562534	17,8479166	0,56792965
20	99,4258477	70,8301832	77,0252513	82,4270941	12,2831303	0,11307836
40	112,422706	91,6246442	96,7945905	100,280647	8,84135292	0,9663461

MCF 10A

SB 203580

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	94,7458616	110,807828	76,0279542	93,8605479	14,2126173	0,57427503
2	109,497978	95,9839132	84,9875508	96,8231473	10,0239212	0,67721238
10	106,601568	96,9301276	74,588769	92,7068216	13,4060201	0,48459061
20	93,2553307	103,652182	97,1902687	98,0325939	4,28608334	0,55162826

Skepinone-L

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	108,769112	109,834217	92,728548	103,777292	7,82473321	0,53228847
10	106,731797	96,8218989	103,670848	102,408181	4,14304754	0,45723802
20	111,876147	89,8493253	94,7481131	98,8245284	9,4430959	0,86881514
40	104,847862	90,8870343	98,7862885	98,1737283	5,71591929	0,67479462

MDA MB 231

SB 203580

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	104,27857	85,5522395	88,8314758	92,8874286	8,16524882	0,28545625
2	120,443376	113,020447	111,806371	115,090064	3,8176738	0,00502474
10	100,567784	107,041149	108,31148	105,306805	3,39088684	0,09129299
20	123,085021	100,967057	108,141312	110,73113	9,21344868	0,1748686

Skepinone-L

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	85,3934479	122,772932	101,952112	103,372831	15,2931421	0,77069927
10	98,7140334	129,10622	102,477686	110,099313	13,5274574	0,35059888
20	89,1913603	142,065806	112,31733	114,524832	21,6422664	0,39630208
40	92,3775378	137,31091	112,586269	114,091572	18,3748277	0,33911577

ZR 751

SB 203580

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
0,2	106,915813	114,400259	97,8153796	106,377151	6,78145393	0,25431724
2	120,253922	127,579987	101,51318	116,44903	10,9765663	0,10142403
10	126,495334	135,162431	96,9928236	119,550196	16,3382156	0,16585707
20	114,930096	156,216993	89,7609935	120,302694	27,3952375	0,35375274

Skepinone-L

Faktor IC 50	Versuch 1	Versuch2	Versuch3	MW	SD	t-Test
0	100	100	100	100	0	
5	100,837778	105,638736	76,1958752	94,2241296	12,897694	0,56092975
10	91,8561022	102,951388	71,5301283	88,7792063	13,0108765	0,28959569
20	98,5056218	94,1801764	69,4148252	87,3668745	12,8162507	0,23576519
40	102,430725	104,851673	88,8624516	98,7149498	7,0365256	0,80894177

Werte zu Abbildung 10: Zellviabilität der Mammakarzinom-Zelllinien AU565 (A), MCF7 (B), MCF10A (C), MDA-MB231 (D) und ZR751 (E) nach der Behandlung mit den p38 MAPK-Inhibitoren SB 203580 und Skepinone

AU 565
**Gegenüberstellung VIABILITÄT der beiden Inhibitoren bei
Faktor IC50 = 20**

	Mittelwerte			
	0	2	3	4
SB 203580	100	64,2158561	70,1318038	63,8888805
Skepinone-L	100	74,5842843	80,9253026	69,4473318

	SD			
	0	2	3	4
SB 203580	0	4,69959675	2,31773471	2,67238487
Skepinone-L	0	3,94803138	2,90675923	2,8195123

	t-Test			
	0	2	3	4
SB 203580	1	0,00899841	0,00031625	0,00043375
Skepinone-L	1	0,93307542	0,11659817	0,05268394

MCF 7**Gegenüberstellung VIABILITÄT der beiden Inhibitoren bei Faktor IC50 = 20**

	Mittelwerte			
	0	2	3	4
SB 203580	100	97,411969	93,3967569	82,9099236
Skepinone	100	141,265112	136,990091	123,635109

	SD			
	0	2	3	4
SB 203580	0	41,0744748	44,3085548	54,1041932
Skepinone-L	0	42,0036184	51,542503	69,1202983

	t-Test			
	0	2	3	4
SB 203580	1	0,43786283	0,51152246	0,65468579
Skepinone-L	1	0,63675838	0,72841237	0,76772699

MCF 10A**Gegenüberstellung VIABILITÄT der beiden Inhibitoren bei Faktor IC50 = 20**

	Mittelwerte			
	0	2	3	4
SB 203580	100	69,7125354	64,8266862	63,7049165
Skepinone-L	100	160,854847	146,970477	146,564588

	SD			
	0	2	3	4
SB 203580	0	10,4582349	9,39840567	8,83258882
Skepinone-L	0	14,6548917	25,0701154	19,8792112

	t-Test			
	0	2	3	4
SB 203580	1	0,00207111	0,00119374	0,00074976
Skepinone-L	1	0,03961431	0,20858882	0,16716786

MDA MB 231**Gegenüberstellung VIABILITÄT der beiden Inhibitoren bei Faktor IC50 = 20**

	Mittelwerte			
	0	2	3	4
SB 203580	100	86,9316157	81,3697187	82,9844561
Skepinone-L	100	197,060409	185,168679	190,069035

	SD			
	0	2	3	4
SB 203580	0	10,4201451	5,79491493	6,87811985
Skepinone-L	0	11,0460934	16,6984498	9,45115679

	t-Test			
	0	2	3	4
SB 203580	1	0,0030162	0,00066328	0,00037769
Skepinone-L	1	0,00426544	0,0168221	0,00138565

ZR 751**Gegenüberstellung VIABILITÄT der beiden Inhibitoren bei Faktor IC50 = 20**

	Mittelwerte			
	0	2	3	4
SB 203580	100	99,9126495	98,7240023	86,7923067
Skepinone-L	100	185,839187	190,602724	165,992114

	SD			
	0	2	3	4
SB 203580	0	18,3593237	19,1994697	27,9326336
Skepinone-L	0	39,2698299	47,3961469	66,6638121

	t-Test			
	0	2	3	4
SB 203580	1	0,18042335	0,14887416	0,29883786
Skepinone-L	1	0,14456723	0,1967334	0,34973263

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen Dank an _ aussprechen. Dankeschön für die Möglichkeit, an einem so interessanten und grundlegenden Thema arbeiten zu dürfen und mich in die Forschung der Frauenklinik einbringen zu können. Die Unterstützung, das Vertrauen und auch die Freiheiten, die mir dabei gewährt wurden, habe ich sehr zu schätzen gewusst.

_ möchte ich für die Übernahme meiner Arbeit als Zweitkorrektor und den damit verbundenen Arbeitsaufwand danken.

Für geduldige Einarbeitung und Hilfe in allen Belangen des Laborlebens gilt mein großer Dank _. Auch dem gesamten Laborteam möchte ich für die gemeinsame Zeit danken - ich bin jedes Mal gerne ins Labor gekommen.

Danke an meine Freunde, die mich auf meinem Weg begleiten und ihn aufregend und lustig machen: Diejenigen, die schon seit Kindertagen mit dabei sind und die, die ich in Mainz kennenlernen durfte.

Meine Eltern, _, und _ haben mich unterstützt, so lange ich denken kann. Ohne sie wäre mir so vieles nicht möglich gewesen - danke für den Zuspruch, die vielschichtige Hilfe und bedingungslose Liebe!

Vielen Dank an den, der mich so zum Lachen bringt wie niemand sonst: _.

Tabellarischer Lebenslauf