

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

Molekulare Wirkweise von SB203580 in Mammakarzinom-Zellen

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

Vorgelegt von

Josef Siegfried Engelhardt

aus Sömmerda

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 07. Dezember 2021



Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturdiskussion .....</b>	<b>3</b>
2.1 Das Mammakarzinom.....	3
2.2 MAPK .....	5
2.2.1 p38 .....	6
2.2.1.1 p38-Signalkaskade.....	7
2.2.1.2 Inaktivierung des p38-Signalweges.....	8
2.2.1.3 Substrate des p38 .....	8
2.2.1.4 p38 in der Tumorgenese .....	10
2.2.1.5 p38 als Ziel in der Therapie von Krebs.....	11
2.2.1.6 Der p38-Inhibitor SB203580.....	11
2.2.2 JNK.....	12
2.2.2.1 JNK-Signalweg.....	12
2.2.2.2 JNK-Substrate.....	13
2.2.3 ERK.....	14
2.2.3.1 ERK-Signalkaskade .....	14
2.2.3.2 RSK1/2/3/4.....	15
2.2.3.3 MSK1/2 .....	16
2.2.3.4 ERK in Tumoren.....	17
2.3 AKT .....	18
2.3.1 AKT-Signalweg.....	18
2.3.1.1 mTOR .....	20
2.3.2 Bedeutung des AKT-Signalweges in der Karzinogenese .....	20
2.3.3 Der AKT-Signalweg als medikamentöse Zielstruktur.....	21
2.4 Übersicht MAPK-Signalkaskade.....	23
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
3.1 Materialien.....	25
3.1.1 Substanzen .....	25
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	26
3.1.3 Geräte .....	27
3.1.4 Antikörper .....	28
3.1.4.1 Erst-Antikörper .....	28
3.1.4.2 Zweit-Antikörper.....	29
3.1.4.3 Lysate zur Antikörper-Kontrolle.....	29
3.1.5 Kit-Systeme .....	29
3.1.6 Puffer und Lösungen .....	29
3.1.7 Computerprogramme .....	30
3.1.8 Kontinuierliche Zelllinien.....	30
3.2 Methoden .....	31
3.2.1 Zellkulturmethoden.....	31
3.2.1.1 Steriles Arbeiten.....	31

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.1.2	Kultivierung humaner Zelllinien .....	31
3.2.1.3	Kryo-Konservierung und Rekultivierung .....	32
3.2.1.4	Aufbringen des SB203580 .....	33
3.2.2	Proteinanalyse .....	33
3.2.2.1	Proteinextraktion aus Zellkulturen .....	33
3.2.2.2	Protein-Konzentrationsbestimmung .....	34
3.2.2.3	Phospho-Kinase-Array .....	34
3.2.2.4	SDS-PAGE .....	36
3.2.2.5	Western-Blot .....	38
3.2.2.6	Antikörper-Detektion .....	38
3.2.2.7	Coomassie-Färbung .....	41
3.2.3	Statistik .....	41
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
4.1	Screening der Aktivität von verschiedenen Kinasen unter Einfluss von SB203580 .....	42
4.2	Validierung der Aktivität relevanter Kinasen unter Einfluss von SB203580 im Western-Blot .....	45
4.2.1	ERK1/2 .....	45
4.2.2	AKT .....	49
4.2.3	HSP27 .....	56
4.2.4	MSK1/2 .....	60
4.2.5	RSK1/2/3 .....	65
4.2.6	c-JUN .....	69
4.2.7	mTOR .....	73
4.3	Übersicht Ergebnisse .....	77
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>79</b>
5.1	ERK1/2 und c-JUN .....	79
5.2	RSK .....	81
5.3	AKT .....	83
5.4	mTOR .....	85
5.5	MSK1/2 und HSP27 .....	86
5.6	Einfluss von SB203580 auf die Neusynthese von Signalmediatoren .....	90
5.7	Molekulare Hintergründe des Einflusses von SB203580 auf die Zellviabilität .....	92
5.8	Bedeutung der gesteigerten Aktivität von ERK, c-Jun, RSK und mTOR .....	95
5.8.1	Übersicht zur Bedeutung der gesteigerten Aktivität von ERK, c-Jun, RSK und mTOR .....	99
<b>6</b>	<b>Fazit .....</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>XIII</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>XLII</b>
9.1	Ergebnisse Western-Blot-Analysen .....	XLIII
9.1.1	ERK1/2 .....	XLIII
9.1.1.1	Verhalten von ERK1/2 (ERK1 44 kDa / ERK2 42 kDa) in MCF-10A-Zellen .....	XLIII
9.1.1.2	Verhalten von ERK1/2 (ERK1 44 kDa / ERK2 42 kDa) in MCF-7-Zellen .....	XLV

## Inhaltsverzeichnis

---

9.1.1.3	Verhalten von ERK1/2 (ERK1 44 kDa / ERK2 42 kDa) in MDA-MB-231-Zellen.....	XLVII
9.1.2	AKT .....	XLIX
9.1.2.1	Verhalten von T-AKT und p-AKT S473 (60 kDa) in MCF-10A-Zellen .....	XLIX
9.1.2.2	Verhalten von T-AKT und p-AKT S473 (60 kDa) in MCF-7-Zellen.....	LI
9.1.2.3	Verhalten von T-AKT und p-AKT S473 (60 kDa) in MDA-MB-231-Zellen .....	LIII
9.1.2.4	Verhalten von T-AKT und p-AKT T308 (60 kDa) in MCF-10A-Zellen .....	LV
9.1.2.5	Verhalten von p-AKT T308 (60 kDa) in MCF-7-Zellen und MDA-MB-231-Zellen.....	LVII
9.1.3	HSP27 .....	LXI
9.1.3.1	Verhalten von HSP27 (27 kDa) in MCF-10A-Zellen.....	LXI
9.1.3.2	Verhalten von HSP27 (27 kDa) in MCF-7-Zellen .....	LXIII
9.1.3.3	Verhalten von HSP27 (27 kDa) in MDA-MB-231-Zellen .....	LXV
9.1.4	MSK1/2.....	LXVII
9.1.4.1	Verhalten von MSK1/2 (90 kDa) in MCF-10A-Zellen.....	LXVII
9.1.4.2	Verhalten von MSK1/2 (90 kDa) in MCF-7-Zellen .....	LXXI
9.1.4.3	Verhalten von MSK1/2 (90 kDa) in MDA-MB-231-Zellen .....	LXXV
9.1.5	RSK.....	LXXIX
9.1.5.1	Verhalten von RSK (90 kDa) in MCF-10A-Zellen.....	LXXIX
9.1.5.2	Verhalten von RSK (90 kDa) in MCF-7-Zellen .....	LXXXI
9.1.5.3	Verhalten von RSK (90 kDa) in MDA-MB-231-Zellen .....	LXXXIII
9.1.6	c-JUN .....	LXXXV
9.1.6.1	Verhalten von c-JUN (48 kDa) in MCF-10A-Zellen.....	LXXXV
9.1.6.2	Verhalten von c-JUN (48 kDa) in MCF-7-Zellen .....	LXXXVII
9.1.6.3	Verhalten von c-JUN (48 kDa) in MDA-MB-231-Zellen .....	LXXXIX
9.1.7	mTOR.....	XCI
9.1.7.1	Verhalten von mTOR (289 kDa) in MCF-10A-Zellen.....	XCI
9.1.7.2	Verhalten von mTOR (289 kDa) in MCF-7-Zellen .....	XCIII
9.1.7.3	Verhalten von mTOR (289 kDa) in MDA-MB-231-Zellen .....	XCV
9.1.7.4	Coomassie-Färbung.....	XCVII

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>10</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>XCVIII</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>XCIX</b>
<b>12</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>C</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AKT	PKB – Protein-kinase-B
AP-1	activating-protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
ASK1	<i>apoptosis-signal-regulating-kinase-1</i>
ATF-1	<i>activating-transcription-factor-1</i>
ATF-2	<i>activating-transcription-factor-2</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	<i>Bcl2-antagonist-of-cell-death</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated-X-protein</i>
BMK1	<i>big-MAPK-1</i>
BSA	<i>Bovines-Serum-Albumin</i> / Rinderserumalbumin
ca.	circa
CDK	<i>Cyclin-dependent-kinase</i>
CDK-I.	<i>Cyclin-dependent-kinase-Inhibitors</i>
CHOP	<i>CCAAT/enhancer-binding-protein-homologous-protein</i>
c-JUN	<i>cellular-Jun</i>
c-MYC	cellular-myelocytomato-se-oncogene-homolog
CREB	<i>cAMP-response-element-binding-protein</i>
CT	Computertomographie
DCIS	<i>Ductale-Carcinoma-in-situ</i>
DEPTOR	<i>DEP-domain-containing-mTOR-interacting-protein</i>
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DT	Bundesrepublik Deutschland
DTT	Dithiothexitol
DUSP	<i>dual-specificity-phosphatases</i>
EDTA	Ethylendiamintetra-essigsäure
eEF2K	<i>eukaryotic-elongation-factor-2-kinase</i>
EGF	<i>Epidermal-growth-factor</i>
eIF4E	<i>eukaryotic-initiation-factor-4E</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

<i>ER<math>\alpha</math></i>	<i>Estrogen-receptor-<math>\alpha</math></i>
ERK	<i>extracellular-signal-regulated-kinase</i>
FAK	<i>Focale-adhesion-Kinase</i>
FCS	<i>Fetal-calf-serum</i>
G $\beta$ L	<i>G-beta-like-protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GLUT4	Glokose-transporter-4
GPCR	<i>G-Protein-coupled-receptor</i>
GRB-2	<i>Growth-hormon-receptor-binding-protein-2</i>
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase-3
GTP	Guanosinetriphosphate
HSP27	<i>heat-shock-protein-27</i>
IGF1	<i>insulin-like-growth-factor-1</i>
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IRS1/2	Insulin-Rezeptor-Substrat-1/2
JIP	<i>JNK-interacting-protein</i>
JNK	<i>c-jun-N-terminal-kinase</i>
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
Konz.	Konzentration
M	Marker
MAP	<i>mitogen-activated-protein</i>
MAP1/2/4	<i>microtubule-associated-proteins-1/2/4</i>
MAPK	<i>mitogen-activated-protein-Kinase</i>
MAPKK/MAP2K	<i>mitogen-activated-protein-Kinase-Kinase</i>
MAPKKK/MAP3K	<i>mitogen-activated-protein-Kinase-Kinase-Kinase</i>
MCF	<i>Michigan-Cancer-Foundation</i>
MDA-MB	<i>M.-D.-Anderson-metastasis-breast-cancer</i>
MDM2	<i>Mouse-double-minute-2-homolog</i>
MEK1/2	<i>MAPK/ERK-kinase1/2</i>
MEKK3	<i>MAPK/ERK-kinase-kinase-3</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

MEKK4	<i>MAPK/ERK-kinase-kinase-4</i>
MK2/ MAPKAPK2	<i>MAPK-activated-protein-kinase-2</i>
MK3/ MAPKAPK3	<i>MAPK-activated-protein-kinase-3</i>
MKK3	<i>MAPK-kinase-3</i>
MKK4	<i>MAPK-kinase-4</i>
MKK6	<i>MAPK-kinase-6</i>
MKK7	<i>MAPK-kinase-7</i>
MKP	<i>MAPK-phosphatases</i>
MLK3	<i>mixed-lineage-kinase-3</i>
MLKK	<i>Myosin-leichte-Ketten-Kinase</i>
MNK1	<i>MAPK-Interacting-Serine/Threonine-Kinase-1</i>
MNK2	<i>MAPK-Interacting-Serine/Threonine-Kinase-2</i>
mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>
mSIN1	<i>mammalian-stress-activated-protein-kinase-interacting-protein-1</i>
MSK1/2	<i>mitogen-and-stress-activated-kinase-1/2</i>
mTOR	<i>mechanistic/mammalian-target-of-Rapamycin</i>
mTORC1	<i>mechanistic/mammalian-target-of-Rapamycin-Complex-1</i>
mTORC2	<i>mechanistic/mammalian-target-of-Rapamycin-Complex-2</i>
NFκB	<i>nuclear-factor-'kappa-light-chain-enhancer'-of-activated-B-cells</i>
p	<i>phosphoryliert</i>
p70S6K	<i>70-kDa-ribosomal-S6-kinases</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered-Saline</i>
PDGF	<i>platelet-derived-growth-factor</i>
<i>PDK1</i>	<i>3'-phosphoinositide-dependent-kinase-1</i>
PH	<i>pleckstrin-homology</i>
PHLPP	<i>PH-domain-leucine-rich-repeat-protein-phosphatase</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PIP2	<i>Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat</i>
PKC	<i>Protein-Kinase-C</i>
PLA <sub>2</sub>	<i>Phospholipase-A<sub>2</sub></i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

PP2A	Protein-Phosphatase-2A
PP2C	Protein-Phosphatase-2C
PRR5	<i>Proline-rich-protein-5</i>
PTEN	<i>Phosphatase-and-tensin-homolog</i>
R.	<i>Rezeptor</i>
RAF	<i>rapidly-accelerated-fibrosarcoma</i>
RAPTOR	<i>regulatory-associated-protein-of-mTOR</i>
RICTOR	<i>rapamycin-insensitive-companion-of-mTOR</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	<i>Revolutions-per-minute</i>
RSK	<i>90-kDa-ribosomal-S6-kinases</i>
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>Short interfering Ribonukleinsäure</i>
SOS	<i>Son-of-sevenless</i>
STAT1	<i>signal-transducer-and-activator-of-transcription-1</i>
STAT3	<i>signal-transducer-and-activator-of-transcription-3</i>
T	<i>total</i> (im Sinne von gesamt)
TAB1	<i>TAK1-binding-protein-1</i>
TAB2	<i>TAK1-binding-protein-2</i>
TAK1	<i>transforming-growth-factor-<math>\beta</math>-activated-kinase-1</i>
TAO1/2	<i>thousand-and-one-amino-acid-1/2</i>
TBS	<i>Tris-buffered-saline</i>
TBST	TBS + 0,1% Tween
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF- $\beta$	<i>Transforming-growth-factor-<math>\beta</math></i>
TNF $\alpha$	<i>tumor-necrosis-factor-<math>\alpha</math></i>
TRAF2	<i>TNF<math>\alpha</math>-R.-associated-factor-2</i>
TRAF6	<i>TNF<math>\alpha</math>-R.-associated-factor-6</i>
TSC1/2	<i>Tubero-sclerosis-complex-1/2</i>
VEGF	<i>vascular-endothelial-growth-factor</i>
VR	Versuchsreihe
WB	Western-Blot
Wip1	<i>Wild-Type-P53-Induced-Phosphatase-1</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Strukturformel SB203580 .....	12
Abbildung 2	Übersicht MAPK-Signalkaskade .....	24
Abbildung 3	Rechnung zur Auswertung der Phospho-Kinase-Arrays.....	36
Abbildung 4	Aufbau des verwendeten semi-dry Blots .....	38
Abbildung 5	Strukturformel des Luminols .....	39
Abbildung 6	Rechnung zur Auswertung der Western-Blots.....	40
Abbildung 7	Phospho-Kinase-Array von MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	43
Abbildung 8	Expression auffälliger Kinasen, ermittelt im Phospho-Kinase-Array .....	44
Abbildung 9	Western-Blot und quantitative Auswertung von T-ERK1/2 und p-ERK1/2 in MCF-7-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	46
Abbildung 10	Western-Blot und quantitative Auswertung von T-ERK1/2 und p-ERK1/2 in MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	47
Abbildung 11	Western-Blot und quantitative Auswertung von T-ERK1/2 und p-ERK1/2 in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	48
Abbildung 12	Western-Blot und quantitative Auswertung von T-AKT und p-AKT S473 in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	50
Abbildung 13	Western-Blot und quantitative Auswertung von T-AKT und p-AKT T308 in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	51
Abbildung 14	Western-Blot und quantitative Auswertung von T-AKT und p-AKT S473 in MCF-7-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	52
Abbildung 15	Western-Blot und quantitative Auswertung von T-AKT und p-AKT S473 in MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	53
Abbildung 16	Western-Blot von T-AKT und p-AKT T308 in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von SB203580.....	55
Abbildung 17	Western-Blot und quantitative Auswertung von T-HSP27 und p-HSP27 in MCF-7-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	57

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 18 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-HSP27 und p-HSP27 in MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	58
Abbildung 19 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-HSP27 und p-HSP27 in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	59
Abbildung 20 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-MSK1, T-MSK2 und p-MSK1/2 in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	61
Abbildung 21 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-MSK1, T-MSK2 und p-MSK1/2 in MCF-7-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	62
Abbildung 22 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-MSK1, T-MSK2 und p-MSK1/2 in MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von SB203580.....	64
Abbildung 23 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-RSK1/2/3 und p-RSK1/2/3/4 in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	66
Abbildung 24 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-RSK1/2/3 und p-RSK1/2/3/4 in MCF-7-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	67
Abbildung 25 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-RSK1/2/3 und p-RSK1/2/3/4 in MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von SB203580.....	68
Abbildung 26 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-c-JUN und p-c-JUN in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	70
Abbildung 27 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-c-JUN und p-c-JUN in MCF-7-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	71
Abbildung 28 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-c-JUN und p-c-JUN in MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	72
Abbildung 29 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-mTOR und p-mTOR in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	74
Abbildung 30 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-mTOR und p-mTOR in MCF-7-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	75
Abbildung 31 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-mTOR und p-mTOR in MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von SB203580 .....	76
Abbildung 32 Signalkaskade der MAP-Kinasen mit Ergebnissen.....	78

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 33 Ausschnitt aus der MAPK-Signalkaskade zu Kapitel 5.1 .....	81
Abbildung 34 Ausschnitt aus der MAPK-Signalkaskade zu Kapitel 5.2 .....	83
Abbildung 35 Ausschnitt aus der MAPK-Signalkaskade zu Kapitel 5.3 .....	85
Abbildung 36 Ausschnitt aus der MAPK-Signalkaskade zu Kapitel 5.4 .....	86
Abbildung 37 Ausschnitt aus der MAPK-Signalkaskade zu Kapitel 5.5 .....	87
Abbildung 38 Signalkaskade der MAP-Kinasen mit Ergebnissen und crosstalks .....	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Basis-Charakteristika der molekularen Subtypen des Mammakarzinoms .....	5
Tabelle 2 Erst-Antikörper .....	28
Tabelle 3 Zusammensetzung des Nährmediums für MCF-10A-Zellen .....	32
Tabelle 4 Pipettierschema zum Gießen der Gele für die SDS-PAGE .....	37

### 1 Einleitung

„... Find a cure for cancer ... The time has come in America when the same kind of concentrated effort that split the atom and took man to the moon should be turned toward conquering this dread disease.“ Mit diesen Worten initiierte Richard Nixon vor genau 50 Jahren bei einer Rede zur Lage der Nation den „War of cancer“, eine vorerst auf 25 Jahre angelegte Kampagne, mit dem Ziel eine Möglichkeit zur Heilung des Krebs zu finden (1, 2). Der Lauf der Geschichte brachte jedoch die ernüchternde Einsicht, dass die Reise zum Mond ein unkomplizierteres Unterfangen als die Heilung von Krebs ist.

Allein in Deutschland wurden im Jahr 2017 ca. 489.000 Neuerkrankungen an Krebs registriert. Bei den Frauen war das Mammakarzinom mit einem Anteil von 29,5% an den Neuerkrankungen das häufigste Krebsleiden (3), welches trotz der immer früheren Diagnosestellung (4, 5) und verbesserter Therapien (6) immer noch bei 23,4% der Betroffenen zum Tode führte (7). Neue Therapien schaffen es zunehmend das Gesamtüberleben – auch bei Patientinnen mit weit fortgeschrittenen Krankheitsgeschehen – im Durchschnitt zu verlängern. Die Entwicklung des HER2/neu-Antikörpers Trastuzumab um die Jahrtausendwende war ein großer Erfolg im Kampf gegen Brustkrebs (8). Eine kürzlich vorgestellte Studie zeigte, dass die Kombination der beiden HER2/neu-Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab in der systemischen Therapie das Gesamtüberleben um 15,7 Monate verlängern kann (9).

Diese Erfolge sind erfreulich, jedoch offenbart die Tatsache, dass wir die Erfolge der Forschung immer noch in der Einheit „Verlängerung des Gesamtüberlebens in Monaten“ angeben, dass der Weg zur „...cure for cancer...“ (1, 2) lang und der Forschungsbedarf groß bleibt. Zu diesem Forschungsbedarf gehört auch die Identifizierung neuer Angriffspunkte für Therapien. Die HER2/neu-Antikörper wirken auf den nachgeschalteten Signalweg der Kinase ERK ein. Dies ist eine der MAP-(*mitogen-activated-protein*)-Kinasen – zu denen auch p38 zählt (8, 10-13).

Dem seit den 1990er Jahren erforschten p38 (14, 15) wurden Eigenschaften eines Tumorpromotors zugeordnet (16-18). So erscheint eine Inhibition zur Therapie von Krebs sinnvoll. Die Bedeutung des p38 für das Mammakarzinom wird wesentlich durch

## Einleitung

---

die Auswirkungen seiner Inhibition durch SB203580 erforscht (19). Daher ist das Verständnis der „Molekularen Wirkweise von SB203580 in Mammakarzinom-Zellen“ wesentlich, um ein für die Entwicklung von neuen Therapieansätzen ausreichendes Verständnis des Signalweges zu erlangen.

p38 wurde in diversen Veröffentlichungen auch tumorsuppressive Eigenschaften zugeordnet (20, 21), die sich mit der Rolle eines Tumorpromotors klar widersprechen. Damit ist auch der Sinn einer Inhibition des p38 – mit der Absicht der Entwicklung einer Krebstherapie – in Frage zu stellen. Um diese gegensätzlichen Erkenntnisse einordnen zu können ist es essentiell, das verwendete Werkzeug zur Untersuchung – den p38 Inhibitor SB203580 (15) – genau zu kennen, ebenso wie seinen Einfluss auf andere Kinasen in Mammakarzinom-Zellen. So kann vermieden werden, dass Eigenschaften von anderen potentiell durch SB203580 beeinflussten Signalwegen fälschlicherweise dem p38 zugeordnet werden.

Um diese Einflüsse des SB203580 auf andere Signalwege in Mammakarzinom-Zellen aufzuzeigen, sollten in dieser Arbeit die Aktivitäten unterschiedlicher Signalwege nach SB203580-Behandlung in *Phospho-Kinase-Arrays* untersucht werden. Somit sollte ein Überblick gewonnen werden bei welchen Proteinen sich das Phosphorylierungsverhalten unter Einfluss von SB203580 ändert. Anschließend sollten zur Bestätigung der Ergebnisse Westernblot-Analysen durchgeführt werden. Dieses Vorhaben sollte mit den Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 sowie der nicht-malignen Zelllinie MCF-10A umgesetzt werden, um festzustellen, ob der Einfluss von SB203580 vom Zelltyp abhängig ist.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Das Mammakarzinom

Jede achte Frau in Deutschland erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Die Inzidenz liegt bei 168 von 100.000 Frauen pro Jahr (3). Es ist weltweit die häufigste Krebstodesursache (22). Zu den wichtigsten Risikofaktoren gehören ein langer hormonell aktiver Zeitraum (23), ein Lebensalter über 60 Jahren und die genetische Prädisposition (24). Der lange hormonell aktive Zeitraum wird durch frühe Menarche, späte Menopause, wenige Schwangerschaften und kurze Stillzeit oder Hormonersatztherapie in der Postmenopause geprägt (23). Die Östrogenproduktion der Adipozyten (23) ist ein Grund warum auch Übergewicht die Wahrscheinlichkeit erhöht an einem Mammakarzinom zu erkranken (24), die Insulinresistenz wie sie beim Diabetes mellitus Typ II auftritt ist ein weiterer. Sie führt zu einer erhöhten Aktivität von IGF-1 (*insulin-like-growth-factor-1*) welches die Proliferation von benignen sowie malignen Brustzellen anregt (23). Zu den hereditären Risikofaktoren zählen insbesondere Keimbahnmutationen in Tumorsuppressorgenen, wie BRCA1/2, RAD51C, TP53 und PTEN (24, 25). 4-10% aller Neuerkrankungen sind genetisch determinierte Karzinome (26-28). Weitere Risikofaktoren sind hohe Brustdichte, Brustkrebs in der Eigen- oder Familienanamnese (24), aber auch Strahlungsexposition, Nikotin und Alkoholabusus (24).

Die Einteilung der Stadien richtet sich nach der TNM-Klassifikation. Tis bezeichnet ein Carcinoma in situ. Tumoren bis 2 cm Durchmesser gelten als T1, 2 bis 5 cm als T2 und alle größeren Tumoren als T3. Ist die Haut oder die Brustwand infiltriert, gelten sie unabhängig von ihrer Größe als T4 (29). N0-N3 und M0-M1 gibt das Ausmaß der befallenen Lymphknoten und das Vorliegen von Fernmetastasen wieder. Die therapeutischen Entscheidungen richten sich nach den UICC Stadien 0 - IV, wobei UICC 0 einem Carcinoma in situ, also Tis und UICC IV einer Fernmetastasierung, also dem M1 entspricht (29).

In der Histologie zeigt sich am häufigsten das invasive Karzinom ohne speziellen Typ, welches ehemals als „invasiv duktal nicht anders spezifiziert“ bezeichnet wurde. Dieser Typ wird bei 80% der Patientinnen festgestellt, die ein Mammakarzinom diagnostiziert

bekommen. Des Weiteren gibt es die invasiven Karzinome mit speziellem Typ, wozu das invasiv-lobuläre Karzinom zählt, sowie zahlreiche Risikoläsionen (30). Bei diesen lässt sich sowohl zum Karzinom ohne speziellen Typ als auch zum Karzinom mit speziellem Typ ein Pendant einer nicht-invasiven Präkanzerose zuordnen. Merkmal ist, dass die Basalmembran dabei nicht durchbrochen wird. Beim Karzinom ohne speziellen Typ ist es das *Ductale-Carcinoma-in-situ* (DCIS) (30, 31), welches die mit Abstand häufigste nicht-invasive Krebsvorstufe ist (32). Beim Karzinom mit speziellem Typ ist es die lobuläre intraepitheliale Neoplasie. Sonderformen des Mammakarzinoms sind unter anderem der Morbus Paget – ein DCIS der Mamille – oder auch das schwer zu therapierende inflammatorische Mammakarzinom (30).

Die interdisziplinäre Tumorkonferenz bietet den geeigneten Rahmen das therapeutische Vorgehen festzulegen (29). Die Therapie des Mammakarzinoms erfolgt primär kurativ. Bei Vorliegen von Fernmetastasen jedoch steht das palliative Vorgehen im Vordergrund (24, 30). Beim kurativen Therapieansatz ist die operative Entfernung des Tumors zu priorisieren, bevorzugt brusterhaltend. Dies ist jedoch abhängig vom Verhältnis der Brust- zur Tumorgröße. Weitere Bestandteile der Therapie sind eine Radio- und oder eine systemische Therapie (30). Die Tumorbettbestrahlung ist bei brusterhaltender Vorgehensweise immer erforderlich. Falls die adjuvante Radiatio nicht möglich ist, wird eine Mastektomie durchgeführt (24). Die systemische Therapie kann adjuvant oder neoadjuvant und mit Antikörpern, anti-hormonell oder als Chemotherapie erfolgen (30).

Die Chemotherapie kann mit Anthracyclin und Taxan (29) durchgeführt werden, wie zum Beispiel Epirubicin (33) mit Docotaxel (29). Bei triple-negativen Tumoren wird noch Carboplatin dazugenommen (33). Um eine Operabilität zu ermöglichen kann diese Therapie auch neoadjuvant erfolgen (30). In der palliativen Situation besteht die Möglichkeit die systemische Therapie noch um CDK4/6-Inhibitoren, wie Ribociclib, zu ergänzen (30).

Wegweisend für die Auswahl der systemischen Therapie ist die Bestimmung der Rezeptoren durch immunhistochemische Färbungen (Tabelle 1) (32). Über die Anfärbung des intranukleären Proteins KI-67 lässt sich der Proliferationsindex bestimmen. Er korreliert mit dem Mitose-Index und lässt Rückschlüsse über die

Wachstumsgeschwindigkeit zu (24). Der Status für den Östrogen- oder Progesteron-Rezeptor ist bei 75% der Mammakarzinom Patientinnen positiv (34). Diese Tumoren werden als Luminal A oder B charakterisiert (35). Für sie gibt es die Möglichkeit einer endokrinen Therapie mit antihormonellen Wirkstoffen, wie dem Tamoxifen, einem selektiven Estrogen-Rezeptor-Modulator. Die GnRH-Analoga kommen in der Prämenopause zur Ovarsuppression zum Einsatz und Aromatasehemmer, wie das Anastrozol, nutzt man postmenopausal (24).

Das weiteren wird der Status des Rezeptors HER2/neu bestimmt (29, 32). Ein Karzinom, welches keine der drei Rezeptoren präsentiert wird als triple-negatives Karzinom bezeichnet. Jener Phänotyp findet sich bei den *Basal-like*-Tumoren und kann durch den Nachweis von Zytokeratin 5/6 bestätigt werden (35). Bei HER2-positiven Karzinomen sollte die systemische Therapie um eine Antikörpertherapie mit Trastuzumab über 12 Monate ergänzt werden. Hierbei ist jedoch die Kardiotoxizität zu beachten, insbesondere bei Patientinnen, die auch Anthracycline bekommen (29, 32). Trastuzumab wirkt am EGF-Rezeptor auf die MAP-Kinase-Signalkaskade ein (8, 36).

**Tabelle 1 Basis-Charakteristika der molekularen Subtypen des Mammakarzinoms**

(35, 37-39) ER = Estrogen-Rezeptor, PR = Progesteron-Rezeptor

Molekularer Subtyp	Expression von Steroidhormonrezeptors	HER2/neu	Zytokeratin 5/6
Luminal A	ER+ und/oder PR+	-	-
Luminal B	ER+ und/oder PR+	+	-
Basal-like	ER- und PR-	-	+
HER2/neu positiv	ER- und PR-	+	-

## 2.2 MAPK

MAP-Kinasen transferieren extrazelluläre Signale zu intrazellulären Zielen (10, 40). Das Akronym MAP steht für *mitogen-activated-protein*. Sie sind beispielsweise beteiligt an Embryogenese, Zelldifferenzierung, Zellwachstum, Inflammation, Stressreaktionen und Apoptose (41, 42). Ein Mitogen ist ein zur Zellteilung anregendes Protein (43). Die MAP-Kinase-Signalwege umfassen mindestens drei hintereinander geschaltete Kinasen. Eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP-3K oder MAP-KKK)

aktiviert eine MAP-Kinase-Kinase (MAP2K oder MAPKK) und diese aktiviert wiederum eine MAP-Kinase (MAP-K). Man spricht hier auch von Phosphorylierungskaskaden (13, 41, 44, 45).

Zu den MAP-Kinasen gehören ERK (*extracellular-signal-regulated-kinase* oder p42/44), JNK (*c-jun-N-terminal-kinase* oder *stress-activated-protein-kinase-1* – SAPK-1) und p38 (*Cytokinin-Specific-binding-Protein* – CSBP oder *reactivating-kinase* – RK oder SAPK2)(11-13). ERK1 und ERK2 werden von Mitogenen aktiviert und steigern die Proliferation. ERK5 (oder *Big-MAP-kinase-1* – BMK-1) wird zum Beispiel durch oxidativen Stress oder Wachstumsfaktoren aktiviert. JNK und p38 werden weniger durch Mitogene aktiviert als vielmehr durch Stresssignale, Wachstumsfaktoren oder inflammatorische Zytokine (11, 13).

### 2.2.1 p38

p38 ist ein 38 kDa schweres Enzym (14, 46, 47). Es ist die Orthologie zu Hog1p der Hefe (48). Zu den vier p38-Varianten gibt es entsprechend vier *Genloci*: p38 $\alpha$  (*MAPK14*), p38 $\beta$  (*MAPK11*), p38 $\gamma$  (*MAPK12* oder ERK6 (Kapitel 2.2.3)) und p38 $\delta$  (*MAPK13*). p38 $\alpha$  und p38 $\beta$  sind ubiquitär vorhanden, jedoch p38 $\beta$  in geringerem Ausmaß (44, 49). p38 $\alpha$  hat Bedeutung bei der Regulation der EPO-Expression und damit Einfluss auf die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen (44, 50). Auch bei der Limitierung der Proliferation anderer Zelltypen, wie dem endokrinen Pankreas, zeigte sich dies (44, 51). p38 $\gamma$  und p38 $\delta$  sind je nach Gewebetyp unterschiedlich exprimiert. Dies fällt beispielsweise in Monozyten auf. Hier findet man ausschließlich p38 $\alpha$ , aber p38 $\beta$  und p38 $\gamma$  werden nicht exprimiert. Bei der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen wird p38 $\delta$  so stark exprimiert, so dass es in ähnlicher Konzentration wie p38 $\alpha$  vorliegt. Bei Neutrophilen konnten auch nur p38 $\alpha$  und p38 $\delta$  detektiert werden. p38 $\gamma$  scheint ein muskelspezifisches Protein zu sein und dort die Expansion von Satellitenzellen zu regulieren (13, 52-54). Lediglich in Endothelzellen kann man mRNA zu p38 $\gamma$ , aber kein Protein nachweisen (52, 53).

Bei Versuchen mit *Knockout*-Mäusen kam heraus, dass ein *Knockout* von *MAPK14* (Gen zu p38 $\alpha$ ) zu schweren Störungen in der Embryonalentwicklung führt. Die Embryonen versterben an den schweren plazentaren Fehlbildungen (44, 55, 56).

Ebenso ergeht es Mausembryonen mit einem *Knockout* von *MKK3* und *MKK6*, dieser *Knockout* ist epistatisch zu dem des *p38 $\alpha$*  (44, 57). Bei den *p38 $\beta$* - und *p38 $\gamma$* -*Knockout*-Mäusen ergibt sich kein eindeutiger Phänotyp. Bei einem *Knockout* des Gens von *p38 $\delta$*  wiederum ist dieser sehr eindeutig, die Tiere sind geschützt gegenüber einer durch *high-fat*-Diät induzierten Insulin-Resistenz. Dies hängt mit der Regulierung der PDK1-Aktivität zusammen. *p38 $\delta$*  scheint eine bedeutende Rolle für den Glukosehaushalt zu spielen (44, 58, 59).

### 2.2.1.1 *p38-Signalkaskade*

*p38* wird von *MKK3* (*MAPK-kinase-3*) und *MKK6* phosphoryliert (Abbildung 2). Diese sind also die MAPKK für *p38*. *MKK6* aktiviert so alle Isoformen von *p38*, *MKK3* alle außer *p38 $\beta$*  (13, 19, 60, 61). *MKK4*, bekannt für die Aktivierung von *JNK*, aktiviert auch *p38 $\alpha$*  (57, 62). Die Aktivierung von *p38* findet durch eine duale Phosphorylierung an der Stelle T180 und Y182 an einem Thr-Gly-Tyr Motiv statt (14, 44). Die Varianten, wie es zu einer Aktivierung der MAPKK kommen kann, sind vielfältig. Eine eindeutige MAPKKK in dieser Funktion ist *ASK1* (*apoptosis-signal-regulating-kinase-1*), weitere sind: *TAK1* (*transforming-growth-factor- $\beta$ -activated-kinase-1*), *TAO1/2* (*thousand-and-one-amino-acid-1/2*), *MLK3* (*mixed-lineage-kinase-3*), *MEKK3* (*MAPK/ERK-kinase-kinase-3*) und *MEKK4* (19, 63). In Säugetier-Zellen hat sich gezeigt, dass *ASK1* eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von *p38 $\alpha$*  durch oxidativen Stress zukommt (19, 64). *ASK1* wird auch durch den *TNF $\alpha$ -R*. (*tumor-necrosis-factor- $\alpha$ -Rezeptor*) über *TRAF2* (*TNF $\alpha$ -R.-associated-factor-2*) aktiviert (65-67).

*TGF- $\beta$*  (*Transforming-growth-factor- $\beta$* ) aktiviert *TAK1* (*Transforming-growth-factor- $\beta$ -activated-kinase-1*) (13, 68), welches auch Signale der Rezeptoren des *IL-1* (*Interleukin-1*) und von *TNF- $\alpha$*  weiterleitet (13, 69, 70). Die Interaktion zwischen dem Rezeptor und *TAK1* wird von *TAB2* (*TAK1-binding-protein-2*) und *TRAF6* vermittelt (13, 71-73). *TAK1* aktiviert neben dem *p38*- und *JNK*-Signalweg auch das anti-apoptotisch wirkende *NF $\kappa$ B* (*nuclear-factor-'kappa-light-chain-enhancer'-of-activated-B-cells*) (74-76).

*TAB1* ist als Gerüstprotein normalerweise an der Übertragung der Aktivität des *IL1*-Rezeptors auf *TAK1* beteiligt (77). *TAB1* hat keine katalytische Aktivität, vermittelt

trotzdem eine Autophosphorylierung an p38 $\alpha$ , nicht jedoch an den anderen Isoformen. Dieser Weg zeigt, dass es auch abseits des MAPKKK-MAPKK-MAPK-Systems alternative bzw. nicht-kanonische Wege zur Aktivierung von MAPK gibt (19, 78, 79).

Der GPCR (*G-Protein-coupled-receptor*) kann Zellwachstum und Differenzierung stimulieren. Das heterotrimere G-Protein transferiert das Signal zu der MAPKKK TAO1/2, welches dann MKK3/6 aktiviert. (13, 80-83).

### 2.2.1.2 Inaktivierung des p38-Signalweges

In die Beendigung der katalytischen Aktivität sind Phosphatasen beteiligt, die die Threonin- und Tyrosin-Reste am Thr-Gly-Tyr-Motiv mit einbeziehen. Die PP2A (*protein-phosphatase-2A*) spaltet in dieser Funktion je einen Phosphat-Rest ab (19, 84). Diese wird auch durch p38 aktiviert und hat neben p38 MEK1/2 (*MAPK/ERK-kinase1/2*) – die MAPKK der ERK1/2 – als Substrat, wodurch es bei vermehrter Aktivität des p38 zu verminderter Aktivität von ERK1/2 kommt (85-87). Aus der Gruppe der PP2C ist das Wip1 (*Wild-Type-P53-Induced-Phosphatase-1*) zu erwähnen, das von p53 aktiviert wird und unter anderem p38 $\alpha$  als Substrat hat (19, 88, 89). Die DUSPs (*dual-specificity-phosphatasen*), die auch als MKPs (*MAPK-phosphatasen*) bezeichnet werden, zeichnen sich durch die Abspaltung beider Phosphatgruppen aus. Die MKP-1/4/5/7 können p38 $\alpha$ , p38 $\beta$  und JNK dephosphorylieren und werden transkriptionell mit den p38 aktivierenden Stimuli hochreguliert. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Limitierung des Signalweges (19, 90).

### 2.2.1.3 Substrate des p38

Cuadrado et al. schätzte, dass jede MAPK 200-300 Substrate hat. Darunter befinden sich bei p38 Protein-Kinasen und sowohl zytoplasmatische wie auch nukleäre Substrate. Eine der wichtigsten von p38 aktivierten Proteinkinasen ist MSK1/2 (*mitogen-and-stress-activated-kinase-1*) (Kapitel 2.2.3.3) (19). Während MSK1/2 eher die Transkription aktivieren, sind MK2 (*MAPKAPK2 = MAPK-activated-protein-kinase-2*) und MK3 (=MAPKAPK3) mehr an einer Genexpression, zumeist auf post-transkriptionaler Ebene, beteiligt. Sie phosphorylieren beispielsweise CREB (*cAMP-response-element-binding-protein*) oder den eEF2K (*eukaryotic-elongation-*

factor-2-kinase), der die Elongation der mRNA während der Translation sicherstellt (19, 91-93).

Des Weiteren kommt MK2 eine wichtige Rolle im Zytoskelett beim Actin-Filament-*Remodelling* durch Phosphorylierung des HSP27 (*heat-shock-protein-27*) zu (15, 19, 93, 94). Dieser Zusammenhang wird dadurch gestützt, dass die Aktivierung von p38 in mit Cytochalasin-D behandelten Zellen in Abhängigkeit von einer entsprechenden Expression von HSP27 zu einer sich steigernden Stabilität der Aktin-Filamente führt und dass dieser Effekt bei Behandlung der Zellen mit SB203580 komplett entfällt (93, 95).

Die von p38 phosphorylierten Kinasen MNK1 (MAPK-Interacting-Serine/Threonine-Kinase-1) und MNK2 regulieren die Proteinsynthese über den eIF4E (*eukaryotic-initiation-factor-4E*) (19, 96). Im Nukleus interagiert p38 auch direkt mit ATF-2 (*activating-transcription-factor-2*) und CHOP (*CCAAT/enhancer-binding-protein-homologous-protein*) (19, 93). Zu den Substraten, die p38 im Zytoplasma bedient, gehören, die PLA<sub>2</sub> (Phospholipase-A<sub>2</sub>) oder das Mikrotubuli-assoziierte Protein TAU (19, 91, 93). Tau hat Bedeutung in der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung und p38 scheint durch eine entzündungsbedingte Hyperphosphorylierung mit daraus folgender Akkumulation des Tau-Proteins auch in die Pathogenese dieser Erkrankung involviert zu sein (91, 97).

Weitere zytoplasmatische Substrate sind Cyclin D1 und CDK-Inhibitoren (*Cyclin-dependent-kinase-Inhibitors*) (19, 91, 93). p38 hemmt Cyclin D1, dessen Anstieg essentiell für den Übergang in die S-Phase ist (44, 98). Weiterhin wird p53 durch p38 aktiviert (44, 99). Über die Kontrolle des G1/S-Checkpoints führt dies zu einem Proliferationsstopp. p38 hemmt zudem den Transkriptionsfaktor E2F, der gehemmt den Übergang in die S-Phase blockiert. So wirkt p38 synergistisch zum dephosphorylierten Retinoblastom-Protein (44, 100). Zusätzlich werden auch noch die CDK-I. durch p38 aktiviert (44, 101). p38 kann aber auch die Proliferation steigern, jedoch wurde dieser Effekt nur in einigen Karzinom-Zelllinien und hämatopoetischen Zellen beobachtet (44, 102). Diese Charakteristik des p38 ist wichtig für die Einordnung der Kinase im Zusammenhang mit den Vorgängen maligner Entartung.

### 2.2.1.4 p38 in der Tumorgenese

Verschiedene Veröffentlichungen zeigten die bedeutende Rolle des p38 bei der Entstehung bösartiger Tumoren, wie für Prostata- (103, 104), Brust- (105, 106), Blasen- (107, 108), Leber- (109) und Lungenkrebs (18), sowie beim follikulären Lymphom (110, 111) und Leukämie (112). Neben der proliferationshemmenden Wirkung des p38 über p53 und die Cycline (Kapitel 2.2.1.3) stellt es sich während der Anpassung an Stress, vor allem bei Zellzyklus-Arrest und Differenzierungsprozessen, als Tumorsuppressor dar (44). Ventura et al. bewiesen, dass Mäuse denen p38 $\alpha$  fehlt, anfällig für die Entwicklung von Lungentumoren und chemisch induzierten Malignomen der Leber sind (20, 44). Die anti-onkogene Rolle von p38 kommt auch von seiner Kapazität in bestimmten Kontexten Zellseneszenz voranzutreiben. Dabei spielt das *downstream-target* MSK1 eine entscheidende Rolle. Bei Patienten mit Estrogen-Rezeptor-positivem Brustkrebs ist eine niedrige MSK1-Expression mit früher Metastasierung assoziiert. Hemmt man MSK1, hemmt dies Differenzierungsvorgänge im Brustkrebszellen und fördert das Anwachsen der Zellen im Knochen sowie deren Wachstumskapazitäten (21, 44).

p38 hat aber auch das Potential Krebs über Verstärkung von Überlebensfähigkeit, Migration oder Resistenzen gegenüber Chemotherapie oder Stress zu fördern (44, 102). Die Hemmung von p38 führt zur Resistenz gegenüber Anoikis. Dies ermöglicht zirkulierenden Krebszellen das Überleben (13, 17). Es hat sich gezeigt, dass p38 zur Tumorprogression im Maus-Modell von Brustkrebs benötigt wird. Eine p38 $\alpha$ -Deletion beeinträchtigt die DNA-Reparatur, erhöht replikativen Stress, sowie chromosomale Instabilität (44, 113). Passend zu dieser Rolle als Tumor-Promotor, wurde von Greenberg et al. in Lungentumoren von 18 verschiedenen Patienten im Vergleich zu normalen Gewebeproben eine erhöhte p38-Kinase-Aktivität festgestellt (18, 44). Leelahavanichkul et al. wiesen immunhistochemisch nach, dass bei 79% von 400 Plattenepithel-Karzinom-Proben aus dem Kopf-Hals-Bereich p38 erhöht war (44, 114).

p38 soll über den Prozess der epithelialen-mesenchymalen-Transition mitverantwortlich sein für die Entstehung von Metastasen. So erlangen die Tumorzellen die Fähigkeit der Invasion, Migration und Extravasation (13, 16, 115). Es ist auch dahingehend in den Metastasierungsprozess involviert, dass p38 die Expression

des extrazellulären Glykoproteins FIBULIN-3 reduziert, welches seinerseits die Zellmigration reguliert (44, 116). Des Weiteren induziert p38 $\alpha$  die Expression von VEGFA und HIF1 $\alpha$ . Beide Moleküle sind Angiogenese-fördernd und damit auch metastasierungsfördernd (44, 102).

Die Einordnung von p38 gegenüber maligner Entartung ist daher schwierig und differenziert. Ob p38 vorrangig tumorsuppressiv oder tumorfördernd wirkt, bleibt eine zentrale Frage in der Erforschung von p38. Das Verhalten der Kinase ist von den Modell- bzw. Versuchsbedingungen und insbesondere vom Zelltyp abhängig. Der Entartungsgrad der Zellen scheint dabei wesentlich zu sein. Insbesondere mit Blick auf die Entwicklung neuer Therapieansätze ist diese Frage zentral (44).

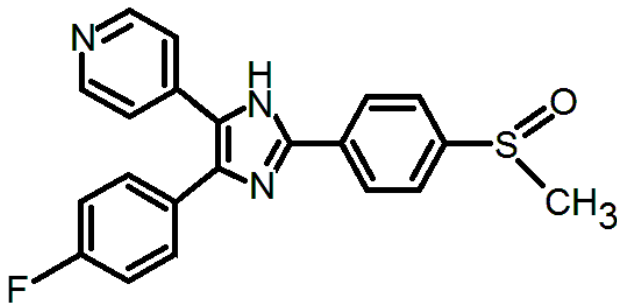
### *2.2.1.5 p38 als Ziel in der Therapie von Krebs*

Bisher gab es sieben klinische Phase I oder Phase II Studien, die p38 als Ziel hatten. Ralimetinib hemmt p38 $\alpha$  und p38 $\beta$  (44). Es wird zur Behandlung vom Ovarialkarzinom (117), dem Glioblastom und dem metastasierten Brustkrebs getestet. Obwohl viel Aufwand zur Entwicklung effektiver p38-Inhibitoren für die klinische Praxis betrieben wurde, scheiterten die klinischen Studien an den Nebenwirkungen bei den Patienten. Meist waren systemische Nebenwirkungen an Herz, Leber und Nervensystem Schuld daran (44, 118). Dies liegt wohl darin begründet, dass p38 einen stark multifunktionalen Charakter hat. Es wurde gezeigt, dass es mehr als 60 Proteine reguliert (44, 119). Obwohl *in vivo*-Experimente zeigten, dass eine p38-Hemmung die Tumorprogression in vielen Fällen unterdrückt, bleibt die Frage offen, ob diese Inhibitoren in anderen Geweben zur Initiation von Entartung führen. Hier besteht *prä*-klinisch weiterer Forschungsbedarf (44, 120). *In vitro* ist SB203580 einer der meist verwendeten p38-Inhibitoren (19).

### *2.2.1.6 Der p38-Inhibitor SB203580*

SB203580 ist ein kompetitiver Typ-I-Inhibitor aus der Klasse der Pyridinylimidazol-Inhibitoren (Abbildung 1). Als eine Kinase besitzt p38 eine ATP-Bindungsstelle. Mit der Adenin-Bindungsstelle dieser Region des p38 interagiert SB203580 (121). 1994 beschrieben Lee et al. erstmalig SB203580 und veröffentlichten daraufhin ihre Beobachtung, dass der Wirkstoff die LPS-induzierte Zytokinproduktion

in Monozyten unterdrückt (14). SB203580 interagiert vorrangig mit den Isoformen p38 $\alpha$  und p38 $\beta$  (13, 122, 123). Ein großer Teil der Informationen, die wir über p38 haben, wurde unter Nutzung von SB203580 erlangt (19). Die Selektivität des Inhibitors ist in kontroverser Diskussion (Kapitel 5.0). Während Koeberle et al. ihn als schwach selektiv deklarieren (124), bezeichneten Cuenda et al. ihn bei seiner Etablierung als „hochgradig selektiven“ Inhibitor, auch wenn Cuenda et al. bereits Auswirkungen von SB203580 unter anderem auf JNK beschreiben (15).



**Abbildung 1 Strukturformel SB203580**

(eigene Abbildung nach (15))

### 2.2.2 JNK

Der JNK-Signalweg (*c-Jun-N-terminal-kinase*) ist - ähnlich wie ERK und p38 – in Tumoren oft dereguliert. Wie p38 wird auch JNK durch Stress aktiviert, daher auch die Bezeichnung als SAPK-1 (*stress-activated-protein-kinase-1*) und es erfüllt eine Schlüsselrolle bei Inflammation, Proliferation, Differenzierung und Apoptose, sowie je nach Zelltyp auch bei Vorgängen der Migration (65, 102, 125, 126). Für JNK codieren drei Gene: *MAPK8* für das Protein JNK1, *MAPK9* für das Protein JNK2 und *MAPK10* für JNK3. Über alternatives Splicing ergeben sich mehr als 10 Isoformen. Während man JNK1 und JNK2 ubiquitär nachweisen kann, gelingt dies bei JNK3 vor allem im ZNS (102, 127). Im JNK-Signalweg konnte nachgewiesen werden, dass Gerüstproteine wie JIP (*JNK-interacting-protein*) eine entscheidende Bedeutung für die Signalweiterleitung haben (128).

#### 2.2.2.1 JNK-Signalweg

Aktiviert wird JNK über duale Phosphorylierung in einem Thr-X-Tyr-Motiv an den Stellen T183 und Y185, welche durch die MAPKKs MKK4 und MKK7 katalysiert wird

(Abbildung 2) (129-131). TGF- $\beta$ , IL1 und TNF $\alpha$  aktivieren über TAK1 den JNK-Signalweg, wie es bei p38 erfolgt (Kapitel 2.2.1.1). Die Interaktion des GPCR unterscheidet sich im JNK-Signalweg von p38 und vollzieht sich wahrscheinlich unabhängig von TAO1/2. Der exakte Signalweg involviert die Proteine RAC und CDC42 und ist noch nicht abschließend geklärt (132, 133).

Analog zu p38 kann auch im JNK-Signalweg durch TNF $\alpha$  über das Gerüstprotein TRAF2 und die MAPKKK ASK1 eine Aktivierung von MKK4 und MKK7 erfolgen. JNK kann dabei pro- oder anti-apoptotisch wirken. Dies hängt nicht nur von der Art des Stimulus ab, sondern auch von der Signalstärke. Während eine transiente JNK-Aktivierung das Zellüberleben fördert, bringt eine starke Aktivierung die Zelle zur TNF $\alpha$ -abhängigen Apoptose. Die transiente Aktivierung wird dann auch nicht ASK1, sondern MEKKs oder MLKs in ihrer Funktion als MAPKKKs zugeschrieben (65, 67).

### 2.2.2.2 JNK-Substrate

JNK phosphoryliert p53 (134) und dessen ebenfalls pro-apoptotischen Cofaktor BAX (*Bcl-2-associated-X-protein*) (135). Fuchs et al. konnten nachweisen, dass der JNK-Signalweg die Stabilität und transkriptionelle Aktivierung von p53 erhöht und dass sich die Fähigkeit von p53 potenziert, den programmierten Zelltod einzuleiten (134, 136). Das Verhältnis des JNK-Signalweges zum ebenfalls pro-apoptotisch wirkenden BAD (*Bcl2-antagonist-of-cell-death*) wird dagegen kontrovers diskutiert (137-139).

Verschiedene Transkriptionsfaktoren sind Substrate von JNK. Wie p38 aktiviert auch JNK ATF-2 (140). Der wichtigste von JNK aktivierte Transkriptionsfaktor ist c-JUN (141), welcher essentiell für die Initiierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (activating-protein-1) ist (102, 142). AP-1 kann sowohl als Homo- wie auch als Heterodimere mit Jun, Fos oder ATF bestehen (143). Während die tumorsuppressiven Eigenschaften des JNK-Signalwegs auf den pro-apoptotischen Kaskaden beruhen, sind die onkogenen Eigenschaften im Wesentlichen auf die Phosphorylierung von c-JUN und die Aktivierung von AP-1 zurückzuführen. AP-1 reguliert so Gene, die Zellzyklus, Apoptose, Metalloproteinasen und nukleäre Hormonrezeptoren sowie die Expression von *immediate-early-genes* steuern. Letztere ist in ruhenden Zellen oft gering oder nicht nachweisbar, werden aber nach extrazellulärer Stimulation, wie z. B.

der Zugabe eines Wachstumsfaktors oder ultravioletter Bestrahlung und anderen Stressfaktoren, innerhalb von Minuten aktiviert (102, 142). Durch die ERK-Signalkaskade kann FOS als Bestandteil des Heterodimers AP-1 aktiviert werden (10, 143).

### 2.2.3 ERK

Der ERK-Signalweg steht in enger Beziehung zu Zellproliferation und Differenzierung. Somit hat ERK eine große Bedeutung unter den Signaltransduktions-Kaskaden (144). ERK ist eine Serine/Threonin-Kinase, welche mitogene Signale weiterleitet (10, 145). Generell ist ERK im Zytoplasma zu finden. Nach Aktivierung tritt es in den Nukleus ein und reguliert Transkription und Gen-Expression. Es gibt acht Isoformen. Zum Teil wird auch nur von sechs Isoformen gesprochen, da ERK6 eine Bezeichnung für die Variante einer anderen MAP-Kinase ist, nämlich p38 $\gamma$  und ERK5 als vierte der vier MAP-Kinasen dann ebenfalls nicht mitgerechnet wird (40, 145, 146). ERK1 mit einer Größe von 44 kDa und ERK2 mit einer Größe von 42 kDa sind die beiden wichtigsten Vertreter der ERK-Familie (147). Ihre Aminosäure-Sequenz ist zu 85% homolog. Auch alle funktionalen Domänen teilen sich beide. Trotzdem zeigten Studien drastisch unterschiedliche Phänotypen, wenn man ERK1 oder ERK2 ausknockt (147-150). ERK5 wiegt mit 110 kDa mehr als das Doppelte wie die anderen MAPK, daher findet man dafür auch die Bezeichnung BMK1 (*big-MAPK-1*). Die strukturellen Unterschiede von ERK5 zu den anderen Isoformen ermöglichen eine Autophosphorylierung der C-terminalen Transkriptions-Aktivierungs-Domäne, wodurch es fähig ist die eigene Gen-Transkription direkt zu regulieren (151). Es wird vor allem durch oxidativen Stress oder Wachstumsfaktoren aktiviert (11, 13).

#### 2.2.3.1 ERK-Signalkaskade

Der Signalweg von ERK1/2 kann stimuliert werden durch Zytokine, Viren, Wachstumsfaktoren, wie PDGF (*platelet-derived-growth-factor*) oder EGF, Liganden von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren sowie onkogenen Stimuli. Der jeweilige Rezeptor an der Zellmembran gibt das eingehende Signal an RAS, ein kleines G-Protein weiter (Abbildung 2) (10, 152). Es hat im inaktiven Zustand GDP gebunden und benötigt zur Aktivierung die Beteiligung eines Adapterproteins, des GRB-2

(*Growth-hormon-receptor-binding-protein-2*) und des *Guanine-nucleotide-exchange-factor*, der auch SOS (*son of sevenless*) genannt wird. Das zytosolische SOS wird durch den Rezeptor an der Membran gebunden. Ist die Konzentration von SOS hoch genug, wird am Ras GDP gegen GTP getauscht und es geht in den aktiven Zustand über. RAS kann durch verschiedene weitere Stimuli aktiviert werden, wie zum Beispiel der PKC (Protein-Kinase-C) (10, 153). RAS agiert als der stromaufwärts gelegener Aktivator der MAPKKK RAF (154). Diese aktiviert die *MAPK/ERK-kinase 1/2* (MEK1/2), eine MAPKK, die schließlich die eigentliche MAPK ERK1/2 aktiviert. MEK1/2 sind dual-spezifische Kinasen, die unter einer Konformationsänderung ERK1 an Y204 und T202 und ERK2 an Y187 und T185 phosphorylieren können. Dieser Erkennungs- und Aktivierungsmechanismus, der eine doppelte Spezifität verleiht, verbessert die Genauigkeit der Signaltransduktion erheblich und verhindert Fehler bei der ERK-Aktivierung. Daraufhin dimerisiert ERK und wird dann aktiv und phosphoryliert stromabwärts gelegene Substrate oder wird in den Zellkern transportiert (10, 152, 155-159).

Im Nukleus sind Transkriptionsfaktoren, wie das Proto-Onkogen c-FOS, ELK-1 und c-MYC, Substrat von ERK1/2. SOS, RAF und MEK werden ebenfalls von ERK1/2 phosphoryliert. Diese Verknüpfung dient als negativer Rückkopplungsmechanismus (10, 160, 161). Im Zytosol reguliert ERK Komponenten des Zytoskeletts, wie MAP1/2/4 (*microtubule-associated-proteins-1/2/4*), die FAK (*Focale-adhesion-Kinase*) und Paxillin (10, 162). Auch Zellmotilität kann durch Phosphorylierung der MLKK (Myosin-leichte-Ketten-Kinase) und daraus resultierender Actin-Myosin-Interaktion durch ERK bewirkt werden (163). Des Weiteren nimmt ERK im Zytosol Einfluss auf die Phospholipase-A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (164), die RSKs und MSK1/2 (165-167).

### 2.2.3.2 RSK1/2/3/4

ERK1/2 aktiviert die *90-kDa-ribosomal-S6-kinases* (RSKs) (165, 166). Es gibt sie in vier humanen Varianten, deren Aminosäure-Sequenz zu 80% identisch ist. Sie regulieren, wie ERK, Zellmotilität und sind sowohl im Nukleus als auch im Zytosol aktiv. RSK4 sticht etwas aus den vier Isoformen hervor. Es ist kaum im Nukleus nachzuweisen, sondern vor allem im Zytosol und hat eine Wachstumshormon-unabhängige Kinaseaktivität. RSK4 wird generell weniger

exprimiert als RSK1-3 und bei Untersuchungen an Mäusen wurde die Expression ausschließlich in Herz, ZNS, Niere und Skelettmuskel nachgewiesen (165, 168).

Der Prozess der Aktivierung von RSK ist komplex. ERK bindet an RSK1 und phosphoryliert es an T573 (169). Anschließend kommt es zu zwei weiteren Phosphorylierungen, die vermutlich auch durch ERK erfolgen, woraufhin eine Autophosphorylierung des RSK1 an S380 erfolgt. Daraufhin bindet an S380 die *PDK1* (*3'-phosphoinositide-dependent-kinase-1*), die eine Phosphorylierung an S221 durchführt. Dieser Schritt markiert die vollständige Aktivierung von RSK1. Der Mechanismus der Aktivierung der anderen Isoformen ist ähnlich (165). Weitere Möglichkeiten, wie es zu einer Aktivierung von RSKs kommen kann, liegen im p38-Signalweg. Die von p38 stromabwärts gelegene MK2 aktiviert ebenfalls RSKs (170).

RSK reguliert verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie c-FOS, CREB, ER $\alpha$  (*Estrogen-receptor- $\alpha$* ) oder den NF $\kappa$ B (92, 171). RSK beeinflusst über CREB die Signalweiterleitung durch PDGF und EGF auf c-Fos (172, 173). Es übt durch Phosphorylierung Einfluss auf die GSK3 (Glykogen-Synthase-Kinase-3) aus und so kann RSK indirekt die Glykogen-Synthese begünstigen. RSK modulieren über GSK3 und Cyclin D1 auch den Zellzyklus zur Proliferation (165, 174).

### 2.2.3.3 MSK1/2

Es gibt noch zwei strukturelle Homologe der RSKs, die ebenfalls von ERK aktiviert werden: die *RSK-like-protein-kinase* (RLPK), besser bekannt als MSK1 (*mitogen-and stress-activated kinase-1*) und RSKB besser bekannt als MSK2. Diese werden im Gegensatz zu RSK auch direkt durch p38 aktiviert (165, 167) (Kapitel 2.2.1.3). MSK1/2 unterscheiden sich in ihrem Aktivierungsmechanismus von RSKs außerdem darin, dass die Aktivierung nicht abhängig von PDK1 ist. Der dem äquivalente Phosphorylierungsvorgang erfolgt durch Autophosphorylierung unter anderem an S376 (175, 176). Die Initiation des Aktivierungsvorgangs der MSK1/2 wird durch p38 $\alpha$  oder ERK1/2 vollzogen. Dies geschieht an drei Stellen, unter anderem S360 (167, 176, 177).

MSK1/2 haben Bedeutung durch die Phosphorylierung von STAT1 (*signal-transducer-and-activator-of-transcription-1*) (19, 178) sowie STAT3 (19, 179) und die schnelle Induktion von *immediate-early-genes* als Antwort auf Stress oder Mitogene (19, 180). Weiterhin agieren MSK1/2 am Nukleosom und phosphorylieren das Histon H3 (181, 182) und den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP-responsive-element-binding-protein*) (183), womit eine anti-inflammatorische Wirkung induziert werden kann. Ein MSK1/2-*Knockout* resultiert in erhöhter Ausschüttung von TNF, IL6 und IL12 nach Stimulation durch Lipopolysaccharide und in verminderter Produktion des anti-inflammatorisch wirkenden IL10. Dies bestätigt die antiinflammatorische Wirkung von MSK1/2 (181, 182). Neben dem CREB (19) phosphoryliert MSK1/2 auch ATF1 (*cAMP-dependent-transcription-factor-1*) (165) und NFκB. Letzteres wird als ein kritischer Regulator bei Proliferation, Zelldifferenzierung und Inflammation beschrieben und ist an der epithelialen-mesenchymalen-Transition in Mammakarzinom-Zellen beteiligt (184, 185).

### 2.2.3.4 ERK in Tumoren

In über einem Drittel aller menschlichen Tumoren konnten Hashino et al. eine erhöhte Aktivität des ERK-Signalweges zeigen (186). In Adenokarzinomen des Pankreas konnten in ca. 90% der Fälle (187), im Colon (188) bzw. in der Schilddrüse in 50% der Fälle (189) und in Adenokarzinomen der Lunge in 30% der Fälle (190) Mutationen von RAS nachgewiesen werden. Wird das *downstream* gelegene Molekül RAF betrachtet, fallen in 66% aller Melanome Mutationen auf (191).

Bei der chronisch myeloischen Leukämie entsteht bei einer zytogenetischen Aberration das Philadelphia-Chromosom (192) mit dem BCR-ABL-Fusionsgen. In der Folge entsteht eine konstitutiv aktive Rezeptor-Tyrosin-Kinase (193). Diese verursacht eine RAF-abhängige Inhibierung des proapoptotischen Proteins BAD (Bcl-2-Antagonist-of-Cell-Death) (194, 195).

Die vielfältige Involvierung des ERK-Signalweges in Tumorgenese und -progression hat bereits verschiedene Therapieansätze ergeben. Sorafenib wird beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom eingesetzt. Ursprünglich entwickelt wurde es als RAF-1-Inhibitor. Es zeigte erst später potente Wirkung an den

Tyrosin-Kinasen-Rezeptoren von VEGF, FGF und PDGF. Bisher konnte jedoch in klinischen Studien nicht nachgewiesen werden, dass die Inhibition von RAF Relevanz für das klinische *Outcome* der behandelten Patienten hat (196, 197).

Der EGF-Rezeptor (*epidermal-growth-factor*) aktiviert die ERK-Signalkaskade (10). Er ist Ziel des chimären Antikörpers Cetuximab (198) sowie des humanen Antikörpers Panitumumab (199), welche bedeutend sind für die Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms. Ob der Einsatz dieser Medikamente erfolgversprechend ist, hängt davon ab, ob der nachgeschaltete Signalweg Mutationen aufweist. Daher ist der Nachweis von Mutationen in *RAS* und *RAF* entscheidend für die Therapie (200-203). Ein weiterer Vertreter der EGF-Rezeptor-Antikörper ist der humanisierte HER2/neu-Antikörper Trastuzumab, der Anwendung in der Therapie des Mammakarzinoms findet (8). Dieser wirkt über den ERK-Signalweg (8, 10), beeinflusst aber auch über den EGF-Rezeptor die PI3K und darüber AKT (Kapitel 2.3.2). Die PI3K-AKT-Signalkaskade scheint eine bedeutende Rolle für die Proliferation von HER2/neu-überexprimierenden Tumorzellen zu haben (204).

### 2.3 AKT

AKT ist auch bekannt als PKB (protein-kinase-B). Es gibt drei Isoformen PKB $\alpha$  (205, 206) – codiert vom Gen *AKT1*, PKB $\beta$  – codiert vom Gen *AKT2* und PKB $\gamma$  (207) – codiert vom Gen *AKT3* (208). AKT fördert Anabolismus. Darunter fällt gesteigerte Glukoseaufnahme und -umsetzung, gesteigerte Glykogen-, Fettsäure- und Proteinsynthese sowie gesteigerte Zellproliferation. Dem entsprechend wird der Katabolismus und Prozesse wie Apoptose gehemmt (206, 209, 210).

#### 2.3.1 AKT-Signalweg

Der typische Stimulus zur Aktivierung des AKT-Signalweges ist Insulin (211, 212). Es bindet extrazellulär an die heterotetramere Rezeptor-Tyrosin-Kinase (213-215), die sich selbst durch Phosphorylierung und anschließend das IRS1/2 (*Insulin-receptor-substrat-1/2*) aktiviert (Abbildung 2) (212, 216, 217). Dadurch kann die regulatorische p85-Untereinheit der PI3K (*Phosphatidylinositol-3-kinase*) gebunden und die PI3K so aktiviert werden (212, 218). Die katalytische p110-Untereinheit der PI3K kann nun ihr

membranständiges Substrat PIP2 (Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat) zu PIP3 (Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat) phosphorylieren (212, 219, 220).

Der Anstieg der PIP3-Konzentration rekrutiert die PDK1 (*Phospho-inositide-dependent-kinase-1*) an die Zellmembran und aktiviert diese. Die Rekrutierung von AKT und PDK1 erfolgt über die PH-(*pleckstrin-homology*)-Domäne, die an das membranständige PIP3 bindet (204, 221-223). Die PDK1 phosphoryliert AKT an T308 und aktiviert es dadurch (224). Die zweite Phosphorylierung von AKT erfolgt durch den mTORC2. mSIN1 (*mammalian-stress-activated-protein-kinase-interacting-protein-1*) unterdrückt die Aktivität von mTORC2. Unter Einfluss von PIP3 wird diese Inhibition aufgehoben und mTORC2 wird aktiviert (225) und phosphoryliert AKT an der Stelle S473 (226, 227). Weiterhin hat der mTORC2 Bedeutung in der Regulation von Actin im Zytoskelett (228).

Aktiviertes AKT lässt Vesikel, die GLUT4 enthalten, in die Zellmembran translozieren, wodurch die Zelle mehr Glukose aufnimmt und auch die Glykolyse aktiviert wird (229, 230). Synchron phosphoryliert AKT die GSK3 (*Glykogen-synthase-kinase-3*). GSK3 wird dadurch gehemmt (231, 232). Da es durch Phosphorylierung wiederum die Glykogen-Synthase hemmt, wird diese durch die doppelte Inhibition aktiviert (210, 230, 233). Nach diesem Prinzip der zweimal hintereinander geschalteten Hemmung wird über TSC1/2 (*Tubero-sclerosis-complex-1/2*) (234, 235) auch RHEB aktiviert, welches wiederum den mTORC1 aktiviert (236). mTORC1 aktiviert die p70S6K (*70-kDa-ribosomal-S6-kinases*) (237). Diese phosphoryliert die Subuntereinheit S6 der 40S-Untereinheit am Ribosom und setzt so die Proteinsynthese in Gang (238, 239). AKT aktiviert auch die Fettsäure-Synthase (230, 240).

Die Hemmung von der GSK3 hat den weiteren entscheidenden Effekt, dass weniger Cyclin D1 abgebaut wird (241). Folglich steigt dessen Konzentration und bei Überschreiten eines Schwellenwertes bildet die Zelle vermehrt Cyclin E. Dies ermöglicht der Zelle den Übergang in die S-Phase (242). Das heißt, dass der aktivierte AKT-Signalweg so Zellteilung und Proliferation fördert (243). Desweiteren hemmt AKT das pro-apoptotische Protein BAD (*Bcl-2-Antagonist-of-Cell-Death*) durch Phosphorylierung (244). Auch p53 wird durch Phosphorylierung seines negativen Regulators MDM2 (*Mouse-double-minute-2-homolog*) gehemmt (245). AKT aktiviert

auch NF $\kappa$ B (246). So wirkt das aktivierte AKT anti-apoptotisch und bringt die Zellzyklusprogression voran (247).

Der Signalweg wird an mehreren Stellen durch Inhibition reguliert. Der aktivierte mTORC1 hemmt das IRS1/2 und dient somit als negativer Feedbackmechanismus (248-250). Die Phosphatase PTEN (*Phosphatase-and-tensin-homolog*) hemmt ebenfalls das IRS1/2 (251) und spaltet von PIP3 einen Phosphatrest ab, so dass es wieder als PIP2 vorliegt (252-254). Die Aktivierung von AKT kann direkt durch Phosphatasen begrenzt werden. An der Stelle T308 erfolgt dies durch PP2A (255, 256) und bei S473 durch PHLPP (*PH-domain-leucine-rich-repeat-protein-phosphatase*) (256, 257).

### 2.3.1.1 mTOR

mTOR (*mechanistic/mammalian-Target-of-Rapamycin*) ist ein sehr großes Molekül mit einem Molekulargewicht von 289 kDa (258). Die Phosphorylierung an S2448 korreliert mit erhöhter Aktivität der Kinase und ist Ziel von AKT (259, 260). mTOR liegt in zwei unterschiedlichen Komplexen vor, die beide das Molekül mTOR, DEPTOR (*DEP-domain-containing-mTOR-interacting-protein*) – ein negativer Regulator (261) – und G $\beta$ L (*G-beta-like-protein*) (262) enthalten. Zum mTORC1 gehört noch RAPTOR (*regulatory-associated-protein-of-mTOR*) (263). Der mTORC2 enthält noch die Bestandteile RICTOR (*rapamycin-insensitive-companion-of-mTOR*) (228) mit PRR5 (*Proline-rich-protein-5*) (264) und mSIN1 (265).

### 2.3.2 Bedeutung des AKT-Signalweges in der Karzinogenese

Die Tumor-assoziierten Mutationen des AKT-Signalweges finden sich bereits früh in der Aktivierungskaskade. Die bedeutendste Veränderung im Gen der PI3K ist Amplifikation, die das Gen *PI3KC* betrifft. Dieses codiert für die katalytische Untereinheit p110 $\alpha$ . Diese Veränderung zeigt sich häufig in Karzinomen (204), wie dem Ovar- (266, 267) und Zervix-Karzinom (268). Die in dieser Arbeit verwendete Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 hat eine Mutation im *PIK3CA*-Gen (Kapitel 3.1.8) (269).

Die PI3K kann außer durch den Insulin-Rezeptor auch durch andere Rezeptoren wie VEGF, FGF-, IGF-1-, PDGF- und EGF-Rezeptoren, sowie den Interleukin-Rezeptoren und Integrine aktiviert werden (270, 271). Es zeigte sich eine gesteigerte Aktivität der PI3K in weiteren Tumoren, wie dem Endometrium- (272) und Mammakarzinomen (267) und vielen anderen Tumorentitäten (271). Häufig ist diese gesteigerte Aktivität auf Überexpression von EGFR, wie dem Her2/neu-Rezeptor (ErbB2), zurückzuführen. Konstitutiv ist dann auch AKT aktiv. Diese Zusammenhänge deuten auf eine bedeutende Rolle des AKT-Signalwegs für die Proliferation von HER2/neu-überexprimierenden Tumorzellen hin (204).

Die Phosphatase PTEN wurde ursprünglich als Tumorsuppressor-Gen entdeckt (252). Sie hat Bedeutung als negativer Regulator des PI3K-Signals. Die tumorsuppressive Wirkung führt man auf die Inhibition des Zellwachstums (273) und die gesteigerte Sensibilität für die Induzierung der Apoptose zurück (274). PTEN ist in fortgeschrittenen Stadien verschiedenster Tumore, insbesondere dem Glioblastom sowie Endometrium- und Prostata-Karzinom, häufig mutiert. Im Nierenzellkarzinom zeigte sich der Verlust der PTEN-Expression während der frühen Karzinogenese, weshalb es auch als Tumormarker zur Diskussion stand (275). Da PTEN physiologisch den AKT-Signalweg hemmt, ist dieser bei Funktionsverlust von PTEN permanent aktiv (204).

### 2.3.3 Der AKT-Signalweg als medikamentöse Zielstruktur

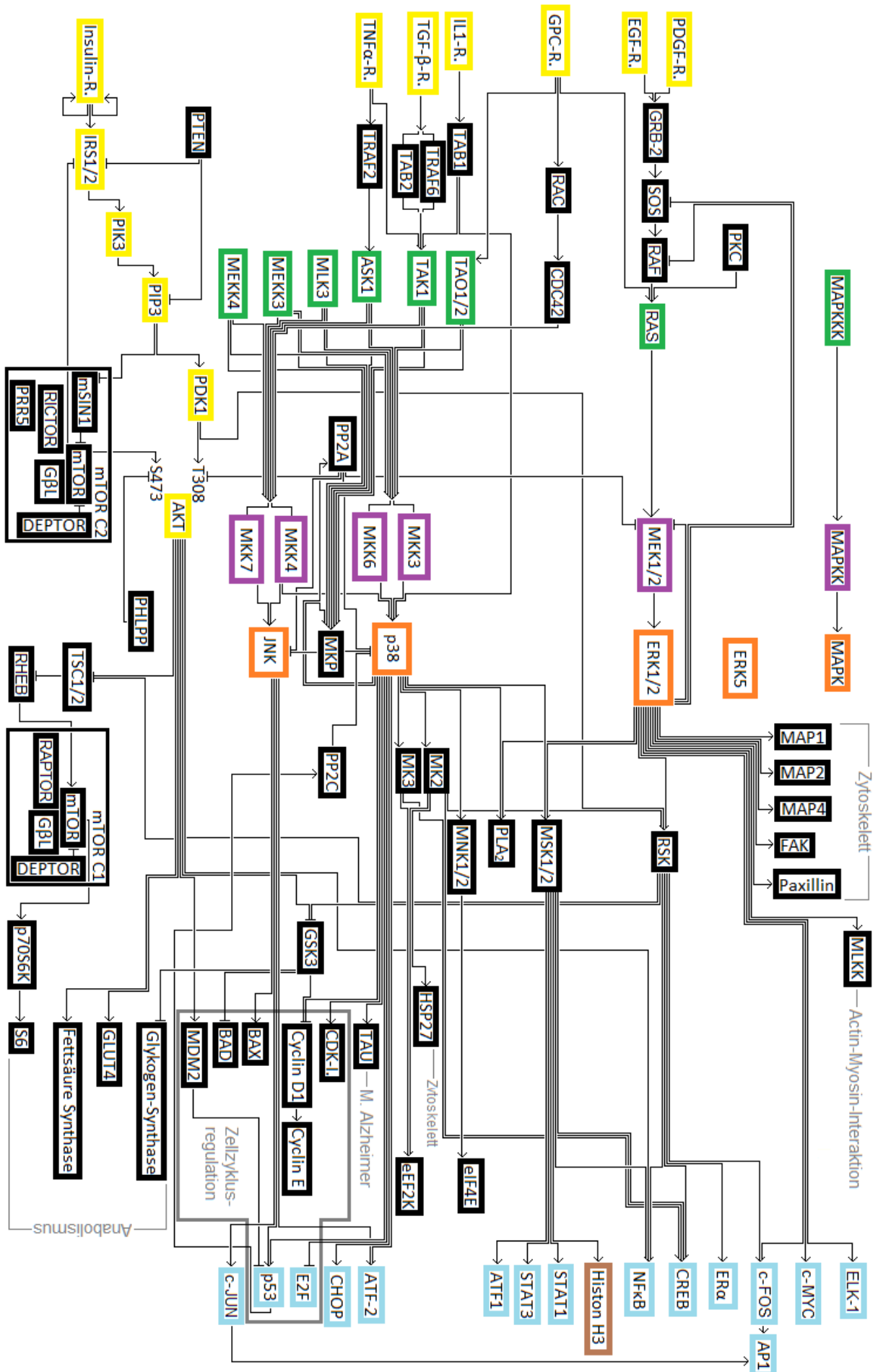
Großes Gewicht hat der Signalweg in der Behandlung des metabolischen Syndroms, insbesondere in der Diabetologie (230). Seit Anfang der 1920er Jahre von Banting und Best das Insulin entdeckt und zum ersten Mal im Patienten verabreicht wurde (276), sind eine Vielzahl von Präparaten zugelassen wurden, die direkt oder indirekt mit dem Signalweg interagieren (230). Weitere bedeutende Wirkstoffe mit Einfluss auf den AKT-Signalweg sind Vertreter der EGFR-Antikörper (Kapitel 2.2.3.4).

Bereits seit den 1990er Jahren erforschte man den Signalweg mit dem Wirkstoff LY294002 (209). Dies ist ein kompetitiver reversibler Inhibitor der ATP-bindenden Domäne der PI3K. *In vitro* zeigte sich die antiproliferative und pro-apoptotische Aktivität des Wirkstoffs bereits einzeln (204, 277). Präklinischen Studien konnten dies

*in vivo* bestätigen. Insbesondere wurden starke Effekte bei Kombination mit Bestrahlung oder zytotoxischen Medikamenten belegt, wodurch das therapeutische Potenzial des AKT-Signalweges deutlich wurde (278, 279).

Das von AKT gesteuerte mTOR therapeutisch zu beeinflussen, erwies sich in mehreren Bereichen als erfolgreich. mTOR-Inhibitoren wie Everolimus, ein Rapamycin-Analogon, werden als Immunsuppressiva eingesetzt, um beispielsweise Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation zu vermeiden (280, 281). In der Kardiologie setzt man sie auf DES (Drug-eluting-stents) ein, um die Lumenstenosierung zu verhindern (282, 283) und auch in der Krebstherapie werden sie unter anderem beim Nierenzellkarzinom eingesetzt (284).

2.4 Übersicht MAPK-Signalkaskade



### **Abbildung 2 Übersicht MAPK-Signalkaskade**

Dargestellt sind alle Moleküle, die in dieser Arbeit Erwähnung finden. Die Grafik erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Legende:

- ⊣ = Symbol für „Molekül wird gehemmt in seiner Aktivität“
- = Symbol für „Molekül wird gesteigert in seiner Aktivität“
- (gelb) = Molekül vorwiegend an der Zellmembran lokalisiert
- (schwarz) = Molekül im Zytosol
- (grün) = MAPKKK
- (lila) = MAPKK
- (orange) = MAPK
- (blau) = Transkriptionsfaktor im Nukleus

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Substanzen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Nähere Produktbezeichnung</b>
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe DT	Rotiphorese®Gel 30 Art. Nr. 3029.1
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe DT	Ammoniumpersulfat
Anodenpuffer Konzentrat	Carl Roth, Karlsruhe DT	Roti®-Blot A 10x Konzentrat Art. Nr. L510.1
Antibiotika Zellkultur	ThermoFisher Scientific, Waltham USA	10.000 units Penicillin + 10 mg Streptomycin /ml
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, St. Louis USA	Choleratoxin
Coomassie Färbemittel	Carl Roth, Karlsruhe DT	Roti®-Blue 5x Konzentrat Art. Nr. A152.1
dest. Wasser	Fresenius Kabi, Sèvres Cedex France	Ampuwa® Spüllösung
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe DT	Dimethylsulfoxid Art. Nr. A994.2
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis USA	DL-Dithiothreitol D9779-250MG
EGF	RD Systems, Minneapolis USA	Recombinant Human EGF Catalog Number: 236-EG
Ethanol	Honeywell Specialty Chemicals, Seelze DT	Ethanol absolut 99,8% 32205
Ethylendiamintetra-essigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis USA	Ethylendiamintetra-essigsäure
Fetales Kälber Serum (FCS)	Gibco / ThermoFisher Scientific, Waltham USA	FBS fetal bovine serum
HEPES	Gibco / ThermoFisher Scientific, Waltham USA	HEPES Buffer Solution 1 M
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, St. Louis USA	Hydrocortison 98% H0888-1G
Insulin	Sigma-Aldrich, St. Louis USA	Insulin solution human I9278-5ML
Kathodenpuffer Konzentrat	Carl Roth, Karlsruhe DT	Roti®-Blot K 10x Konzentrat Art. Nr. L511.1
Laufpuffer	Carl Roth, Karlsruhe DT	Rotiphorese® SDS-PAGE 10x Konzentrat Art. Nr. 3060.2
Luminol	Perkin Elmer, Waltham USA	Western Lightning® Plus ECL Order N.: NEL105001EA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe DT	Natriumchlorid Art. Nr. P029.3
Natriumhydroxid (NAOH)	Carl Roth, Karlsruhe DT	Natriumhydroxid Art. Nr.6771.1
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt DT	Nonfat dried milk powder A0830,0500
Magnesiumchlorid (MgCl)	Carl Roth, Karlsruhe DT	Magnesiumchlorid Art. Nr. 2189.1
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis USA	Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline D8537-500ML
Phosphatase Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis USA	Phosphatase Inhibitor Cocktail II P5726-5ML
Protease Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis USA	Protease Inhibitor Cocktail P8340-1ML
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis USA	Bovine Serum Albumin A2153-100G
Roti®-Block	Carl Roth, Karlsruhe DT	Roti®-Block 10x Konzentrat Art. Nr. A151.2

## Material und Methoden

Sammelgelpuffer	BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules USA	Sammelgelpuffer Cat. # 161-0799 (0,5 M Tris-HCl pH 6,8)
p38-Inhibitor	Tocris bio-technie, Minneapolis USA	SB203580 hydrochloride Cat. #1402
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe DT	Natriumdodecylsulfat 10%
Terralin liquid	Schülke, Norderstedt	Terralin liquid Article code: 102001
Tetramethylethylene-diamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis USA	TEMED T9281-25ML
Trenngelpuffer	BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules USA	Trenngelpuffer Cat. # 161-0798 (1,5 M Tris-HCl pH 8,8)
Tris	Carl Roth, Karlsruhe DT	Tris Art. Nr. 4855.2
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth, Karlsruhe DT	Tris-HCl Art. Nr. 9090.2
Triton X 100	Sigma-Aldrich, St. Louis USA	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol 9002-93-1
Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis USA	Trypsin-EDTA 0,25%
Tween20	AppliChem GmbH, Darmstadt DT	Tween®20 A4974,0100
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Perkin Elmer, Waltham USA	Western Lightning® Plus ECL Order N.: NEL105001EA
Zellkulturmedium	Gibco / ThermoFisher Scientific, Waltham USA	Gibco™ RPMI 1640

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Nähere Produktbezeichnung</b>
Cell Counting Slides	Logos Biosystems, Anyang Südkorea	Luna™ Cell Counting Slides
Entsorgungsbeutel	Carl Roth, Karlsruhe DT	Entsorgungsbeutel 200x300 mm Best. Nr. E706.1
Einmalhandschuhe	Semperit, Wien Österreich	Nitril Sempercure
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe DT	Pasteurpipetten
Pinzette	Labotec, Wiesbaden DT	Pinzette
Pipettenspitzen	StarLab, Hamburg DT	Pipettenspitzen FilterTips, TipOne (0,5-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl)
Polypropylen-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen DT	Falcon™-Röhrchen (15 ml, 50 ml)
PVDF-Membran	Millipore, Boston USA	Polyvinylidenfluorid-Membran Immobilon-P Transfer-Membran NEF1002001PK
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg DT	„Eppis“ (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)
Schere	Labotec, Wiesbaden DT	Schere
Serologische Pipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen DT	Serologische Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen DT	Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen DT	Zellkulturschalen (145 mm x 20 mm)
Zellschaber	CostarGroup, Washington USA	Cell Lifter
96-Well-Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen DT	96-Well-Platte Cat. N. 655180

## Material und Methoden

### 3.1.3 Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Nähere Produktbezeichnung</b>
Absaughilfe	IBS Integra Biosciences, Fernwald DT	Absaughilfe Vacuboy
Chemilumineszenz-Detektor	ProteinSimple, San Jose USA	Flourochem E Western-Blot Detector
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau DT	Hera Cell 24
Computer		
Eismaschine	Ziegra, Hannover DT	Eismaschine
ELISA Reader	Promega detections system, Sunnyvale USA	ELISA Reader GLOMAX® multi+ Model #E9032
Gefrierschrank -20°C	LIEBHERR, Bulle Schweiz	Premium
Gefrierschrank -80°C	Nalge Nunc Int, USA Waltham	Gefrierschrank
Gelelektrophorese-kammer	BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules USA	BIO-RAD Mini Protean Tetra System
Gießapparatur Glasplatten	BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules USA	Mini Protean Glass plates Cat. # 1653311
Gießapparatur Deckgläser	BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules USA	Mini Protean Short plates Cat. # 1653308
Heizblock Reagiergefäße 1,5ml	Eppendorf, Hamburg DT	Thermostat 5320 Block Heater
Kühlschrank 4°C	LIEBHERR, Bulle Schweiz	ProfiLine
Kippschüttler	Heidolph Instruments, Schwabach DT	Duomax 1030
Magnetmischer	IKA-Werke, Staufen DT	RCT basic
Mikroskop	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar DT	DMIL LED Fluo
Mikrozentrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau DT	Fresco 17
Netzgerät	Biometra, Göttingen DT	Standard Power Pack P25
Pipetten	Eppendorf, Hamburg DT	Pipetten Research (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)
Pipettierhilfe	Brand, Wertheim DT	Pipettierhilfe Accu-jet® pro
Rollmischer	IKA-Werke, Staufen DT	Roller 6 digital
Sicherheitswerkbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau DT	HeraSafe
Stickstofftank	ThermoFisher Scientific, Waltham USA	Kryo Locator 6 Plus
Thermoschüttler	Cellmedia, Zeitz DT	TS PRO Art. No.: 112000
Vortex-Mischer	IKA-Werke, Staufen DT	Vortex VF2
Waage	Kern & Sohn GmbH, Balingen DT	Labor Feinwaage KERN EG 620-3NM
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel DT	Type 1003
Western-Blot	BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules USA	Trans-Blot® Turbo™
Western-Blot-Roller	BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules USA	Blotting Roller
Zellzähler	Logos Biosystems, Anyang Südkorea	Luna automated cell counter
Zentrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau DT	Megafuge 1,0R

## Material und Methoden

### 3.1.4 Antikörper

#### 3.1.4.1 Erst-Antikörper

**Tabelle 2 Erst-Antikörper**

Erläuterungen zu Abkürzungen in dieser Tabelle:

p	phosphoryliert = AK nur gegen das phosphorylierte Protein
T	total = AK gegen das Gesamt-Protein
C.S.	Cell signaling Technologie, Cambridge UK
Inv.	Invitrogen / ThermoFisher Scientific, Waltham USA
RnD.	RD Systems, Minneapolis USA
Sa. C.	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz USA
S. Al.	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
5% MP	5% Milchpulver in TBST
5% BSA	5% BSA in TBST

Erst-AK	Firma / Best. Nr.	Klon	Organismus	Ansatzlösung	Blocklösung	Verdünnung	Zweit-Ak Verdünnung	m <sub>target</sub> in kDa
p-AKT (T308)	C.S. #13038	D25E6	rabbit	5% BSA	5% MP	1:1000	1:2000	60
p-AKT (T308)	C.S. #4056	244F9	rabbit	5% BSA	5% MP	1:1000	1:2000	60
p-AKT (S473)	C.S. #9271	poly-clonal	rabbit	5% BSA	5% MP	1:100	1:3000	60
T-AKT	C.S. #9272	poly-clonal	rabbit	Roti®-Block	Roti®-Block	1:1000	1:2000	60
p-c-JUN (S63)	C.S. #91952	E617P	rabbit	5% BSA	5% MP	1:1000	1:2000	48
T-c-Jun	Sa. C. Sc-45	poly-clonal	rabbit	5% BSA	5% MP	1:1000	1:2000	48
p-ERK1/2 (T202/Y204, T185/Y187)	C.S. #9101	poly-clonal	rabbit	5% BSA	5% MP	1:1000	1:2000	44/42
T-ERK1/2	C.S. #9102	poly-clonal	rabbit	5% BSA	5% MP	1:1000	1:2000	44/42
p-HSP27 (S82)	C.S. #9709	D1H 2F6	rabbit	5% BSA	5% MP	1:1000	1:2000	27
T-HSP27	C.S. #95357	D6W 5V	rabbit	5% BSA	5% MP	1:1000	1:2000	27
p-MSK1/2 (S376/ S360)	RnD. MAB1094	1013D	rabbit	5% MP	5% MP	1:500 (1,0 µg/ml)	1:2000	90
T-MSK1	C.S. #3489	C27B2	rabbit	5% BSA	5% MP	1:1000 /1:500 *	1:2000	90
T-MSK2	C.S. #3679	D41A4	rabbit	5% BSA	5% MP	1:1000 /1:500 *	1:2000	90
p-mTOR (S2448)	C.S. #5536	D9C2	rabbit	5% BSA	5% MP	1:400	1:2000	289
T-mTOR	C.S. #2983	7C10	rabbit	5% BSA	5% MP	1:500	1:2000	289
p-RSK1/2/3/4 (S221/ S227/ S218/S232)	Inv. PA5-37829	poly-clonal	rabbit	5% BSA	5% MP	1:1000	1:2000	90
T-RSK1/2/3	C.S. #9355	32D7	rabbit	5% BSA	5% MP	1:1000	1:2000	90
β-Actin	S. Al. A5441	AC-15	mouse	Roti®-Block	Roti®-Block	1:4000	1:1000	42

\* Für die MCF-10A-Zellen wurde der AK 1:500 verdünnt, bei MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen wurde er 1:1000 verdünnt.

## Material und Methoden

### 3.1.4.2 Zweit-Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Nähere Produktbezeichnung
Zweit-Ak Anti-rabbit HRP	Dako, Glostrup Dänemark	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP P0448
Zweit-Ak Anti-mouse HRP	Dako, Glostrup Dänemark	Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP P0260

### 3.1.4.3 Lysate zur Antikörper-Kontrolle

Bezeichnung	Hersteller	Nähere Produktbezeichnung
AKT Control Extracts	Cell signaling Technologie, Cambridge UK	#9273 enthält: positiv Kontrolle: Zellextrakte von mit Calyculin A behandelten Jurkat-Zellen #48217 negativ Kontrolle: Zellextrakte von mit LY294002 behandelten Jurkat-Zellen #66376

### 3.1.5 Kit-Systeme

Bezeichnung	Hersteller	Nähere Produktbezeichnung
Proteinkonzentrationsbestimmung	ThermoFisher Scientific, Waltham USA	Pierce BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay Kit 23227
Phospho Kinase Array	RD Systems, Minneapolis USA	Human Phospho-Kinase Array ARY003C
Phospho Kinase Array	RD Systems, Minneapolis USA	Human Phospho-Kinase Array ARY003B

### 3.1.6 Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Anodenpuffer	84 mL dest. Wasser 32 mL Ethanol 16 mL Roti®-Blot A 10x Konzentrat
Kathodenpuffer	84 mL dest. Wasser 32 mL Ethanol 16 mL Roti®-Blot K 10x Konzentrat
Ladepuffer (6x)	350 mM Tris-HCl, 34,4 % Glycerol, 10 % SDS, 10 % $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,06 % Bromphenolblau, eingestellt auf einen pH-Wert von 6,8
Lysepuffer	100 $\mu$ l Puffer C (10x) 10 $\mu$ l Sigma Phosphatase Inhibitor Cocktail II 10 $\mu$ l Sigma Protease Inhibitor Cocktail 10 $\mu$ l DTT 870 $\mu$ l dest. Wasser

## Material und Methoden

10x Puffer C	20 mM Hepes 0,2 M NaCl 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,4 mM EDTA 1% Triton X-100
1x Roti-Block	100 mL Roti®-Block 10x Konzentrat 900 mL dest. Wasser
1x SDS-Laufpuffer	100 mL Rotiphorese® SDS-PAGE 10x Konzentrat 900 mL dest. Wasser
10x TBS	26 g Tris-HCl 4,24 g Tris 292,7 g NaCl Ad 1 L dest. Wasser
1x TBST	100 mL 10x TBS 900 mL dest. Wasser 1 mL Tween20
Färbelösung für die Coomassie-Färbung	60% dest. Wasser 20% Ethanol 20% Roti®Blue 5-fach-Konzentrat
Entfärbelösung für die Coomassie-Färbung	90% dest. Wasser 7,5% Essigsäure 2,5% Ethanol

### 3.1.7 Computerprogramme

Bezeichnung	Hersteller	Nähere Produktbezeichnung
AlphaView SA	ProteinSimple, San Jose USA	AlphaView SA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond USA	365 MSO
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond USA	365 MSO
Microsoft Powerpoint	Microsoft Corporation, Redmond USA	365 MSO
Paint	Microsoft Corporation, Redmond USA	Windows 8.1

### 3.1.8 Kontinuierliche Zelllinien

**MCF-10A-Zellen** (American Type Culture Collection, Gaithersburg USA) wurden Mitte der 80iger Jahre während einer plastischen Operation bei einer 36-jährigen kaukasischen Patientin gewonnen, die eine fibrös-zystischen Mastopathie hatte. Dem entsprechend sind die Zellen nicht kanzerös (285). Der Karyotyp ist nicht normal, aber diploid. (286, 287), Im Elektronenmikroskop zeigen die Zellen Charakteristika von luminalen duktalem Zellen, nicht aber von Myoepithelzellen. MCF steht für *Michigan-Cancer-Foundation*.(288)

**MCF-7-Zellen** (American Type Culture Collection, Gaithersburg USA) entstammen einer 69-jährigen kaukasischen Patientin mit einem invasiv duktalem Karzinom Luminal A. Die Zellen wurden im Jahr 1970 gewonnen. Die Patientin hatte eine Mastektomie aufgrund eines malignen Tumors. Drei Jahre später mussten befallene thorakale Lymphknoten entfernt werden. In der Folge entwickelte sie einen Pleuraerguss. Aus diesem entstammen die Zellen dieser Zelllinie. Sie sind sowohl Progesteron- als auch Östrogen-Rezeptor positiv, aber HER2/neu negativ. Der Karyotyp zeigt sich mixoploid mit einem hohen Anteil nahezu tetraploider Zellen (285, 289). Die Zellen haben eine heterozygote Transition im *PIK3CA*-Gen (PI3K p110-Untereinheit) und eine homozygote Deletion im *CDKN2A*-Gen (269).

**MDA-MB-231-Zellen** (American Type Culture Collection, Gaithersburg USA) wurden ebenfalls aus einem malignen Pleuraerguss gewonnen. Die 51-jährige kaukasische Patientin hatte ein Adenokarzinom der Mamma. Die Zellen sind triple-negativ (285). Die Zellen sind mit einer Chromosomenzahl zwischen 65 und 69 nahezu triploid. Die Zellen haben eine heterozygote Transition im *KRAS*-Gen, eine heterozygote Transversion im *BRAF*-Gen, eine homozygote Transition im *p53*-Gen, eine homozygote Deletion im *CDKN2A*-Gen und eine homozygote Transversion im *NF2*-Gen (290). MDA-MB steht für "*M.-D.-Anderson-metastasis-breast-cancer*". Das ist eines der größten Onkologischen Zentren in den USA in der Stadt Houston (291).

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Zellkulturmethoden

##### 3.2.1.1 Steriles Arbeiten

Zur Kultivierung der Zellen wurde steril gearbeitet. Die Behälter der verwendeten Lösungen wurden im 37°C warmen Wasserbad erwärmt und vor Überführung in die sterile Werkbank mit Reinigungsalkohol Terralin liquid desinfiziert. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>.

##### 3.2.1.2 Kultivierung humaner Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden mit RPMI1640 Nährmedium kultiviert. Dem wurden 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin zugegeben. Wenn die Zellen das Medium

## Material und Methoden

verbraucht hatten, zeigte sich eine gelbe Verfärbung des Mediums durch einen darin enthaltenen pH-Indikator. Daraufhin wurde das Medium gewechselt. Zeigte sich ein konfluentes Wachstum, wurde die Zellen gesplittet. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült, 1 min mit Trypsin inkubiert und anschließend mit dem Mikroskop kontrolliert, ob sich alle Zellen gelöst hatten. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von Vollmedium abgestoppt. Die Zellen konnten nun in einer oder mehreren neuen Zellkulturflaschen unter einer höheren Passagenummer weiterkultiviert werden. 24 h vor den Versuchen wurde auf FCS-freies Medium umgestellt. Einige Besonderheiten gab es im Umgang mit den MCF-10A-Zellen. Bei diesen war die nötige Inkubationszeit der Zellen mit Trypsin teils um das 10-fache länger und dem Nährmedium mussten noch die in der Tabelle (Tabelle 3) angegebenen Zusätze beigefügt werden (285).

**Tabelle 3 Zusammensetzung des Nährmediums für MCF-10A-Zellen**

Quelle: (285)

Substanz und ggf. gewünschte Konzentration im fertigen Nährmedium für MCF-10A-Zellen	Konzentration in Verpackungseinheit	Volumen, das zugegeben werden muss
Nährmedium: RPMI 1640		500 ml
5% FCS		25 ml
1% P/S		5 ml
<i>Epidermal-growth-factor</i> (EGF) 20 ng/ml	20 µg/50µl	25 µl
Hydrocortison $1,4 \times 10^{-6}$ M-Lösung	260 µg/ml	1 ml
Choleratoxin 100 ng/ml	200 µg/ml	250 µl
Insulin 10 µg/ml-Lösung	10 mg/ml	500 µl

### 3.2.1.3 Kyro-Konservierung und Reaktivierung

Zur Kyro-Konservierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gespült und die Zellen mit 1 ml Trypsin von der Oberfläche abgelöst. Anschließend wurden sie für 1 min in den Inkubator gestellt, gegebenenfalls leicht beklopft und dann unter dem Mikroskop kontrolliert, ob sich die Zellen gelöst hatten. Bei den MCF-10A-Zellen dauerte es bis zu 10 min, bis sie sich lösten. Anschließend wurde die Wirkung des Trypsins mit 9 ml Vollmedium abgestoppt und die Zellsuspension in ein 15-ml-Reaktionsgefäß überführt. Bei 300 g erfolgte für 5 min das Zentrifugieren. Der

Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 3 ml FCS mit 10% DMSO suspendiert. Bei einer voll bewachsenen T-75-Zellkulturflasche konnten dann drei Kryo-Reaktionsgefäße mit je 1 ml befüllt werden. Darin enthalten waren ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ ml. Diese wurden zunächst für 24 h in einem Isopropylalkohol-Behälter bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. So konnten die Zellen dauerhaft konserviert und aufbewahrt werden.

Zur Reaktivierung wurden die Zellen für 2-5 min in  $37^\circ\text{C}$  warmen Wasserbad aufgetaut, in die sterile Werkbank überführt und in einem 15-ml-Reaktionsgefäß mit 2 ml Vollmedium versetzt. Nun wurde die Suspension für 5 min bei 300 g zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Zuletzt mussten die Zellen mit Vollmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt werden.

### *3.2.1.4 Aufbringen des SB203580*

Das SB203580 wurde lyophilisiert geliefert. 10 mg des Pulvers wurden mit 23,7 ml destilliertem Wasser versetzt. Das Gemisch wurde unter Rühren 3 min auf  $60^\circ\text{C}$  erhitzt, um das Pulver zu lösen. So entstand eine Lösung mit einer Konzentration von 1 mM. Diese wurde aliquotiert und eingefroren. Zur Behandlung der Zellen mit dem SB203580 wurde dieses mit Vollmedium auf Konzentrationen von  $0,1 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$ ,  $5 \mu\text{M}$  bzw.  $10 \mu\text{M}$  verdünnt und für je 2 h auf die Zellen gegeben.

### *3.2.2 Proteinanalyse*

Alle Arbeiten mit Proteinextrakten erfolgten auf Eis.

#### *3.2.2.1 Proteinextraktion aus Zellkulturen*

Die Zellkulturplatten wurden einmal mit 10 ml PBS gespült. Anschließend wurde PBS auf die Platten gegeben und mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen in die Flüssigkeit gekratzt. Diese wurde in einem Reaktionsgefäß für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zu den Proben für die Phospho-Kinase-Arrays wurde pro Membran-Set  $334 \mu\text{l}$  des mitgelieferten Lysepuffer 6 dazu gegeben. Die Proben für die weiteren Western-Blot Analysen wurden mit 1ml Lysepuffer pro Platte angesetzt (Kapitel 3.1.6). Nun wurde alle 10 min

mit dem Vortex-Mischer resuspendiert und insgesamt 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in ein 2-ml-Reaktionsgefäß gegeben und bei 16000 g in der Mikrozentrifuge aufgetrennt. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C. Die Proben für die Western-Blots wurden dazu nach folgendem Schema aliquotiert, um zu vermeiden, dass die Proben häufiger als zweimal aufgetaut und wieder eingefroren wurden: 1x 530µl, 1x 250µl, 4x 50µl und 1x 20µl.

### *3.2.2.2 Protein-Konzentrationsbestimmung*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Bicinchoninsäure (BCA) mit einem Kit-System von Thermo Scientific. An die Peptidbindung binden dabei zweiwertige Kupferionen (Biuret-Reaktion) und werden bei alkalischem pH-Wert zu einwertigen Kupferionen reduziert. Es entsteht ein blau-violetten Farbstoffkomplex dessen Extinktion photometrisch bestimmt werden kann (292).

15 µl der zu untersuchenden Probe wurden in einem 2-ml-Reaktionsgefäß 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. In 9 Reaktionsgefäßen wurden nun je 75 µl einer Verdünnungsreihe pipettiert. Als nächstes wurden die Reaktionslösungen A und B des Kit-Systems 50:1 gemischt und davon 600 µl zu den Eppendorf-Röhrchen der Probe und denen der Verdünnungsreihe gegeben. Aus jedem Eppendorf-Röhrchen der Probe und der Verdünnungsreihe wurden nun in drei benachbarte Well einer 96-Well-Platte je 200 µl pipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation über 30 min bei 37°C im Inkubator. Zuletzt erfolgte die Messung der Extinktion im ELISA-Reader bei 562 nm (292). Anhand der erstellten Standardreihe konnte mit Hilfe des Programms Excel die Konzentration bestimmt werden.

### *3.2.2.3 Phospho-Kinase-Array*

Es wurden pro Zelllinie von Zellen, die 2 h mit 10 µM SB203580 behandelt wurden und von unbehandelten Zellen Proteinextrakte erstellt. Mit beiden Proteinextrakten wurde dann pro Zelllinie je ein Phospho-Kinase-Array durchgeführt.

Zum Prinzip der Phospho-Kinase Arrays: Die im Zell-Lysat enthaltenen Proteine binden an die Antikörper auf der Membran. Daran wiederum können dann die

## Material und Methoden

---

Antikörper binden, die im nächsten Schritt das Streptavidin mit der Meerrettich-Peroxidase binden (293, 294). Das Streptavidin dient dabei als Signalverstärker, da es viele Bindungsstellen für die Meerrettich-Peroxidase hat (295). Bei Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Luminol wird Licht emittiert (296). Dieses Signal detektiert der Westernblot-Entwickler.

Zum praktischen Vorgehen: Jede Membran wurde in ein Well der 8-Well-Platte abgelegt. Die Membranen wurden 1 h auf der Schüttelplatte mit dem Array Buffer 1 inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran abzudecken (295). Das Volumen der Proteinextrakt-Probe, das 600  $\mu\text{g}$  enthielt, wurde verwendet und mit Array Buffer 1 aufgefüllt, sodass ein Volumen von 2 ml entstand. Je 1 ml davon wurde dann anschließend, nach Verwerfen des Array Buffer 1, auf je eine Membran gegeben und über Nacht bei 4°C auf der Schüttelplatte inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen in 3 ml Waschpuffer 10 min auf die Schüttelplatte gestellt. Dieses Waschen wurde zweimal wiederholt. Nun wurden 20  $\mu\text{l}$  des Detection-Antibody-Cocktail A 1:50 verdünnt und zur Membran A und entsprechend Detection-Antibody-Cocktail B zu Membran B gegeben und 2 h auf der Schüttelplatte inkubiert. Es erfolgte danach wieder ein dreimaliges Waschen wie bereits beschrieben. Inzwischen konnte die Meerrettich-Peroxidase 1:2000 mit Array Buffer 2/3 verdünnt werden. Davon wurde je 1 ml zu den Membranen gegeben und für 30 min auf der Schüttelplatte inkubiert. Anschließend erfolgte zum letzten Mal das dreimalige Waschen. Der Chemi-Reagent-Mix 1 enthielt Wasserstoffperoxid und der Chemi-Reagent-Mix 2 enthielt Luminol. Beide wurden im 1:1-Verhältnis zusammen pipettiert. Dieses Gemisch wurde nun für 1 min auf die Membranen gegeben. Das Zusammenpipettieren erfolgte hier maximal 15 min vor Auftrag auf die Membranen. Nun wurden die Membranen zwischen zwei transparente Folien gelegt, die Luftblasen herausgestrichen und die Chemilumineszenz im Westernblot-Entwickler dokumentiert.

Zur Auswertung der Phospho-Kinase-Arrays wurde mit dem Programm AlphaView SA die Lichtemission der einzelnen *Spots* quantifiziert. Es wurden nur die Kinasen weiter betrachtet, die auch eine Lichtemission zeigten. Wenn das quantifizierte Signal schwächer war als die Schwankung der Belichtung des Hintergrundes der Membran, wurde die zu dem *Spot* gehörende Kinase von der Auswertung ausgeschlossen. Da immer zwei nebeneinanderliegende *Spots* die gleiche Phosphorylierungsstelle einer

## Material und Methoden

---

Kinase detektierten, wurde aus diesen beiden Werten ein Mittelwert gebildet. Dieser wurde zu der quantifizierten Lichtemission der Referenzpunkte auf der Membran ins Verhältnis gesetzt. Dieser Schritt erfolgte, um Belichtungsunterschiede der verschiedenen Bereiche der Membran im Chemilumineszenz-Detektor zu minimieren. Anschließend wurde wieder ein Quotient gebildet aus den ermittelten Werten der *Spots* der behandelten Membran als Dividend und den Werten der *Spots* der unbehandelten Membran als Divisor (Abbildung 3). So erhielt man Faktoren, die aussagen wie stark sich die Phosphorylierung der Kinasen bei der jeweiligen Zelllinie durch Einfluss des Wirkstoffs änderte. Es konnten 37 Phosphorylierungsstellen von Kinasen gleichzeitig untersucht werden und ein Überblick über die Einflüsse des Wirkstoffs auf die Phosphorylierungskaskaden gewonnen werden. Bei einer Änderung der Phosphorylierung größer 50% wurden die Kinasen in Western-Blots weiter untersucht.

$$\frac{\frac{\text{Mittelwert der quantifizierten Lichtemission der zwei Spots, die eine Kinase detektieren, der behandelten Membran}}{\text{quantifizierte Lichtemission der Referenzspots, der behandelten Membran}}}{\frac{\text{Mittelwert der quantifizierten Lichtemission der zwei Spots, die eine Kinase detektieren, der unbehandelten Membran}}{\text{quantifizierte Lichtemission der Referenzspots, der unbehandelten Membran}}}$$

**Abbildung 3** Rechnung zur Auswertung der Phospho-Kinase-Arrays

### 3.2.2.4 SDS-PAGE

Zunächst musste unter dem Abzug das Polyacrylamid-Gel gegossen werden. Die Gieß-Apparatur wurde zusammengesetzt und mit destilliertem Wasser auf Dichtigkeit überprüft. Als erstes wurde das Trenngel gegossen (Tabelle 4). Es galt zu beachten welche Masse die Moleküle haben die später nachgewiesen werden sollen. Wenn die Molekülmassen kleiner als 100 kDa waren, wurden 10%ige Trenngele und bei Molekülmassen größer 100 kDa wurden 7,5%ige Trenngele verwendet (Tabelle 2).

**Tabelle 4 Pipettierschema zum Gießen der Gele für die SDS-PAGE**

	<b>Trenngele 10%</b>	<b>Trenngele 7,5%</b>	<b>Sammelgele 4%</b>
dest. Wasser	1,9	2,65	1,7
Acrylamid (30%ig) in ml	1,7	1,25	0,415
Gelpuffer in ml	1,3 ml Trenngelpuffer	1,3 ml Trenngelpuffer	0,315 ml Sammelgelpuffer
SDS (10%ig) in $\mu$ l	50	50	25
APS in $\mu$ l	50	50	25
TEMED in $\mu$ l	2	2	2,5

Es wurden pro Kammer 4,5 ml Trenngel hineingegossen. Um eine gerade Kante zu erhalten, wurde dann 1 ml Ethanol darauf gegeben. Nun wurde der Polymerisierung 30 min Zeit gegeben. Anschließend konnte das Ethanol abgekippt werden. Nun wurde die Kammer mit Sammelgel (Tabelle 4) vollgefüllt und direkt danach der 15-Well-Kamm hineingedrückt. Es wurde wieder 30 min gewartet. Zu beachten war, dass ab der Zugabe von APS und TEMED die Polymerisation durch deren katalytische Wirkung gestartet wurde (297). Daher mussten Verzögerungen im Arbeitsablauf ab diesem Zeitpunkt vermieden werden. Die Gele wurden in angefeuchtetem Zellstoff bei 4°C bis zur Verwendung gelagert.

Die Proteine sollten anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Damit dieser Prozess nicht durch die Eigenladung der Moleküle beeinflusst wird, wurde diese mit SDS überdeckt (298). Pro Gel sollten 10 Proben sowie die Marker aufgetragen werden. Es wurde das Volumen der Proteinextrakte ausgerechnet, welches 10  $\mu$ g Protein enthielt. Die Proteinproben wurden dem entsprechend mit Ladepuffer auf ein einheitliches Volumen verdünnt. Es wurde immer mit Überschuss angesetzt. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert und kamen für 10 min bei 600 RPM auf die Schüttelplatte und danach für 10 min bei 95°C auf den Heizblock, um die Proteine zu denaturieren. In der Zwischenzeit wurden die Laufapparaturen zusammengebaut, die Kämmen gezogen und gegebenenfalls Reste des Gels aus den in den Gelen durch die Kämmen gebildeten Taschen entfernt und SDS-Ladepuffer in die Apparatur gegeben. Es wurde in jede Tasche 14  $\mu$ l des Protein-Ladepuffer-Gemisches gegeben und in die erste Tasche 5  $\mu$ l BenchMark und 3  $\mu$ l MagicMark XP. Nur zur Detektion von mTOR wurden je 7  $\mu$ l der Marker verwendet. Anschließend wurden 75 V Spannung an der Apparatur angelegt bis die Sammelgelphase nach ca. 25 min durchlaufen war. Dann wurde die Spannung auf 125 V erhöht. Kurz bevor die Lauffront das Gel verlassen würde, wurde

die Spannung abgestellt – meist nach ca. 90 min. Bei den Gelen, die zur Detektion von mTOR gedacht waren, wurde der Strom erst 30 min nach Austreten der roten 64 kDa Markierung aus dem Gel ausgestellt, also ca. nach 3 h.

### 3.2.2.5 Western-Blot

Da die nach ihrer Größe in dem Gel aufgetrennten Moleküle Antikörpern nur schwer zugänglich sind, war es erforderlich sie auf eine Membran zu blotten. Dazu wurde folgendermaßen nach dem semi-dry Verfahren (299) vorgegangen:

Die Anodenseite der Blot-Apparatur wurde mit Anodenpuffer bestrichen. Darauf kamen sechs Filterpapiere, die im gleichen Puffer getränkt waren. Die PVDF-Membran (300) wurde kurz in Ethanol aktiviert, in destilliertem Wasser gewaschen, in Anodenpuffer äquilibriert und auf den Filterpapieren platziert. Mittig darauf wurde das Gel abgelegt. Nun wurden sechs in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere darauf gegeben und der Stapel mit dem Western-Blot-Roller ausgerollt, um Luftblasen zu entfernen. Zuletzt wurde die Kathodenseite der Apparatur mit dem entsprechenden Puffer angefeuchtet (Abbildung 4). So gestapelt wurde der Blot an die Spannungsquelle angeschlossen und für 30 min bei 1 A und 25 V geblottet.



**Abbildung 4 Aufbau des verwendeten semi-dry Blots**

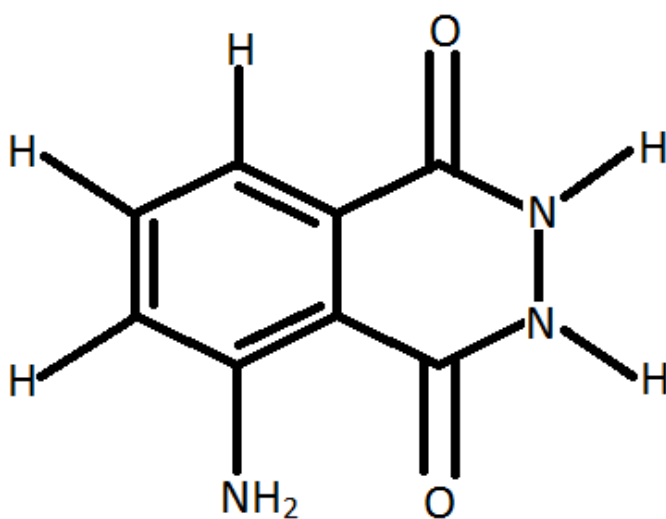
(in Anlehnung an (295))

### 3.2.2.6 Antikörper-Detektion

Wenn die Membran fertig geblottet war, wurde sie für 1 h auf der Schüttelplatte blockiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken (Tabelle 2) (295). Anschließend wurde mit TBST gewaschen. Dies erfolgte dreimal für 10 min. Wenn die Erst-Antikörpern gegen phosphorylierte Proteine gerichtet waren, wurde statt 10 min immer nur 5 min gewaschen. Die Erst-Antikörper wurden in einem

50-ml-Reaktionsgefäß verdünnt (Tabelle 2) und die Membran nach dem Waschen dazu gegeben. Über Nacht wurden die Membranen in den 50-ml-Reaktionsgefäßen auf den Rollenschüttler bei 12 RPM und 4°C gegeben. Am nächsten Tag erfolgte das oben beschriebene dreimalige Waschen und anschließend die Inkubation über 1 h mit dem Zweit-Antikörper entsprechend dem Organismus des Erst-Antikörpers (Tabelle 2). Der Zweit-Antikörper wurde stets in der gleichen Ansatzlösung verdünnt wie der Erst-Antikörper. Nun wurde ein letztes Mal das anfangs beschriebene Waschen durchgeführt.

Anschließend wurde Western Lightning Plus ECL Reagenz verwendet. Dabei wird das Oxidizing Reagent – enthält Wasserstoffperoxid – und das Enhanced Luminol Reagent Plus 1:1 zusammen pipettiert und gemischt. Anschließend wurden 2 ml davon gleichmäßig auf die Membran getropft und 1 min inkubiert. Die Membran wurde nun zwischen zwei Folien gelegt, die Luftblasen herausgestrichen und in den Westernblot-Entwickler gelegt. Die Detektion der nachzuweisenden Proteine gelang also mithilfe der am Zweit-Antikörper gebundenen Meerrettich-Peroxidase. Wurde  $H_2O_2$  und Luminol zugegeben, wurde das Luminol oxidiert. Die Elektronen der aromatischen Ringe (Abbildung 5) wurden dabei auf höhere Energieniveaus in den angeregten Singulett-Zustand gehoben. Beim Zurückfallen auf ihr eigentliches Grundniveau emittierten sie Photonen im blauen Spektralbereich, um Energie abzugeben (296).



**Abbildung 5 Strukturformel des Luminols**

(in Anlehnung an (296))

## Material und Methoden

---

Dieses Signal wurde dann im Westernblot-Entwickler als Chemilumineszenz detektiert. Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit dem Programm AlphaView SA. Die quantifizierte Lichtemission der Bande des Gesamt-Proteins oder des phosphorylierten Proteins der Kinase, der mit SB203580 in der jeweiligen Konzentration behandelten Probe wurde ins Verhältnis gesetzt zur quantifizierten Lichtemission der Bande des dazugehörigen  $\beta$ -Actins. Diese Rechnung erfolgte entsprechend noch einmal für die unbehandelte Probe. Abschließend wurde wieder ein Quotient gebildet mit der Rechnung zu der behandelten Membran als Dividend und der Rechnung zu der unbehandelten Membran als Divisor (Abbildung 6). So erhielt man Faktoren, die aussagen wie ausgeprägt die Änderung der Expression des untersuchten Proteins bei der jeweiligen Probe durch Einfluss des Wirkstoffs in der jeweiligen Konzentration ist. Mit dem Programm Microsoft Office Excel wurden die Daten entsprechend verarbeitet.

$$\frac{\frac{\text{quantifizierte Lichtemission der Bande der Kinase (Gesamt-Protein oder phosphoryliertes Protein), der mit SB203580 in der jeweiligen Konzentration behandelten Probe}}{\text{quantifizierte Lichtemission der Bande des } \beta\text{-Actins, der mit SB203580 in der jeweiligen Konzentration behandelten Probe}}}{\frac{\text{quantifizierte Lichtemission der Bande der Kinase (Gesamt-Protein oder phosphoryliertes Protein), der unbehandelten Probe}}{\text{quantifizierte Lichtemission der Bande des } \beta\text{-Actins, der unbehandelten Probe}}}$$

### ***Abbildung 6 Rechnung zur Auswertung der Western-Blots***

Zwei Informationen wurden hier also miteinander kombiniert, um ein Molekül nachzuweisen: die spezifische Bindung durch den Erstantikörper und die ermittelte Molekülmasse. Wenn diese beiden Informationen zusammenpassten, also das Lichtsignal auf der richtigen Höhe – nach Abgleich mit dem Marker für die Molekularmasse – auftrat, wurde davon ausgegangen, dass das gesuchte Molekül nachgewiesen werden konnte.

Um die Membran zur Detektion eines weiteren Proteins zu verwenden, wurde sie nun gestrippt. Die Antikörper wurden so wieder von der Membran abgelöst. Dazu wurde sie 5 min in destilliertem Wasser gewaschen, dann 20 min auf der Schüttelplatte mit 0,2 M Natriumhydroxidlauge behandelt und anschließend wieder 5 min in destilliertem Wasser gewaschen. Nun konnte die Membran wieder blockiert werden. Es wurde zuerst immer ein Antikörper gegen ein phosphoryliertes Protein verwendet. Nach dem ersten Strippen wurde ein Antikörper gegen ein Gesamt-Protein auf die Membran

gegeben, welches allerdings deutlich größer oder kleiner sein sollte als das phosphorylierte Protein, damit ein ausreichender Abstand der Banden gegeben war und Signalüberlagerungen ausgeschlossen werden konnten. Nach dem zweiten Strippen wurde immer ein Antikörper gegen  $\beta$ -Actin als Ladekontrolle verwendet.

### 3.2.2.7 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung wurde als Ladekontrolle bei den Gelen zur Detektion von mTOR eingesetzt. Der Farbstoff bindet als tiefblauer Komplex unspezifisch an fast alle Proteine (298, 301). Für die Färbelösung wurde das Fünffach-Konzentrat Roti®Blue verwendet. Zuerst wurde Ethanol und destilliertes Wasser (Kapitel 3.1.6) vermischt und anschließend auf dem Magnetrührer langsam das Konzentrat zugegeben. Die Membran wurde zuerst gestrippt und anschließend 24 h in einem 50-ml-Reaktionsgefäß mit 25 ml Färbelösung auf den Rollenschüttler gegeben. Anschließend wurde dreimal für 24 h entfärbt (Kapitel 3.1.6). Anschließend wurden die Membranen getrocknet und dokumentiert (Anhang 9.1.7.4).

### 3.2.3 Statistik

Die Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Microsoft Excel verwendet. Es wurde ein Student's t-Test zur Ermittlung der Signifikanz durchgeführt. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert  $< 0,05$  angenommen.

### 4 Ergebnisse

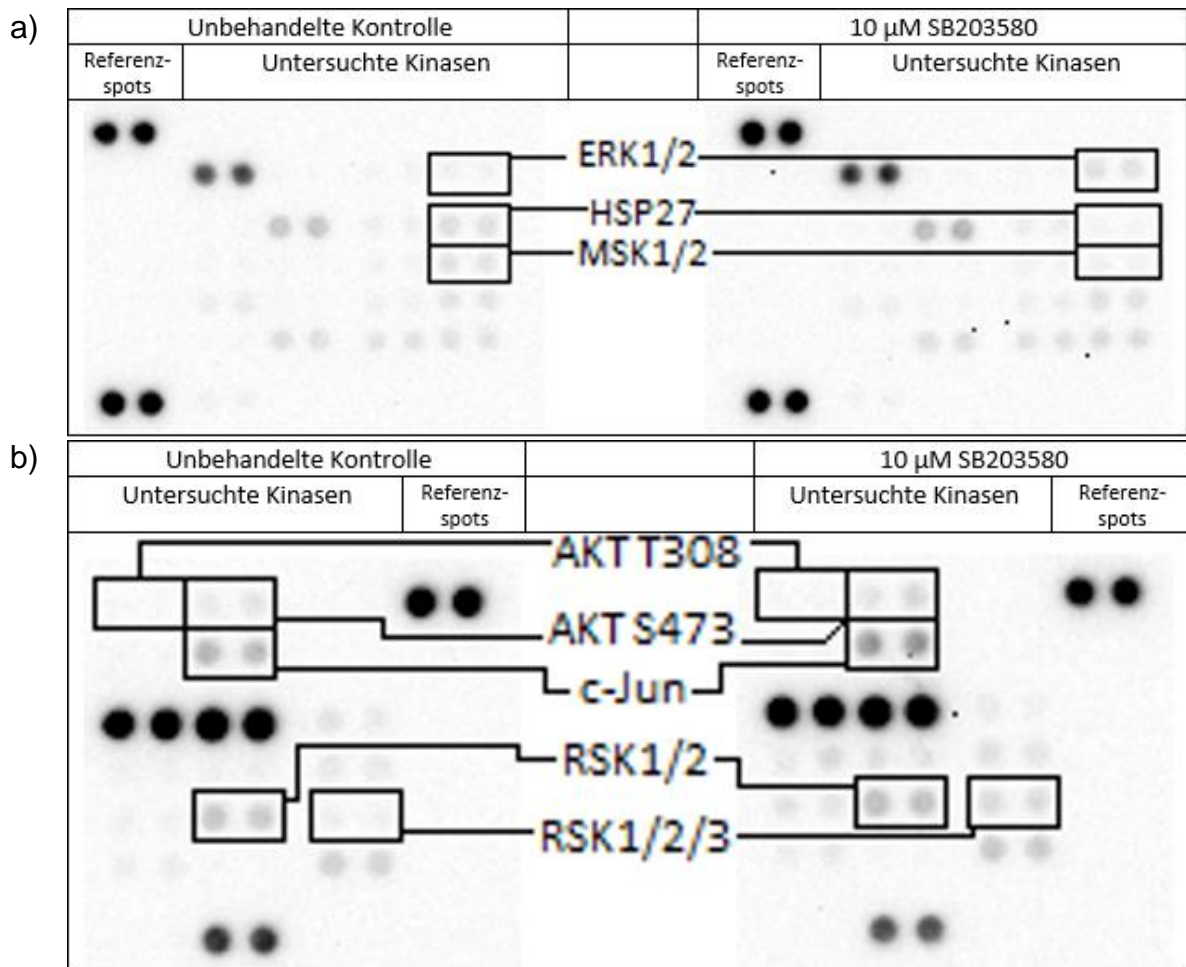
Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss des Inhibitors SB203580 auf die Signalkaskaden der MAP-Kinasen in Mamma-Karzinom-Zellen näher zu betrachten. Repräsentativ dafür wurden MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen sowie die nicht-maligne Zelllinie MCF-10A verwendet. Dafür wurden zunächst Phospho-Kinase-Arrays durchgeführt, um einen Überblick über mögliche Einflüsse des p38-Inhibitors auf andere Kinasen der Kaskaden zu gewinnen. Die Kinasen, die im Phospho-Kinase-Array auffällig waren, wurden anschließend in Western-Blot-Analysen näher untersucht. Dabei wurden drei Versuchsdurchgänge erstellt und der Inhibitor in vier unterschiedlichen Konzentrationen (0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ) betrachtet und mit unbehandelten Zellen verglichen. Alle Western-Blots, die in die Auswertung eingeflossen sind, sowie alle Tabellen mit den Ergebnissen und der weiteren Auswertung finden sich im Anhang (Anhang 9.1).

#### 4.1 Screening der Aktivität von verschiedenen Kinasen unter Einfluss von SB203580

Die verwendeten Phospho-Kinase-Arrays ermittelten gleichzeitig die Aktivität von 37 Kinasen. Nachfolgend sind die Aktivitäten der Kinasen dargelegt, welche eine Änderung ihrer Phosphorylierung durch SB203580 um 50% zeigten und daher auch in Western-Blots weiter untersucht wurden (Abbildung 7).

Die Phosphorylierung der Kinasen ERK1/2, HSP27, MSK 1/2, AKT T308, AKT S473, c-JUN und RSK1/2/3 änderte sich durch SB203580 in den MCF-10A-Zellen um maximal 20% (Abbildung 8). Daher waren die Änderungen der Phosphorylierungen der Kinasen in den MCF-10A-Zellen nicht ausschlaggebend für die Auswahl der im Western-Blot zu untersuchenden Proteine. Vor allem die MDA-MB-231-Zellen wiesen eindeutige Veränderungen auf. Diese zeigten für p-ERK1/2 eine 2-fach erhöhte Expression, wie auch für p-AKT S473 und p-c-JUN. Die Phosphorylierung von c-JUN in den MCF-7-Zellen war durch die Behandlung um den Faktor 1,4 gesteigert (Abbildung 8).

## Ergebnisse



**Abbildung 7 Phospho-Kinase-Array von MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von SB203580**

Auf der linken Seite ist der Phospho-Kinase-Array der unbehandelten Zellen zu sehen. Auf der rechten Seite ist der Phospho-Kinase-Array nach Behandlung der Zellen mit SB203580 in einer Konzentration von 10  $\mu$ M für 2 h dargestellt. Die Membran des Arrays war geteilt: Teil -a- der Abbildung zeigt Teil A des Membran-Sets und Teil -b- der Abbildung entsprechend Teil B des Membran Sets. Markiert sind Kinasen, die eine deutliche Reaktion auf die SB203580-Behandlung zeigten: ERK1/2 (T202/Y204, T185/Y187), HSP27 (S78/S82), MSK1/2 (S376/S360), AKT (T308), AKT (S473), c-JUN (S63), RSK1/2/3 (S380/S386/S377) und RSK1/2 (S221/S227).

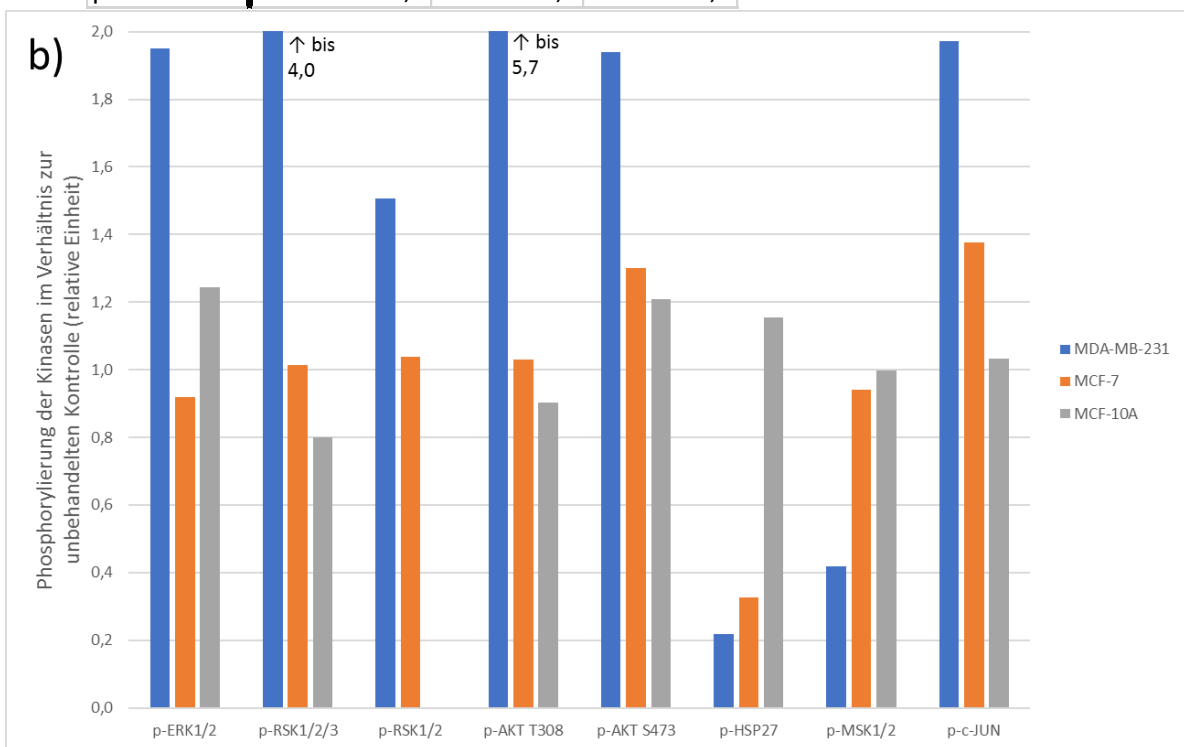
Die 5,7-fache Erhöhung der Expression von p-AKT T308 in den MDA-MB-231-Zellen sollte differenziert betrachtet werden, da das emittierte Signal zwar sehr unterschiedlich, aber verglichen mit den Referenzspots bei behandelten wie unbehandelten Zellen sehr schwach ausgeprägt war (Abbildung 7, Abbildung 8). Es wurde daher auch in Western-Blots weiter überprüft. In den MDA-MB-231-Zellen war unter Behandlung die Expression von p-HSP27 um 80% und p-MSK1/2 um 60% supprimiert. Das p-HSP27 war in den MCF-7-Zellen mit einer Verringerung der Expression um 70% nur 10% weniger erniedrigt als in den MDA-MB-231-Zellen bei denen es um 80% erniedrigt vorlag. Das RSK 1/2/3 zeigte unter Einfluss des Inhibitors

## Ergebnisse

eine 4-fache Steigerung der Expression für die untersuchten Phosphorylierungsstellen S380/S386/S377 und eine 1,5-fache für die Phosphorylierungsstellen S221/S227 des RSK1/2 in den MDA-MB-231-Zellen.

a)

	Zelllinie		
	MDA-MB-231	MCF-7	MCF-10A
p-ERK1/2	2,0	0,9	1,2
p-RSK1/2/3	4,0	1,0	0,8
p-RSK1/2	1,5	1,0	
p-AKT T308	5,7	1,0	0,9
p-AKT S473	1,9	1,3	1,2
p-HSP27	0,2	0,3	1,2
p-MSK1/2	0,4	0,9	1,0
p-c-JUN	2,0	1,4	1,0



**Abbildung 8 Expression auffälliger Kinasen, ermittelt im Phospho-Kinase-Array**

SB203580 wurde in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  für 2 h auf die Zellen gegeben. Die Phosphorylierung folgender Kinasen wurden dargestellt: ERK1/2 (T202/Y204, T185/Y187), HSP27 (S78/S82), MSK1/2 (S376/S360), AKT (T308), AKT (S473), c-JUN (S63), RSK1/2/3 (S380/S386/S377) und RSK1/2 (S221/S227). Teil -a- der Abbildung zeigt die Faktoren, um die sich die Phosphorylierung unter SB203580 im Verhältnis zu unbehandelten Zellen änderte. Teil -b- stellt dies graphisch dar. Der Graph der RSK1/2/3 und jener der AKT T308 für die MDA-MB-231-Zellen ist aus Formatgründen nicht vollständig abgebildet. Der Phospho-Kinase-Array für die MCF-10A-Zellen wurde aus logistischen Gründen in einer anderen Herstellerversion verwendet und enthielt keine Anlage zur Detektion der Phosphorylierung von RSK1/2 (S221/S227).

## Ergebnisse

---

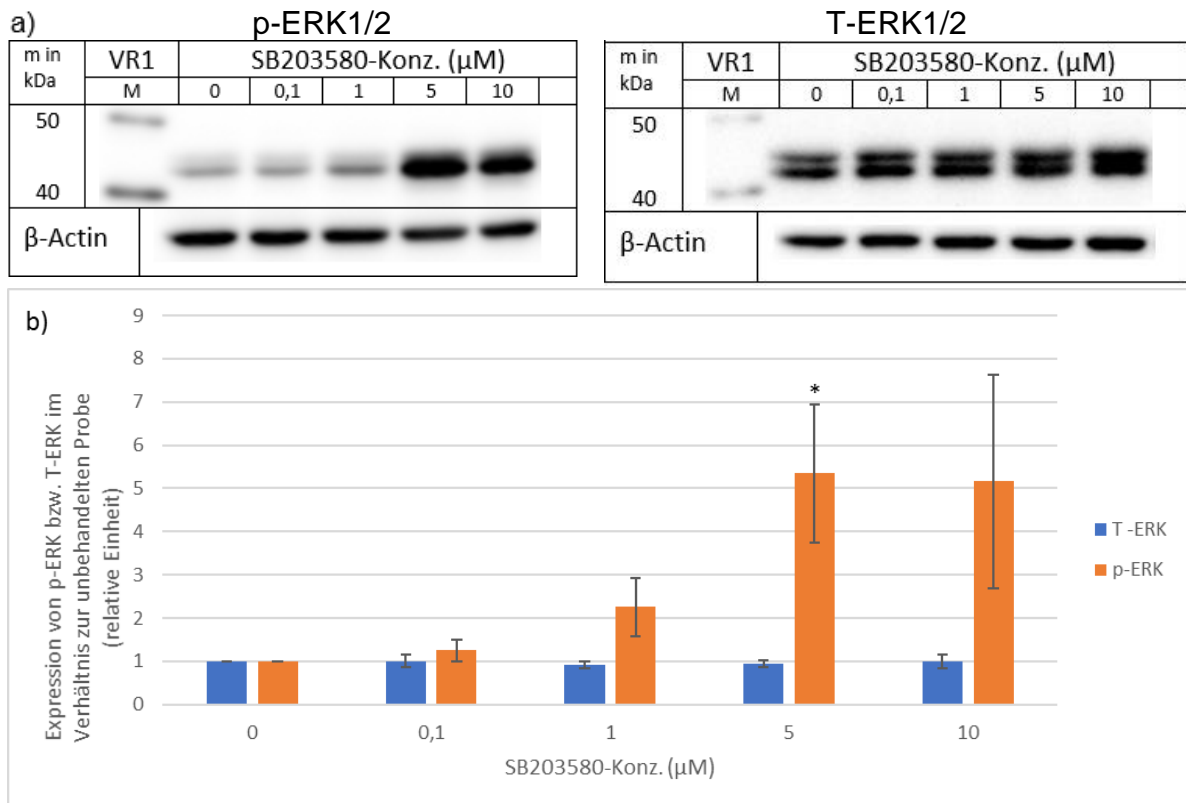
### 4.2 Validierung der Aktivität relevanter Kinasen unter Einfluss von SB203580 im Western-Blot

#### 4.2.1 ERK1/2

Alle drei Zelllinien zeigten unter dem Einfluss des Inhibitors im Western-Blot eine gesteigerte Aktivität von p-ERK1/2 bei relativ konstant bleibender Menge von T-ERK1/2. Die Mittelwerte von T-ERK1/2 schwankten in den Proben aller drei Zelllinien lediglich zwischen dem 0,9-fachen und 1,1-fachen im Vergleich zur unbehandelten Probe (Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11). Auch der t-Test legte dem Betrachter die Annahme der Null-Hypothese nahe. Denn wenn man bei den drei Zelllinien die Mittelwerte der vier mit SB203580 in unterschiedlichen Konzentrationen behandelten Proben betrachtet, zeigten sieben der zwölf Proben einen p-Wert  $> 0,5$  für die Veränderung von T-ERK1/2 und bei drei Proben davon sogar einen p-Wert  $> 0,9$ . Dies sagt aus, dass die Nullhypothese mit einer Wahrscheinlichkeit bei  $p > 0,5$  in mehr als 50% der Fälle bzw. bei  $p > 0,9$  in mehr als 90% der Fälle die richtige Annahme ist, also kein Unterschied zwischen den behandelten Zellen im Vergleich zu den Unbehandelten bestand.

Die MCF-7-Zellen zeigten von allen drei Zelllinien die stärkste Steigerung der Expression von p-ERK1/2. Unter dem Einfluss von SB203580 in einer Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  war diese bis auf das 5,4-fache des Niveaus der Zellen ohne Behandlung gesteigert (Abbildung 9). Die Expression von p-ERK1/2 lag bei den drei Versuchswiederholungen bei Faktoren zwischen 3,5 und 6,4 und damit nah genug beieinander, um im t-Test einen p-Wert von 0,042 zu erzeugen, womit das Ergebnis auch statistisch als signifikant betrachtet werden kann. Bei den Proben, die mit SB203580 in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  behandelt wurden, ergaben sich ähnliche Faktoren der Expressionserhöhung mit einem Mittelwert von 5,2. Die MCF-7-Zellen, die mit dem Inhibitor in der niedrigsten Konzentration behandelt wurden, ergaben fast gar keine Steigerung der Phosphorylierung an ERK1/2 und bei der Konzentration des SB203580 von  $1,0 \mu\text{M}$  kam es immerhin zu einer Zunahme der Phosphorylierung um den Faktor 2,3.

## Ergebnisse

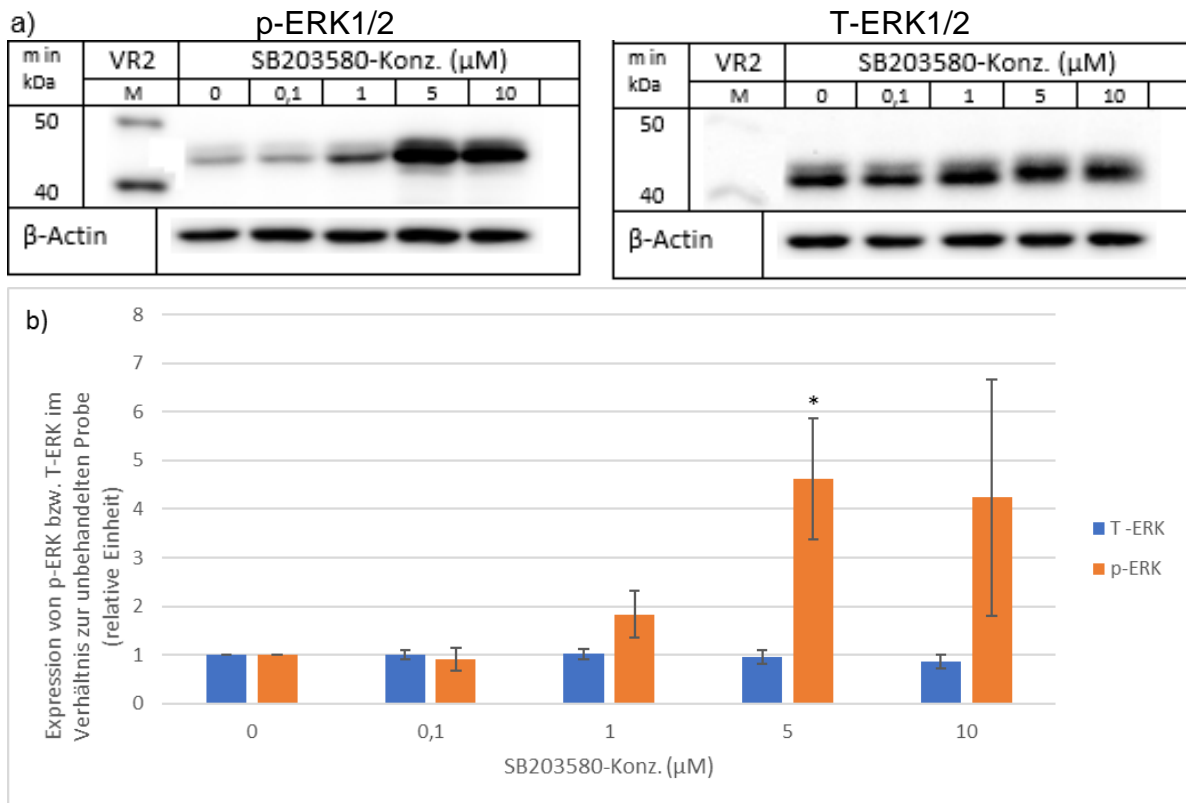


**Abbildung 9** Western-Blot und quantitative Auswertung von T-ERK1/2 und p-ERK1/2 in MCF-7-Zellen unter Einfluss von SB203580

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-ERK1/2 (T202/Y204, T185/Y187) und total-ERK1/2 (T-ERK1/2). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die unbehandelten Zellen wurde mit einem t-Test ermittelt und bei einem p-Wert < 0,05 mit einem \* gekennzeichnet.

Die MDA-MB-231-Zellen verhielten sich sehr ähnlich wie die MCF-7-Zellen. Die stärkste Steigerung der Phosphorylierung von ERK1/2 lag hier ebenfalls bei 5  $\mu\text{M}$  vor und lag bei dem Faktor 4,6 im Vergleich zur unbehandelten Probe (Abbildung 10). Diese Steigerung war mit dem p-Wert von 0,038 signifikant. Die Expression von p-ERK1/2 der MDA-MB-231-Zellen, die mit SB203580 in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  behandelt wurden, war nur unwesentlich niedriger als bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$ . Bei einer Konzentration des SB203580 von 1  $\mu\text{M}$  gab es eine Steigerung um den Faktor 1,9 zur unbehandelten Probe.

## Ergebnisse



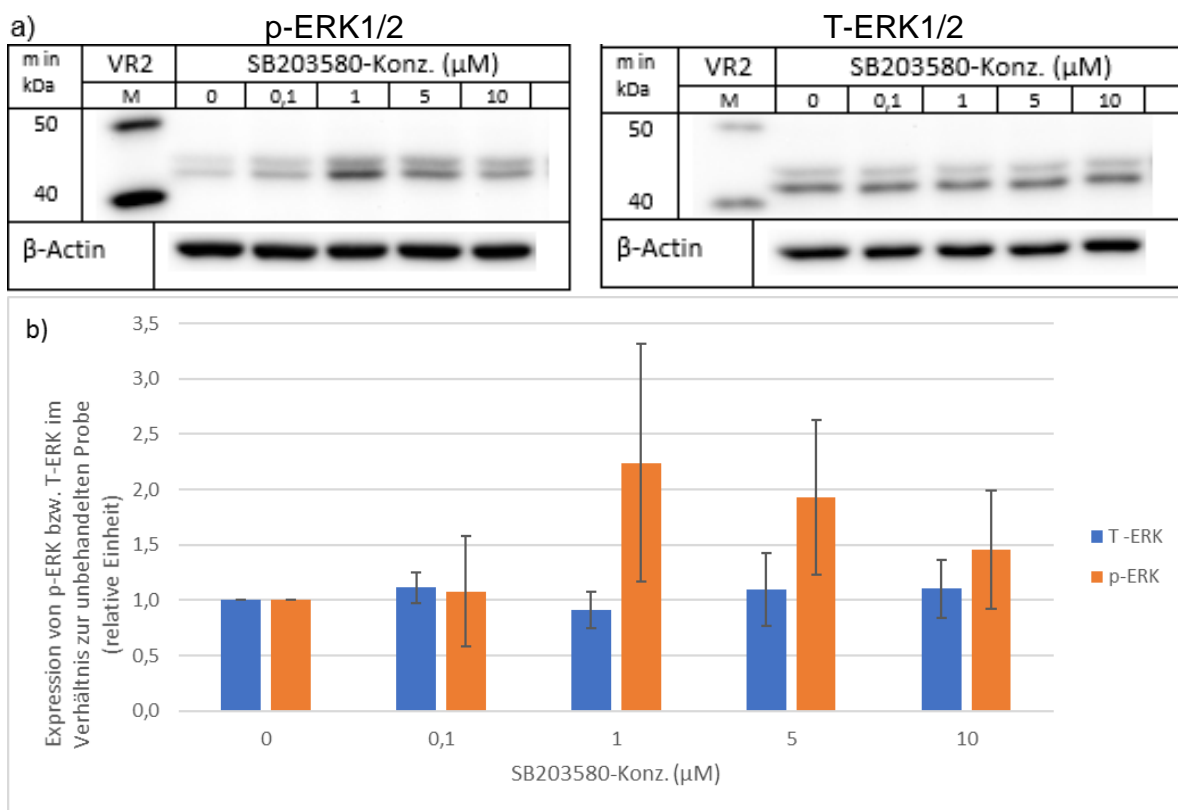
**Abbildung 10** Western-Blot und quantitative Auswertung von T-ERK1/2 und p-ERK1/2 in MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von SB203580

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-ERK1/2 (T202/Y204, T185/Y187) und total-ERK1/2 (T-ERK1/2). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die unbehandelten Zellen wurde mit einem t-Test ermittelt und bei einem p-Wert < 0,05 mit einem \* gekennzeichnet.

Die Werte der Expression von p-ERK1/2 für die Proben mit den beiden niedrigen Konzentrationen 0,1 und 1  $\mu\text{M}$  waren in allen drei Zelllinien sehr ähnlich. Bei der niedrigsten Konzentration des Inhibitors schwankten die Mittelwerte lediglich um 10% und bei 1  $\mu\text{M}$  lag die Steigerung immer um den Faktor zwei. Die MCF-10A-Zellen hoben sich von den malignen Zelllinien dadurch hervor, dass die stärkste Phosphorylierung bei den Proben, die mit SB203580 in einer Konzentration von 1,0  $\mu\text{M}$  behandelt wurden, vorlag und nicht bei den hohen Konzentrationen mit 5 und 10  $\mu\text{M}$  (Abbildung 11). Zwar näherten sich bei den hohen Konzentrationen des Inhibitors die Werte dem Ausgangswert ohne Zugabe des Inhibitors wieder an, allerdings

## Ergebnisse

exprimierten die Zellen unter dem Einfluss der stärksten Konzentration von SB203580 immer noch 1,5-mal so viel p-ERK1/2 wie die unbehandelten MCF-10A-Zellen.



**Abbildung 11 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-ERK1/2 und p-ERK1/2 in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580**

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-ERK1/2 (T202/Y204, T185/Y187) und total-ERK1/2 (T-ERK1/2). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert.

Das Protein ERK1/2 zeigte in allen Western-Blots Doppelbanden, da die verwendeten Erst-Antikörper sich gegen die Isoformen ERK1 und ERK2 richteten. Die Banden auf der Höhe von 44 kDa stellten ERK1 und die bei 42 kDa stellten ERK2 dar. Generell kann man bei allen im Rahmen dieser Arbeit erstellten Darstellungen von ERK1/2 beobachten, dass ERK2 kräftigere Signale im Western-Blot generierte und auch, dass die Steigerung der Phosphorylierung in einem stärkeren Ausmaß auftrat als bei ERK1. Dieser Effekt war so ausgeprägt, dass das durch ERK2 generierte Signal jenes von

## Ergebnisse

---

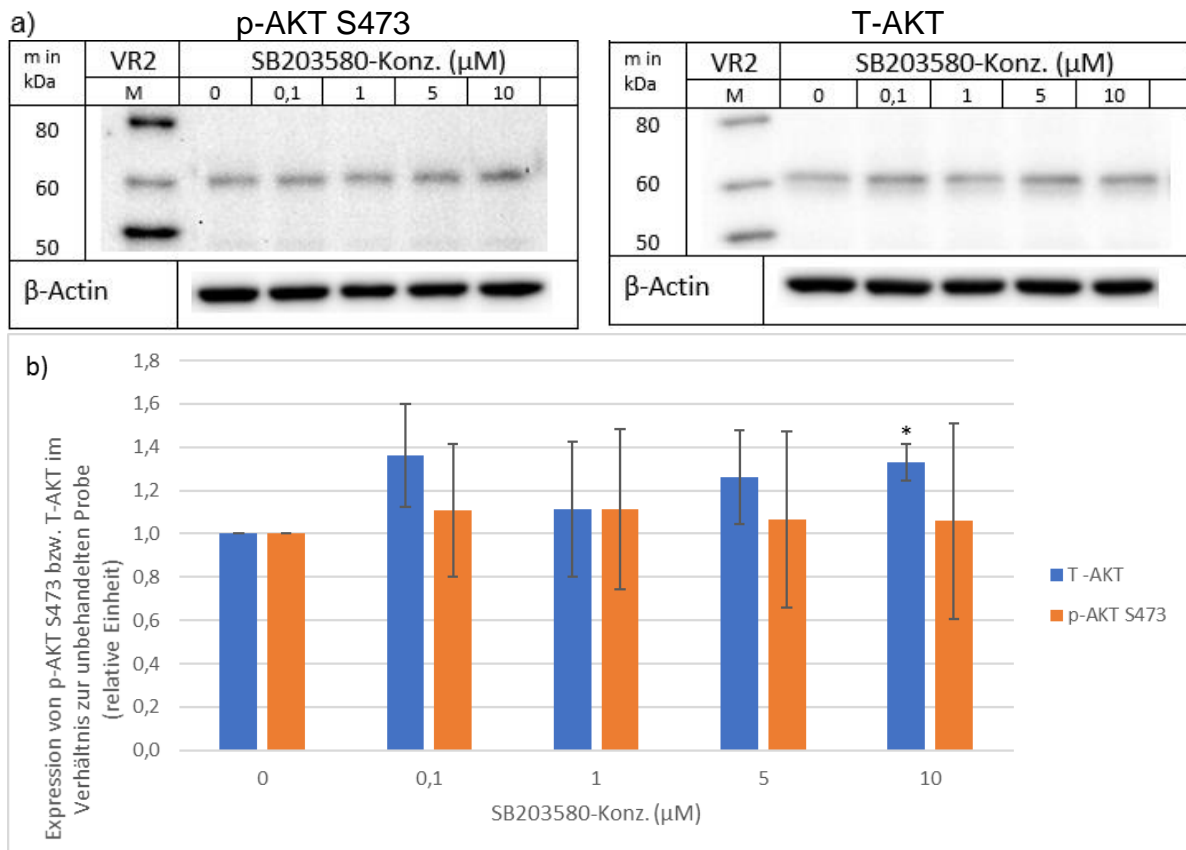
ERK1 häufig überlagerte. Dadurch war eine einzelne Auswertung der Banden von ERK1 und ERK2 meist nicht möglich.

### 4.2.2 AKT

In den MCF-10A-Zellen lag eine gering erhöhte Expression von T-AKT vor, mit Mittelwerten, die um den Faktor 1,11 bis 1,36 erhöht waren. Dabei gab es ein signifikantes Ergebnis für die Steigerung der Expression, der mit SB203580 in der Konzentration von 10  $\mu$ M behandelten Zellen (Abbildung 12). Es ist jedoch anzumerken, dass dieses Ergebnis mehr dadurch hervorsteicht, dass die Werte der drei Wiederholungen sehr nah beieinander lagen als durch eine stärkere Abweichung des Mittelwertes – verglichen mit den in den drei anderen Konzentrationen behandelten Zellen.

Die Phosphorylierung an der Stelle S473 war in den behandelten Zellen unabhängig von der Konzentration des SB203580 immer leicht um 6 bzw. 11% erhöht. Die Standardabweichung war allerdings um ein Vielfaches größer als die Abweichung der Mittelwerte der behandelten von den unbehandelten MCF-10A-Zellen. Auch die p-Werte des t-Test sagen aus, dass die Annahme der Nullhypothese in ca. 60 bis 84% der Fälle richtig ist. Dies spricht also dafür, dass kein signifikanter Unterschied der Phosphorylierung der behandelten Zellen zu den unbehandelten MCF-10A-Zellen bestand.

## Ergebnisse



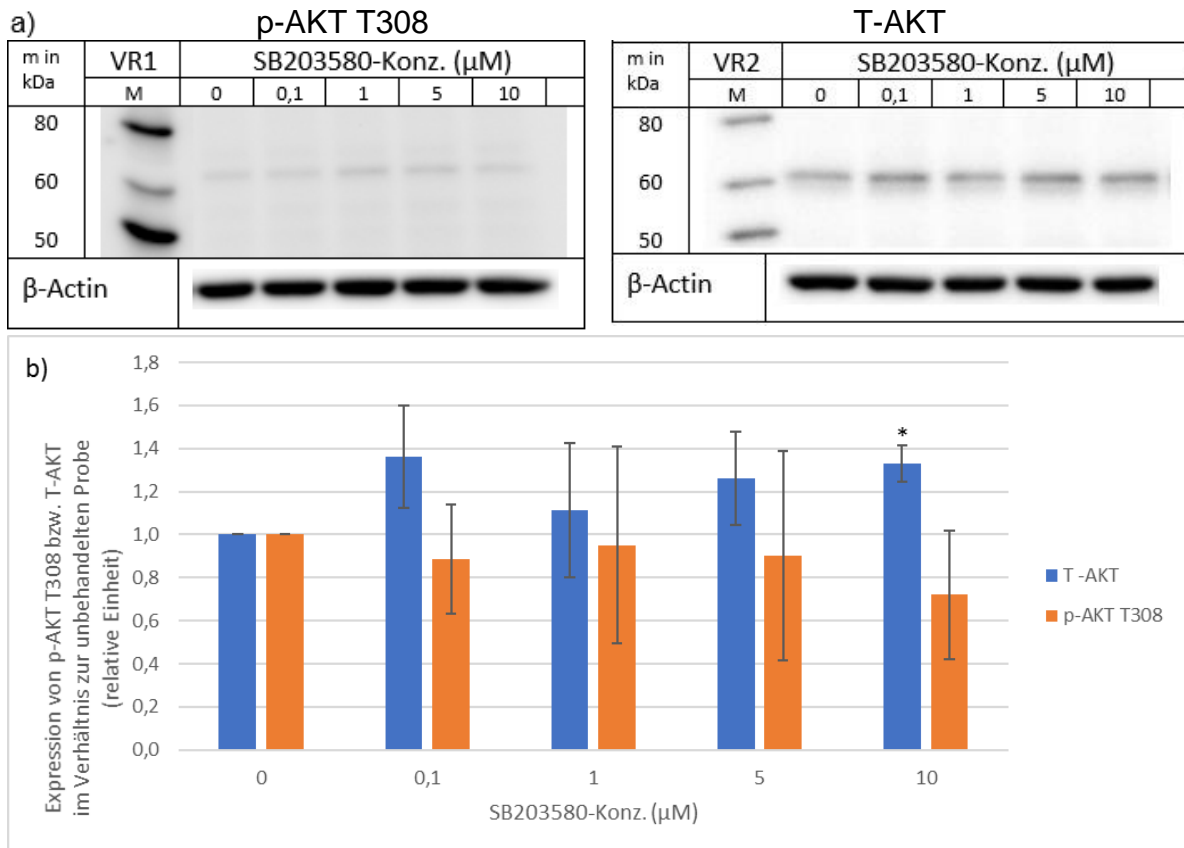
**Abbildung 12 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-AKT und p-AKT S473 in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580**

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-AKT S473 und total-AKT (T-AKT). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die unbehandelten Zellen wurde mit einem t-Test ermittelt und bei einem p-Wert < 0,05 mit einem \* gekennzeichnet.

Die Expression von an der Stelle T308 phosphoryliertem AKT war in den MCF-10A-Zellen dezent erniedrigt, bei Betrachtung der Mittelwerte der behandelten Proben im Vergleich mit dem der unbehandelten (Abbildung 13). Die Werte der drei Wiederholungen im Einzelnen gesehen ergaben unabhängig von der eingesetzten Konzentration des Inhibitors je einen Durchgang mit einer geringeren, je einen mit einer höheren und einen Durchgang mit einer den unbehandelten Zellen sehr ähnlichen Phosphorylierung an T308. So kamen auch die Standardabweichungen zu Stande, die alle in der Grafik optisch die Linie bei  $Y=1,0$  schneiden. Es war die einzige Zelllinie, bei der ein Signal durch Antikörper gegen dieses an jener Stelle phosphorylierte Protein

## Ergebnisse

möglich war. Die Phosphorylierung in MCF-10A-Zellen an p-AKT T308 ist generell gering. Verbunden mit der niedrigen Signifikanz der Ergebnisse, ermittelt durch den t-Test, legt dies nahe, die Abweichung der Mittelwerte der behandelten Proben von den unbehandelten Zellen nicht überzubewerten.



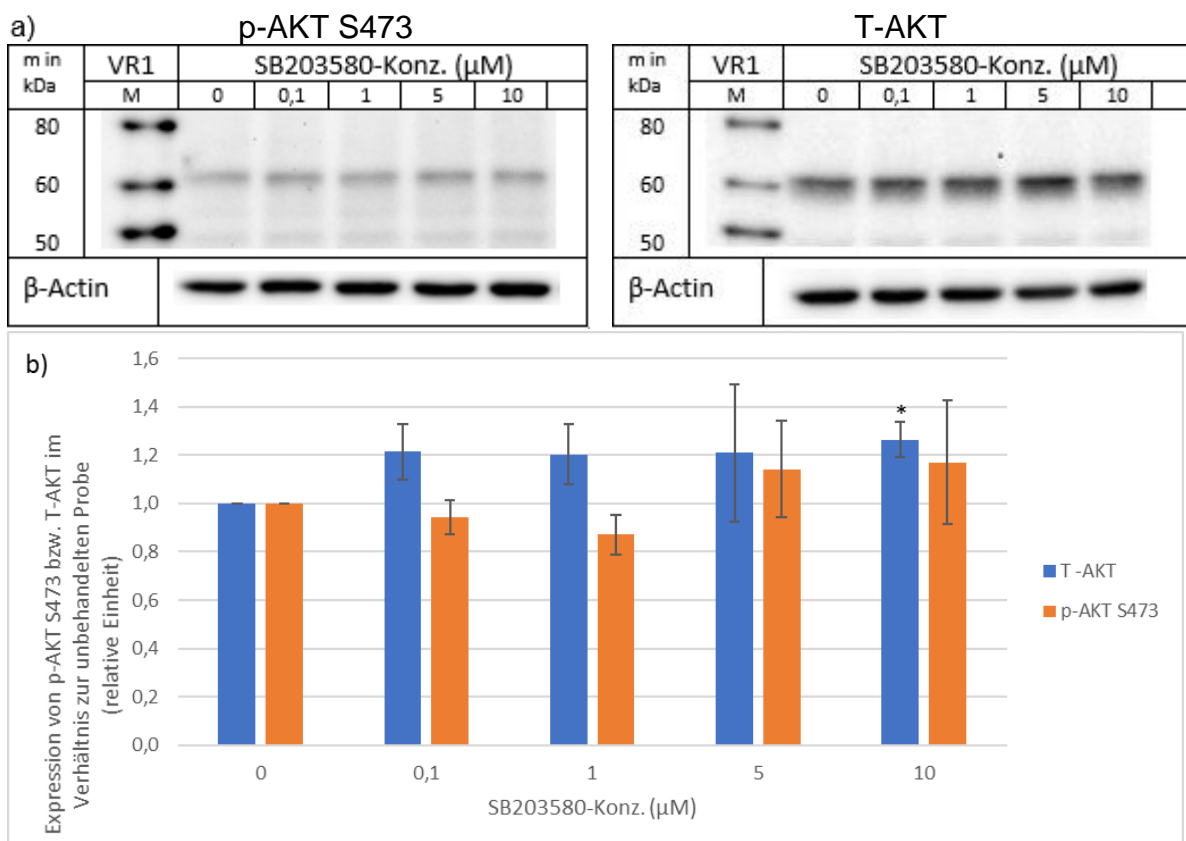
**Abbildung 13 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-AKT und p-AKT T308 in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580**

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-AKT T308 und total-AKT (T-AKT). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die unbehandelten Zellen wurde mit einem t-Test ermittelt und bei einem p-Wert < 0,05 mit einem \* gekennzeichnet.

Die MCF-7-Zellen zeigten unabhängig von der verwendeten Konzentration des SB203580 eine Erhöhung der Expression von T-AKT um ca. 20% (Abbildung 14). Dieses Ergebnis war bei der höchsten Konzentration signifikant und auch bei der Verwendung des Inhibitors in einer Dosierung von 0,1  $\mu\text{M}$  bzw. 1  $\mu\text{M}$  lagen die Werte mit Standardabweichungen von 0,12 bzw. 0,13 relativ nah beieinander. Die

## Ergebnisse

Phosphorylierung von AKT an der Stelle S473 zeigte hingegen keinen eindeutigen Trend. Sie war in den beiden niedrigen Konzentrationen des Inhibitors geringer und in den beiden hohen Konzentrationen höher als in den unbehandelten MCF-7-Zellen. Die Standardabweichungen waren bei Verwendung von 0,1  $\mu\text{M}$  bzw. 1  $\mu\text{M}$  des Inhibitors kleiner als bei Verwendung von 5  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  des Inhibitors. Doch auch die Standardabweichungen bei Verwendung der beiden höheren Konzentrationen des Inhibitors waren nicht groß.



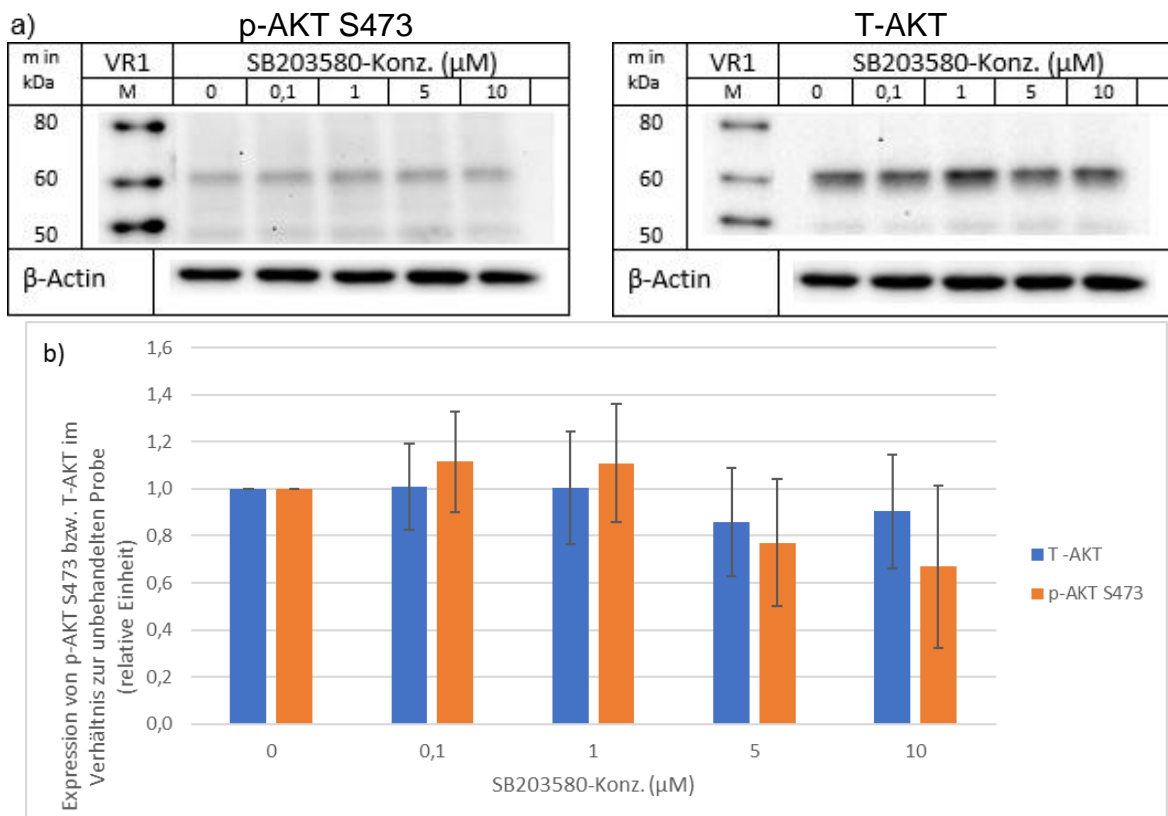
**Abbildung 14 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-AKT und p-AKT S473 in MCF-7-Zellen unter Einfluss von SB203580**

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-AKT S473 und total-AKT (T-AKT). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die unbehandelten Zellen wurde mit einem t-Test ermittelt und bei einem p-Wert < 0,05 mit einem \* gekennzeichnet.

Die MDA-MB-231-Zellen zeigten in den niedrigen Konzentrationen gar keine Änderung der Expression des T-AKT und in den hohen Konzentrationen stellte sich eine leichte

## Ergebnisse

Erniedrigung der Mittelwerte um 10% bzw. 14% dar, jedoch mit dazu verhältnismäßig großen Standardabweichungen (Abbildung 15). Die p-Werte waren zweimal  $> 0,9$  und bei den hohen Konzentrationen mit 0,4 und 0,56 sprechen sie ebenfalls gegen eine signifikante Veränderung des T-AKT durch den Inhibitor SB203580 in MDA-MB-231-Zellen. Die Phosphorylierung an der Stelle S473 erfolgte in einem den MCF-7-Zellen reziproken Bild. Hier war die Expression des p-AKT an Stelle S473 bei niedrigen Konzentrationen des SB203580 erhöht und bei hohen erniedrigt. Die Verwendung von 5 und 10  $\mu\text{M}$  SB203580 ergab in zwei der drei Versuchsdurchgänge einen Trend zu verminderter Phosphorylierung, während ein Versuchsdurchgang kaum Veränderung unter den steigenden Konzentrationen des Inhibitors zeigte. Dies spiegeln die großen Standardabweichungen wider.

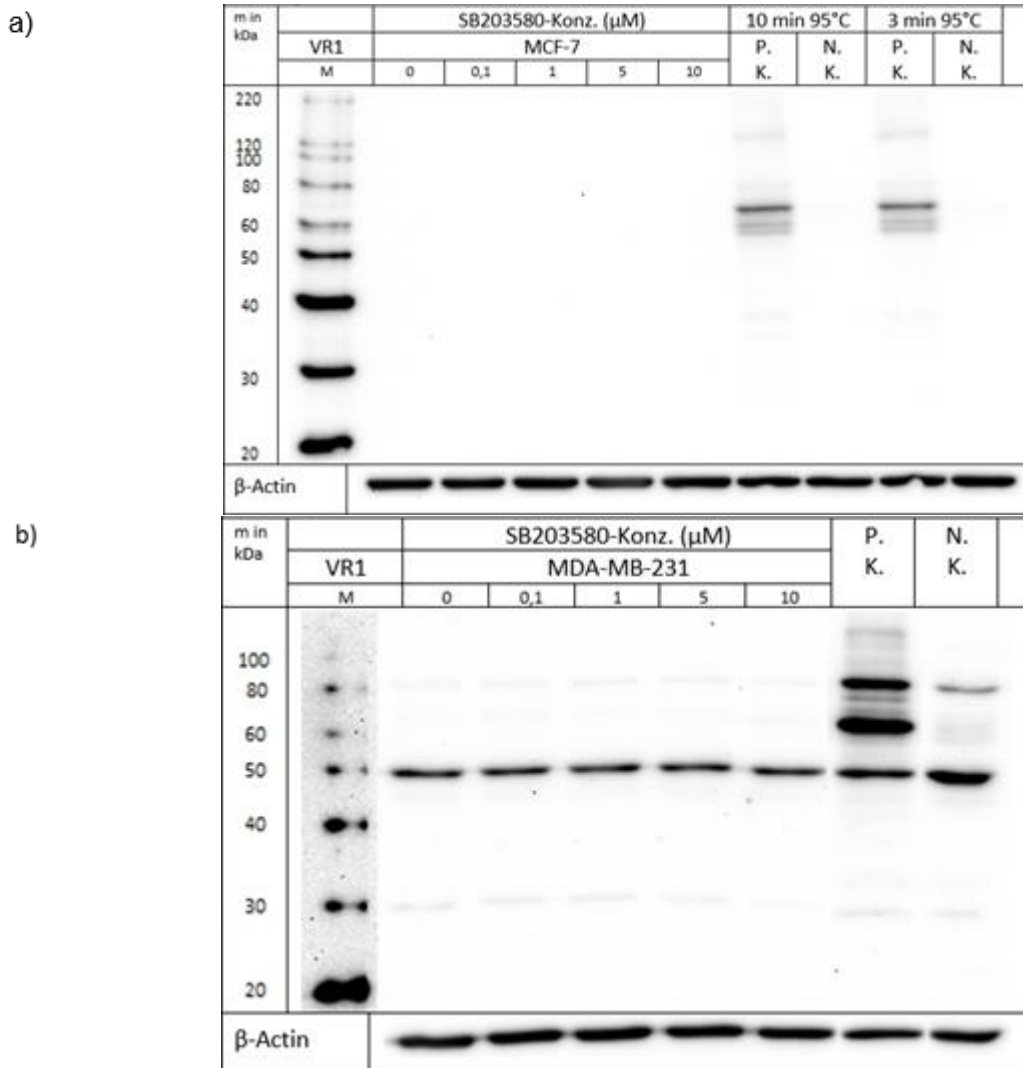


**Abbildung 15 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-AKT und p-AKT S473 in MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von SB203580**

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-AKT S473 und total-AKT (T-AKT). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert.

Die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 zeigten unter den in dieser Arbeit vorliegenden Bedingungen keine nachweisbare Phosphorylierung des Proteins AKT an der Stelle T308. Um methodische Fehler auszuschließen wurden die Versuchsbedingungen variiert. So wurden die Versuche mit diversen Proteinmengen und unterschiedlichen thermischen Vorbehandlungen der Proben (Abbildung 16 Teil -a-), variierenden Blockier- und Ansatzlösungen und zwei verschiedenen Erst-Antikörpern wiederholt (Abbildung 16 und Anhang 9.1.2.5). Der in den MCF-10A-Zellen verwendete Antikörper gegen p-AKT T308 war der Klon „D25E6“. Zeigte dieser in den MCF-10A-Zellen eine schwache Phosphorylierung, ergaben sich bei den malignen Zelllinien keine Hinweise auf Bindung von Phosphat an der Stelle T308 des AKT-Proteins. Der Klon „244F9“ stellte im Western-Blot, wenn pro Geltasche höhere Proteinmengen von 17,86 bzw. 20 µg eingesetzt wurden, eine kräftige Bande bei MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen dar (Abbildung 16 Teil -b-). Für das Molekül AKT war diese jedoch etwas zu niedrig, auf der Höhe von 50 und nicht von 60 kDa. Die Zelllysate zur Überprüfung der Antikörper (Kapitel 3.1.4.3) bestätigten dann die Vermutung, dass es sich dabei um eine unspezifische Bindung des Antikörpers handelte. Denn die kräftige Bande bei 50 kDa zeigte sich in der Positiv- und der Negativkontrolle des Herstellers. Die Positivkontrolle ergab für beide verwendeten Klone kräftige Signale auf der Höhe von 60 kDa und bestätigte damit die ordnungsgemäße Funktion des Versuchsablaufs.

## Ergebnisse



**Abbildung 16** Western-Blot von T-AKT und p-AKT T308 in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von SB203580

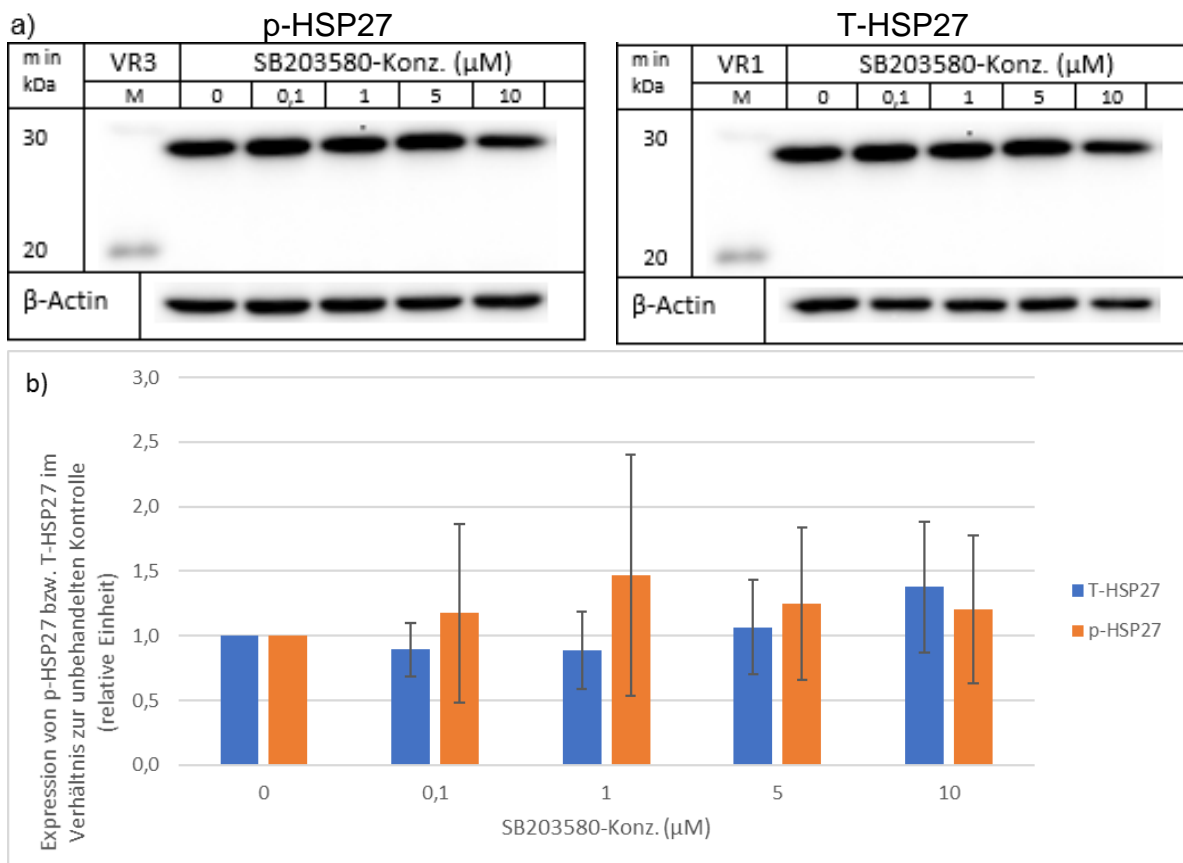
SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (20  $\mu\text{g}$ ) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt ist die Expression von p-AKT T308. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. „P.K.“ = positiv-Kontrolle = Zellextrakte von mit Calyculin-A behandelten Jurkat-Zellen. „N.K.“ = negativ-Kontrolle = Zellextrakte von mit LY294002 behandelten Jurkat-Zellen Im Teil -a- der Abbildung ist ein repräsentatives Western-Blot-Ergebnis dargestellt für die MCF-7-Zellen sowie der Kontrolllysate zur Überprüfung der Funktion des Antikörpers. Der verwendete Antikörper war der Klon „D25E6“. Die Proteinlysate wurden 10 min bei 95°C denaturiert und die Kontrolllysate für 3 min bzw. 10 min. Der Teil -b- der Abbildung zeigt ein repräsentatives Western-Blot-Ergebnis für die MDA-MB-231-Zellen sowie der Kontrolllysate zur Überprüfung der Funktion des Antikörpers. Der verwendete Antikörper war der Klon „244F9“. Die Proteinlysate wurden 10 min bei 95°C denaturiert und die Kontrolllysate für 3 min.

### 4.2.3 HSP27

Das T-HSP27 änderte sich kaum in den MCF-7- und MDA-MB231-Zellen. Erst wenn der Inhibitor mit der höchsten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt wurde, stieg der Mittelwert der Expression um ca. 40%. Die Standardabweichung dieses Ergebnisses war in beiden Zelllinien groß. Dies liegt darin begründet, dass je ein Versuchsdurchgang eine Steigerung der Expression um 80% ergab und je ein Durchgang eine leichte Verringerung um 10 bzw. 20%. Bei den MCF-10A-Zellen wichen die Mittelwerte um höchstens 15% von der unbehandelten Probe ab, bis auf jene Zellen, die mit dem Inhibitor in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  behandelt wurden. Der Mittelwert stieg hier um 24% im Verhältnis zur unbehandelten Probe.

Die Phosphorylierung des HSP27 in den MCF-7-Zellen war unter Einfluss des Inhibitors gesteigert (Abbildung 17). Wurde der Inhibitor in Konzentrationen von 0,1 oder 5 bzw. 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt, stieg die Phosphorylierung um ca. 20%, bei einer eingesetzten Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  stieg sie um 47%. Einer der Versuchswiederholungen zeigte bei allen Konzentrationen eine leichte Verringerung der Expression von p-HSP27. Daher sind die Standardabweichungen groß.

## Ergebnisse

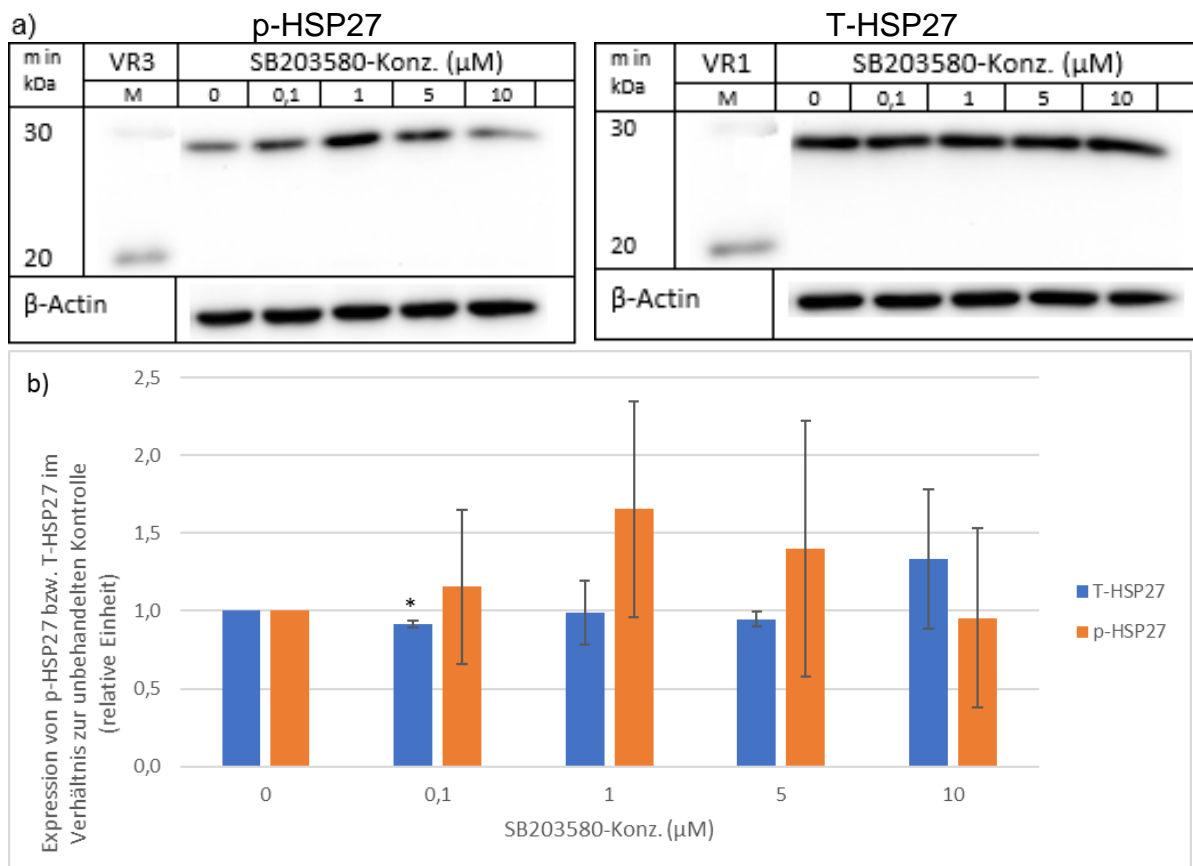


**Abbildung 17** Western-Blot und quantitative Auswertung von T-HSP27 und p-HSP27 in MCF-7-Zellen unter Einfluss von SB203580

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-HSP27 S82 und total-HSP27 (T-HSP27). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert.

Die Expression des p-HSP27 in den MDA-MB-231-Zellen zeigte ein den MCF-7-Zellen ähnliches Bild. Wurde der Inhibitor in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  verwendet, stieg der Mittelwert der Expression um 65% und bei 5  $\mu\text{M}$  um 40% (Abbildung 18). Es gab auch hier große Standardabweichungen durch einen Versuchsdurchgang, der unabhängig von der eingesetzten Konzentration des Inhibitors eine verringerte Phosphorylierung des HSP27 hervorbrachte.

## Ergebnisse

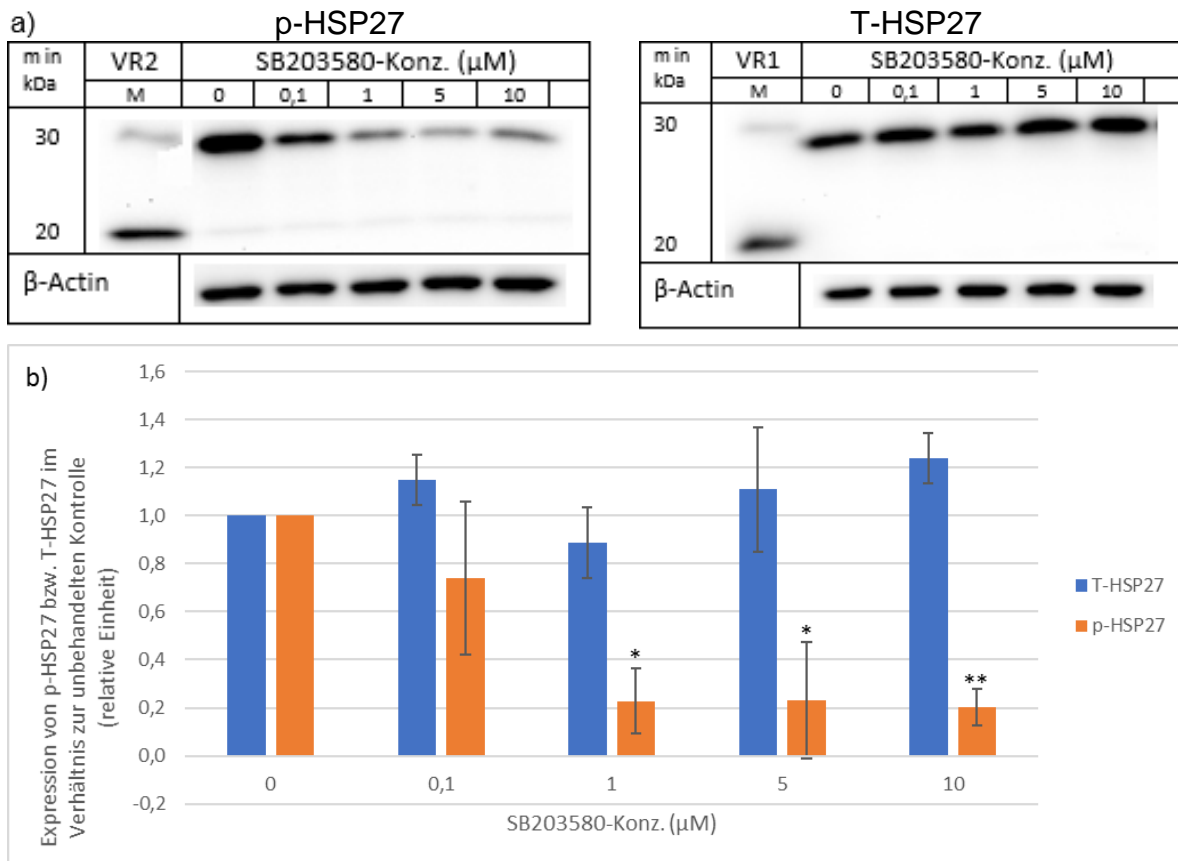


**Abbildung 18** Western-Blot und quantitative Auswertung von T-HSP27 und p-HSP27 in MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von SB203580

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-HSP27 S82 und total-HSP27 (T-HSP27). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die unbehandelten Zellen wurde mit einem t-Test ermittelt und bei einem p-Wert < 0,05 mit einem \* gekennzeichnet.

Die Phosphorylierung der MCF-10A-Zellen ging durch den Inhibitor stark zurück (Abbildung 19). Wurde das SB203580 in der Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  verwendet, war die Phosphorylierung um 26% geringer. Verwendete Konzentrationen von 1 und 5  $\mu\text{M}$  senkten die Phosphorylierung um 77%, in der höchsten Konzentration sank die Expression des p-HSP27 um 80%. Bis auf die Resultate bei Verwendung des SB203580 in der niedrigsten Konzentration waren diese Ergebnisse signifikant und die Ergebnisse der höchsten eingesetzten Konzentration des SB203580 ergaben einen p-Wert < 0,01.

## Ergebnisse



**Abbildung 19 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-HSP27 und p-HSP27 in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580**

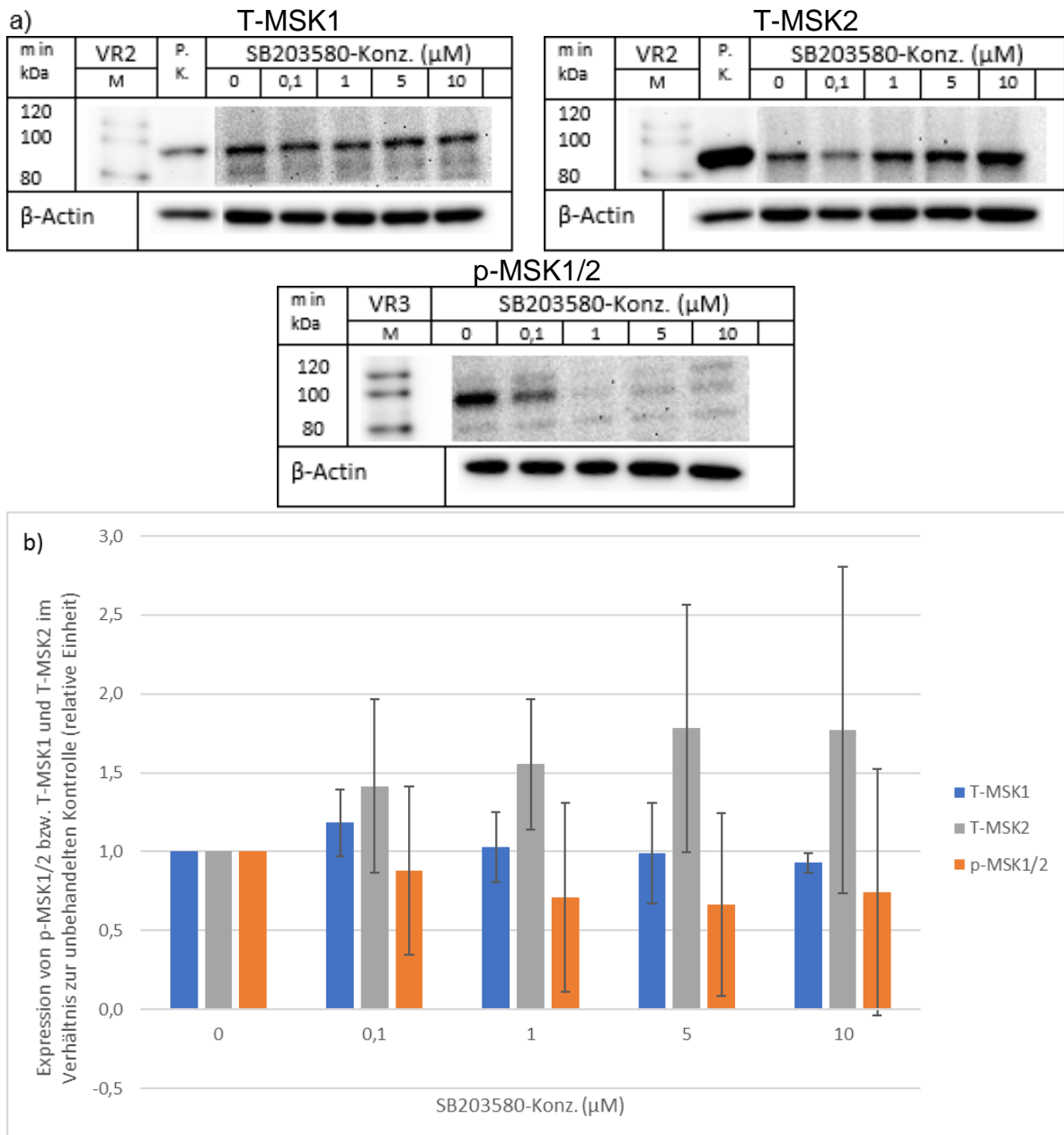
SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-HSP27 S82 und total-HSP27 (T-HSP27). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die unbehandelten Zellen wurde mit einem t-Test ermittelt und bei einem p-Wert < 0,05 mit einem \* bzw. bei einem p-Wert < 0,01 mit zwei \* gekennzeichnet.

### 4.2.4 MSK1/2

Beim Nachweis von T-MSK1 und T-MSK2 in MCF-10A-Zellen gab es Schwierigkeiten ein adäquates Signal im Western-Blot zu generieren. Die Versuchsbedingungen mussten mehrfach angepasst werden, unter anderem durch eine Änderung der Verdünnung des Erstantikörpers von 1:1000 auf 1:500. Bei der Erstellung der Western-Blots zum Nachweis von T-MSK1 und T-MSK2 in MCF-10A-Zellen wurde daher vor der Gelelektrophorese in eine Geltasche eine positiv-Kontrolle pipettiert. Dies waren MDA-MB-231-Zellen, in denen zuvor in drei unabhängigen Versuchen das Gesamtprotein MSK1 und MSK2 in starker Expression nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse der Western-Blots zeigten, dass sich die Expression des Gesamtproteins des MSK1 in den MCF-10A-Zellen um höchstens 7% verändert hat (Abbildung 20). Lediglich die Zellen, die mit dem Inhibitor in einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  behandelt wurden, steigerten die Expression des T-MSK1 um 18%. Bei steigender Konzentration des Inhibitors zeigten die MCF-10A-Zellen einen kontinuierlichen Anstieg der Expression des T-MSK2 bis auf einen Faktor von 1,78 im Verhältnis zu unbehandelten Zellen. Diese Steigerung erfolgte in einem Versuchsdurchgang auf das 1,3-fache, in einem auf das 1,5-fache und im dritten auf das 3-fache im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Durch dieses ungleichmäßig ausgeprägte Ausmaß der Expressionssteigerung ergaben sich große Standardabweichungen.

Die Expression des p-MSK1/2 sank im Mittelwert in den MCF-10A-Zellen um maximal 33% bei einer Konzentration des Inhibitors von 5  $\mu\text{M}$  (Abbildung 20). Bei Betrachtung der einzelnen Versuchsdurchgänge zeigten zwei Wiederholungen eine starke Suppression des p-MSK1/2 um bis zu 90%, während ein Versuchsdurchgang herausstach und eine Steigerung der Expression um bis zu 60% darstellte. Durch das ambivalente Verhalten der unterschiedlichen Versuchswiederholungen wurden Standardabweichungen und p-Werte groß.

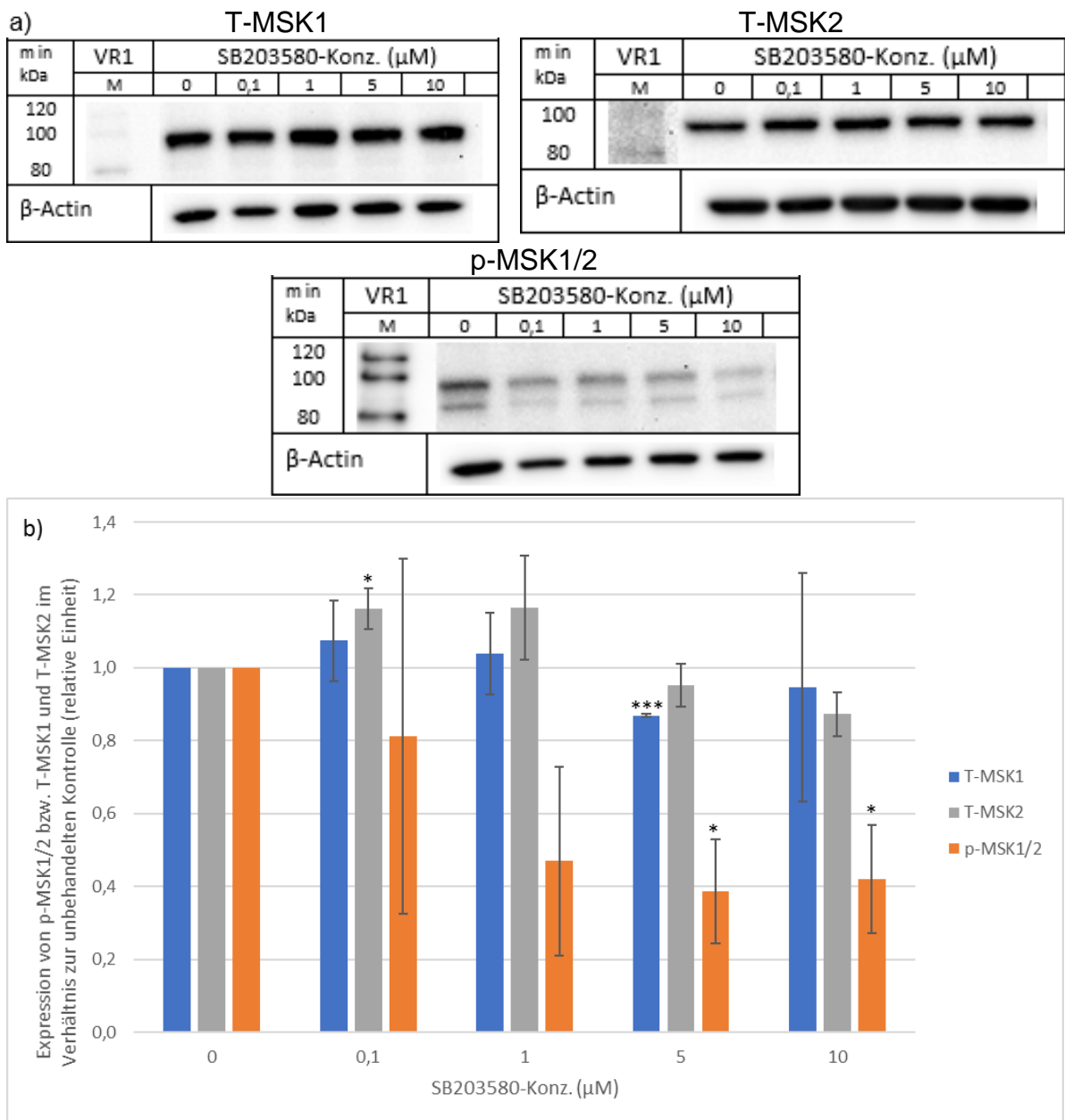
## Ergebnisse



**Abbildung 20 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-MSK1, T-MSK2 und p-MSK1/2 in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580**

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-MSK1/2 S376/ S360, total-MSK1 (T-MSK1) und total-MSK2 (T-MSK2). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. P.K. = positiv-Kontrolle = mit SB203580 behandelte MDA-MB-231-Zellen. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert.

## Ergebnisse



**Abbildung 21 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-MSK1, T-MSK2 und p-MSK1/2 in MCF-7-Zellen unter Einfluss von SB203580**

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10 μg) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-MSK1/2 S376/ S360, total-MSK1 (T-MSK1) und total-MSK2 (T-MSK2). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von β-Aktin normiert. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die unbehandelten Zellen wurde mit einem t-Test ermittelt und bei einem p-Wert < 0,05 mit einem \*, bei einem p-Wert < 0,01 mit zwei \* bzw. bei einem p-Wert < 0,001 mit drei \* gekennzeichnet.

## Ergebnisse

---

T-MSK1 veränderte sich in den MCF-7-Zellen um höchstens 13% (Abbildung 21). Das hochsignifikante Ergebnis bei Konzentrationen des Inhibitors von 5  $\mu\text{M}$  war geprägt durch dreimalige Wiederholung des exakt gleichen Ergebnisses mit dem Faktor 0,87. T-MSK2 veränderte sich kaum stärker mit Abweichungen von 16% zu den unbehandelten MCF-7-Zellen. Sowohl T-MSK1 als auch T-MSK2 zeigten, bei den niedrigen Konzentrationen des Inhibitors, eine leichte Steigerung und bei den hohen Konzentrationen eine leichte Suppression der Expression.

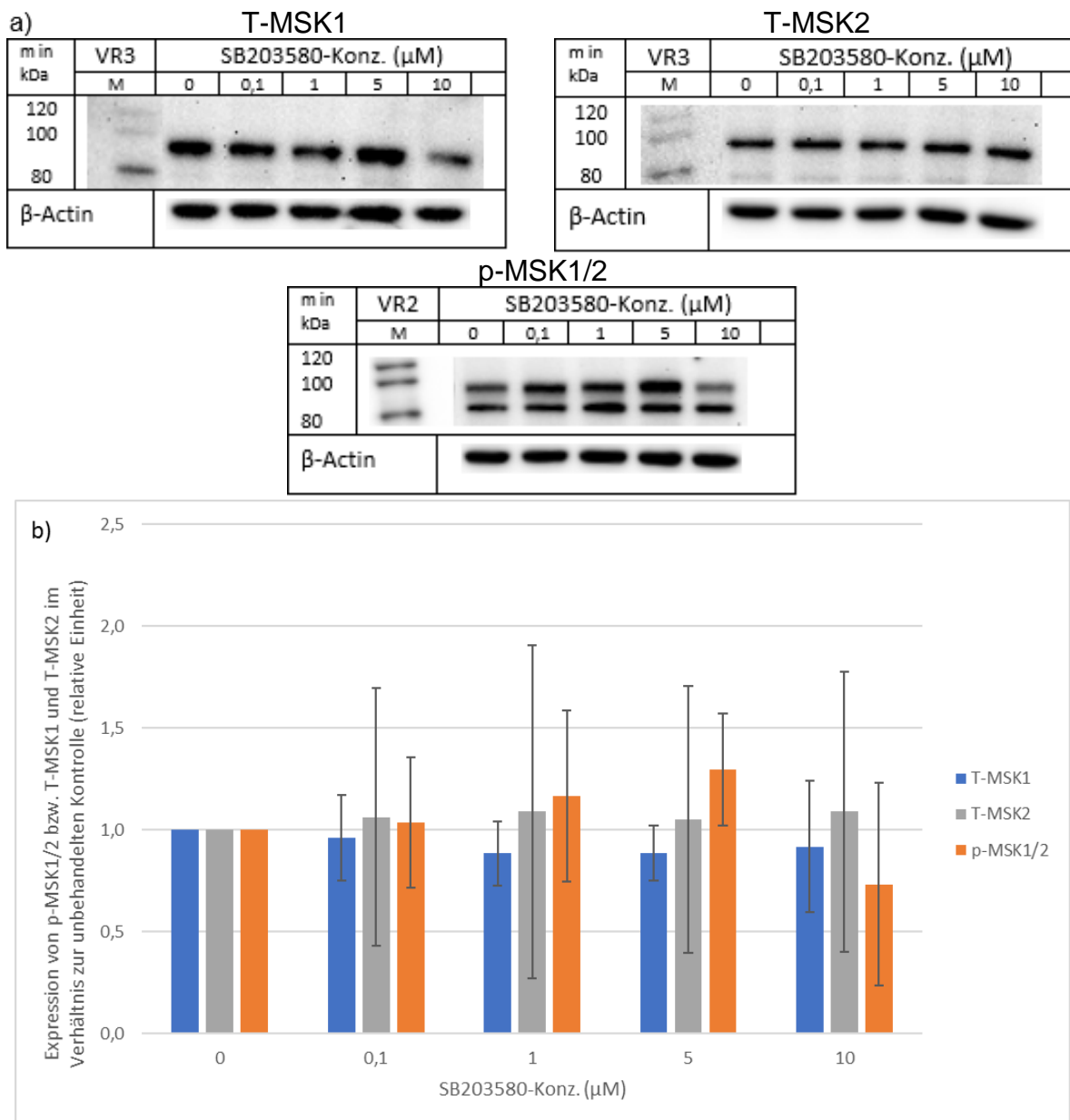
Die Phosphorylierung des MSK1/2 ging mit steigender Konzentration des verwendeten SB203580 immer stärker zurück (Abbildung 21). Die stärkste Suppression des p-MSK1/2 von 61%, im Verhältnis zu den unbehandelten MCF-7-Zellen, ergab sich bei den mit SB203580 in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  behandelten Zellen. Bereits die Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zeigte einen niedrigen p-Wert von 0,07. Bei den Konzentrationen von 5 und 10  $\mu\text{M}$  bewies der p-Wert eindeutig die Signifikanz der Ergebnisse.

Die MDA-MB-231-Zellen zeigten im Mittelwert kaum Veränderungen der Gesamtproteinkonzentrationen (Abbildung 22). Das T-MSK1 zeigte eine leicht verminderte Expression je nach Konzentration des Inhibitors um 4% bis 12% und das T-MSK2 eine gering gesteigerte Expression um höchstens 9% im Vergleich zur unbehandelten Probe. Die p-Werte zu diesen Ergebnissen drängen zur Annahme der Nullhypothese. Dies gilt insbesondere für T-MSK2 mit p-Werten zwischen 0,84 und 0,91. Die p-Werte zu T-MSK1 sind geringer als bei den Ergebnissen zu T-MSK2. Dies liegt vor allem daran, dass die Ergebnisse der drei Versuchswiederholungen näher beieinander lagen und weniger an einer stärkeren Abweichung zur unbehandelten Kontrolle.

Die Phosphorylierung des MSK1/2 war in den MDA-MB-231-Zellen bei den beiden niedrigen Konzentrationen des SB203580 im Mittelwert kaum verändert. Sie war bei Verwendung von 5  $\mu\text{M}$  des SB203580 um 30% erhöht und bei Verwendung von 10  $\mu\text{M}$  um 27% erniedrigt (Abbildung 22). Diese Schwankung der Expression des p-MSK1/2 zeigten sich ebenfalls bei Betrachtung der einzelnen Versuchswiederholungen. So schwankten die Expressionen des p-MSK1/2 der drei Durchgänge der mit SB203580 in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  behandelten Zellen vom 0,3-fachen bis zum

## Ergebnisse

1,2-fachen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. Dieser Umstand begründete die Ausmaße der Standardabweichungen.



**Abbildung 22 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-MSK1, T-MSK2 und p-MSK1/2 in MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von SB203580**

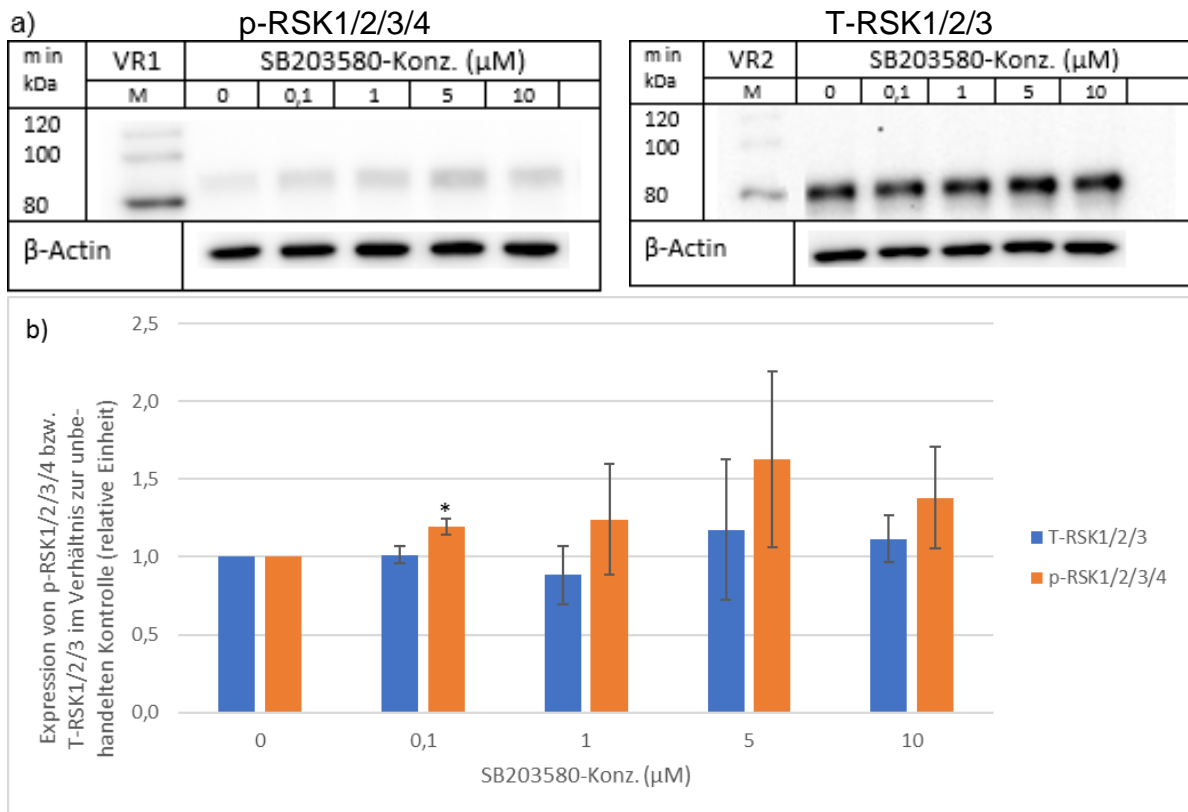
SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-MSK1/2 S376/ S360, total-MSK1 (T-MSK1) und total-MSK2 (T-MSK2). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die unbehandelten Zellen wurde mit einem t-Test ermittelt und bei einem p-Wert < 0,05 mit einem \*, bei einem p-Wert < 0,01 mit zwei \* bzw. bei einem p-Wert < 0,001 mit drei \* gekennzeichnet.

### 4.2.5 RSK1/2/3

Die Expression von T-RSK1/2/3 war in MCF-10A-Zellen unter Einfluss des Inhibitors in einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  unverändert, bei 1  $\mu\text{M}$  um 12% erniedrigt und bei 5  $\mu\text{M}$  um 17% erhöht sowie bei 10  $\mu\text{M}$  um 12% erhöht. Noch geringer waren die Veränderungen der Expression in den MCF-7-Zellen mit im Mittelwert maximal 4% Abweichung des Expressionsniveaus von den unbehandelten Zellen. Die p-Werte lagen zwischen 0,63 und 0,89 und legten damit die Annahme der Nullhypothese mit Wahrscheinlichkeiten von 63% bis 89% nahe. In den MDA-MB-231-Zellen stieg die Expression des Gesamtproteins RSK1/2/3 unabhängig von der Konzentration in allen behandelten Proben im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle an. Die Zellen, die mit dem Inhibitor in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  behandelt wurden, steigerten die Expression am stärksten bis auf den Faktor 1,3 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Durch die großen Standardabweichungen ergaben sich jedoch p-Werte, die keine Signifikanz der Veränderung durch den Inhibitor belegen konnten.

Die MCF-10A-Zellen zeigten unter Einfluss des Inhibitors in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  die ausgeprägteste Steigerung der Expression des p-RSK1/2/3/4 von den drei Zelllinien (Abbildung 23). Der Mittelwert erhöhte sich um 63% verglichen mit dem der unbehandelten Kontrolle. Der Anstieg des Mittelwertes der Phosphorylierung war bei einer verwendeten Konzentration des Inhibitors von 0,1  $\mu\text{M}$  mit 19% am geringsten unter den Proben der behandelten MCF-10A-Zellen. Jedoch war diese Expressionserhöhung des p-RSK1/2/3/4 signifikant. Bei den Zellen, die mit dem Inhibitor in höheren Konzentrationen behandelt wurden, war im Mittelwert die Steigerung der Expression höher. Es ergaben sich jedoch größere Unterschiede zwischen den drei Versuchswiederholungen in der Expressionssteigerung. Dadurch waren die p-Werte größer und die Ergebnisse statistisch weniger signifikant.

## Ergebnisse

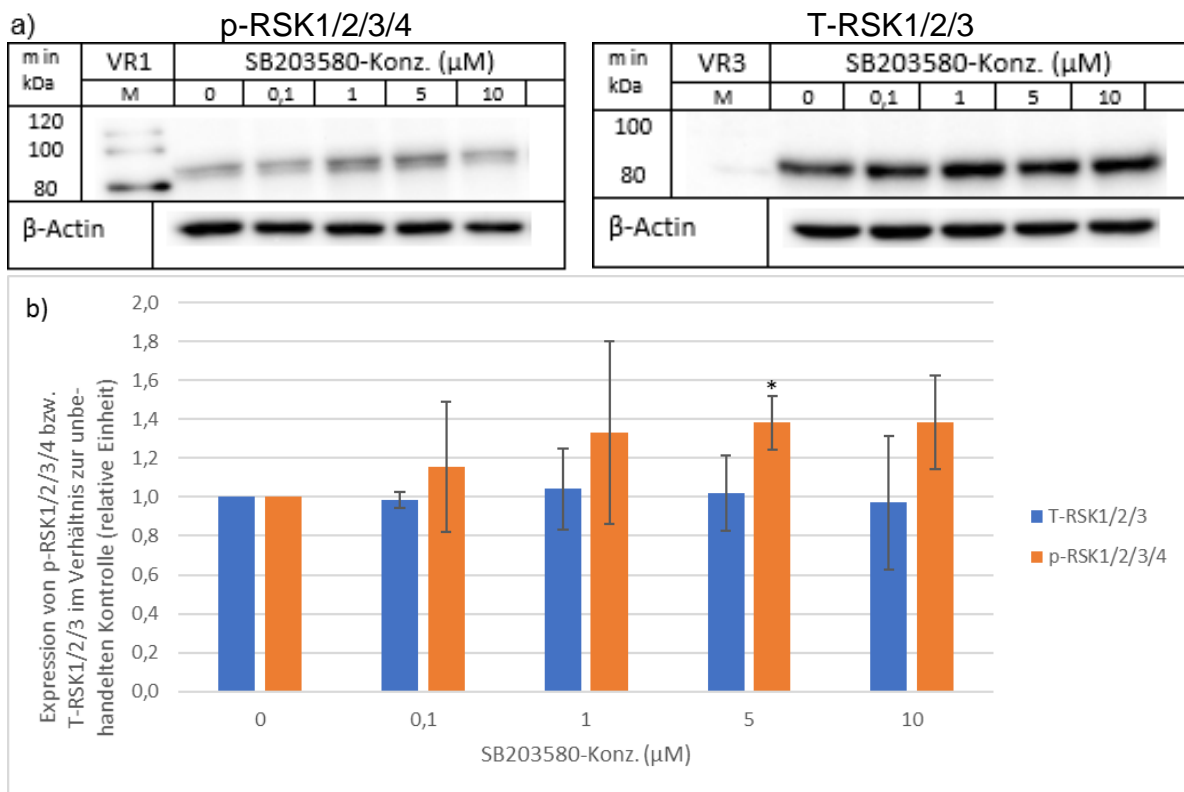


**Abbildung 23** Western-Blot und quantitative Auswertung von T-RSK1/2/3 und p-RSK1/2/3/4 in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-RSK1/2/3/4 (S221/ S227/ S218/ S232) und total-RSK1/2/3 (T-RSK1/2/3). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die unbehandelten Zellen wurde mit einem t-Test ermittelt und bei einem p-Wert < 0,05 mit einem \* gekennzeichnet.

Die MCF-7-Zellen zeigten einen signifikanten Anstieg der Phosphorylierung um 38% bei Behandlung mit SB203580 in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  (Abbildung 24). Ebenso stark stieg die Expression des p-RSK1/2/3/4 bei Verwendung des Inhibitors in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  und mit 33% nur unwesentlich geringer bei Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  SB203580.

## Ergebnisse

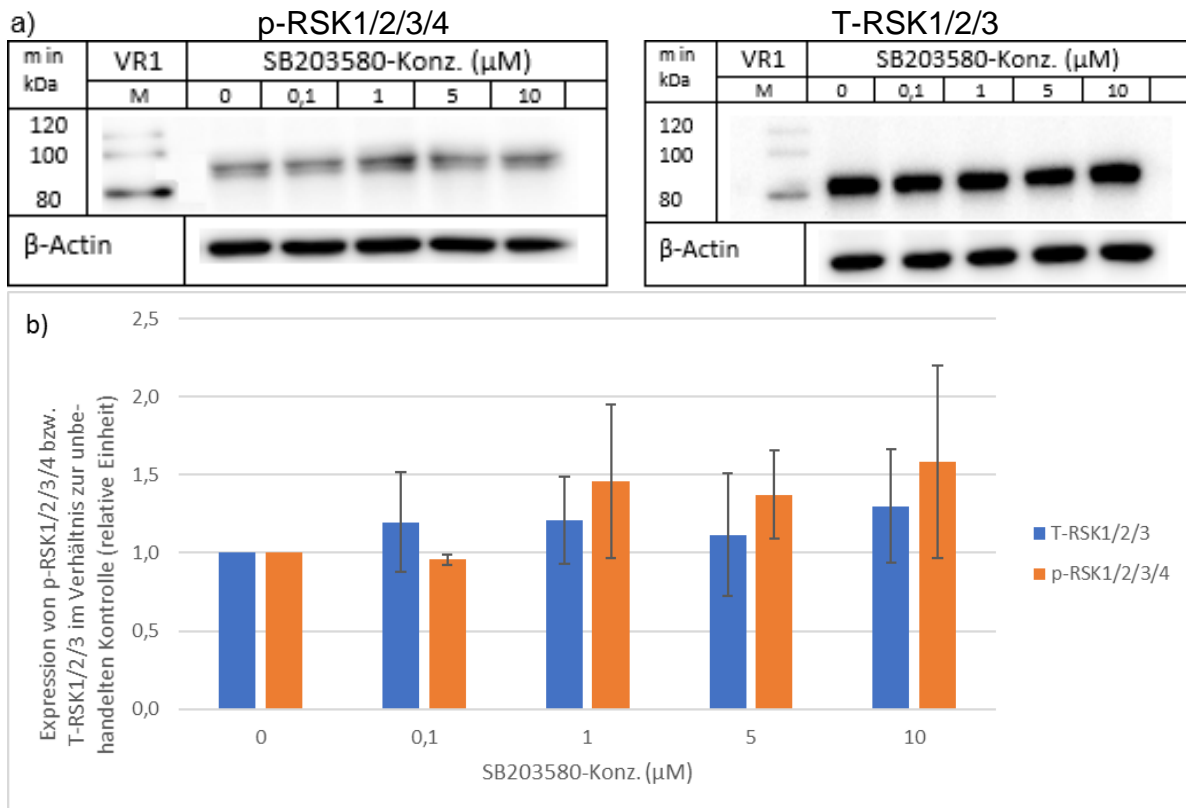


**Abbildung 24 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-RSK1/2/3 und p-RSK1/2/3/4 in MCF-7-Zellen unter Einfluss von SB203580**

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10 µg) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-RSK1/2/3/4 (S221/ S227/ S218/ S232) und total-RSK1/2/3 (T-RSK1/2/3). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von β-Aktin normiert. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die unbehandelten Zellen wurde mit einem t-Test ermittelt und bei einem p-Wert < 0,05 mit einem \* gekennzeichnet.

Die MDA-MB-231-Zelllinie zeigte ebenfalls eine gesteigerte Phosphorylierung des RSK1/2/3/4 unter Einfluss des Inhibitors (Abbildung 25). Ab einer Verwendung des Inhibitors in Konzentrationen von 1 µM stieg die Expression des p-RSK1/2/3/4 an. Der Anstieg auf einen Faktor 1,59 im Verhältnis zu unbehandelten Zellen war nur unwesentlich geringer als bei den MCF-10A-Zellen. Bis auf die Probe, die mit einer Konzentration von 0,1 µM des Inhibitors behandelt wurde, ergaben die unterschiedlich starken Steigerungen der Expression große Standardabweichungen.

## Ergebnisse



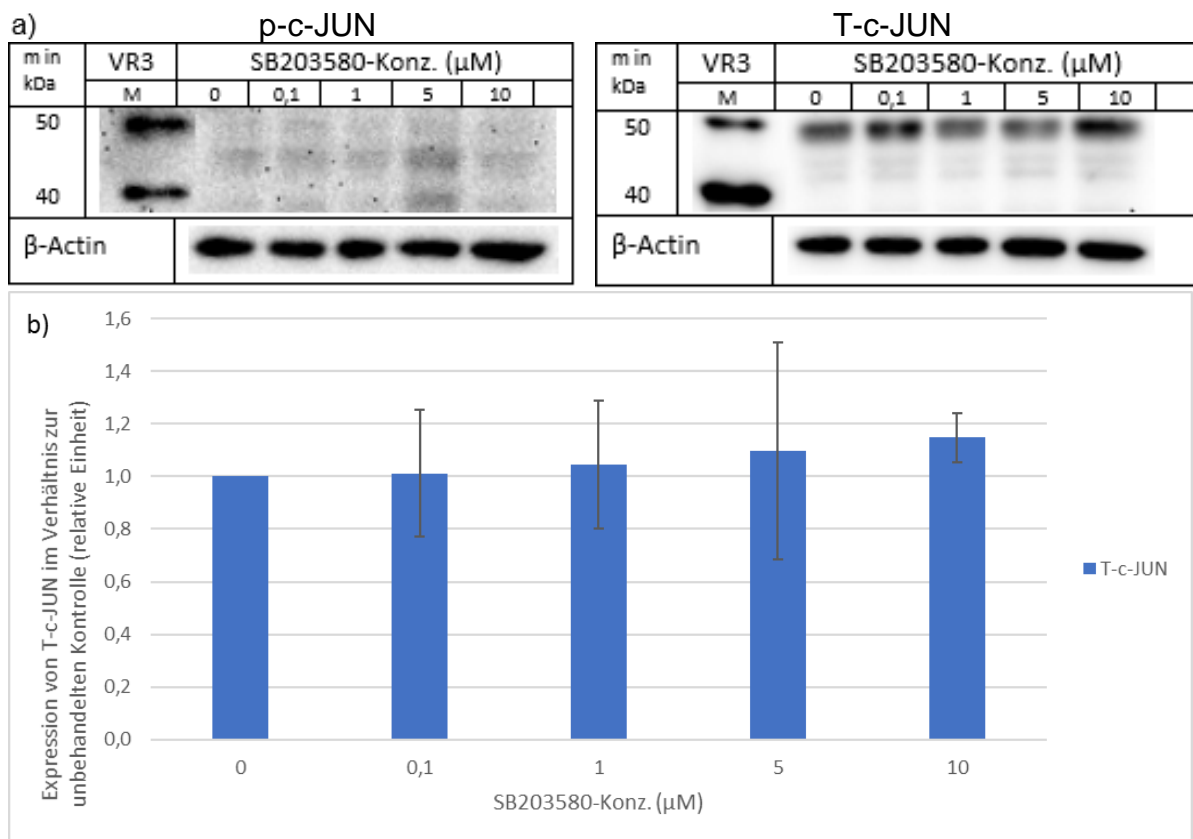
**Abbildung 25 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-RSK1/2/3 und p-RSK1/2/3/4 in MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von SB203580**

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-RSK1/2/3/4 (S221/ S227/ S218/ S232) und total-RSK1/2/3 (T-RSK1/2/3). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die unbehandelten Zellen wurde mit einem t-Test ermittelt und bei einem p-Wert < 0,05 mit einem \* gekennzeichnet.

### 4.2.6 c-JUN

In den MCF-7-Zellen stieg der Mittelwert der Expression von T-c-JUN in den Zellen, die mit 0,1  $\mu\text{M}$  SB203580 behandelt wurden, um den Faktor 1,22 im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen. In den anderen drei Konzentrationen lag diese Steigerung bei 4-5%. Der t-Test ergab p-Werte zwischen 0,78 und 0,88, womit eine signifikante Abweichung mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden konnte. Die MDA-MB-231-Zellen exprimierten bei Behandlung mit 0,1  $\mu\text{M}$  im Mittelwert 23% weniger T-c-JUN und bei 1  $\mu\text{M}$  SB203580 16% weniger als die unbehandelten Zellen. Noch weniger änderte sich das Expressionsverhalten von T-c-JUN in den Zellen, die mit 5 bzw. 10  $\mu\text{M}$  des Inhibitors behandelt wurden. Die MCF-10A-Zellen zeigten in den Zellen, auf die der Inhibitor in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  gegeben wurde, eine im Mittelwert um 15% gesteigerte Expression des T-c-JUN (Abbildung 26). Bei den anderen drei verwendeten Konzentrationen des SB203580 ist dieser Anstieg  $< 10\%$  bei p-Werten zwischen 0,72 und 0,95. Dies schloss eine signifikante Veränderung des T-c-JUN – ähnlich wie bei den mit 1, 5 bzw. 10  $\mu\text{M}$  SB203580 behandelten MCF-7-Zellen – mit hoher Wahrscheinlichkeit aus. In den MCF-10A-Zellen war die Expression von p-c-JUN – unabhängig ob mit oder ohne Behandlung – so gering, dass keine Generierung eines Signals im Western-Blot möglich war.

## Ergebnisse

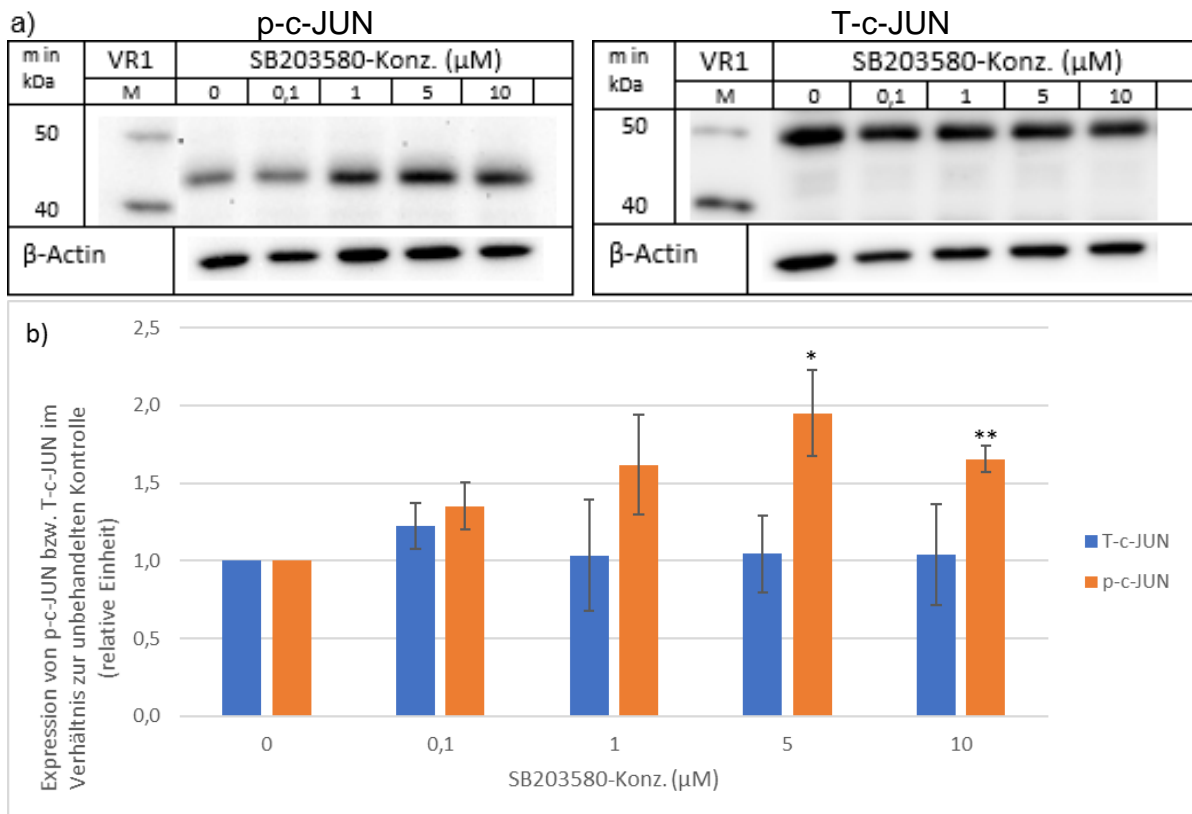


**Abbildung 26** Western-Blot und quantitative Auswertung von T-c-JUN und p-c-JUN in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-c-JUN (S63) und total-c-JUN (T-c-Jun). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert.

Die MCF-7-Zellen exprimierten bei Behandlung mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  des SB203580 95% mehr p-c-JUN als die unbehandelten Zellen (Abbildung 27). Dieses Ergebnis war signifikant. Der Anstieg der Phosphorylierung zeigte sich bereits in den Zellen, die mit dem Inhibitor in den beiden niedrigeren Konzentrationen behandelt wurden. Hier ergab das Ergebnis des t-Test keine Signifikanz, jedoch zeigten die p-Werte dank geringer Standardabweichungen mit Werten von 0,058 und 0,079 eine Tendenz an. Bei Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor in der höchsten verwendeten Konzentration war die Phosphorylierung um 65% gesteigert. Dieses Ergebnis war mit einem p-Wert < 0,01 hochsignifikant.

## Ergebnisse

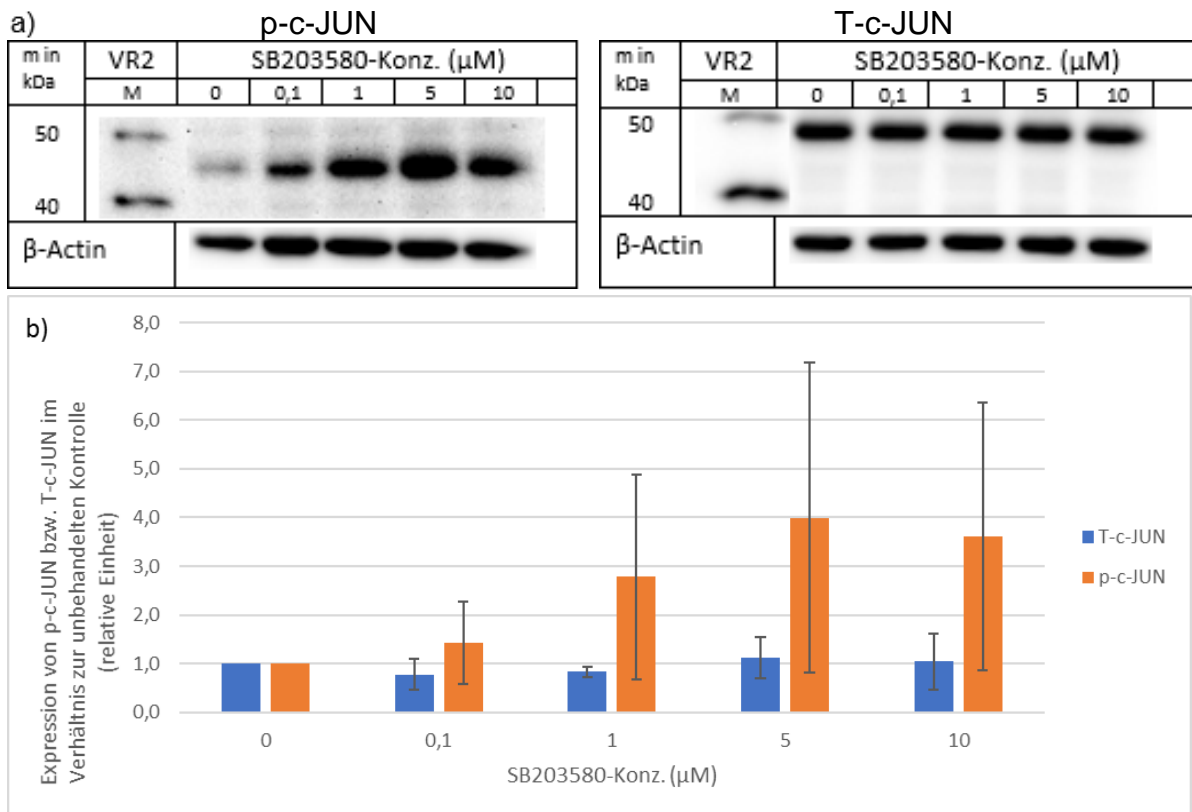


**Abbildung 27 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-c-JUN und p-c-JUN in MCF-7-Zellen unter Einfluss von SB203580**

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-c-JUN (S63) und total-c-JUN (T-c-Jun). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert. Die Signifikanz der Ergebnisse bezogen auf die unbehandelten Zellen wurde mit einem t-Test ermittelt und bei einem p-Wert < 0,05 mit einem \* und bei einem p-Wert < 0,01 mit zwei \* gekennzeichnet.

Die Phosphorylierung in MDA-MB-231-Zellen stieg nach Behandlung mit SB203580 im Mittelwert unabhängig von der Konzentration an (Abbildung 28). Der ausgeprägteste Anstieg zeigte sich bei Verwendung des Inhibitors in der Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  mit einer 4-fach erhöhten Phosphorylierung im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen. Die p-Werte zeigten keine Signifikanz. Bei einem der Durchgänge lag die Steigerung der Phosphorylierung bei Verwendung des Inhibitors in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  nur bei Faktor 1,6 und bei Konzentrationen von 0,1 und 10  $\mu\text{M}$  ergab sich eine Reduktion der Phosphorylierung gegenüber den unbehandelten Zellen. Dieser Durchgang senkte die Mittelwerte und generierte die großen Standardabweichungen.

## Ergebnisse



**Abbildung 28** Western-Blot und quantitative Auswertung von T-c-JUN und p-c-JUN in MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von SB203580

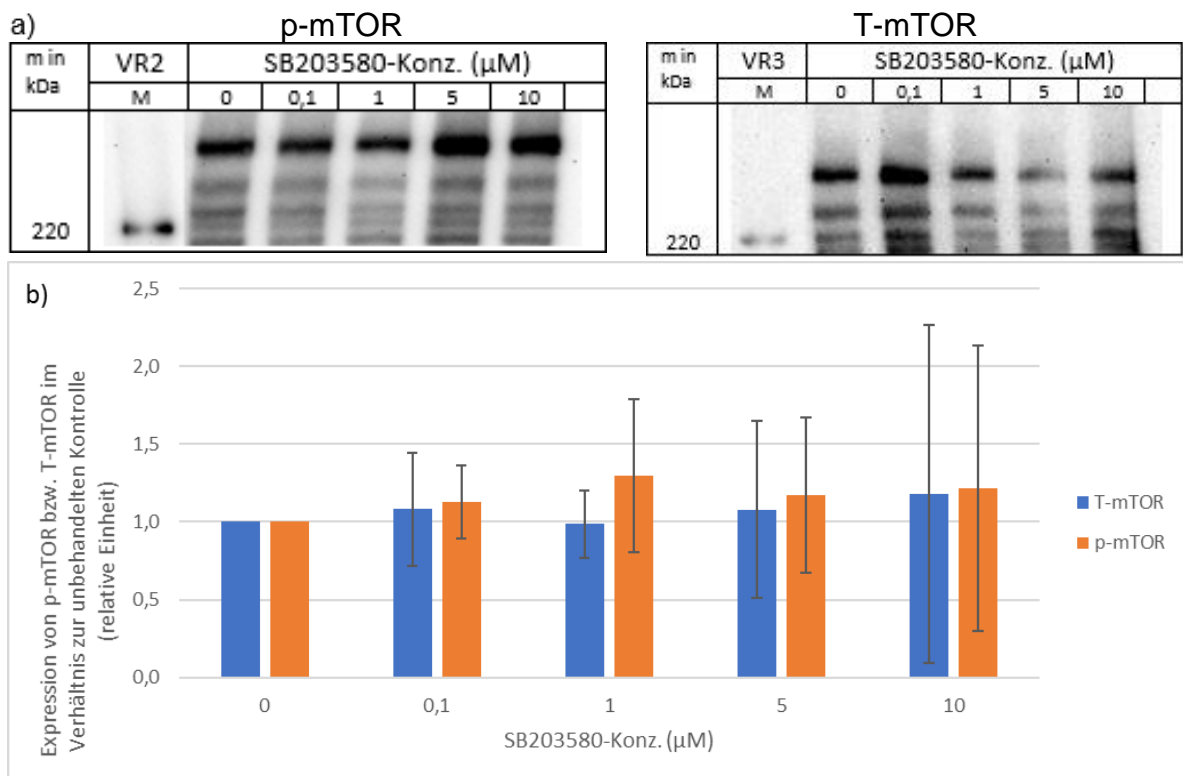
SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-c-JUN (S63) und total-c-JUN (T-c-Jun). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression von  $\beta$ -Aktin normiert.

### 4.2.7 mTOR

Das Gesamtprotein mTOR in MCF-10A-Zellen schwankte unter Einfluss des Inhibitors um maximal 8%, in einer Probe um 18%. Die p-Werte von 0,74 bis 0,92 schlossen eine signifikante Veränderung nahezu aus. Vergleichbar verhielten sich die MCF-7-Zellen. Bei der niedrigsten verwendeten Konzentration stieg der Mittelwert der Expression des T-mTOR um 24%, bei den in höheren Konzentrationen behandelten Zellen änderte sich die Expression um höchstens 9%. Die p-Werte waren ebenfalls hoch mit Werten von 0,6 bis 0,98 und verwiesen damit auf die Annahme der Nullhypothese. Die MDA-MB-231-Zelllinie zeigte einen Anstieg der Expression von T-mTOR um das 1,84-fache bei Aufbringen von 1  $\mu$ M SB203580 auf die Zellen verglichen mit den unbehandelten Zellen. Dieses Ergebnis wurde geprägt durch eine Versuchswiederholung, bei der ein Anstieg um das 2,7-fache zu beobachten war. Die anderen beiden Wiederholungen zeigten moderatere Steigerungen der Expression von T-mTOR. In den Zellen, die mit den anderen drei Konzentrationen des Inhibitors behandelt wurden, war der Anstieg im Mittelwert wesentlich kleiner mit maximal 22%.

Die Phosphorylierung des mTOR in MCF-10A-Zellen steigerte sich in allen verwendeten Konzentrationen im Mittelwert um höchstens Faktor 1,3 (Abbildung 29). Die Standardabweichungen für die Ergebnisse waren groß. Besonders fiel dies für die Erhöhung des Mittelwertes um 22% bei den mit 10  $\mu$ M SB203580 behandelten Zellen auf. Während ein Durchgang eine Reduktion der Phosphorylierung um 70% zeigte, ergab ein anderer eine Steigerung um 220%. Dadurch kamen die Ausmaße der Standardabweichung zustande.

## Ergebnisse



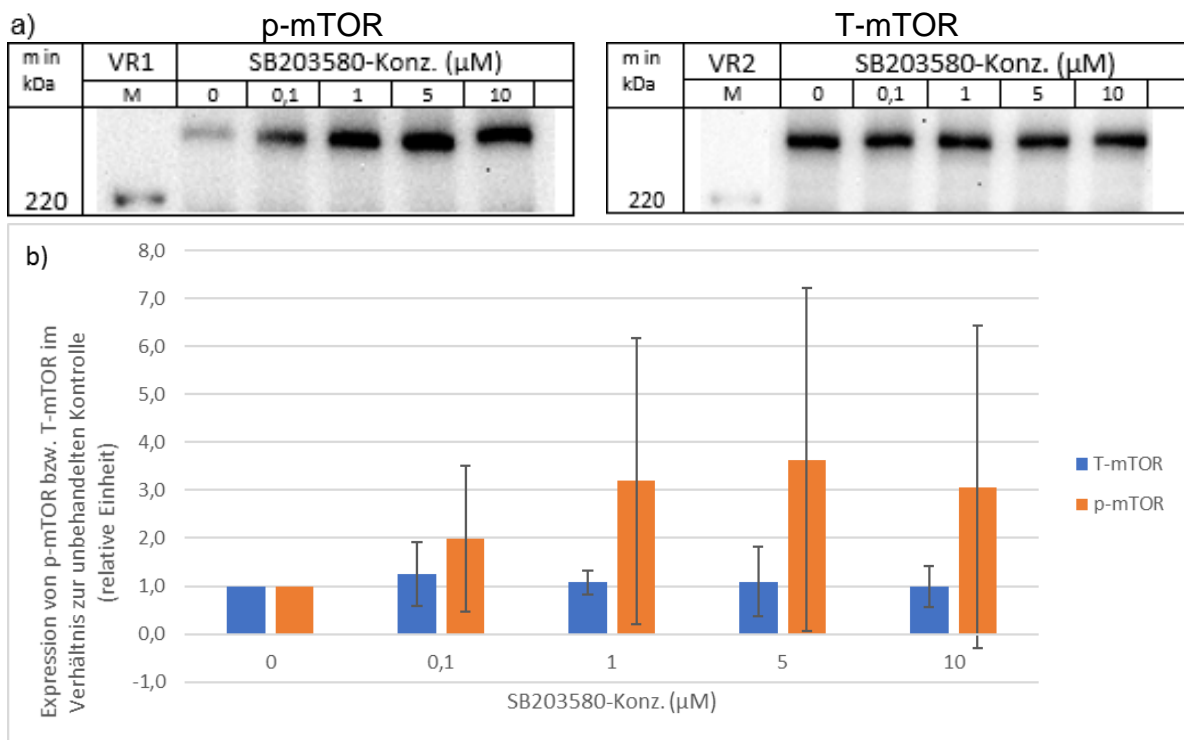
**Abbildung 29** Western-Blot und quantitative Auswertung von T-mTOR und p-mTOR in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 7,5%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-mTOR (S2448) und total-mTOR (T-mTOR). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

In den MCF-7-Zellen zeigte sich eine gesteigerte Phosphorylierung von mTOR unter Einfluss des SB203580 (Abbildung 30). Dieser Effekt war am ausgeprägtesten bei einer Konzentration des Inhibitors von 5  $\mu\text{M}$  mit einer Erhöhung des p-mTOR im Mittelwert um das 3,63-fache. Bei Konzentrationen von 1 und 10  $\mu\text{M}$  war die Steigerung größer Faktor 3. Bei Verwendung des Inhibitors in einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  lag sie bei Faktor 2 im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Bei Betrachtung der Versuchsdurchgänge im Einzelnen fällt auf, dass bei zwei Durchgängen lediglich Steigerungen bis zu 70% auftraten, während es im dritten Durchgang bis zu einer 7,8-fachen Steigerung der Expression von p-mTOR kam. So kam es zu den großen Standardabweichungen. Alle drei Durchgänge haben gemeinsam, dass die Phosphorylierung mit der Konzentration des verwendeten SB203580 anstieg, alle Versuchswiederholungen erreichten ihren Höchstwert bei

## Ergebnisse

einer Konzentration des SB203580 von 5  $\mu\text{M}$  und bei der höchsten Konzentration des Inhibitors war der festgestellte Effekt wieder etwas geringer.

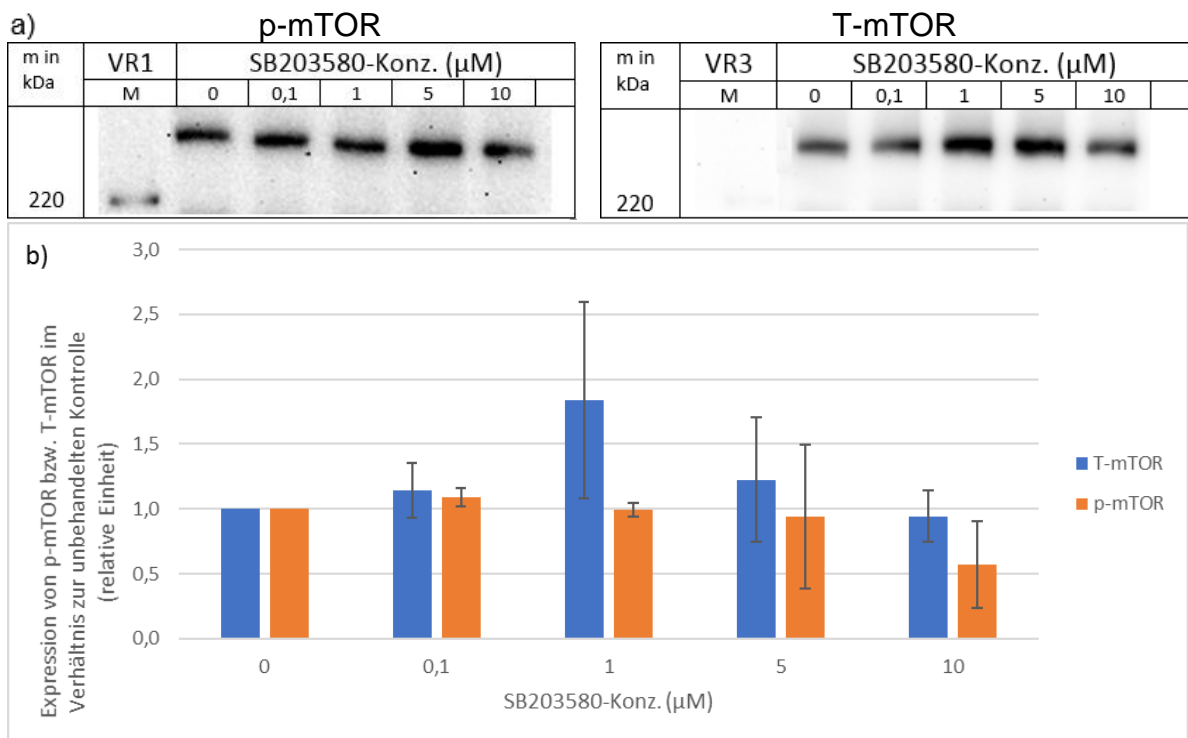


**Abbildung 30 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-mTOR und p-mTOR in MCF-7-Zellen unter Einfluss von SB203580**

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 7,5%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-mTOR (S2448) und total-mTOR (T-mTOR). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Die MDA-MB-231-Zellen zeigten sich bei Behandlung mit den niedrigen Konzentrationen des SB203580 bis 5  $\mu\text{M}$  kaum beeinflusst in der Phosphorylierung von mTOR (Abbildung 31). Es kam zu Abweichungen von im Mittelwert höchstens 9% im Vergleich zu unbehandelten MDA-MB-231-Zellen. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  war die Expression des p-mTOR um 43% supprimiert.

## Ergebnisse



**Abbildung 31 Western-Blot und quantitative Auswertung von T-mTOR und p-mTOR in MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von SB203580**

SB203580 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für 2 h auf die Zellen gegeben, die extrahierten Proteine (10  $\mu\text{g}$ ) in einem 7,5%-igen Polyacrylamidgel separiert und die analysierten Moleküle im Western-Blot abgebildet. Dargestellt sind die Expression von p-mTOR (S2448) und total-mTOR (T-mTOR). Im Teil -a- der Abbildung sind repräsentative Western-Blot-Ergebnisse dargestellt. „M“ = Marker. „VR“ = Versuchsreihe. „m in kDa“ = atomare Masse des Markers in kDa. Der Teil -b- der Abbildung zeigt die Mittelwerte der Expressionswerte sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.



### **Abbildung 32 Signalkaskade der MAP-Kinasen mit Ergebnissen**

Dargestellt sind alle Moleküle, die in dieser Arbeit Erwähnung finden. Die Grafik erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Legende:

⊣ = Symbol für „Molekül wird gehemmt in seiner Aktivität“

→ = Symbol für „Molekül wird gesteigert in seiner Aktivität“

■ (gelb) = Molekül vorwiegend an der Zellmembran lokalisiert

■ (schwarz) = Molekül im Zytosol

■ (grün) = MAPKKK

■ (lila) = MAPKK

■ (orange) = MAPK

■ (hellblau) = Transkriptionsfaktor im Nukleus

 = p38 unter Einfluss von SB203580

↑ (rot) = erhöhte Aktivität unter Einfluss von SB203580 in dieser Arbeit nachgewiesen

↓ (blau) = erniedrigte Aktivität unter Einfluss von SB203580 in dieser Arbeit nachgewiesen

### 5 Diskussion

#### 5.1 ERK1/2 und c-JUN

Im Jahr 1995 veröffentlichten Cuenda et al., dass sie bei hitzeschock behandelten HeLa-Zellen, die sich vom Zervix-Karzinom ableiten (302) und osmotisch gestressten PC12-Zellen keine Beeinflussung der Aktivität von ERK2 und einen höchstens 18%-igen Aktivitätsverlust von JNK durch SB203580 in einer Konzentration von 100  $\mu$ M feststellen konnten. Da Cuenda et al. bereits bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M SB203580 einen 95%-igen Aktivitätsrückgang von p38 darlegten, folgerte man, dass dieser Inhibitor sehr spezifisch ist (15). Hazzalin et al. kamen zwei Jahre später zu einer ähnlichen Einschätzung in C3H-10T1/2-Zellen und urteilten, dass SB203580 sich nicht auf ERK oder JNK auswirkt, aber zu einer leichten Erhöhung der Aktivität der stromaufwärts gelegenen Kinase MKK6 führt, dem wichtigsten p38-Aktivator in diesen Zellen (303).

Diese Erkenntnisse sind auf die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien MCF-10A, MCF-7 und MDA-MB-231 nicht übertragbar. Alle drei Zelllinien zeigten unter Einfluss des Inhibitors eine Erhöhte Aktivität von ERK1/2. Diese signifikante Erhöhung lag bei den MCF-7-Zellen bei einer Steigerung bis zum 5,3-fachen und bei den MDA-MB-231 bei dem 4,6-fachen. Die MCF-10A-Zellen zeigten eine Steigerung auf das 2,2-fache im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Auch der Einfluss des Inhibitors auf c-JUN steht im Widerspruch zu den Erkenntnissen von Cuenda et al. und Hazzalin et al. c-JUN als wichtiges Substrat von JNK wird von diesem an der Stelle S63 phosphoryliert (141). Diese Phosphorylierung steigerte sich bei den in dieser Arbeit untersuchten MCF-7-Zellen signifikant um 95%. In den MDA-MB-231-Zellen konnte ebenfalls eine gesteigerte Expression des p-c-JUN beobachtet werden.

Zu vergleichbaren Ergebnissen wie denen dieser Arbeit kamen Henklova et al. mit Primärkulturen humaner Hepatozyten. Dort aktivierte SB203580 ERK, JNK und c-JUN. Des Weiteren zeigte Henklova et al., dass ERK, aber nicht JNK, in mehreren Tumorzelllinien durch SB203580 aktiviert wurde, wie HepG2-, HL-60-, Saos-2- und HaCaT-Zelllinien (304). Die Differenzierung zwischen malignen und nicht-malignen Zelllinien, die Henklova et al. vornehmen, kann man auf die Ergebnisse dieser Arbeit

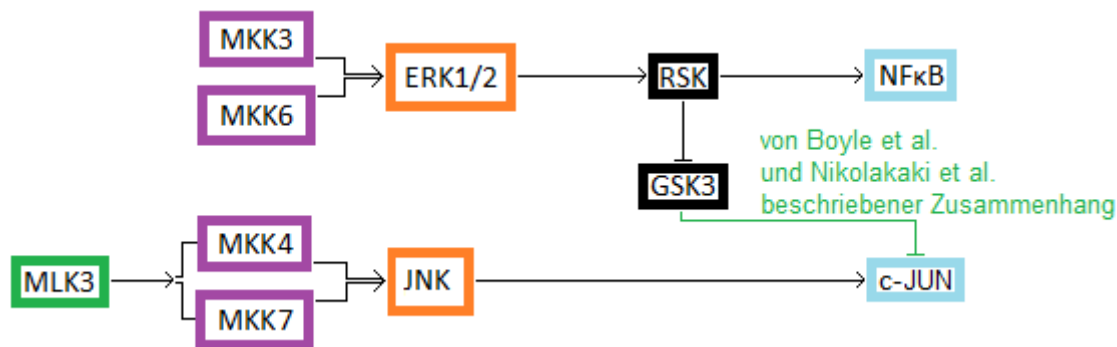
hingegen nicht übertragen, denn die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine Beeinflussung von c-JUN in den malignen Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7. Die Änderung der Phosphorylierung der nicht-malignen MCF-10A-Zellen konnte hingegen nicht gezeigt werden, da die Expression von p-c-JUN bei diesen Zellen unabhängig von deren Behandlung zu gering war, um sie im Western-Blot darzustellen.

Die Steigerung der Phosphorylierung anderer MAPK legten auch Birkenkamp et al. im Jahr 2000 dar. Sie arbeiteten mit TF-1-Zellen (305). Diese Zellen entstammen einer akuten Erythroleukämie – einer Form der akute myeloische Leukämie (306, 307). In den mit Okadasäure gestressten TF-1-Zellen wurde ein Anstieg der Transkription von NFκB durch SB203580 ab 5 μM bis 10 μM festgestellt unter Assoziation einer verstärkten Phosphorylierung von ERK1/2 und JNK. Daraus wurde geschlossen, dass SB203580 in höheren Konzentrationen ERK1/2 aktiviert, wodurch dann sekundär mehr NFκB transkribiert wird (305). Eine gesteigerte Phosphorylierung von ERK1/2 beobachtete man also bei den gleichen Konzentrationen wie in dieser Arbeit.

Muniyappa et al. stellten in A549-Zellen, die aus einem humanen Adenokarzinom des alveolaren Basalepithels entstammen (308, 309), ebenfalls fest, dass die Zellen unter Einfluss von SB203580 eine gesteigerte Phosphorylierung von c-JUN zeigen. Dies wurde gezeigt bei Behandlung der Zellen mit SB203580 in einer Konzentration von 2 μM und 5 μM für eine Stunde. Wie in der vorliegenden Arbeit beobachtete man diesen Effekt bei unveränderter Gesamtproteinexpression des c-JUN im Western-Blot. Mit Hilfe von RNA-Interferenz kam man zu den Erkenntnissen, dass dies über eine gesteigerte Aktivierung von JNK erfolgt. Weiterhin wurde herausgefunden, dass die MAPKKK MLK3 unter Einfluss von SB203580 stärker phosphoryliert wird und diese über die MKK4/7 dann JNK aktivieren (310).

Auch unabhängig von der MAPK JNK wären Mechanismen der Aktivierung von c-JUN in Verknüpfung zu anderen Erkenntnissen dieser Arbeit realistisch. Boyle et al. und Nikolakaki et al. fanden heraus, dass die GSK-3 c-JUN hemmt (174, 311, 312). Wenn dieser Zusammenhang für die verwendeten Brustkrebszelllinien zuträfe, wäre eine Aktivierung von c-JUN durch die gesteigerte Aktivität von ERK und RSK folgerichtig. ERK aktiviert RSK welches wiederum die GSK-3 hemmt (165, 166, 174). Wenn GSK-3 eine Inhibition des c-JUN verursachen würde, dann wäre die Folge der zweifach

hintereinandergeschalteten Inhibition eine Weitergabe der verstärkten Aktivität von RSK an c-Jun.



**Abbildung 33** Ausschnitt aus der MAPK-Signalkaskade zu Kapitel 5.1

Legende:  $\dashv$  = Symbol für „Molekül wird gehemmt in seiner Aktivität“;  $\rightarrow$  = Symbol für „Molekül wird gesteigert in seiner Aktivität“;  $\blacksquare$  = Molekül im Zytosol;  $\blacksquare$  = MAPKKK;  $\square$  = MAPKK;  $\square$  = MAPK;  $\square$  = Transkriptionsfaktor im Nukleus

## 5.2 RSK

Zhang et al. fanden bei ihrer Forschung zur Ätiologie von Hautkrebs heraus, dass UVA-Strahlung eine Phosphorylierung an S381 an RSKs auslösen kann. Dabei schlossen sie eine Beteiligung von p38 an den Phosphorylierungsprozessen von den RSKs aus (313). Czaplinska et al. haben wiederum in den Mammakarzinom-Zelllinien SKBR3- und MDA-MB-361 sowie der benignen Zelllinie HB2 eine indirekte Aktivierung von RSK2 durch p38 festgestellt, die zu einer verstärkten Zellmigration führt. Die Ergebnisse beruhen auf Behandlung der Zellen mit SB202190 in einer Konzentration von 10  $\mu$ M über 24 h. Es kam daraufhin durch den Inhibitor zu einer verminderten Phosphorylierung von RSK2, die im Western-Blot dargestellt werden konnte (314).

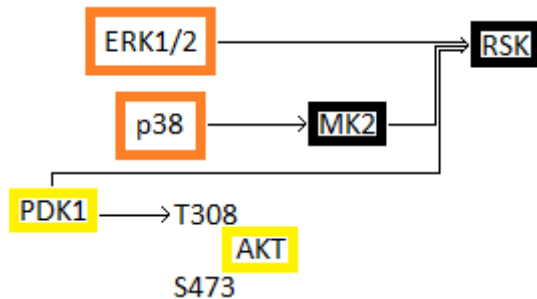
Sowohl die Veröffentlichung von Zhang et al. als auch von Czaplinska et al. widersprechen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die durch Inhibition von p38 eine gesteigerte Aktivität der RSK1/2/3/4 nachwies. Bei der zuvor beschriebenen eindeutigen Aktivierung von ERK1/2 (Kapitel 5.1) ist die gesteigerte Phosphorylierung von RSK1/2/3/4 naheliegend, da dieses ein Substrat von ERK1/2 ist (165, 166). Wenn bei der Behandlung SB203580 in einer Konzentration von 5  $\mu$ M angewendet wurde, kam es in den MCF-7-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung um 38%. Die MCF-10A-Zellen reagierten ähnlich, hier stieg die Phosphorylierung um 63%

und in den MDA-MB-231-Zellen erhöhte sich der Anteil von p-RSK1/2/3/4 um 59% bei Behandlung der Zellen mit SB203580 in einer Konzentration von 10  $\mu$ M verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

Es fällt auf, dass die Faktoren der Steigerung der Phosphorylierung von RSK1/2/3/4 – in allen drei Zelllinien zwischen dem 1,38- bis 1,63-fachen – wesentlich kleiner ausfallen, als bei der Steigerung der Phosphorylierung von ERK1/2 – mit Faktoren von dem 2,2- bis 5,3-fachen. Es scheint, als würde das Signal nicht 1:1 weitergegeben werden. RSKs werden – im Gegensatz zu den strukturell nah verwandten MSKs (165, 167) – nicht von p38 direkt, wohl aber von den von p38 phosphorylierten MK2 aktiviert. Dies fanden Zaru et al. heraus, als sie nach dem Kontrollmechanismus von Endozytose durch Toll-like-Rezeptoren in dendritischen Zellen suchten. Ihre Erkenntnisse beruhen auf der Inhibition des p38 und seines Substrates MK2 durch SB203580 in einer Konzentration von 5  $\mu$ M über 30 min. SB203580 hat durch die Inhibition des p38 somit auch hemmenden Einfluss auf die RSKs, auch wenn dieser in den vorliegenden Ergebnissen nicht überwiegt (165, 170).

Eine weitere Ursache für die milder ausfallende Steigerung der Aktivierung der RSKs im Verhältnis zu ERK1/2 könnte im Aktivierungsmechanismus der RSKs begründet liegen. ERK1/2 phosphoryliert RSK1 an T573 (169), daraufhin kommt es zu weiteren Phosphorylierungen an RSK1, unter anderem an S380 (165). Die Phosphorylierung an S380 fiel im Phospho-Kinase-Array bereits durch eine 4-fache Steigerung der Phosphorylierung in mit SB203580 in einer Konzentration von 10  $\mu$ M behandelten MDA-MB-231-Zellen auf. Die vollständige Aktivierung von RSKs bedingt jedoch die PDK1. Diese würde dann an S380 binden und die in dieser Arbeit im Western-Blot untersuchte Phosphorylierung an S221 vollziehen. Der Mechanismus der Aktivierung der anderen Isoformen ist ähnlich (165). Es wurde die Aktivität der PDK1 anhand der Phosphorylierung von AKT T308 in dieser Arbeit in Western-Blots untersucht. Dabei konnte keine Veränderung der Phosphorylierung von AKT an T308 durch Einfluss des Inhibitors SB203580 nachgewiesen werden. So lässt sich vermuten, dass der Einfluss der von SB203580 unveränderten PDK1 die durch ERK1/2 gesteigerte Signalweitergabe an RSK1/2/3/4 ausbremst.

Der unverändert gebliebene Einfluss der PDK1 und der Einfluss, der in seiner Aktivität gehemmten MK2 könnten ursächlich sein für die geringer ausfallende Steigerung der Phosphorylierung von RSK1/2/3/4 im Vergleich zu seinem Aktivator ERK1/2.



**Abbildung 34 Ausschnitt aus der MAPK-Signalkaskade zu Kapitel 5.2**

Legende: → = Symbol für „Molekül wird gesteigert in seiner Aktivität“; ■ = Molekül vorwiegend an der Zellmembran lokalisiert; ■ = Molekül im Zytosol; ■ = MAPK

### 5.3 AKT

Zuluaga et al. zeigten, dass in Kardiomyozyten p38 $\alpha$  AKT negativ moduliert. Dies erfolgt unabhängig von der PI3K durch Inhibition der Interaktion zwischen CAVEOLIN-1 und PP2A. CAVEOLIN-1 hemmt PP2A, welches wiederum AKT hemmt. Durch die doppelte Inhibition würde CAVEOLIN-1 eigentlich AKT aktivieren. Diesen Prozess störte p38 $\alpha$  in der Darstellung von Zuluaga et al. in Abhängigkeit der Lokalisation der PP2A (315). Seimon et al. zeigten, dass eine genetische Ablation von p38 $\alpha$  die AKT-Aktivität in Makrophagen von Mäusen supprimiert (316). Der Umkehrschluss würde bedeuten, dass p38 $\alpha$  die AKT-Aktivität steigert. Dies wäre ein klarer Widerspruch zu der Beobachtung von Zuluaga et al. Zu einer vergleichbaren Beobachtung kamen auch Wu et al., die feststellten, dass p38 $\alpha$  über MK2 und HSP27 eine Phosphorylierung der Stelle S473 von AKT erreichen (317).

Die in dieser Arbeit erstellten Ergebnisse, können wohl keine der vorangestellten Thesen untermauern. Es konnte in keiner der drei Zelllinien eine wesentliche Beeinflussung von AKT gezeigt werden. Dies gilt sowohl für die Stelle T308 als auch für die Stelle S473. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen auch nicht die These von Wu et al. aus dem Jahr 2007, dass HSP27 in eine von MK2 vermittelten Interaktion zwischen p38 $\alpha$  und AKT involviert ist. HSP27 zeigte sich als stromabwärts gelegene

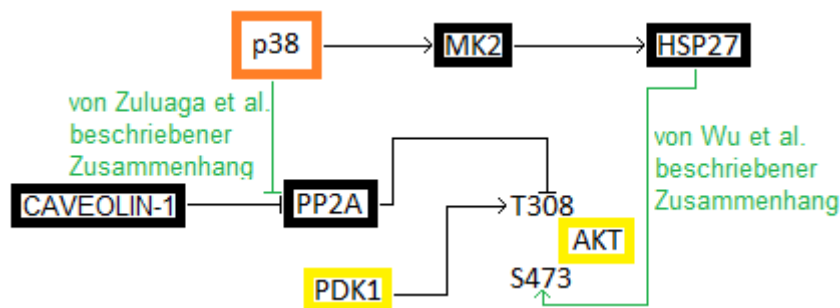
Kinasen von p38 unter Einfluss des SB203580 in MCF-10A-Zellen supprimiert, so wie es von dem Einfluss eines Inhibitors von p38 zu erwarten wäre. Trotzdem zeigten auch die MCF-10A-Zellen keine Veränderung der Expression des p-AKT.

Zuluaga et al., Seimon et al. und Wu et al. haben alle drei mit unterschiedlichen Methoden zur Inhibition von p38 gearbeitet. In den Veröffentlichungen, in denen eine Aktivierung von AKT durch p38 beschrieben wird, haben Seimon et al. p38 mit SB202190 gehemmt und bestätigten das Ergebnis mit genetischer Ablation (316). Wu et al. führten die Hemmung des p38 mittels RNA-Interferenz durch (317), während in der Veröffentlichung von Zuluaga et al., die einen hemmenden Effekt des p38 auf AKT darstellen, die Inhibition des p38 mit SB203580 durchführten (315). Dieser Umstand mildert neben den unterschiedlichen biologischen Modellen, die verwendet wurden, die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ab.

Es wäre daher denkbar, dass Zuluaga et al. aufgrund von unselektiven Nebeneffekten des SB203580 mit anderen Kinasen zu einem anderen Ergebnis kommen. Gestützt wird diese Überlegung durch Lali et al., die beschrieben, dass SB203580 in IL2-stimulierten T-Zellen unabhängig von der Interaktion des Inhibitors mit p38 ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  die PDK1 hemmt und so einen hemmenden Einfluss auf den AKT-Signalweg hat. Zuluaga et al. haben mit einer Konzentration des SB203580 von 5  $\mu\text{M}$  gearbeitet. Lali et al. schreiben in ihrer Veröffentlichung jedoch nichts darüber, ob sie den Einfluss der PP2A auf diese Prozesse untersucht haben (318). Durch die Argumente von Lali et al. ist der von Zuluaga et al. dargestellte hemmende Effekt des p38 auf den AKT-Signalweg mit Vorsicht zu betrachten.

Auch die Ergebnisse von Lali et al. lassen sich durch die vorliegenden Ergebnisse der Western-Blot-Untersuchungen kaum untermauern. Die von der PDK1 durchgeführte Phosphorylierung an T308 war in den MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen bereits ohne Behandlung zu gering, um ein Signal im Western-Blot zu generieren. Die MCF-10A-Zellen zeigten nur ein schwaches Argument für die These von Lali et al. Bei Behandlung der Zellen mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  sank die Phosphorylierung des AKT an T308 im Mittelwert um 28%, jedoch zeigten nur zwei der drei Versuchswiederholungen diese Tendenz, während eine Versuchsreihe unverändert blieb. Bis zu einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  sank die Phosphorylierung um maximal

10% und die großen Standardabweichungen erzeugten p-Werte bis zu 0,87. Damit rät der t-Test eindeutig zu Annahme der Nullhypothese.



**Abbildung 35 Ausschnitt aus der MAPK-Signalkaskade zu Kapitel 5.3**

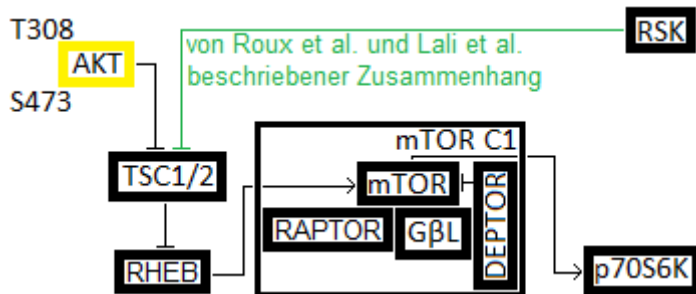
Legende:  $\dashv$  = Symbol für „Molekül wird gehemmt in seiner Aktivität“;  $\rightarrow$  = Symbol für „Molekül wird gesteigert in seiner Aktivität“;  $\square$  = Molekül vorwiegend an der Zellmembran lokalisiert;  $\blacksquare$  = Molekül im Zytosol;  $\color{orange}\square$  = MAPK

#### 5.4 mTOR

Nach Betrachtung der Ergebnisse von AKT wäre zu erwarten gewesen, dass mTOR in seiner Aktivität nicht beeinflusst wird. Da AKT ein wesentlicher Stimulus zur Phosphorylierung des mTORC1 über TSC1/2 (234, 235) und RHEB (236) darstellt, wäre aufgrund der unveränderten Aktivität von AKT in den vorliegenden Ergebnissen auch ein konstantes Niveau der Aktivierung von mTOR zu erwarten gewesen. Diese Annahme bestätigt sich auch für die MCF-10A-Zellen. Wenn man den Abfall der Phosphorylierung von mTOR im Mittelwert um 43% in den MDA-MB-231-Zellen ignoriert, die mit SB203580 in der höchsten Konzentration von 10  $\mu$ M behandelt wurden, dann könnte man diese These auch für die Ergebnisse der Zelllinie MDA-MB-231 geltend machen.

In den MCF-7-Zellen zeigte sich eine gesteigerte Phosphorylierung von mTOR unter Einfluss des SB203580. Dieser Effekt war bei einer Konzentration des Inhibitors von 5  $\mu$ M mit einer Erhöhung des p-mTOR im Mittelwert um das 3,63-fache am ausgeprägtesten. Bei Konzentrationen von 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M war die Steigerung größer Faktor 3. Neben AKT existieren noch weitere Stimuli, die mTOR phosphorylieren. In HEK293-Zellen zeigte Roux et al. bzw. Ma et al. in HEK293T-Zellen (319), dass neben AKT auch RSK den TSC1/2 hemmt und über die zweifache Inhibition zu einer Aktivierung von RHEB und schließlich zur Phosphorylierung von mTOR führt (165,

256, 320). Zu diesem *crossstalk* passend, fallen die MCF-7-Zellen ebenfalls auf. Als einzige der drei Zelllinien zeigten sie einen signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von RSK1/2/3/4. Die Aktivität des RSK1/2/3/4 stieg im Mittelwert um 38% und ist als potentielle Ursache der mTOR-Aktivierung zu betrachten.



**Abbildung 36** Ausschnitt aus der MAPK-Signalkaskade zu Kapitel 5.4

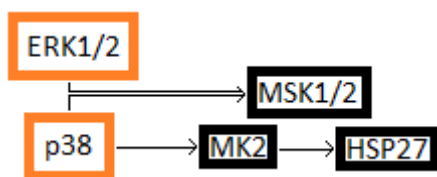
Legende:  $\dashv$  = Symbol für „Molekül wird gehemmt in seiner Aktivität“;  $\rightarrow$  = Symbol für „Molekül wird gesteigert in seiner Aktivität“;  $\blacksquare$  = Molekül vorwiegend an der Zellmembran lokalisiert;  $\blacksquare$  = Molekül im Zytosol

Recchia et al. fanden heraus, dass es in Prostatakarzinom-LNCaP-Zellen und A549-Zellen (Kapitel 5.1) einen Zusammenhang von p38 und mTOR gibt. EGF als proliferationsfördernder Faktor erhöht Cyclin D1. Dies konnten Recchia et al. durch Inhibition von p38 oder mTOR verhindern, ebenso wie den proliferationsfördernden Effekt. Interessanterweise verhinderten sowohl die p38-Inhibition als auch die mTOR-Inhibition die Aktivierung der durch EGF induzierten Aktivierung der ribosomalen p70S6-Kinase. Aus ihren Forschungsergebnissen schlussfolgerten Recchia et al., dass p38 als *upstream* gelegener Aktivator von mTOR wirkt und, dass dieser Mechanismus zur Progression von Prostata- und Lungenkrebs beitragen kann (321). Die MDA-MB-231-Zellen exprimieren auch den EGF-Rezeptor (322). Ein derartiger Mechanismus würde den Abfall der Phosphorylierung des mTOR in den mit SB203580 in einer Konzentration von 10  $\mu$ M behandelten MDA-MB-231-Zellen um 43% erklären.

## 5.5 MSK1/2 und HSP27

HSP27 wird von der MK2 und diese wiederum von p38 aktiviert (15). MSK1/2 ist ein direktes Substrat von p38 (167). Unter dem Einfluss eines p38-Inhibitors wie SB203580 wäre demzufolge eine verminderte Aktivierung dieser Kinasen zu erwarten

(15). Die benignen MCF-10A-Zellen reflektierten diese Erwartung in ihrem Verhalten. Die Expression des p-MSK1/2 sank im Mittelwert um bis zu 33% ab. In einzelnen Versuchsdurchgängen war eine Suppression der Phosphorylierung, bei Verwendung des SB203580 in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  um bis zu 90% zu beobachten. Die Suppression von mit Phenylephrin und Endothelin-1 stimuliertem MSK1 durch Inhibition von p38 mit SB203580 wurde auch in kardialen Myozyten von Ratten beobachtet. Markou et al. legten in diesem Zusammenhang dar, dass GPCR-Agonisten eine Aktivierung von MSK1 nur durch Aktivierung von ERK und p38 gemeinsam erreichen können. (323).



**Abbildung 37 Ausschnitt aus der MAPK-Signalkaskade zu Kapitel 5.5**

Legende:  $\rightarrow$  = Symbol für „Molekül wird gesteigert in seiner Aktivität“;  $\blacksquare$  = Molekül im Zytosol;  $\square$  = MAPK

Auch die Phosphorylierung des HSP27 der MCF-10A-Zellen ging durch den Inhibitor stark zurück. Bereits bei Konzentrationen des Inhibitors von 0,1  $\mu\text{M}$ , war die Phosphorylierung um 26% geringer. Dieser Effekt steigerte sich mit signifikanten Ergebnissen bei steigender Konzentration des Inhibitors bis zu einem mit einem p-Wert von 0,0029 hochsignifikanten Abfall der Expression des p-HSP27 um 80% bei Verwendung des SB203580 in der höchsten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Zu einer vergleichbaren Beobachtung in MCF-10A-Zellen kamen 2020 auch Wang et al. Sie zeigten, dass HER2 eine frühe Metastasierung von Brustkrebs durch Inhibition von p38, MK2 und HSP27 fördert. Die *downstream* von p38 gelegenen Hintergründe identifizierten sie mit SB203580 in MCF-10A-Zellen und supprimierten HSP27 in den Zellen durch den Inhibitor (324).

Die Zellen spiegeln in der Reaktion auf den Inhibitor den Grad ihrer Entartung wider (Kapitel 3.1.8). Die MCF-10A-Zellen, die als benigne beschrieben werden (285), verhalten sich nach Einfluss des Inhibitors wie zu erwarten ist. Es kommt zu einer geringeren Phosphorylierung von HSP27 und MSK1/2, während die maligne Zelllinie MCF-7 (289) nur mit der Absenkung der Aktivität einer der beiden *downstream targets*

## Diskussion

---

von p38 reagiert. Betrachtet man den Chromosomensatz und die Anzahl der Mutationen in den MDA-MB-231-Zellen (285, 290, 291), kann man sie als die von den Dreien am stärksten entartete Zelllinie beschreiben und sie reagiert dazu passend völlig inadäquat auf den Inhibitor. Eine Inhibition von p38, führte kaum zu einer Verminderung der Aktivität der direkten bzw. indirekten Substrate. Somit konnten anhand der vorliegenden Ergebnisse zu HSP27 und MSK1/2 keine Indizien dafür gefunden werden, dass es bei der MDA-MB-231-Zelllinie überhaupt zu einer Inhibition von p38 kommt.

Die MDA-MB-231-Zellen änderten bei der höchsten und der niedrigsten verwendeten Konzentration die Phosphorylierung des HSP27 kaum, während es durch die beiden mittleren eingesetzten Konzentrationen entgegen der Erwartung zu einem Anstieg der Phosphorylierung kam. Die Phosphorylierung des MSK1/2 zeigte durch den Inhibitor kein eindeutiges Verhalten. Sie stieg mit der Konzentration des verwendeten Inhibitors leicht an und war bei der höchsten verwendeten Konzentration niedriger als in den unbehandelten Zellen.

In den MCF-7-Zellen war es das HSP27, welches von der anfangs geschilderten Erwartung abwich, dass beide Moleküle weniger aktiv sind. Das p-HSP27 zeigte sich sogar in der Expression leicht gesteigert, in 3 der 4 verwendeten Konzentrationen um 20%. Casado et al. zeigten, dass es in MCF-7-Zellen durch das Zytostatikum Vincristin zu einer Phosphorylierung von HSP27 kommt, welche durch Zugabe von SB203580 blockiert werden konnte (325). Die Applikation von Vincristin bei Casado et al. scheint der entscheidende Faktor zu sein, wie es zu der zu den vorliegenden Ergebnissen gegensätzlichen Beobachtung kam, dass SB203580 die Phosphorylierung von HSP27 hemmt. Dies lässt in Kombination mit den vorliegenden Ergebnissen die Vermutung zu, dass SB203580 erst bei gesteigerter Aktivität des HSP27 einen suppressiven Effekt auf HSP27 in MCF-7-Zellen hat. Die Auswirkungen des Inhibitors auf das MSK1/2 als direktes Substrat von p38 waren in den MCF-7-Zellen ähnlich den MCF-10A-Zellen. Die Phosphorylierung des MSK1/2 ging mit steigender Konzentration des verwendeten SB203580 immer stärker zurück. Signifikant sank die Expression des p-MSK1/2 im Mittelwert um bis zu 61% in den mit SB203580 in einer Konzentration von 5  $\mu$ M behandelten Zellen.

Bei der Betrachtung des Effektes des SB203580 auf die Phosphorylierung von MSK1/2 ist zu beachten, dass dieses neben p38 auch ERK1/2 als Aktivator hat (165, 167). ERK1/2 zeigte sich unter Einfluss des SB203580 in allen drei Zelllinien gesteigert phosphoryliert. Dies könnte eine Erklärung darstellen, warum es in den MDA-MB-231-Zellen bis zur Verwendung des SB203580 in einer Konzentration von 5  $\mu$ M zu einer Steigerung der Expression von p-MSK1/2 um 30% kommt. Gleichzeitig wird die Möglichkeit verschleiert, von der Phosphorylierung von MSK1/2 Rückschlüsse auf die tatsächliche Aktivität des p38 zu ziehen.

So wäre denkbar, dass es in den MDA-MB-231-Zellen durch den Inhibitor doch zu einer Aktivitätsverminderung des p38 kommt und auch MSK1/2 demnach weniger phosphoryliert wird. Dies könnte im Western-Blot nicht dargestellt werden, da die gesteigerte Aktivität von ERK1/2 den Effekt aufhebt. In den vorliegenden Ergebnissen findet sich nur ein schwacher Beweis dafür, dass SB203580 p38 doch auch in den MDA-MB-231-Zellen hemmt. Dieses Indiz ist die Aktivitätsminderung des MSK1/2 in den mit SB203580 in der höchsten Konzentration von 10  $\mu$ M behandelten MDA-MB-231-Zellen um 27% im Mittelwert.

Gleiches gilt für das Verhalten von MSK1/2 in den MCF-10A- und MCF-7-Zellen. Es ist denkbar, dass die indirekte Inhibition des MSK1/2 durch SB203580 noch ausgeprägter wäre, wenn die Zuführung des Inhibitors nicht einen derart starken Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK1/2 hätte, das wiederum potentiell den Effekt der p38-Inhibition auf MSK1/2 abmildert.

Umgekehrt gilt auch zu überdenken welchen Einfluss *downstream targets* des potentiell durch SB203580 gehemmten p38 auf andere MAPK wie ERK1/2 haben. In diesem Kontext gibt es mehrere Veröffentlichungen, die Hinweise darauf geben, dass HSP27 einen aktivierenden Einfluss auf ERK hat. Wang et al. haben im Zusammenhang mit idiopathischer Lungenfibrose gezeigt, dass ein HSP27-*Knockdown* auch die TGF- $\beta$  induzierte Aktivierung von ERK senkt (326). Dies würde im Umkehrschluss bedeuten, dass eine Steigerung der HSP27-Expression auch die TGF- $\beta$  induzierte Aktivierung von ERK fördert. In Prostata-Karzinom-Zelllinien wurde gezeigt, dass eine Überexpression von HSP27 die IGF-I vermittelte Phosphorylierung von ERK steigert (327). Außerdem wurde in

HeLa-Zellen deutlich, dass eine Phosphorylierung des HSP27 an S82 essentiell ist für die TRAIL(*TNF-related-apoptosis-inducing-ligand*)-getriggerte überlebensfördernde ERK-Signaltransduktion (328).

Unter der Annahme, dass HSP27 ein Aktivator von ERK ist, fällt in den vorliegenden Ergebnissen auf, dass ERK1/2 in den Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 eine ca. 5-fach gesteigerte Expression durch Einfluss des Inhibitors hatte, während sich in der MCF-10A-Zelllinie die Phosphorylierung von ERK1/2 maximal um das 2,2-fache steigerte. Dabei ist die MCF-10A-Zelllinie die einzige der drei Zelllinien, die zum Teil hochsignifikant durch den Inhibitor ein im Mittelwert um bis zu 80% supprimiertes p-HSP27 zeigte, während die Expression des p-HSP27 in den anderen beiden Zelllinien sogar dezent erhöht war. Sicherlich beweist diese Beobachtung noch nicht, dass HSP27 ERK aktiviert. Aber, dass die einzige der drei Zelllinien, in der p-HSP27 supprimiert ist, auch eine im Verhältnis gesehen schwächere Aktivierung des ERK1/2 aufzeigt, weil ihr hier potentiell ein Aktivator des ERK1/2 wegfällt, gibt einen weiteren Hinweis darauf.

### 5.6 Einfluss von SB203580 auf die Neusynthese von Signalmediatoren

Die Phosphorylierung der untersuchten Kinasen änderte sich in den vorliegenden Ergebnissen in vielfältiger Art und Weise, doch die Veränderungen der Neusynthese von Signalmediatoren durch die zweistündige Behandlung der Zellen mit SB203580 war gering. Dies liegt zum Teil in der Komplexität der beiden Prozesse begründet und in der geringen Wirkzeit der Behandlung. Die Phosphorylierung erfolgt durch Kinasen, die als Enzyme als sogenannte Biokatalysatoren *per* Definition für beschleunigte Substratumsetzung stehen. Die Änderung der Gesamtprotein-Menge hingegen ist ein komplexerer Vorgang, der neben der adäquaten Signalweiterleitung die Genexpression mit Transkription, Translation und der Modifizierung dieser Prozesse bedingt (329). Jedoch führt diese Komplexität nicht immer zu einer großen Zeitspanne zwischen Stimulus und daran angepasster Genexpression wie die *immediate-early-genes*, die unter anderem durch den Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert werden, zeigen (102, 142).

Carbajo et al. haben über die EGF-Rezeptor-Aktivierung in MCF-7-Zellen die divergente Dynamik von Gen-Promotoren beschrieben. Dabei hoben sie hervor, dass generelle Promotoren im zeitlichen Verlauf schon früh einen Höhepunkt ihrer Expression erreichen, während Stimulus-spezifische Promotoren, die unter anderem mit Regulatoren des ERK-Signalweges verknüpft sind, tendenziell eine Aktivierung ihrer Expression zu einem späteren Zeitpunkt zeigen. Die Gene, die man diesen Promotoren zugeordnet hat, haben Bedeutung für p53- und MAPK-Signalwege, während die generellen Promotoren Apoptose und Zellzyklus regeln (330).

Dass Carbajo et al. die MAPK-Signalwege mit Promotoren in Verbindung bringen, die die Expression nach Stimulation tendenziell zu einem späteren Zeitpunkt ändern, passt zu den vorliegenden Ergebnissen. T-ERK1/2 änderte sich im Gegensatz zu p-ERK (Kapitel 4.2.1 und Kapitel 5.1) durch die zweistündige Behandlung in den drei Zelllinien um maximal 10%, bei hohen p-Werten im t-Test, die eindeutig zu einer Annahme der Nullhypothese rieten. Die Beobachtung, dass ein zeitlich begrenzter Stimulus zwar die Phosphorylierung beeinflusst, nicht jedoch die Expression des Gesamtproteins von ERK1/2, machten auch Tajti et al. bei der Kultivierung von trigeminalen Neuronen. Es wurde festgestellt, dass es zu einer gesteigerten Expression von CGRP (*calcitonin-gene-related-peptide*) sowohl in den Neuronen als auch der Gliazellen kommt. Diese wird durch gesteigerte Aktivität von ERK vermittelt. Bereits zwei Stunden nachdem die Zellen in Kultur genommen wurden, exprimierten sie mehr p-ERK, während sie nach 48 h immer noch keine Änderung des Gesamtproteins zeigten (331). Auch bei Behandlung von drei Neuroblastom Tumorzelllinien mit dem MEK-Inhibitor U0126 stellten Eppstein et al. fest, dass das Gesamt-Protein von MEK und ERK nach 24 h Behandlung immer noch konstant bleibt, während p-ERK und p-MEK bereits nach 1 h im Western-Blot abgesunken sind. Eppstein et al. bestätigten damit, dass die Inhibition von MEK an ERK weitergegeben wird (332).

Die vorliegenden Ergebnisse zu der Gesamtprotein-Menge von c-JUN zeigten ebenfalls nur geringe Veränderungen durch den Inhibitor um maximal 23%. Okada et al. haben dazu Untersuchungen an JNK, dem wichtigsten Aktivator des c-JUN (141), vorgenommen. Es wurden die intrazellulären Signalkaskaden der Wundheilung an Hornhaut-Epithel von Mäusen untersucht. Zwei Stunden nach Entfernung der

Hornhaut konnte ein Anstieg der Expression von p-JNK festgestellt werden, während T-JNK konstant blieb. Damit zeigte Okada et al, das JNK bedeutend ist für Wundheilung und Migration (333).

c-JUN ist charakterisiert durch die Involvierung in die Regulation von *immediate-early-genes* durch AP-1. Daher ist eine kurzfristige Änderung der Genexpression über c-JUN eigentlich typisch für den Transkriptionsfaktor (102, 142). Hazzalin et al. haben 1997 in C3H-10T1/2-Zellen untersucht, ob die Wirkung von SB203580 auf die Expression der mRNA des c-JUN abhängig davon ist, durch welchen Stimulus die Transkription der mRNA des c-JUN angeregt wurde. Die Aktivierung der Transkription des c-JUN-Gens mit Anisomycin konnte durch SB203580 supprimiert werden. Die Einwirkzeit betrug dabei eine Stunde. Die Konzentrationen des Inhibitors lagen zwischen 0,5  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$ . Bei Stimulation des c-JUN durch EGF entdeckte man eine entgegengesetzte Wirkung des SB203580. Das EGF wurde dabei in einer Konzentration von 50 ng/ml verwendet. Die Expression von c-JUN-mRNA wurde verstärkt (303). Die Beobachtung einer gesteigerten Expression von c-JUN unter Einfluss von SB203580 konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, auch nicht in den MCF-10A-Zellen, die mit EGF in einer Konzentration von 20 ng/ml kultiviert wurden.

Die Expression von T-RSK1/2/3 wich bis auf eine Ausnahme ebenfalls um maximal 21% von den unbehandelten Proben ab. Die weiteren Ergebnisse der anderen untersuchten Kinasen zur Entwicklung der Gesamtprotein-Menge durch SB203580 zeigten kaum größere Abweichungen von den unbehandelten Zellen. Neben der quantitativen Einschätzung der Gesamtproteinentwicklung zeigten diese auch qualitativ unter den Behandlungen der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors meist keine eindeutige Tendenz zu einer Zu- oder Abnahme des Gesamtproteins durch die Inkubation mit SB203580.

### 5.7 Molekulare Hintergründe des Einflusses von SB203580 auf die Zellviabilität

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde das funktionelle Zellverhalten der drei Zelllinien MCF-10A, MCF-7 und MDA-MB-231 unter Inhibition von p38 untersucht. Die Inhibition des p38 wurde sowohl auf molekulare Ebene mit dem Hemmstoff SB203580 und

Skepinone-L durchgeführt (334) als auch auf posttranslationaler Ebene durch *Knockdown* von p38 $\alpha$  mit siRNA (335). Bei den Untersuchungen der Viabilität der Zellen unter Einfluss einer Inhibition von p38 auf molekularer Ebene fiel auf, dass es durch Skepinone-L zu einer Steigerung der Viabilität kam, während es durch SB203580 zu einer Abnahme der Viabilität kam (334). Die Tendenz zu einer Steigerung der Viabilität durch den Wirkstoff Skepinone-L konnte mit der Hemmung von p38 $\alpha$  durch siRNA bestätigt werden (335).

Durch SB203580 sank die Viabilität in den MCF-10A-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf 64% ab. Durch Skepinone-L stieg sie auf 147% (334) und durch die posttranslationale Hemmung des p38 $\alpha$  stieg sie auf 117%. Diese Ergebnisse waren alle signifikant (335). In den malignen Zelllinien waren die Verhältnisse ähnlich. In beiden Zelllinien sank die Viabilität durch den Inhibitor SB203580 auf 83% ab. Durch Skepinone-L stieg die Viabilität in den MCF-7-Zellen auf 124% (334). Dies bestätigte sich auch durch die posttranslationale Hemmung des p38 $\alpha$  mit einem signifikanten Anstieg auf 121% (335). In den MDA-MB-231-Zellen stieg die Viabilität bis auf 190% durch Skepinone-L (334) und durch den Einfluss der p38 $\alpha$ -spezifischen siRNA auf 113% (335) .

Diese Ergebnisse waren ein wesentlicher Impuls zur Forschung in dieser Arbeit. Der von Koeberle et al. als weniger selektiv beschriebene Wirkstoff SB203580 senkte die Viabilität, während der als selektiv beschriebene Wirkstoff Skepinone-L (124) und die spezifische Hemmung des p38 $\alpha$  auf posttranslationaler Ebene zu einer Steigerung dieser führten. Die Charakterisierung des p38-Signalweges als proliferationshemmenden Signalweg (Kapitel 2.2.1.3) führt zum Umkehrschluss, dass bei einer Hemmung die Proliferation steigen sollte. Dass unter SB203580 das Gegenteil der Fall ist, deutet darauf hin, dass die von Koeberle et al. angedeutete Unselektivität (124) von SB203580 ursächlich für den Einfluss auf die Viabilität sein könnte.

ERK1/2 zeigte sich in allen Zelllinien unter Einfluss von SB203580 gesteigert (Kapitel 4.2.1), ebenso wie sein *target* RSK (165, 166) (Kapitel 4.2.5). Die Wirkung dieser Signalwege beispielsweise über c-FOS (10, 160, 161) oder NF $\kappa$ B wird als der Apoptose entgegengesetzt beschrieben. Dass NF $\kappa$ B anti-apoptotisch im

Mammakarzinom wirkt, stellten Sovak et al. in mehreren Brustkrebs-Modellen fest. Darunter waren auch Nachweise in MCF-7- und MCF-10F-Zellen. Letztere sind den MCF-10A-Zellen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, in ihren Eigenschaften sehr ähnlich (76). Auch die Hemmung der GSK-3 durch RSK, die zu einer Aktivierung von Cyclin-D1 führt, hat eine Zellzyklusprogression zur Folge (165, 174). Diese Eigenschaften eines aktivierten ERK1/2 durch SB203580 widersprechen sich mit einer verminderten Viabilität durch den Inhibitor. Auch das in den MCF-7-Zellen und den MDA-MB-231-Zellen durch SB203580 aktivierte c-JUN (Kapitel 4.2.6) wird als Onkogen und durch die Wirkung als Teil des dimeren Transkriptionsfaktors AP-1 als anti-apoptotisch charakterisiert (102, 142). Dem JNK-Signalweg wird auch eine pro-apoptotische Komponente bei starker Aktivierung zugeschrieben. Dies erfolgt TNF $\alpha$ -abhängig über ASK1, während die anti-apoptotischen Eigenschaften eher durch transiente Aktivierung von MEKKs und MLKs zum Tragen kommen (65, 67). Die Aktivierung des JNK-Signalweges durch SB203580 erfolgt laut Muniyappa et al. durch MLK3 (310). Diese Umstände machen die gesteigerte Aktivität im JNK-Signalweg als Grund für die herabgesetzte Viabilität der Zellen durch SB203580 unwahrscheinlich.

MSK-1/2 aktiviert immediate-early-genes. Diese werden als Onkogene beschrieben (336). Auch das im Mammakarzinom anti-apoptotisch wirkende NF $\kappa$ B (76) und STAT3 wird durch MSK1/2 aktiviert (337). Letzteres haben Sinibaldi et al. in Fibroblasten von Mäusen erforscht. STAT3 regt bei alternativer Aktivierung Cyclin D1 an. Dadurch steigt auch die intrazelluläre Konzentration an Cyclin E. Dies ermöglicht der Zelle den Übergang in die S-Phase und Zellzyklusprogression. STAT3 wurde von Sinibaldi et al. auf Grundlage dieser Erkenntnisse als Onkogen beschrieben (338). Das so vorrangig anti-apoptotisch wirkende MSK1/2 war unter Einfluss von SB203580 in den MCF-10A- und MCF-7-Zellen supprimiert (Kapitel 4.2.4). Dies wäre eine Erklärung für eine verminderte Viabilität durch SB203580.

Es spricht jedoch viel dagegen, dass die Suppression von MSK1/2 durch SB203580 eine Erklärung für die Verringerung der Viabilität unter Einfluss des Inhibitors ist. Denn die MDA-MB-231-Zellen zeigen, wie die MCF-7-Zellen, einen Rückgang der Viabilität um 17% durch den Inhibitor SB203580, obwohl die MDA-MB-231-Zellen keine Suppression der Aktivierung des MSK1/2 zeigten. Auch liegt MSK1/2 *downstream* von p38 (165, 167) und müsste daher theoretisch auch durch Skepinone-L oder eine

posttranslationale Hemmung von p38 mit siRNA gehemmt vorliegen. Wenn es also wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse des funktionellen Zellverhaltens hat, sollte die Viabilität auch unter Skepinone-L oder die Hemmung durch p38-spezifische siRNA vermindert werden. Außerdem scheint es unwahrscheinlich, dass die Suppression des MSK den Effekt der gesteigerten Signalwege JNK und ERK überwiegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit vermögen nicht, die unterschiedlichen Auswirkungen der Hemmung auf molekularer Ebene durch die Inhibitoren Skepinone-L und SB203580 auf die Viabilität hinreichend zu erklären. Dies offenbart weiteren Forschungsbedarf.

### 5.8 Bedeutung der gesteigerten Aktivität von ERK, c-Jun, RSK und mTOR

Es wäre naheliegend das Verhalten von ERK, c-JUN, RSK und mTOR damit zu erklären, dass SB203580 unspezifisch sei. Die vorliegenden Ergebnisse wären dann dadurch zu begründen, dass SB203580 direkt mit den jeweiligen Molekülen interagiert. SB203580 besetzt als Typ-I-Inhibitor kompetitiv die ATP-Bindungsstelle der p38-Kinase (121). Da ATP als allgemeiner kurzfristiger Energielieferant in der Zelle dient, haben sehr viele Enzyme in der Zelle eine Bindungsstelle für ATP und damit auch Potential zur Bindung eines dem ATP strukturell ähnlichen Inhibitors (121, 329).

Karaman et al. haben das Bindungsverhalten von SB203580 an der katalytischen Domäne von 317 Kinasen untersucht (339). Dies erfolgte außerhalb der Zelle mit separierten Kinasen in Reaktionsgefäßen über ein Bindungs-Assay. Die Kinasen wurden durch Fusion mit T7-Phagen oder in HEK-293-Zellen exprimiert und anschließend mit DNA für den PCR-Nachweis markiert und detektiert. Mit dem Bindungs-Assay wurde die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) für die Bindung des SB203580 in einer Konzentration von 10  $\mu$ M mit den jeweiligen katalytischen Domänen ermittelt. Diese lag für p38 $\alpha$  bei 12 nM und für p38 $\beta$  bei 70 nM. Bei 53 Kinasen konnte eine Bindung von SB203580 festgestellt werden. Keine Bindung zeigte ein kleinere Dissoziationskonstante als p38 $\alpha$ , also war keine Bindung stärker als in diesem Fall. Da hier die Bindung an der katalytischen Domäne untersucht wird, führt diese Bindung immer zu einer Inhibition und nie zu einer Aktivierung der Kinase. Dies liegt daran, dass SB203580 als kompetitiver Inhibitor durch diese Bindung die Interaktion mit ATP verhindert. Eine Reaktion des SB203580 als allosterischer Effektor, die theoretisch auch zu einer Aktivierung der Kinase führen kann, haben Karaman et al. nicht

untersucht. Dies wäre für SB203580 als Typ-I-Inhibitor jedoch auch untypisch (121, 329, 339). Für ERK1/2 konnte dabei keine Bindung des Inhibitors festgestellt werden. Aber es wurde eine Bindung an RAF1 festgestellt, die mit einem  $K_d$  von 910 jedoch 75-mal schwächer ist als die Bindung zu p38 $\alpha$ . Auch stellte man Bindungen zu EGFR und MEK2 fest, die jedoch noch schwächer als mit RAF1 waren. Diese Kinasen sind stromaufwärtsgelegen von ERK1/2. Bei einer Inhibition durch SB203580 würde ERK1/2 daher gehemmt vorliegen (339). Dies widerspricht den vorliegenden Ergebnissen zum Einfluss von SB203580 auf ERK1/2, da die vorliegende Arbeit zeigt, dass ERK1/2 und sein Substrat RSK1/2/3/4 durch SB203580 gesteigert phosphoryliert vorliegen.

Auch die beobachteten Effekte auf c-JUN, das eine gesteigerte Aktivierung zeigt, lässt sich durch die Ergebnisse von Karaman et al. nicht bestätigen. Diese haben zwar den Einfluss von SB203580 auf c-JUN nicht untersucht, jedoch zeigten sie eine Bindung von SB203580 an allen drei Isoformen des Aktivators JNK. Bei JNK2 mit einer  $K_d$  von 130 und bei JNK3 mit einer  $K_d$  von 35 war die Inhibition von JNK2 damit ca. halb so stark wie die von p38 $\beta$  und die Inhibition von JNK3 sogar doppelt so stark wie bei p38 $\beta$  (339). Dadurch hätte c-JUN weniger und nicht mehr phosphoryliert vorliegen müssen, wie in den Ergebnissen dieser Arbeit.

Der weitere Vergleich der vorliegenden Ergebnisse, mit denen von Karaman et al. offenbart, dass diese keine Bindung des Inhibitors an MSK1/2 feststellen konnten (339). Dies stützt die Theorie, dass die verringerte Phosphorylierung von MSK1/2 in den MCF-10A- und MCF-7-Zellen, die in dieser Arbeit beobachtet wurde, aufgrund der Inhibition des Aktivators p38 zustande kommt (Kapitel 5.5). Auch an AKT1/2/3 bindet SB203580 laut Karaman et al. nicht, genauso wenig wie an die PI3K, die AKT aktiviert, inklusive der mutierten Variante der MCF-7-Zellen (339). Dies unterstreicht die Plausibilität der unveränderten Phosphorylierung von AKT in den vorliegenden Ergebnissen. Die Interaktion des SB203580 mit mTOR wurde von Karaman et al. nicht untersucht (339). Die Ergebnisse von Karaman et al. werden in Ihrer Aussagekraft dahingehend gestärkt, dass Fabian et al. zu ähnlichen Erkenntnissen gekommen sind. Unabhängig von Karaman et al. wurde durch Fabian et al. mit der gleichen Methode gearbeitet. Fabian et al. untersuchten die Interaktionen von SB203580 mit 113 Kinasen (339, 340).

Wenn die Aktivierung von ERK1/2 und c-JUN in den vorliegenden Western-Blot-Analysen nicht durch eine direkte Interaktion des SB203580 mit den Molekülen oder ihrer aktivierenden Kinasen erklärbar sind, rückt dies eine mechanistische Erklärung in den Fokus. Die Effekte auf die anderen Kinasen in der MAPK-Kaskade könnten einen Kompensationsmechanismus der Zelle darstellen, um den Funktionsverlust von p38 auszugleichen. Henklova et al. stellten fest, dass die Aktivierung von ERK durch SB203580 in diversen Zelllinien wahrscheinlich auf die Hemmung der basalen p38-Aktivität zurückzuführen ist (304). In der Tat wurde ein einseitiger *crossstalk* zwischen p38 und ERK in einer Vielzahl von Zellen gezeigt, einschließlich Maus-Fibroblasten NIH3T3 (341), humanen Hepatomzellen HepG2 (342), kardialen Ratten-Myoblasten H9c2 (343), T-Lymphozyten (344) und kortikalen Ratten-Neuronen-Kulturen (345).

Eine Begründung dafür könnten die Mechanismen der Zelle sein, von denen man annimmt, dass sie in ihrer physiologischen Funktion die Aktivität der MAPK begrenzen sollen. Die MKPs werden von p38 und den p38 stimulierenden Faktoren aktiviert und dephosphorylieren dann p38 (346, 347). Auch die Phosphatase PP2A limitiert die Aktivität von p38 (348). Jedoch sind diese Phosphatasen nicht spezifisch für p38. Die MKPs dephosphorylieren neben p38 auch JNK (349) und PP2A hemmt neben p38 (348) auch JNK (350) und ERK1/2 (351-353). Nehmen wir an, p38 wird selektiv durch SB203580 gehemmt. Wenn dann durch einen Inhibitor ein Stimulus der Phosphatasen entfällt, dann hat ihre dadurch geminderte Aktivität auch Konsequenzen für ihre weiteren Substrate und nicht nur für p38. Damit wird die Schlussfolgerung unumgänglich, dass durch einen p38-Inhibitor über die Phosphatasen ERK1/2 und JNK in ihrer Aktivität gesteigert sein müssen. Dies würde auch die Auswirkungen auf das von JNK aktivierte c-JUN, sowie das von ERK1/2 aktivierte RSK erklären und über den beschriebenen *crossstalk* zwischen RSK und dem TSC1/2 auch die gesteigerte Phosphorylierung von mTOR in den MCF-7-Zellen (Kapitel 5.4 und Abbildung 38).

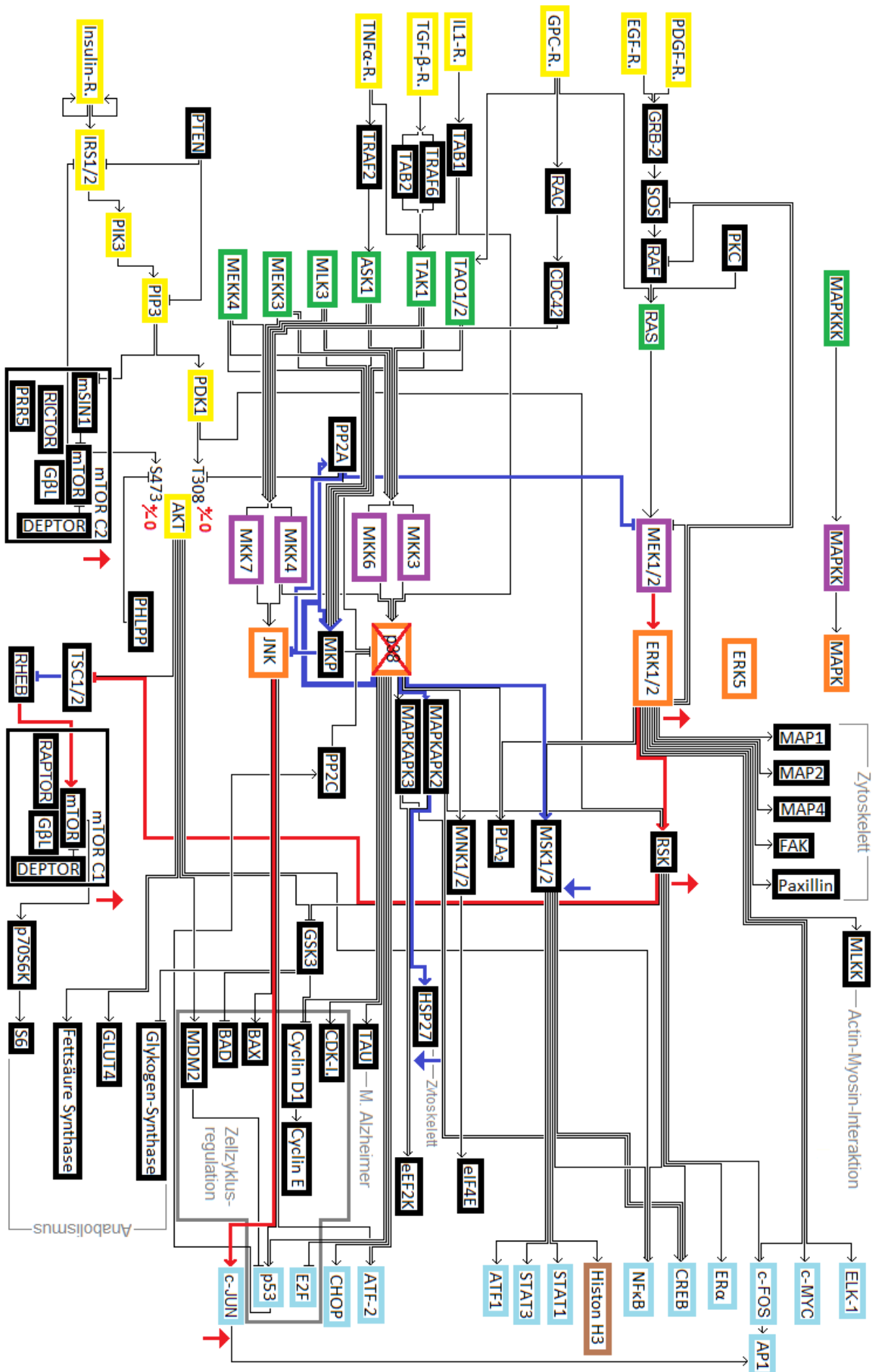
Den Fakt, der diese Theorie angreifbar macht, könnte man in der Methodik der Erforschung der Phosphatasen und deren Zusammenhang zu p38 vermuten. Denn SB203580 ist ein etablierter Inhibitor für p38 (13). In der Tat haben Westermarck et al., Franklin et al., Hu et al. und Menetsch et al. alle SB203580 verwendet, um die von ihnen Veröffentlichten Zusammenhänge der MKPs oder der PP2A zu p38 zu

beweisen. Jedoch haben alle vier nicht ausschließlich mit SB203580 gearbeitet, sondern die Ergebnisse durch weitere Untersuchungen bestätigt, wie zum Beispiel durch RNA-Interferenz (346, 347, 349, 353).

Das Verhalten der MDA-MB-231-Zellen stellt die Theorie ebenfalls in Frage, dass die Aktivierung der anderen Moleküle wie ERK1/2 und c-JUN durch die Phosphatasen zustande kommt. Denn MSK1/2 und HSP27, die Substrate des p38, reagierten nicht auf die Inhibition des p38 (Kapitel 5.5). Dadurch steht die Frage im Raum, ob p38 in seiner Aktivität in dieser Zelllinie durch den Inhibitor überhaupt gehemmt wird. Wenn p38 in den MDA-MB-231-Zellen nicht weniger aktiv ist, dann wäre eine verminderte Aktivität der Phosphatasen auch keine Erklärung mehr für die gesteigerte Aktivität von ERK1/2 und c-Jun. Die MDA-MB-231-Zelllinie bedarf in diesem Zusammenhang weitere Erforschung.

# Diskussion

## 5.8.1 Übersicht zur Bedeutung der gesteigerten Aktivität von ERK, c-Jun, RSK und mTOR



### **Abbildung 38 Signalkaskade der MAP-Kinasen mit Ergebnissen und crosstalks**

Dargestellt sind alle Moleküle, die in dieser Arbeit Erwähnung finden. Die Grafik erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Legende:

⇨ = Symbol für „Molekül wird gehemmt in seiner Aktivität“

⇨ = Symbol für „Molekül wird gesteigert in seiner Aktivität“

■ = Molekül vorwiegend an der Zellmembran lokalisiert

■ = Molekül im Zytosol

■ = MAPKKK

■ = MAPKK

■ = MAPK

■ = Transkriptionsfaktor im Nukleus



■ = p38 unter Einfluss von SB203580



↑ = erhöhte Aktivität unter Einfluss von SB203580 in dieser Arbeit nachgewiesen



↓ = erniedrigte Aktivität unter Einfluss von SB203580 in dieser Arbeit nachgewiesen



— = Signalweg mit erhöhter Aktivität unter Einfluss von SB203580 in dieser Arbeit diskutiert



— = Signalweg mit erniedrigter Aktivität unter Einfluss von SB203580 in dieser Arbeit diskutiert

### 6 Fazit

Das Verhalten von SB203580 in Mammakarzinom-Zellen ist von den behandelten Zelllinien und der Konzentration des Inhibitors abhängig. Dies zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Zusammenschau mit den Veröffentlichungen zur bereits erfolgten Forschung zu SB203580 und p38. In den drei untersuchten Zelllinien MCF-10A, MCF-7 und MDA-MB-231 konnte mit den Phospho-Kinase-Arrays weitere Kinasen außer p38 detektiert werden, die durch SB203580 beeinflusst sind. Die Ergebnisse der im Anschluss erfolgten Western-Blot-Analysen legten dar, wie unterschiedlich sich der Inhibitor auf die Kaskaden auswirkt, die nach dem aktuellen Stand der Forschung durch p38 angeregt werden. Außerdem wurden die Auswirkungen auf andere Kinasen der MAPK-Signalkaskaden untersucht.

Eine Beeinflussung der Aktivität von AKT konnte nicht festgestellt werden. Einige Kinasen zeigten unabhängig von der untersuchten Zelllinie eine veränderte Aktivierung, wie ERK1/2, das durch SB203580 in allen drei Zelllinien vermehrt aktiv war. Andere Kinasen verhielten sich in allen drei Zelllinien unterschiedlich, wie der Komplex mTOR, der in den MCF-10A-Zellen keine veränderte Aktivität zeigte, während in den MCF-7-Zellen eine verstärkte und in den MDA-MB-231-Zellen eine verminderte Aktivierung vorlag. So konnten wesentliche Einflüsse des Inhibitors auf andere Kinasen in Mammakarzinom-Zellen aufgedeckt werden, genauso wie die Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp.

Durch die verdeutlichte Vernetzung des p38 zu anderen Signalwegen konnte aufgezeigt werden, dass unerwünschte Wechselwirkungen bei der Nutzung des p38 als potentiell *target* in der Therapie des Mammakarzinoms zu erwarten wären. Die Aktivierung der ERK- sowie weiterer Signalkaskaden als Effekt der Inhibierung des p38-Signalweges müsste bei der Frage der Sinnhaftigkeit einer Inhibition von p38 in therapeutischer Absicht berücksichtigt werden. Innerhalb der Arbeitsgruppe gewonnene Erkenntnisse zur veränderten Viabilität unter Einfluss des Inhibitors in Abgleich zur veränderten Viabilität durch posttranslationale Hemmung konnten den Ergebnissen gegenübergestellt werden. Endgültig die veränderte Viabilität unter Einfluss von SB203580 erklären, vermochten die aufgedeckten Signalwege aber nicht. Hier offenbarte sich weiterer Forschungsbedarf.

## Fazit

---

Eine Untersuchung der Signalwege nach posttranslationaler Hemmung von p38 $\alpha$  und p38 $\beta$  könnte weitere Erkenntnisse liefern. Diese Experimente könnten auch bestätigen, dass die Aktivierung anderer MAPK durch SB203580 durch die fehlende Stimulation der Phosphatasen zustande kommt und nicht durch eine unspezifische Interaktion des SB203580. Wenn die Aktivierung anderer MAPK durch unspezifische Interaktionen des Inhibitors bedingt wäre, würde die Aktivierung der anderen MAPK bei posttranslationaler Hemmung des p38 $\alpha$  und  $\beta$  dann nämlich ausbleiben.

SB203580 hemmt nicht alle Isoformen des p38. Bei der Erforschung von Kompensationsmechanismen der Zellen zum Ausgleich des Funktionsverlustes von p38 $\alpha$  und p38 $\beta$  wäre es interessant, ob andere Isoformen des p38 vermehrt aktiv werden. Des Weiteren besteht Forschungsbedarf darin, die Auswirkung des SB203580 auf weitere *downstream targets* des p38 in MDA-MB-231-Zellen zu klären. Es zeigte sich weder MSK1/2 noch HSP27 in den Zellen supprimiert. Daher steht zur Diskussion, ob SB203580 in diesen Zellen überhaupt eine Funktionsminderung des p38 hervorruft.

Karaman et al. beschrieben eine Hemmung von RSK1 und RSK4 durch SB203580 (339). Es wäre deshalb nötig die Signalkaskaden, die von RSK beeinflusst werden, weiter zu untersuchen. Sollte sich dadurch eine verminderte Aktivität von etablierten Substraten des RSK zeigen, könnte die in dieser Arbeit beobachtete gesteigerte Phosphorylierung von RSK1/2/3/4 und ERK1/2 auch ein Kompensationsmechanismus der Hemmung von RSK1 und RSK4 darstellen.

Cuenda et al. führten 1995 SB203580 als einen bemerkenswert selektiven Inhibitor ein und schlossen ihre Veröffentlichung dazu mit den Worten ab: „Wir sagen vorher, dass SB203580 zur Identifizierung neuer physiologischer Eigenschaften und Substrate von p38 nützlich sein wird ... “ (15). Rückwirkend betrachtet kann festgestellt werden, dass Cuenda et al. mit dieser Einschätzung im Recht waren und der Inhibitor auch seinen Beitrag zum „War of Cancer“ leistet (1, 2).

### 7 Zusammenfassung

Dem Molekül p38 (14, 15) wurden bereits tumorpromovierende Eigenschaften zugeordnet (16-18). Ebenso finden sich Darstellungen der Kinase als Tumorsuppressor in der Literatur (20, 21). Um die zum Teil gegensätzlichen Einschätzungen von p38 einordnen zu können ist es essentiell, das verwendete Werkzeug zur Untersuchung – den p38 Inhibitor SB203580 (19) – genau zu kennen, ebenso wie seinen Einfluss auf andere Kinasen in Mammakarzinom-Zellen. So kann vermieden werden, dass Eigenschaften von anderen potentiell durch SB203580 beeinflussten Signalwegen fälschlicherweise dem p38 zugeordnet werden.

Um diese Einflüsse des SB203580 auf andere Signalwege in Mammakarzinom-Zellen aufzuzeigen, wurden in dieser Arbeit die Aktivitäten unterschiedlicher Signalwege nach SB203580-Behandlung in Phospho-Kinase-Arrays untersucht. Somit wurde ein Überblick gewonnen bei welchen Proteinen sich das Phosphorylierungsverhalten unter Einfluss von SB203580 ändert. Anschließend wurden zur Bestätigung der Ergebnisse Western-Blot-Analysen durchgeführt. Diese Vorgehensweise wurde mit den Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 sowie der nicht-malignen Zelllinie MCF-10A umgesetzt, um festzustellen, ob der Einfluss von SB203580 vom Zelltyp abhängig ist.

Die untersuchten Kinasen MSK1/2 und HSP27 liegen *downstream* von p38 (15, 167). In den MCF-10A-Zellen waren beide *downstream targets* des p38 supprimiert. In den MCF-7-Zellen war nur die Aktivität des MSK1/2 vermindert und die MDA-MB-231-Zellen zeigten kaum eine Beeinflussung von MSK1/2 und HSP27. Hier zeigte sich deutlich die Abhängigkeit des Einflusses von SB203580 vom jeweiligen Zelltyp.

ERK1/2 zeigte sich in allen drei Zelllinien vermehrt aktiv, ebenso sein *target* RSK1/2/3/4. Für c-JUN konnte in den beiden malignen Zelllinien ebenfalls eine Steigerung seiner Aktivität nachgewiesen werden. In den MCF-7-Zellen wurde auch eine gesteigerte Phosphorylierung von mTOR gezeigt. In den MCF-10A-Zellen war mTOR nicht beeinflusst und in den MDA-MB-231-Zellen gering vermindert. Die Aktivität von AKT blieb in allen drei Zelllinien unverändert.

## Zusammenfassung

---

Die verminderte Aktivität von HSP27 und MSK1/2 entspricht der Erwartung, dass eine Inhibition der *upstream* gelegenen Kinase p38 auch dessen *targets* weniger stark phosphoryliert vorliegen lässt. Für die gesteigerten Aktivitäten von ERK1/2, RSK1/2/3/4, c-JUN und mTOR gibt die Funktion der Phosphatasen zur Begrenzung der Aktivität der MAP-Kinasen einen plausiblen Erklärungsansatz. Da unter Einfluss des SB203580 mit der Inhibition des p38 ein Stimulus der Phosphatasen entfällt (346-348), sind sie weniger aktiv und begrenzen damit auch die Aktivität ihrer weiteren Substrate weniger (349-353). Dies könnte wiederum die gesteigerte Aktivität von ERK1/2, RSK1/2/3/4, c-JUN und mTOR erklären.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Sporn MB. The war on cancer. *Lancet*. 1996;347(9012):1377-81.
2. National Cancer Institute U.S. National Institutes of Health. National Cancer Act of 1971 Richard Nixon 1971 [Available from: [https://dtp.cancer.gov/timeline/flash/milestones/M4\\_Nixon.htm](https://dtp.cancer.gov/timeline/flash/milestones/M4_Nixon.htm)].
3. Koch-Institut R, e.V. GdeKiD. Krebs in Deutschland 2015/2016. Robert Koch-Institut; 2019.
4. Elmore JG, Armstrong K, Lehman CD, Fletcher SW. Screening for breast cancer. *Jama*. 2005;293(10):1245-56.
5. Freedman GM, Anderson PR, Goldstein LJ, Hanlon AL, Cianfrocca ME, Millenson MM, et al. Routine mammography is associated with earlier stage disease and greater eligibility for breast conservation in breast carcinoma patients age 40 years and older. *Cancer*. 2003;98(5):918-25.
6. Pestalozzi BC. [Therapeutic advances in breast cancer]. *Ther Umsch*. 2006;63(4):255-61.
7. Robert Koch-Institut. Übersichten zu den Krebsneuerkrankungs- und Krebssterbefällen 2016 [Available from: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2019/kid\\_2019\\_c00\\_97\\_krebs\\_gesamt.pdf?blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/kid_2019_c00_97_krebs_gesamt.pdf?blob=publicationFile)].
8. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001;344(11):783-92.
9. Swain SM, Baselga J, Kim SB, Ro J, Semiglazov V, Campone M, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(8):724-34.
10. Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med*. 2020;19(3):1997-2007.
11. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*. 1995;270(13):7420-6.
12. Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*. 1994;78(6):1027-37.

## Literaturverzeichnis

---

13. Koul HK, Pal M, Koul S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Genes Cancer*. 2013;4(9-10):342-59.
14. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 1994;372(6508):739-46.
15. Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, et al. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett*. 1995;364(2):229-33.
16. Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, et al. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*. 2001;12(1):27-36.
17. Cheng TL, Symons M, Jou TS. Regulation of anoikis by Cdc42 and Rac1. *Exp Cell Res*. 2004;295(2):497-511.
18. Greenberg AK, Basu S, Hu J, Yie TA, Tchou-Wong KM, Rom WN, et al. Selective p38 activation in human non-small cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26(5):558-64.
19. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*. 2010;429(3):403-17.
20. Ventura JJ, Tenbaum S, Perdiguero E, Huth M, Guerra C, Barbacid M, et al. p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nat Genet*. 2007;39(6):750-8.
21. Gawrzak S, Rinaldi L, Gregorio S, Arenas EJ, Salvador F, Urosevic J, et al. MSK1 regulates luminal cell differentiation and metastatic dormancy in ER(+) breast cancer. *Nat Cell Biol*. 2018;20(2):211-21.
22. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
23. Noss D, Ortmann O. Krebs und Hormone. In: Kaufmann M, Costa SD, Scharl A, editors. *Die Gynäkologie*. 3 ed. Heidelberg: Springer Medizin; 2013. p. 709-20.
24. Kaufmann M, von Minckwitz G, Scharl A, Costa SD, Linder M. Mammakarzinom. In: Kaufmann M, Costa SD, Scharl A, editors. *Die Gynäkologie*. 3 ed. Heidelberg: Springer Medizin; 2013. p. 625-708.
25. Kast K, Rhiem K, Schmutzler RK, Prieshof B, Costa SD. Genetische Beratung bei gynäkologischen Erkrankungen. In: Kaufmann M, Costa SD, Scharl A, editors. *Die Gynäkologie*. 3 ed. Heidelberg: Springer Medizin; 2013. p. 757-68.

## Literaturverzeichnis

---

26. Loman N, Johannsson O, Bendahl PO, Borg A, Fernö M, Olsson H. Steroid receptors in hereditary breast carcinomas associated with BRCA1 or BRCA2 mutations or unknown susceptibility genes. *Cancer*. 1998;83(2):310-9.
27. Newman B, Austin MA, Lee M, King MC. Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(9):3044-8.
28. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994;266(5182):66-71.
29. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG), Deutschen Krebshilfe (DKH). ©Leitlinienprogramm Onkologie S3-Leitlinie Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms Kurzversion 4.2 – Februar2020 AWMF-Registernummer: 032-045OL 2020 [Available from: [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom\\_4\\_0/Version\\_4.3/LL\\_Mammakarzinom\\_Kurzversion\\_4.2.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.3/LL_Mammakarzinom_Kurzversion_4.2.pdf)].
30. Schem C, Jonat W, Maass N. Maligne Tumoren der Mamma. In: Petru E, Fink D, Köchli OR, Loibl S, editors. *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. 5 ed. Heidelberg: Springer; 2019. p. 1-32.
31. Rane SU, Mirza H, Grigoriadis A, Pinder SE. Selection and evolution in the genomic landscape of copy number alterations in ductal carcinoma in situ (DCIS) and its progression to invasive carcinoma of ductal/no special type: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;153(1):101-21.
32. Janni W, Rack B. Mammaerkrankungen. In: Janni W, Hancke K, Fehm T, Scholz C, Rack B, editors. *Facharztwissen Gynäkologie*. 2 ed. München: Elsevier; 2017. p. 297-358.
33. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG), Deutschen Krebshilfe (DKH). S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.3, 2020,AWMF Registernummer:032-045OL Langversion 2020 [Available from: [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom\\_4\\_0/Version\\_4.3/LL\\_Mammakarzinom\\_Langversion\\_4.3.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.3/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.3.pdf)].
34. Niemeier LA, Dabbs DJ, Beriwal S, Striebel JM, Bhargava R. Androgen receptor in breast cancer: expression in estrogen receptor-positive tumors and in estrogen receptor-negative tumors with apocrine differentiation. *Mod Pathol*. 2010;23(2):205-12.
35. Badowska-Kozakiewicz AM, Budzik MP. Immunohistochemical characteristics of basal-like breast cancer. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2016;20(6):436-43.

## Literaturverzeichnis

---

36. Gala K, Chandarlapaty S. Molecular pathways: HER3 targeted therapy. *Clin Cancer Res.* 2014;20(6):1410-6.
37. Haupt B, Ro JY, Schwartz MR. Basal-like breast carcinoma: a phenotypically distinct entity. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(1):130-3.
38. Dvorkin-Gheva A, Hassell JA. Identification of a novel luminal molecular subtype of breast cancer. *PLoS One.* 2014;9(7):e103514.
39. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(16):5367-74.
40. Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(9):1619-33.
41. Sayama K, Hanakawa Y, Nagai H, Shirakata Y, Dai X, Hirakawa S, et al. Transforming growth factor-beta-activated kinase 1 is essential for differentiation and the prevention of apoptosis in epidermis. *J Biol Chem.* 2006;281(31):22013-20.
42. Kim TW, Michniewicz M, Bergmann DC, Wang ZY. Brassinosteroid regulates stomatal development by GSK3-mediated inhibition of a MAPK pathway. *Nature.* 2012;482(7385):419-22.
43. Canovas B, Nebreda AR. Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021:1-21.
44. Martínez-Limón A, Joaquin M, Caballero M, Posas F, de Nadal E. The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6).
45. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011;75(1):50-83.
46. Ferrer I, Blanco R, Carmona M, Puig B. Phosphorylated mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK-P), protein kinase of 38 kDa (p38-P), stress-activated protein kinase (SAPK/JNK-P), and calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaM kinase II) are differentially expressed in tau deposits in neurons and glial cells in tauopathies. *J Neural Transm (Vienna).* 2001;108(12):1397-415.
47. Han J, Lee JD, Tobias PS, Ulevitch RJ. Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *J Biol Chem.* 1993;268(33):25009-14.
48. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.* 1994;265(5173):808-11.
49. del Barco Barrantes I, Coya JM, Maina F, Arthur JS, Nebreda AR. Genetic analysis of specific and redundant roles for p38alpha and p38beta MAPKs during mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(31):12764-9.

## Literaturverzeichnis

---

50. Tamura K, Sudo T, Senftleben U, Dadak AM, Johnson R, Karin M. Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell*. 2000;102(2):221-31.
51. Wong ES, Le Guezennec X, Demidov ON, Marshall NT, Wang ST, Krishnamurthy J, et al. p38MAPK controls expression of multiple cell cycle inhibitors and islet proliferation with advancing age. *Dev Cell*. 2009;17(1):142-9.
52. Hale KK, Trollinger D, Rihanek M, Manthey CL. Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J Immunol*. 1999;162(7):4246-52.
53. Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, et al. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem*. 1997;272(48):30122-8.
54. Gillespie MA, Le Grand F, Scimè A, Kuang S, von Maltzahn J, Seale V, et al. p38- $\gamma$ -dependent gene silencing restricts entry into the myogenic differentiation program. *J Cell Biol*. 2009;187(7):991-1005.
55. Adams RH, Porras A, Alonso G, Jones M, Vintersten K, Panelli S, et al. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell*. 2000;6(1):109-16.
56. Mudgett JS, Ding J, Guh-Siesel L, Chartrain NA, Yang L, Gopal S, et al. Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(19):10454-9.
57. Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, Ventura JJ, Kelkar N, Tanaka Y, et al. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev*. 2003;17(16):1969-78.
58. Sumara G, Formentini I, Collins S, Sumara I, Windak R, Bodenmiller B, et al. Regulation of PKD by the MAPK p38delta in insulin secretion and glucose homeostasis. *Cell*. 2009;136(2):235-48.
59. Cuenda A, Nebreda AR. p38delta and PKD1: kinase switches for insulin secretion. *Cell*. 2009;136(2):209-10.
60. Enslen H, Raingeaud J, Davis RJ. Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem*. 1998;273(3):1741-8.
61. Alonso G, Ambrosino C, Jones M, Nebreda AR. Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms depending on signal strength. *J Biol Chem*. 2000;275(51):40641-8.
62. Doza YN, Cuenda A, Thomas GM, Cohen P, Nebreda AR. 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 Lett*. 1995;364(2):223-8.

## Literaturverzeichnis

---

63. Cuevas BD, Abell AN, Johnson GL. Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene*. 2007;26(22):3159-71.
64. Dolado I, Swat A, Ajenjo N, De Vita G, Cuadrado A, Nebreda AR. p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2007;11(2):191-205.
65. Matsuzawa A, Nishitoh H, Tobiume K, Takeda K, Ichijo H. Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice. *Antioxid Redox Signal*. 2002;4(3):415-25.
66. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*. 1996;84(2):299-308.
67. Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, Takeda K, Nakano H, Rothe M, et al. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell*. 1998;2(3):389-95.
68. Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, et al. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science*. 1995;270(5244):2008-11.
69. Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*. 1999;398(6724):252-6.
70. Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, et al. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1087-95.
71. Ono K, Ohtomo T, Ninomiya-Tsuji J, Tsuchiya M. A dominant negative TAK1 inhibits cellular fibrotic responses induced by TGF-beta. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;307(2):332-7.
72. Hocevar BA, Prunier C, Howe PH. Disabled-2 (Dab2) mediates transforming growth factor beta (TGFbeta)-stimulated fibronectin synthesis through TGFbeta-activated kinase 1 and activation of the JNK pathway. *J Biol Chem*. 2005;280(27):25920-7.
73. Kim SI, Kwak JH, Zachariah M, He Y, Wang L, Choi ME. TGF-beta-activated kinase 1 and TAK1-binding protein 1 cooperate to mediate TGF-beta1-induced MKK3-p38 MAPK activation and stimulation of type I collagen. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292(5):F1471-8.
74. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*. 2001;412(6844):346-51.
75. Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*. 2006;2006(357):re13.

## Literaturverzeichnis

---

76. Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, Zanieski GJ, Rogers AE, Traish AM, et al. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest.* 1997;100(12):2952-60.
77. Mendoza H, Campbell DG, Burness K, Hastie J, Ronkina N, Shim JH, et al. Roles for TAB1 in regulating the IL-1-dependent phosphorylation of the TAB3 regulatory subunit and activity of the TAK1 complex. *Biochem J.* 2008;409(3):711-22.
78. Zhou H, Zheng M, Chen J, Xie C, Kolatkar AR, Zarubin T, et al. Determinants that control the specific interactions between TAB1 and p38alpha. *Mol Cell Biol.* 2006;26(10):3824-34.
79. Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, et al. MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science.* 2002;295(5558):1291-4.
80. Hsu YC, Ip MM. Conjugated linoleic acid-induced apoptosis in mouse mammary tumor cells is mediated by both G protein coupled receptor-dependent activation of the AMP-activated protein kinase pathway and by oxidative stress. *Cell Signal.* 2011;23(12):2013-20.
81. Frazier WJ, Xue J, Luce WA, Liu Y. MAPK signaling drives inflammation in LPS-stimulated cardiomyocytes: the route of crosstalk to G-protein-coupled receptors. *PLoS One.* 2012;7(11):e50071.
82. Hutchison M, Berman KS, Cobb MH. Isolation of TAO1, a protein kinase that activates MEKs in stress-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem.* 1998;273(44):28625-32.
83. Chen Z, Hutchison M, Cobb MH. Isolation of the protein kinase TAO2 and identification of its mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase binding domain. *J Biol Chem.* 1999;274(40):28803-7.
84. Keyse SM. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12(2):186-92.
85. Junttila MR, Li SP, Westermarck J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *Faseb j.* 2008;22(4):954-65.
86. Wang PY, Liu P, Weng J, Sontag E, Anderson RG. A cholesterol-regulated PP2A/HePTP complex with dual specificity ERK1/2 phosphatase activity. *Embo j.* 2003;22(11):2658-67.
87. Kins S, Kurosinski P, Nitsch RM, Götz J. Activation of the ERK and JNK signaling pathways caused by neuron-specific inhibition of PP2A in transgenic mice. *Am J Pathol.* 2003;163(3):833-43.
88. Lindqvist A, de Bruijn M, Macurek L, Brás A, Mensinga A, Bruinsma W, et al. Wip1 confers G2 checkpoint recovery competence by counteracting p53-dependent transcriptional repression. *Embo j.* 2009;28(20):3196-206.

## Literaturverzeichnis

---

89. Le Guezennec X, Bulavin DV. WIP1 phosphatase at the crossroads of cancer and aging. *Trends Biochem Sci.* 2010;35(2):109-14.
90. Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene.* 2007;26(22):3203-13.
91. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(8):1358-75.
92. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68(2):320-44.
93. Shi Y, Gaestel M. In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for downstream assistance. *Biol Chem.* 2002;383(10):1519-36.
94. Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Landry J. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem.* 1993;268(32):24210-4.
95. Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Huot J, Landry J. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci.* 1997;110 ( Pt 3):357-68.
96. Mahalingam M, Cooper JA. Phosphorylation of mammalian eIF4E by Mnk1 and Mnk2: tantalizing prospects for a role in translation. *Prog Mol Subcell Biol.* 2001;27:132-42.
97. Culbert AA, Skaper SD, Howlett DR, Evans NA, Facci L, Soden PE, et al. MAPK-activated protein kinase 2 deficiency in microglia inhibits pro-inflammatory mediator release and resultant neurotoxicity. Relevance to neuroinflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2006;281(33):23658-67.
98. Thoms HC, Dunlop MG, Stark LA. p38-mediated inactivation of cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4 stimulates nucleolar translocation of RelA and apoptosis in colorectal cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67(4):1660-9.
99. Kishi H, Nakagawa K, Matsumoto M, Suga M, Ando M, Taya Y, et al. Osmotic shock induces G1 arrest through p53 phosphorylation at Ser33 by activated p38MAPK without phosphorylation at Ser15 and Ser20. *J Biol Chem.* 2001;276(42):39115-22.
100. Gubern A, Joaquin M, Marquès M, Maseres P, Garcia-Garcia J, Amat R, et al. The N-Terminal Phosphorylation of RB by p38 Bypasses Its Inactivation by CDKs and Prevents Proliferation in Cancer Cells. *Mol Cell.* 2016;64(1):25-36.
101. Lafarga V, Cuadrado A, Lopez de Silanes I, Bengoechea R, Fernandez-Capetillo O, Nebreda AR. p38 Mitogen-activated protein kinase- and HuR-dependent stabilization of p21(Cip1) mRNA mediates the G(1)/S checkpoint. *Mol Cell Biol.* 2009;29(16):4341-51.

102. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(8):537-49.
103. Park JI, Lee MG, Cho K, Park BJ, Chae KS, Byun DS, et al. Transforming growth factor-beta1 activates interleukin-6 expression in prostate cancer cells through the synergistic collaboration of the Smad2, p38-NF-kappaB, JNK, and Ras signaling pathways. *Oncogene*. 2003;22(28):4314-32.
104. Maroni PD, Koul S, Meacham RB, Koul HK. Mitogen Activated Protein kinase signal transduction pathways in the prostate. *Cell Commun Signal*. 2004;2(1):5.
105. Tsai PW, Shiah SG, Lin MT, Wu CW, Kuo ML. Up-regulation of vascular endothelial growth factor C in breast cancer cells by heregulin-beta 1. A critical role of p38/nuclear factor-kappa B signaling pathway. *J Biol Chem*. 2003;278(8):5750-9.
106. Suarez-Cuervo C, Merrell MA, Watson L, Harris KW, Rosenthal EL, Väänänen HK, et al. Breast cancer cells with inhibition of p38alpha have decreased MMP-9 activity and exhibit decreased bone metastasis in mice. *Clin Exp Metastasis*. 2004;21(6):525-33.
107. Kumar B, Sinclair J, Khandrika L, Koul S, Wilson S, Koul HK. Differential effects of MAPKs signaling on the growth of invasive bladder cancer cells. *Int J Oncol*. 2009;34(6):1557-64.
108. Kumar B, Koul S, Petersen J, Khandrika L, Hwa JS, Meacham RB, et al. p38 mitogen-activated protein kinase-driven MAPKAPK2 regulates invasion of bladder cancer by modulation of MMP-2 and MMP-9 activity. *Cancer Res*. 2010;70(2):832-41.
109. Iyoda K, Sasaki Y, Horimoto M, Toyama T, Yakushijin T, Sakakibara M, et al. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2003;97(12):3017-26.
110. Elenitoba-Johnson KS, Jenson SD, Abbott RT, Palais RA, Bohling SD, Lin Z, et al. Involvement of multiple signaling pathways in follicular lymphoma transformation: p38-mitogen-activated protein kinase as a target for therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(12):7259-64.
111. Lin Z, Crockett DK, Jenson SD, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS. Quantitative proteomic and transcriptional analysis of the response to the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 in transformed follicular lymphoma cells. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3(8):820-33.
112. Liu RY, Fan C, Liu G, Olashaw NE, Zuckerman KS. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for tumor necrosis factor-alpha -supported proliferation of leukemia and lymphoma cell lines. *J Biol Chem*. 2000;275(28):21086-93.
113. Cánovas B, Igea A, Sartori AA, Gomis RR, Paull TT, Isoda M, et al. Targeting p38 $\alpha$  Increases DNA Damage, Chromosome Instability, and the Anti-tumoral Response to Taxanes in Breast Cancer Cells. *Cancer Cell*. 2018;33(6):1094-110.e8.

## Literaturverzeichnis

---

114. Leelahavanichkul K, Amornphimoltham P, Molinolo AA, Basile JR, Koontongkaew S, Gutkind JS. A role for p38 MAPK in head and neck cancer cell growth and tumor-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Mol Oncol*. 2014;8(1):105-18.
115. Bhowmick NA, Zent R, Ghiassi M, McDonnell M, Moses HL. Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *J Biol Chem*. 2001;276(50):46707-13.
116. Arechederra M, Priego N, Vázquez-Carballo A, Sequera C, Gutiérrez-Uzquiza Á, Cerezo-Guisado MI, et al. p38 MAPK down-regulates fibulin 3 expression through methylation of gene regulatory sequences: role in migration and invasion. *J Biol Chem*. 2015;290(7):4383-97.
117. Vergote I, Heitz F, Buderath P, Powell M, Sehouli J, Lee CM, et al. 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. *Gynecol Oncol*. 2020;156(1):23-31.
118. Soni S, Anand P, Padwad YS. MAPKAPK2: the master regulator of RNA-binding proteins modulates transcript stability and tumor progression. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):121.
119. Trempelec N, Dave-Coll N, Nebreda AR. SnapShot: p38 MAPK substrates. *Cell*. 2013;152(4):924-.e1.
120. Igea A, Nebreda AR. The Stress Kinase p38 $\alpha$  as a Target for Cancer Therapy. *Cancer Res*. 2015;75(19):3997-4002.
121. Astolfi A, Iraci N, Manfroni G, Barreca ML, Cecchetti V. A Comprehensive Structural Overview of p38 $\alpha$  MAPK in Complex with Type I Inhibitors. *ChemMedChem*. 2015;10(6):957-69.
122. Cuenda A, Cohen P, Buée-Scherrer V, Goedert M. Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *Embo j*. 1997;16(2):295-305.
123. Kumar S, McDonnell PC, Gum RJ, Hand AT, Lee JC, Young PR. Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;235(3):533-8.
124. Koeberle SC, Romir J, Fischer S, Koeberle A, Schattel V, Albrecht W, et al. Skepinone-L is a selective p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor. *Nat Chem Biol*. 2011;8(2):141-3.
125. Karin M, Gallagher E. From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life*. 2005;57(4-5):283-95.

## Literaturverzeichnis

---

126. Kyriakis JM, Avruch J. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem.* 1990;265(28):17355-63.
127. Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Dérijard B, et al. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo j.* 1996;15(11):2760-70.
128. Yasuda J, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sharma M, Davis RJ. The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol.* 1999;19(10):7245-54.
129. Dérijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, et al. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell.* 1994;76(6):1025-37.
130. Sánchez I, Hughes RT, Mayer BJ, Yee K, Woodgett JR, Avruch J, et al. Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature.* 1994;372(6508):794-8.
131. Moriguchi T, Toyoshima F, Masuyama N, Hanafusa H, Gotoh Y, Nishida E. A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNFalpha and cellular stresses. *Embo j.* 1997;16(23):7045-53.
132. Marinissen MJ, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22(7):368-76.
133. Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, et al. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell.* 1995;81(7):1137-46.
134. Fuchs SY, Adler V, Pincus MR, Ronai Z. MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(18):10541-6.
135. Lei K, Nimnual A, Zong WX, Kennedy NJ, Flavell RA, Thompson CB, et al. The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Cell Biol.* 2002;22(13):4929-42.
136. Win S, Than TA, Kaplowitz N. The Regulation of JNK Signaling Pathways in Cell Death through the Interplay with Mitochondrial SAB and Upstream Post-Translational Effects. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11).
137. Donovan N, Becker EB, Konishi Y, Bonni A. JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J Biol Chem.* 2002;277(43):40944-9.
138. Yu C, Minemoto Y, Zhang J, Liu J, Tang F, Bui TN, et al. JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol Cell.* 2004;13(3):329-40.
139. Zhang J, Liu J, Yu C, Lin A. BAD Ser128 is not phosphorylated by c-Jun NH2-terminal kinase for promoting apoptosis. *Cancer Res.* 2005;65(18):8372-8.

## Literaturverzeichnis

---

140. Gupta S, Campbell D, Dérijard B, Davis RJ. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*. 1995;267(5196):389-93.
141. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev*. 1993;7(11):2135-48.
142. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(11):859-68.
143. Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9(2):240-6.
144. English JM, Vanderbilt CA, Xu S, Marcus S, Cobb MH. Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms. *J Biol Chem*. 1995;270(48):28897-902.
145. Roskoski R, Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*. 2012;66(2):105-43.
146. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007;26(22):3279-90.
147. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, et al. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*. 1991;65(4):663-75.
148. Marchi M, D'Antoni A, Formentini I, Parra R, Brambilla R, Ratto GM, et al. The N-terminal domain of ERK1 accounts for the functional differences with ERK2. *PLoS One*. 2008;3(12):e3873.
149. Pagès G, Guérin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, et al. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science*. 1999;286(5443):1374-7.
150. Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, et al. Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron*. 2002;34(5):807-20.
151. Morimoto H, Kondoh K, Nishimoto S, Terasawa K, Nishida E. Activation of a C-terminal transcriptional activation domain of ERK5 by autophosphorylation. *J Biol Chem*. 2007;282(49):35449-56.
152. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001;410(6824):37-40.
153. Bandaru P, Kondo Y, Kuriyan J. The Interdependent Activation of Son-of-Sevenless and Ras. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9(2).
154. Dhillon AS, Meikle S, Yazici Z, Eulitz M, Kolch W. Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *Embo j*. 2002;21(1-2):64-71.

## Literaturverzeichnis

---

155. Jones JC, Renfro LA, Al-Shamsi HO, Schrock AB, Rankin A, Zhang BY, et al. (Non-V600) BRAF Mutations Define a Clinically Distinct Molecular Subtype of Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2017;35(23):2624-30.
156. Catling AD, Schaeffer HJ, Reuter CW, Reddy GR, Weber MJ. A proline-rich sequence unique to MEK1 and MEK2 is required for raf binding and regulates MEK function. *Mol Cell Biol.* 1995;15(10):5214-25.
157. Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science.* 1992;258(5081):478-80.
158. Canagarajah BJ, Khokhlatchev A, Cobb MH, Goldsmith EJ. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell.* 1997;90(5):859-69.
159. Butch ER, Guan KL. Characterization of ERK1 activation site mutants and the effect on recognition by MEK1 and MEK2. *J Biol Chem.* 1996;271(8):4230-5.
160. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* 2000;351 Pt 2(Pt 2):289-305.
161. O'Neill E, Kolch W. Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br J Cancer.* 2004;90(2):283-8.
162. Liu ZX, Yu CF, Nickel C, Thomas S, Cantley LG. Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. *J Biol Chem.* 2002;277(12):10452-8.
163. Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresh DA. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol.* 1997;137(2):481-92.
164. Ulisse S, Cinque B, Silvano G, Rucci N, Biordi L, Cifone MG, et al. Erk-dependent cytosolic phospholipase A2 activity is induced by CD95 ligand cross-linking in the mouse derived Sertoli cell line TM4 and is required to trigger apoptosis in CD95 bearing cells. *Cell Death Differ.* 2000;7(10):916-24.
165. Anjum R, Blenis J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(10):747-58.
166. Sturgill TW, Ray LB, Erikson E, Maller JL. Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature.* 1988;334(6184):715-8.
167. Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *Embo j.* 1998;17(15):4426-41.
168. Dümmler BA, Hauge C, Silber J, Yntema HG, Kruse LS, Kofoed B, et al. Functional characterization of human RSK4, a new 90-kDa ribosomal S6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types. *J Biol Chem.* 2005;280(14):13304-14.

## Literaturverzeichnis

---

169. Roux PP, Richards SA, Blenis J. Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity. *Mol Cell Biol.* 2003;23(14):4796-804.
170. Zaru R, Ronkina N, Gaestel M, Arthur JSC, Watts C. The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways. *Nature Immunology.* 2007;8(11):1227-35.
171. Frödin M, Gammeltoft S. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol.* 1999;151(1-2):65-77.
172. De Cesare D, Jacquot S, Hanauer A, Sassone-Corsi P. Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(21):12202-7.
173. Bruning JC, Gillette JA, Zhao Y, Bjorbaeck C, Kotzka J, Knebel B, et al. Ribosomal subunit kinase-2 is required for growth factor-stimulated transcription of the c-Fos gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(6):2462-7.
174. Nikolakaki E, Coffey PJ, Hemelsoet R, Woodgett JR, Defize LH. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates Jun family members in vitro and negatively regulates their transactivating potential in intact cells. *Oncogene.* 1993;8(4):833-40.
175. Frödin M, Antal TL, Dümmler BA, Jensen CJ, Deak M, Gammeltoft S, et al. A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *Embo j.* 2002;21(20):5396-407.
176. McCoy CE, Campbell DG, Deak M, Bloomberg GB, Arthur JS. MSK1 activity is controlled by multiple phosphorylation sites. *Biochem J.* 2005;387(Pt 2):507-17.
177. Tomás-Zuber M, Mary JL, Lesslauer W. Control sites of ribosomal S6 kinase B and persistent activation through tumor necrosis factor. *J Biol Chem.* 2000;275(31):23549-58.
178. Zhang Y, Cho YY, Petersen BL, Zhu F, Dong Z. Evidence of STAT1 phosphorylation modulated by MAPKs, MEK1 and MSK1. *Carcinogenesis.* 2004;25(7):1165-75.
179. Zhang Y, Liu G, Dong Z. MSK1 and JNKs mediate phosphorylation of STAT3 in UVA-irradiated mouse epidermal JB6 cells. *J Biol Chem.* 2001;276(45):42534-42.
180. Soloaga A, Thomson S, Wiggin GR, Rampersaud N, Dyson MH, Hazzalin CA, et al. MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *Embo j.* 2003;22(11):2788-97.
181. Reyskens KM, Arthur JS. Emerging Roles of the Mitogen and Stress Activated Kinases MSK1 and MSK2. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:56.
182. Ananieva O, Darragh J, Johansen C, Carr JM, McIlrath J, Park JM, et al. The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol.* 2008;9(9):1028-36.

## Literaturverzeichnis

---

183. Delghandi MP, Johannessen M, Moens U. The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. *Cell Signal*. 2005;17(11):1343-51.
184. Pires BR, Mencalha AL, Ferreira GM, de Souza WF, Morgado-Díaz JA, Maia AM, et al. NF-kappaB Is Involved in the Regulation of EMT Genes in Breast Cancer Cells. *PLoS One*. 2017;12(1):e0169622.
185. Gilmore TD, Garbati MR. Inhibition of NF-kB signaling as a strategy in disease therapy. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2011;349:245-63.
186. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, et al. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene*. 1999;18(3):813-22.
187. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*. 1988;53(4):549-54.
188. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*. 1987;327(6120):293-7.
189. Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, Williams ED, Goyns M, Stringer B, et al. High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene*. 1989;4(2):159-64.
190. Rodenhuis S, Slebos RJ, Boot AJ, Evers SG, Mooi WJ, Wagenaar SS, et al. Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res*. 1988;48(20):5738-41.
191. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
192. Nowell PC. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut*. 1962;8:65-6.
193. Kelliher MA, McLaughlin J, Witte ON, Rosenberg N. Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(17):6649-53.
194. Neshat MS, Raitano AB, Wang HG, Reed JC, Sawyers CL. The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf. *Mol Cell Biol*. 2000;20(4):1179-86.
195. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*. 1995;80(2):285-91.
196. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(1):103-19.

## Literaturverzeichnis

---

197. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* 2004;64(19):7099-109.
198. Aboud-Pirak E, Hurwitz E, Pirak ME, Bellot F, Schlessinger J, Sela M. Efficacy of Antibodies to Epidermal Growth Factor Receptor Against KB Carcinoma In Vitro and in Nude Mice. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* 1988;80(20):1605-11.
199. Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, Davis CG. Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2001;38(1):17-23.
200. Pentheroudakis G, Kotoula V, De Roock W, Kouvatsos G, Papakostas P, Makatsoris T, et al. Biomarkers of benefit from cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer: interaction of EGFR ligand expression with RAS/RAF, PIK3CA genotypes. *BMC Cancer.* 2013;13:49.
201. Afrăsânie VA, Marinca MV, Alexa-Stratulat T, Gafton B, Păduraru M, Adavidoaiei AM, et al. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer - practical implications for the clinician. *Radiol Oncol.* 2019;53(3):265-74.
202. Kelly H, Goldberg RM. Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: current options, current evidence. *J Clin Oncol.* 2005;23(20):4553-60.
203. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol.* 2010;28(3):466-74.
204. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.* 2004;30(2):193-204.
205. Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science.* 1991;254(5029):274-7.
206. Alessi DR, Caudwell FB, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* 1996;399(3):333-8.
207. Jones PF, Jakubowicz T, Hemmings BA. Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. *Cell Regul.* 1991;2(12):1001-9.
208. Konishi H, Kuroda S, Tanaka M, Matsuzaki H, Ono Y, Kameyama K, et al. Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of three types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;216(2):526-34.

## Literaturverzeichnis

---

209. Carpenter CL, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8(2):153-8.
210. Villar-Palasi C, Lerner J. Insulin-mediated effect on the activity of UDPG-glycogen transglucosylase of muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1960;39:171-3.
211. Kohn AD, Kovacina KS, Roth RA. Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. *Embo j.* 1995;14(17):4288-95.
212. Lee J, Pilch PF. The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am J Physiol.* 1994;266(2 Pt 1):C319-34.
213. Jacobs S, Hazum E, Cuatrecasas P. The subunit structure of rat liver insulin receptor. Antibodies directed against the insulin-binding subunit. *J Biol Chem.* 1980;255(14):6937-40.
214. Massague J, Pilch PF, Czech MP. Electrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unique subunit stoichiometries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(12):7137-41.
215. Jacobs S, Kull FC, Jr., Cuatrecasas P. Monensin blocks the maturation of receptors for insulin and somatomedin C: identification of receptor precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(5):1228-31.
216. Rosen OM, Herrera R, Olowe Y, Petruzzelli LM, Cobb MH. Phosphorylation activates the insulin receptor tyrosine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(11):3237-40.
217. Myers MG, Jr., White MF. The new elements of insulin signaling. Insulin receptor substrate-1 and proteins with SH2 domains. *Diabetes.* 1993;42(5):643-50.
218. Okamoto M, Hayashi T, Kono S, Inoue G, Kubota M, Okamoto M, et al. Specific activity of phosphatidylinositol 3-kinase is increased by insulin stimulation. *Biochem J.* 1993;290 ( Pt 2)(Pt 2):327-33.
219. Hiles ID, Otsu M, Volinia S, Fry MJ, Gout I, Dhand R, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell.* 1992;70(3):419-29.
220. Whitman M, Downes CP, Keeler M, Keller T, Cantley L. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature.* 1988;332(6165):644-6.
221. Fu W, Hall MN. Regulation of mTORC2 Signaling. *Genes (Basel).* 2020;11(9).
222. Pawson T, Nash P. Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev.* 2000;14(9):1027-47.

## Literaturverzeichnis

---

223. Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, et al. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol.* 1997;7(10):776-89.
224. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B. *Curr Biol.* 1997;7(4):261-9.
225. Liu P, Gan W, Chin YR, Ogura K, Guo J, Zhang J, et al. PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-Dependent Activation of the mTORC2 Kinase Complex. *Cancer Discov.* 2015;5(11):1194-209.
226. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo j.* 1996;15(23):6541-51.
227. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005;307(5712):1098-101.
228. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol.* 2004;14(14):1296-302.
229. Govers R. Cellular regulation of glucose uptake by glucose transporter GLUT4. *Adv Clin Chem.* 2014;66:173-240.
230. Huang X, Liu G, Guo J, Su Z. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *Int J Biol Sci.* 2018;14(11):1483-96.
231. Moule SK, Welsh GI, Edgell NJ, Foulstone EJ, Proud CG, Denton RM. Regulation of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 by insulin and beta-adrenergic agonists in rat epididymal fat cells. Activation of protein kinase B by wortmannin-sensitive and -insensitive mechanisms. *J Biol Chem.* 1997;272(12):7713-9.
232. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 1995;378(6559):785-9.
233. Parker PJ, Caudwell FB, Cohen P. Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle; effect of insulin on the state of phosphorylation of the seven phosphoserine residues in vivo. *Eur J Biochem.* 1983;130(1):227-34.
234. Tee AR, Fingar DC, Manning BD, Kwiatkowski DJ, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(21):13571-6.

## Literaturverzeichnis

---

235. Potter CJ, Huang H, Xu T. Drosophila Tsc1 functions with Tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. *Cell*. 2001;105(3):357-68.
236. Garami A, Zwartkuis FJ, Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, Stocker H, et al. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell*. 2003;11(6):1457-66.
237. Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(4):1432-7.
238. Morley SJ, Thomas G. Intracellular messengers and the control of protein synthesis. *Pharmacol Ther*. 1991;50(3):291-319.
239. Ferrari S, Thomas G. S6 phosphorylation and the p70s6k/p85s6k. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1994;29(6):385-413.
240. Van de Sande T, De Schrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in the overexpression of fatty acid synthase in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2002;62(3):642-6.
241. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*. 1998;12(22):3499-511.
242. Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol*. 1994;14(3):1669-79.
243. Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle*. 2003;2(4):339-45.
244. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997;91(2):231-41.
245. Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(20):11598-603.
246. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol*. 1999;9(11):601-4.
247. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):489-501.
248. Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, et al. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol*. 2004;166(2):213-23.

## Literaturverzeichnis

---

249. Shah OJ, Hunter T. Turnover of the active fraction of IRS1 involves raptor-mTOR- and S6K1-dependent serine phosphorylation in cell culture models of tuberous sclerosis. *Mol Cell Biol.* 2006;26(17):6425-34.
250. Tzatsos A, Kandror KV. Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 2006;26(1):63-76.
251. Weng LP, Smith WM, Brown JL, Eng C. PTEN inhibits insulin-stimulated MEK/MAPK activation and cell growth by blocking IRS-1 phosphorylation and IRS-1/Grb-2/Sos complex formation in a breast cancer model. *Hum Mol Genet.* 2001;10(6):605-16.
252. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997;275(5308):1943-7.
253. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet.* 1997;15(4):356-62.
254. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.* 1998;273(22):13375-8.
255. Andjelković M, Jakubowicz T, Cron P, Ming XF, Han JW, Hemmings BA. Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(12):5699-704.
256. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* 2017;169(3):381-405.
257. Gao T, Furnari F, Newton AC. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell.* 2005;18(1):13-24.
258. Sabatini DM, Pierchala BA, Barrow RK, Schell MJ, Snyder SH. The rapamycin and FKBP12 target (RAFT) displays phosphatidylinositol 4-kinase activity. *J Biol Chem.* 1995;270(36):20875-8.
259. Reynolds THt, Bodine SC, Lawrence JC, Jr. Control of Ser2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. *J Biol Chem.* 2002;277(20):17657-62.
260. Hoeffler CA, Klann E. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci.* 2010;33(2):67-75.
261. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell.* 2009;137(5):873-86.

## Literaturverzeichnis

---

262. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, et al. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell*. 2003;11(4):895-904.
263. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*. 2002;110(2):177-89.
264. Woo SY, Kim DH, Jun CB, Kim YM, Haar EV, Lee SI, et al. PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. *J Biol Chem*. 2007;282(35):25604-12.
265. Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA, et al. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol*. 2006;16(18):1865-70.
266. Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, et al. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet*. 1999;21(1):99-102.
267. Hollestelle A, Elstrodt F, Nagel JH, Kallemeijn WW, Schutte M. Phosphatidylinositol-3-OH kinase or RAS pathway mutations in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer Res*. 2007;5(2):195-201.
268. Ma YY, Wei SJ, Lin YC, Lung JC, Chang TC, Whang-Peng J, et al. PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene*. 2000;19(23):2739-44.
269. American Type Culture Collection. Cell Lines by Gene Mutation 2019 [Available from: [https://www.atcc.org/~media/pdfs/culture%20guides/cell\\_lines\\_by\\_gene\\_mutation.as\\_hx](https://www.atcc.org/~media/pdfs/culture%20guides/cell_lines_by_gene_mutation.as_hx)].
270. Hennessey BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(12):988-1004.
271. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1784(1):150-8.
272. Livasy CA, Reading FC, Moore DT, Boggess JF, Lininger RA. EGFR expression and HER2/neu overexpression/amplification in endometrial carcinosarcoma. *Gynecol Oncol*. 2006;100(1):101-6.
273. Weng LP, Smith WM, Dahia PL, Ziebold U, Gil E, Lees JA, et al. PTEN suppresses breast cancer cell growth by phosphatase activity-dependent G1 arrest followed by cell death. *Cancer Res*. 1999;59(22):5808-14.
274. Lu Y, Lin YZ, LaPushin R, Cuevas B, Fang X, Yu SX, et al. The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells. *Oncogene*. 1999;18(50):7034-45.

## Literaturverzeichnis

---

275. Brenner W, Färber G, Herget T, Lehr HA, Hengstler JG, Thüroff JW. Loss of tumor suppressor protein PTEN during renal carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2002;99(1):53-7.
276. Gilchrist JA, Best CH, Banting FG. Observations with Insulin on Department of Soldiers' Civil Re-Establishment Diabetics. *Can Med Assoc J*. 1923;13(8):565-72.
277. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*. 1994;269(7):5241-8.
278. Hu L, Hofmann J, Lu Y, Mills GB, Jaffe RB. Inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase increases efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *Cancer Res*. 2002;62(4):1087-92.
279. Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res*. 2001;61(10):3986-97.
280. Dancey JE. Inhibitors of the mammalian target of rapamycin. *Expert Opin Investig Drugs*. 2005;14(3):313-28.
281. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006;124(3):471-84.
282. Müller R, Büllsfeld L, Gerckens U, Grube E. [State of treatment of coronary artery disease by drug releasing stents]. *Herz*. 2002;27(6):508-13.
283. Gershlick AH. Drug eluting stents in 2005. *Heart*. 2005;91 Suppl 3(Suppl 3):iii24-31.
284. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*. 2008;372(9637):449-56.
285. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 2006;10(6):515-27.
286. Soule HD, McGrath CM. A simplified method for passage and long-term growth of human mammary epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1986;22(1):6-12.
287. Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD, Jr., Brenz R, McGrath CM, et al. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res*. 1990;50(18):6075-86.
288. Tait L, Soule HD, Russo J. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of an immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res*. 1990;50(18):6087-94.

## Literaturverzeichnis

---

289. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51(5):1409-16.
290. American Type Culture Collection. TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER PANELS 2008 [Available from: <https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/03E3D0D9F0C74FE593CE7D010F982CA2.ashx>].
291. Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ, Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst.* 1974;53(3):661-74.
292. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76-85.
293. Nielsen UB, Cardone MH, Sinskey AJ, MacBeath G, Sorger PK. Profiling receptor tyrosine kinase activation by using Ab microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(16):9330-5.
294. Korf U, Derdak S, Tresch A, Henjes F, Schumacher S, Schmidt C, et al. Quantitative protein microarrays for time-resolved measurements of protein phosphorylation. *Proteomics.* 2008;8(21):4603-12.
295. Bade S, Röckendorf N, Frey A, Petersen A. Detektion von Protein und Nucleinsäure auf Membran: Western Blotting. In: Jansohn M, Rothhämel S, editors. *Gentechnische Methoden Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* 5th ed. 2012 ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2012. p. 279-308.
296. Jüstel T, Schwung S. *Leuchtstoffe, Lichtquellen, Laser, Lumineszenz.* 2nd ed. 2019 ed. Berlin: Springer-Verlag GmbH; 2019.
297. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(7):3116-20.
298. Dechert U. Gelelektrophoresen. In: Jansohn M, Rothhämel S, editors. *Gentechnische Methoden Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* 5th ed. 2012 ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2012. p. 37-94.
299. Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods.* 1984;10(3-4):203-9.
300. Gültekin H, Heermann KH. The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem.* 1988;172(2):320-9.

## Literaturverzeichnis

---

301. Fazekas de St Groth S, Webster RG, Datyner A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta*. 1963;71:377-91.
302. Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT. TISSUE CULTURE STUDIES OF THE PROLIFERATIVE CAPACITY OF CERVICAL CARCINOMA AND NORMAL EPITHELIUM. *Cancer Res*. 1952;12(4):264-5.
303. Hazzalin CA, Cuenda A, Cano E, Cohen P, Mahadevan LC. Effects of the inhibition of p38/RK MAP kinase on induction of five fos and jun genes by diverse stimuli. *Oncogene*. 1997;15(19):2321-31.
304. Henklova P, Vrzal R, Papouskova B, Bednar P, Jancova P, Anzenbacherova E, et al. SB203580, a pharmacological inhibitor of p38 MAP kinase transduction pathway activates ERK and JNK MAP kinases in primary cultures of human hepatocytes. *Eur J Pharmacol*. 2008;593(1-3):16-23.
305. Birkenkamp KU, Tuyt LM, Lummen C, Wierenga AT, Kruijer W, Vellenga E. The p38 MAP kinase inhibitor SB203580 enhances nuclear factor-kappa B transcriptional activity by a non-specific effect upon the ERK pathway. *Br J Pharmacol*. 2000;131(1):99-107.
306. Kitamura T, Tojo A, Kuwaki T, Chiba S, Miyazono K, Urabe A, et al. Identification and analysis of human erythropoietin receptors on a factor-dependent cell line, TF-1. *Blood*. 1989;73(2):375-80.
307. Schwartz SO, Critchlow J. Erythremic myelosis (Di Guglielmo's disease); critical review with report of four cases, and comments on erythroleukemia. *Blood*. 1952;7(8):765-93.
308. Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer*. 1976;17(1):62-70.
309. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1973;51(5):1417-23.
310. Muniyappa H, Das KC. Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by widely used specific p38 MAPK inhibitors SB202190 and SB203580: a MLK-3-MKK7-dependent mechanism. *Cell Signal*. 2008;20(4):675-83.
311. Boyle WJ, Smeal T, Defize LH, Angel P, Woodgett JR, Karin M, et al. Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell*. 1991;64(3):573-84.
312. Meng Q, Xia Y. c-Jun, at the crossroad of the signaling network. *Protein Cell*. 2011;2(11):889-98.

## Literaturverzeichnis

---

313. Zhang Y, Zhong S, Dong Z, Chen N, Bode AM, Ma W, et al. UVA induces Ser381 phosphorylation of p90RSK/MAPKAP-K1 via ERK and JNK pathways. *J Biol Chem.* 2001;276(18):14572-80.
314. Czaplinska D, Turczyk L, Grudowska A, Mieszkowska M, Lipinska AD, Skladanowski AC, et al. Phosphorylation of RSK2 at Tyr529 by FGFR2-p38 enhances human mammary epithelial cells migration. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(11):2461-70.
315. Zuluaga S, Alvarez-Barrientos A, Gutiérrez-Uzquiza A, Benito M, Nebreda AR, Porras A. Negative regulation of Akt activity by p38alpha MAP kinase in cardiomyocytes involves membrane localization of PP2A through interaction with caveolin-1. *Cell Signal.* 2007;19(1):62-74.
316. Seimon TA, Wang Y, Han S, Senokuchi T, Schrijvers DM, Kuriakose G, et al. Macrophage deficiency of p38alpha MAPK promotes apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions in mice. *J Clin Invest.* 2009;119(4):886-98.
317. Wu R, Kausar H, Johnson P, Montoya-Durango DE, Merchant M, Rane MJ. Hsp27 regulates Akt activation and polymorphonuclear leukocyte apoptosis by scaffolding MK2 to Akt signal complex. *J Biol Chem.* 2007;282(30):21598-608.
318. Lali FV, Hunt AE, Turner SJ, Foxwell BM. 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. *J Biol Chem.* 2000;275(10):7395-402.
319. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell.* 2005;121(2):179-93.
320. Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(37):13489-94.
321. Recchia AG, Musti AM, Lanzino M, Panno ML, Turano E, Zumpano R, et al. A cross-talk between the androgen receptor and the epidermal growth factor receptor leads to p38MAPK-dependent activation of mTOR and cyclinD1 expression in prostate and lung cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(3):603-14.
322. Fitzpatrick SL, LaChance MP, Schultz GS. Characterization of epidermal growth factor receptor and action on human breast cancer cells in culture. *Cancer Res.* 1984;44(8):3442-7.
323. Markou T, Lazou A. Phosphorylation and activation of mitogen- and stress-activated protein kinase-1 in adult rat cardiac myocytes by G-protein-coupled receptor agonists requires both extracellular-signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem J.* 2002;365(Pt 3):757-63.

## Literaturverzeichnis

---

324. Wang J, Wang G, Cheng D, Huang S, Chang A, Tan X, et al. Her2 promotes early dissemination of breast cancer by suppressing the p38-MK2-Hsp27 pathway that is targetable by Wip1 inhibition. *Oncogene*. 2020;39(40):6313-26.
325. Casado P, Zuazua-Villar P, Prado MA, Valle ED, Iglesias JM, Martínez-Campa C, et al. Characterization of HSP27 phosphorylation induced by microtubule interfering agents: implication of p38 signalling pathway. *Arch Biochem Biophys*. 2007;461(1):123-9.
326. Wang G, Jiao H, Zheng JN, Sun X. HSP27 regulates TGF- $\beta$  mediated lung fibroblast differentiation through the Smad3 and ERK pathways. *Int J Mol Med*. 2017;39(1):183-90.
327. Zoubeydi A, Zardan A, Wiedmann RM, Locke J, Beraldi E, Fazli L, et al. Hsp27 promotes insulin-like growth factor-I survival signaling in prostate cancer via p90Rsk-dependent phosphorylation and inactivation of BAD. *Cancer Res*. 2010;70(6):2307-17.
328. Qi S, Xin Y, Qi Z, Xu Y, Diao Y, Lan L, et al. HSP27 phosphorylation modulates TRAIL-induced activation of Src-Akt/ERK signaling through interaction with  $\beta$ -arrestin2. *Cell Signal*. 2014;26(3):594-602.
329. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Gatto jr. GJ. *Biochemie*. 7. Auflage ed. Heidelberg: Springer Spektrum; 2014.
330. Carbajo D, Magi S, Itoh M, Kawaji H, Lassmann T, Arner E, et al. Application of Gene Expression Trajectories Initiated from ErbB Receptor Activation Highlights the Dynamics of Divergent Promoter Usage. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144176.
331. Tajti J, Kuris A, Vécsei L, Xu CB, Edvinsson L. Organ culture of the trigeminal ganglion induces enhanced expression of calcitonin gene-related peptide via activation of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2. *Cephalalgia*. 2011;31(1):95-105.
332. Eppstein AC, Sandoval JA, Klein PJ, Woodruff HA, Grosfeld JL, Hickey RJ, et al. Differential sensitivity of chemoresistant neuroblastoma subtypes to MAPK-targeted treatment correlates with ERK, p53 expression, and signaling response to U0126. *J Pediatr Surg*. 2006;41(1):252-9.
333. Okada Y, Saika S, Shirai K, Yamanaka O, Kitano A, Wang Z, et al. JNK MAPK signaling contributes in vivo to injury-induced corneal epithelial migration. *Ophthalmic Res*. 2009;42(4):185-92.
334. Breitbach A. Wirkung unterschiedlicher p38 MAPK-Inhibitoren auf das funktionelle Verhalten von Mammakarzinomzellen [Dissertation]. Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. 2020.
335. Engelhardt JT. Molekulare Bedeutung von p38 für Mammakarzinom-Zellen [Dissertation]. Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. 2021.

## Literaturverzeichnis

---

336. Healy S, Khan P, Davie JR. Immediate early response genes and cell transformation. *Pharmacol Ther.* 2013;137(1):64-77.
337. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene.* 2000;19(21):2474-88.
338. Sinibaldi D, Wharton W, Turkson J, Bowman T, Pledger WJ, Jove R. Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. *Oncogene.* 2000;19(48):5419-27.
339. Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, Gallant P, Atteridge CE, Campbell BT, et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol.* 2008;26(1):127-32.
340. Fabian MA, Biggs WH, 3rd, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, et al. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat Biotechnol.* 2005;23(3):329-36.
341. Chen G, Hitomi M, Han J, Stacey DW. The p38 pathway provides negative feedback for Ras proliferative signaling. *J Biol Chem.* 2000;275(50):38973-80.
342. Singh RP, Dhawan P, Golden C, Kapoor GS, Mehta KD. One-way cross-talk between p38(MAPK) and p42/44(MAPK). Inhibition of p38(MAPK) induces low density lipoprotein receptor expression through activation of the p42/44(MAPK) cascade. *J Biol Chem.* 1999;274(28):19593-600.
343. Lee J, Hong F, Kwon S, Kim SS, Kim DO, Kang HS, et al. Activation of p38 MAPK induces cell cycle arrest via inhibition of Raf/ERK pathway during muscle differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;298(5):765-71.
344. Kogkopoulou O, Tzakos E, Mavrothalassitis G, Baldari CT, Paliogianni F, Young HA, et al. Conditional up-regulation of IL-2 production by p38 MAPK inactivation is mediated by increased Erk1/2 activity. *J Leukoc Biol.* 2006;79(5):1052-60.
345. Hong SS, Qian H, Zhao P, Bazy-Asaad A, Xia Y. Anisomycin protects cortical neurons from prolonged hypoxia with differential regulation of p38 and ERK. *Brain Res.* 2007;1149:76-86.
346. Hu JH, Chen T, Zhuang ZH, Kong L, Yu MC, Liu Y, et al. Feedback control of MKP-1 expression by p38. *Cell Signal.* 2007;19(2):393-400.
347. Manetsch M, Che W, Seidel P, Chen Y, Ammit AJ. MKP-1: a negative feedback effector that represses MAPK-mediated pro-inflammatory signaling pathways and cytokine secretion in human airway smooth muscle cells. *Cell Signal.* 2012;24(4):907-13.
348. Alvarado-Kristensson M, Andersson T. Protein phosphatase 2A regulates apoptosis in neutrophils by dephosphorylating both p38 MAPK and its substrate caspase 3. *J Biol Chem.* 2005;280(7):6238-44.

## Literaturverzeichnis

---

349. Franklin CC, Kraft AS. Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. *J Biol Chem.* 1997;272(27):16917-23.
350. Avdi NJ, Malcolm KC, Nick JA, Worthen GS. A role for protein phosphatase-2A in p38 mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of the c-Jun NH(2)-terminal kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem.* 2002;277(43):40687-96.
351. Sontag E, Fedorov S, Kamibayashi C, Robbins D, Cobb M, Mumby M. The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell.* 1993;75(5):887-97.
352. Li SP, Junttila MR, Han J, Kähäri VM, Westermarck J. p38 Mitogen-activated protein kinase pathway suppresses cell survival by inducing dephosphorylation of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase1,2. *Cancer Res.* 2003;63(13):3473-7.
353. Westermarck J, Li SP, Kallunki T, Han J, Kähäri VM. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression. *Mol Cell Biol.* 2001;21(7):2373-83.



## 9 Anhang

Anmerkung zur Symbolik in Graphiken:



Antennen geben die Standardabweichung graphisch wieder, die Balken den jeweiligen Mittelwert

\* p-Wert < 0,05

\*\* p-Wert < 0,01

\*\*\* p-Wert < 0,001

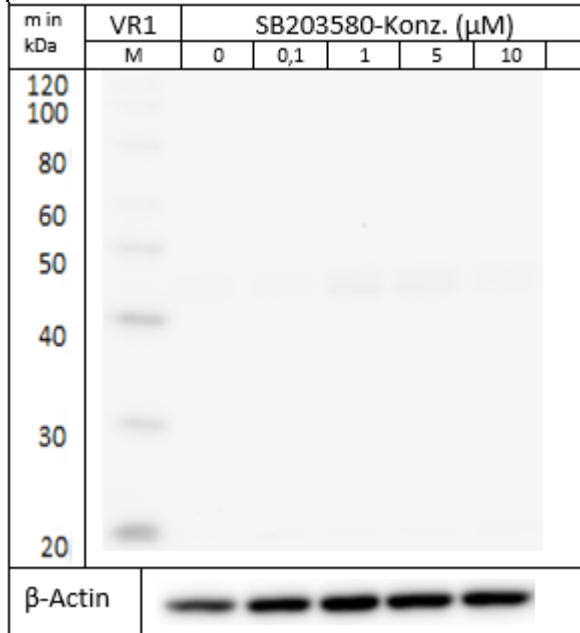
# Anhang

## 9.1 Ergebnisse Western-Blot-Analysen

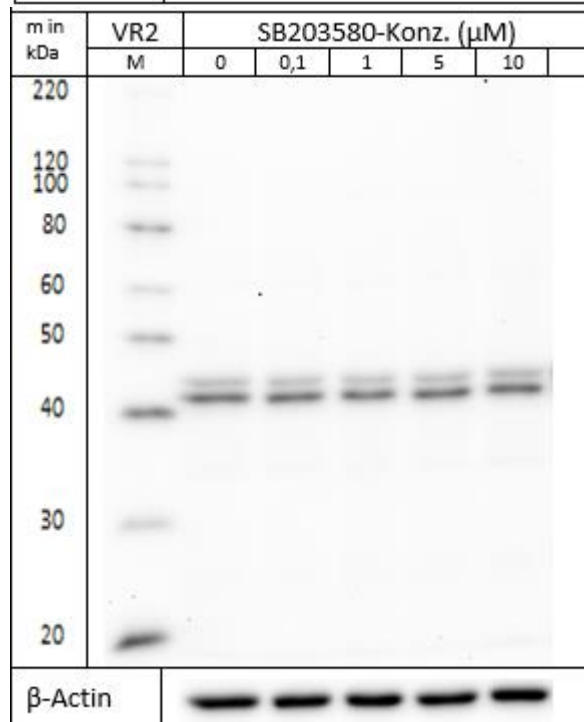
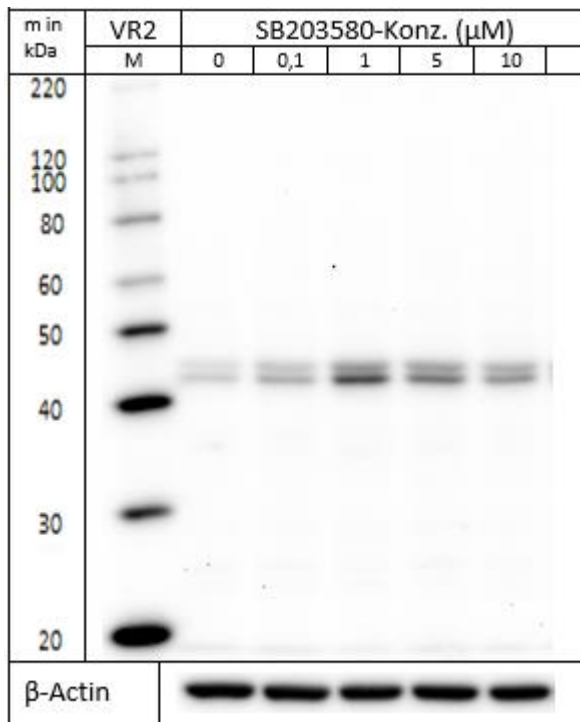
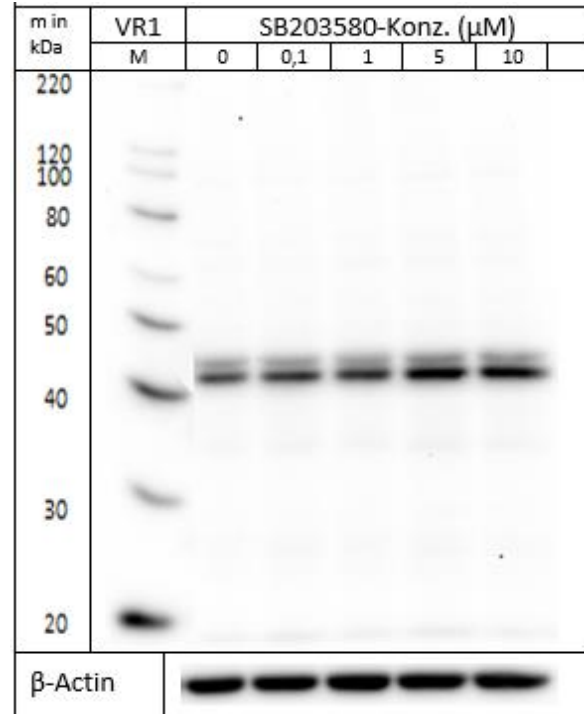
### 9.1.1 ERK1/2

#### 9.1.1.1 Verhalten von ERK1/2 (ERK1 44 kDa / ERK2 42 kDa) in MCF-10A-Zellen

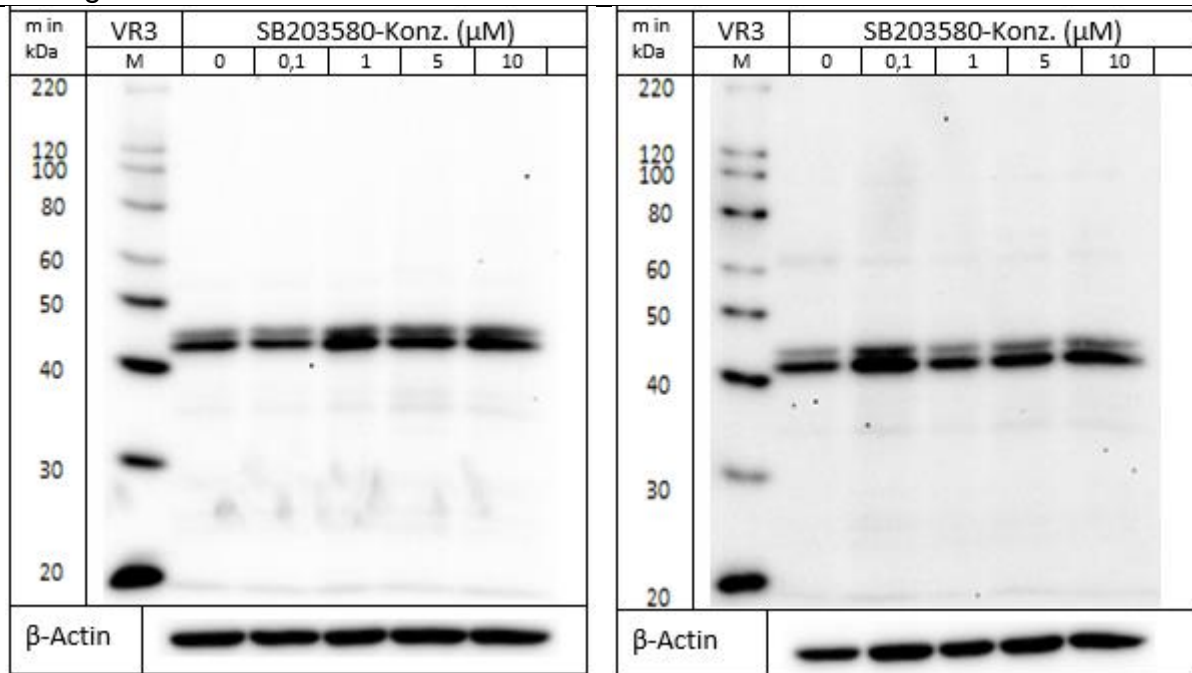
##### p-ERK1/2



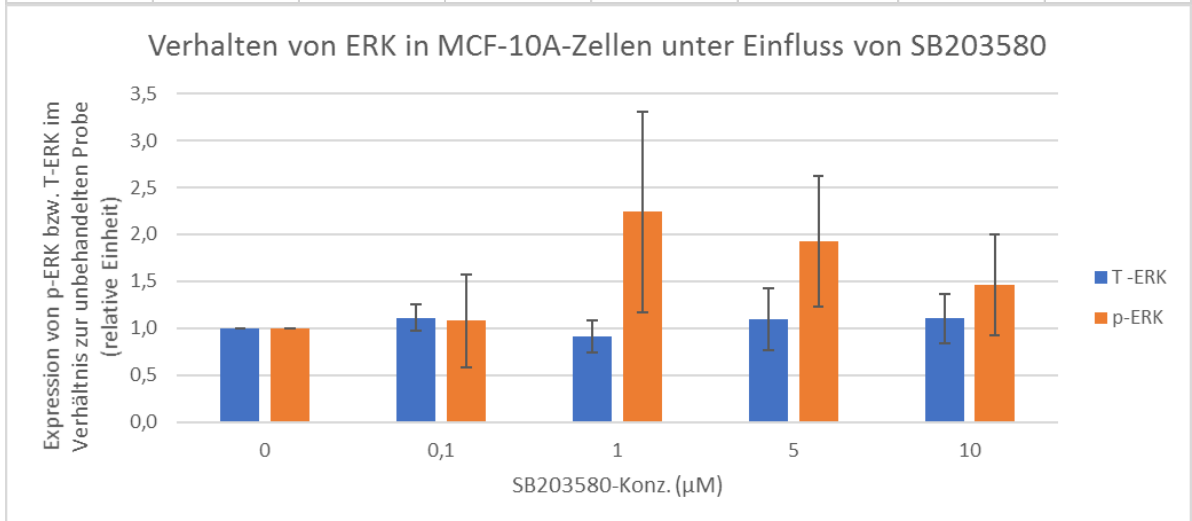
##### T-ERK1/2



# Anhang



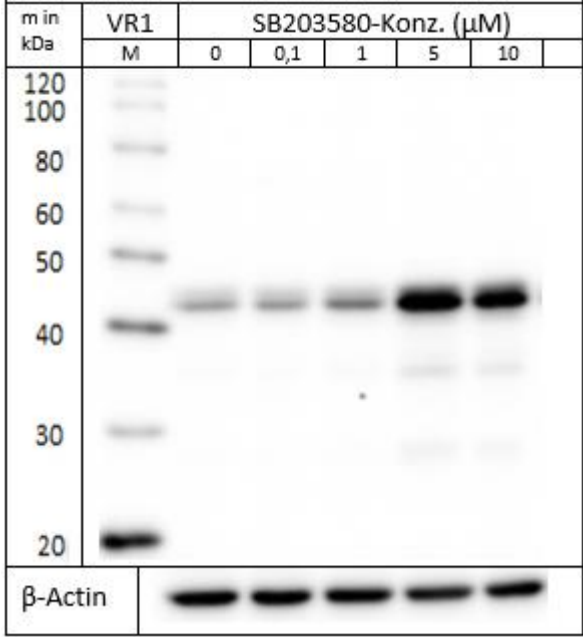
	SB203580-Konz. (μM)	Expression von p-ERK bzw. T-ERK (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
T-ERK	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,1	1,0	1,2	1,11	0,14	0,295
	1	1,1	0,9	0,8	0,91	0,17	0,458
	5	1,5	1,0	0,8	1,09	0,33	0,672
	10	1,4	1,0	0,9	1,10	0,26	0,570
p-ERK	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	0,7	1,6	0,9	1,08	0,50	0,808
	1	1,9	3,4	1,4	2,24	1,07	0,184
	5	1,9	2,6	1,2	1,93	0,70	0,147
	10	1,0	2,0	1,4	1,46	0,54	0,277



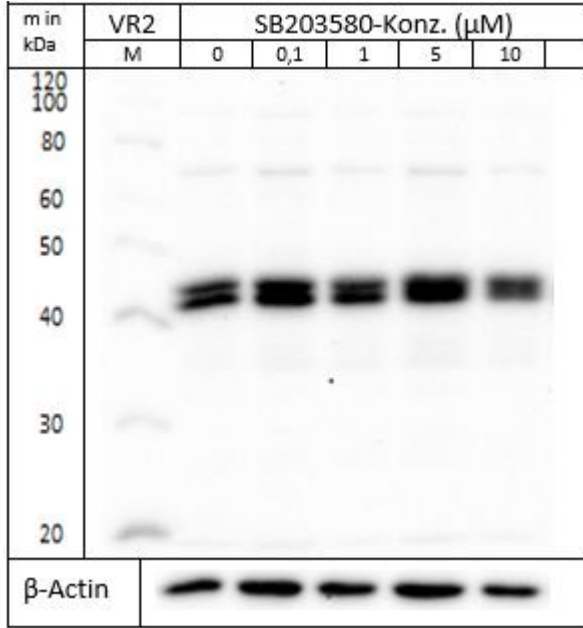
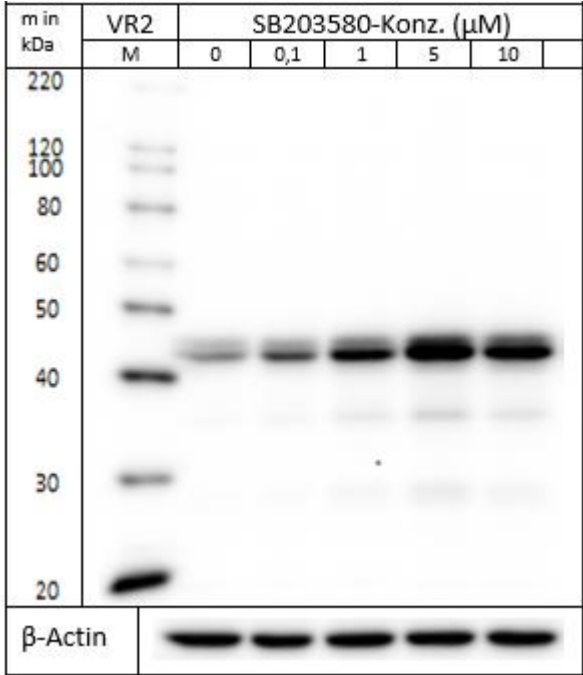
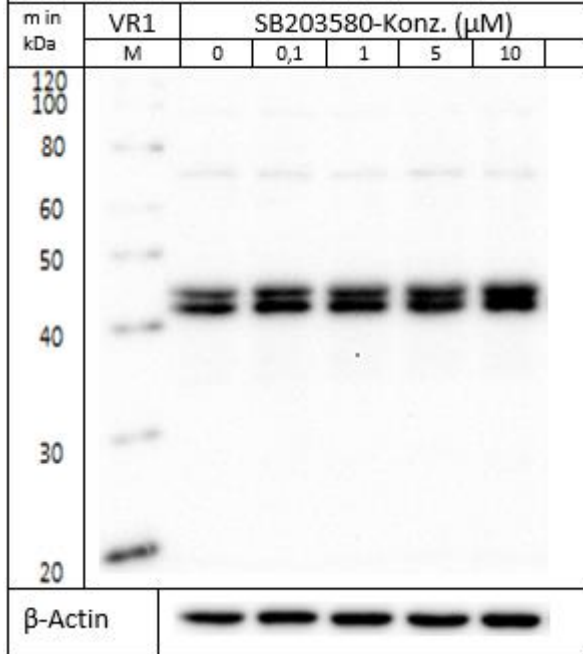
Anhang

9.1.1.2 Verhalten von ERK1/2 (ERK1 44 kDa / ERK2 42 kDa) in MCF-7-Zellen

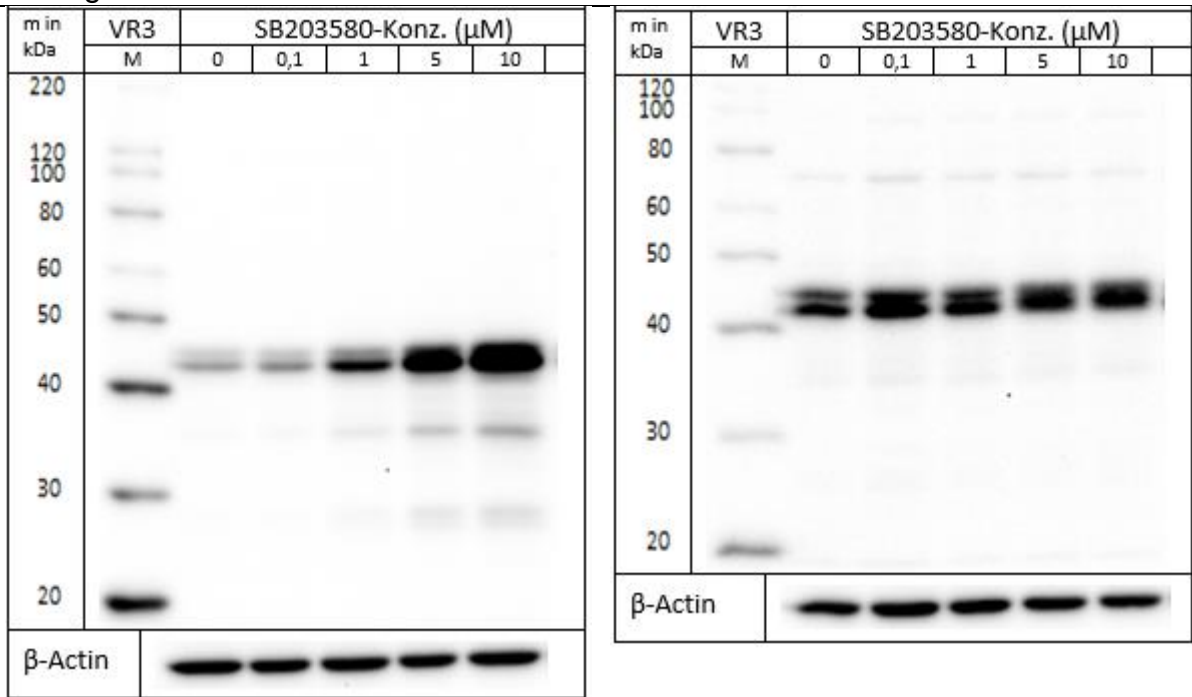
p-ERK1/2



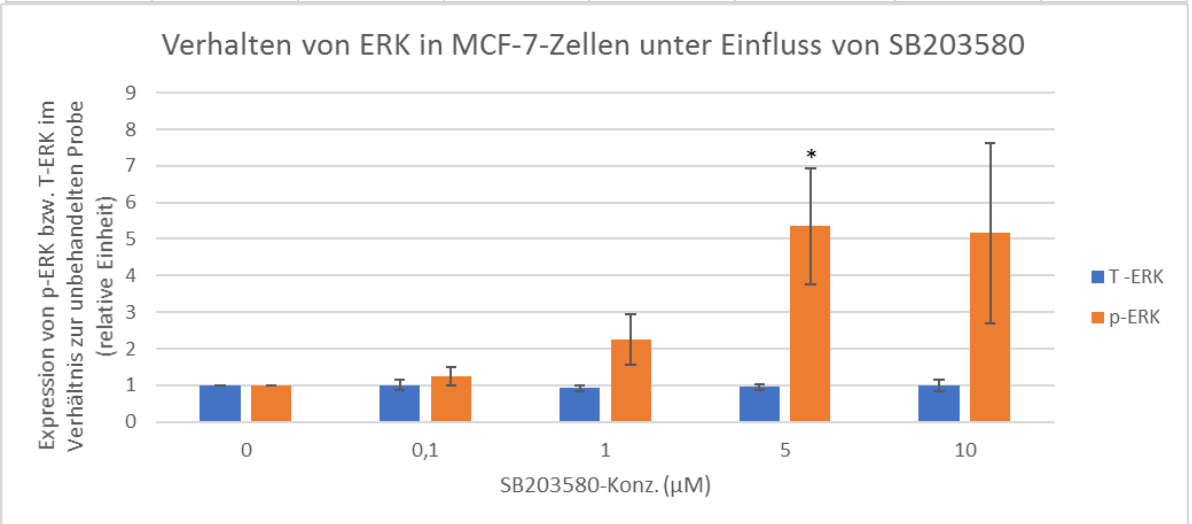
T-ERK1/2



# Anhang



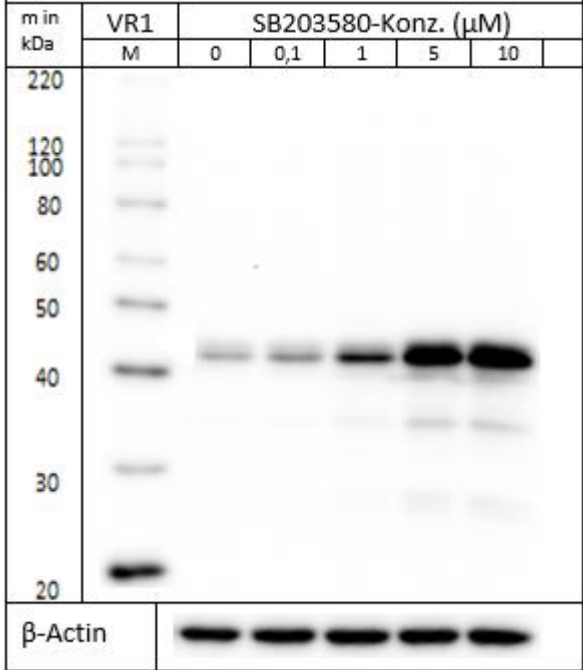
	SB203580-Konz. (μM)	Expression von p-ERK bzw. T-ERK (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
T-ERK	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,0	0,8	1,1	1,00	0,15	0,965
	1	1,0	0,8	0,9	0,92	0,09	0,238
	5	1,0	0,9	1,0	0,95	0,08	0,404
	10	1,0	0,8	1,2	1,01	0,15	0,956
p-ERK	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,0	1,5	1,2	1,26	0,26	0,226
	1	1,5	2,3	2,9	2,25	0,69	0,087
	5	6,1	3,5	6,4	5,35	1,59	0,042
	10	4,6	3,0	7,8	5,16	2,46	0,100



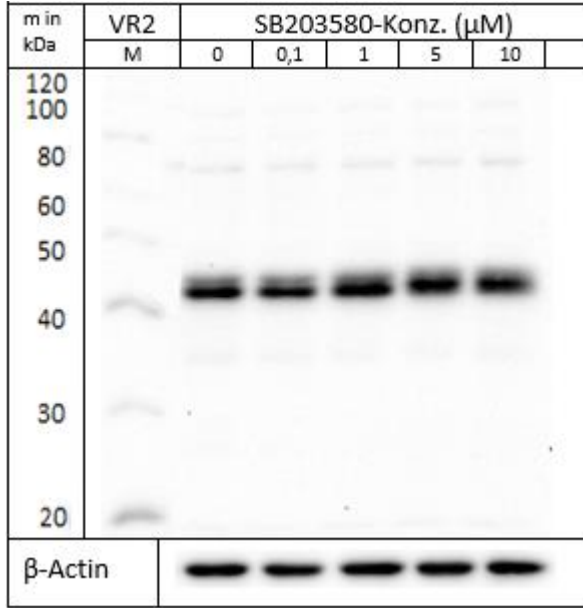
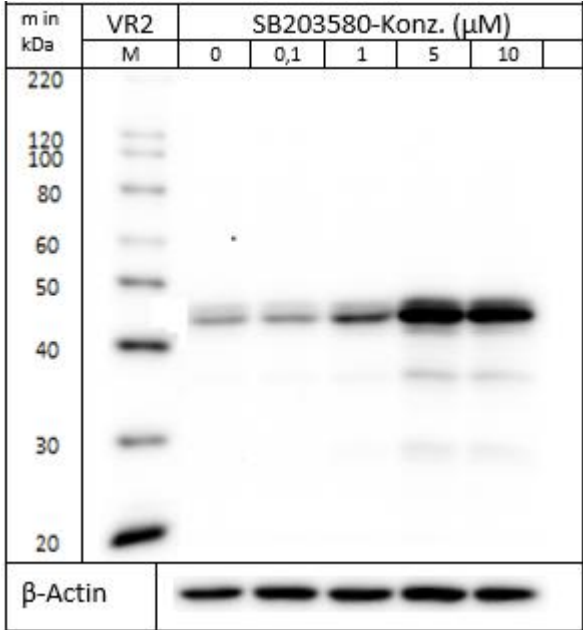
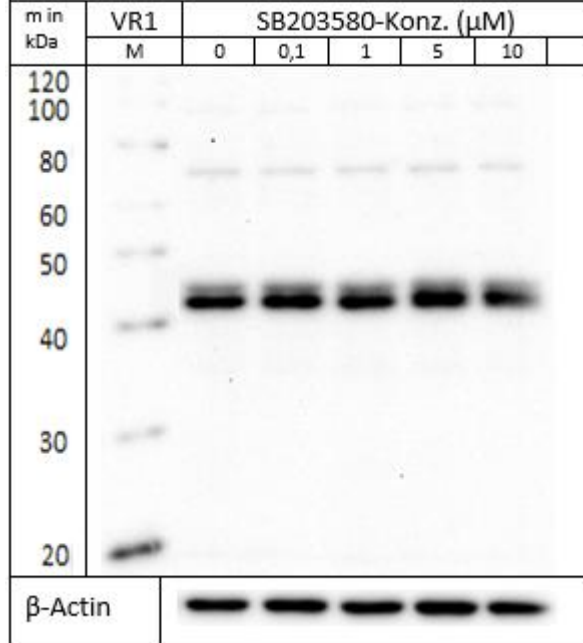
Anhang

9.1.1.3 Verhalten von ERK1/2 (ERK1 44 kDa / ERK2 42 kDa) in MDA-MB-231-Zellen

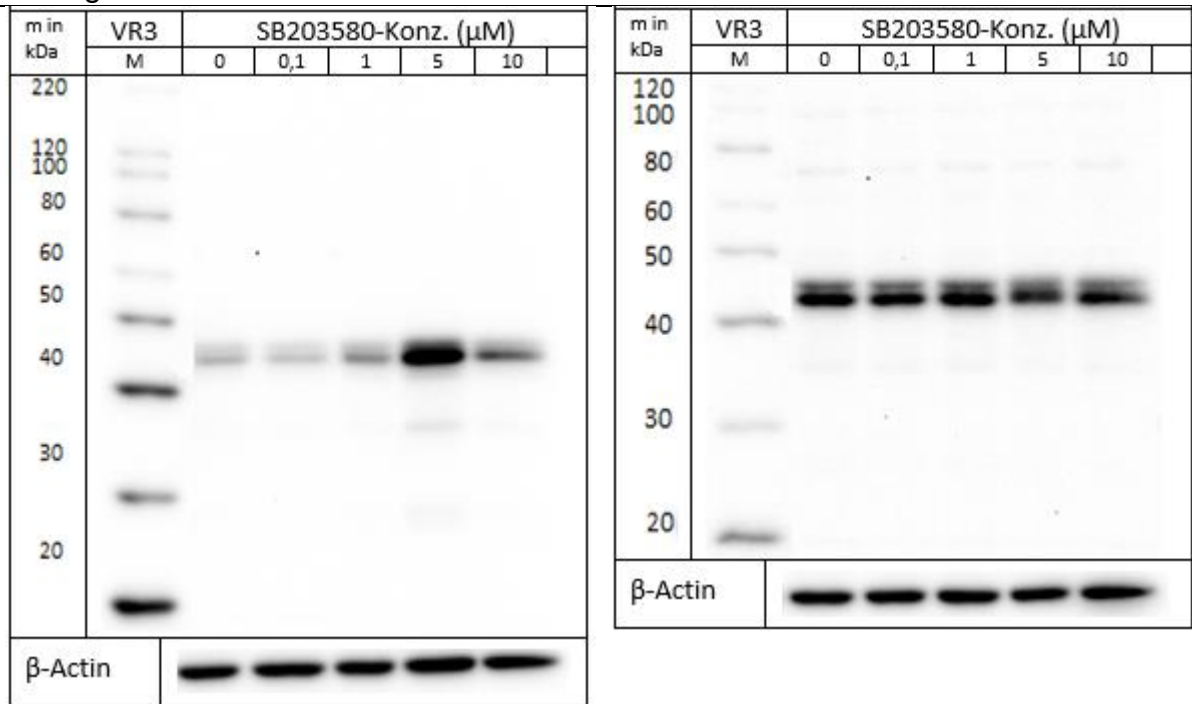
p-ERK1/2



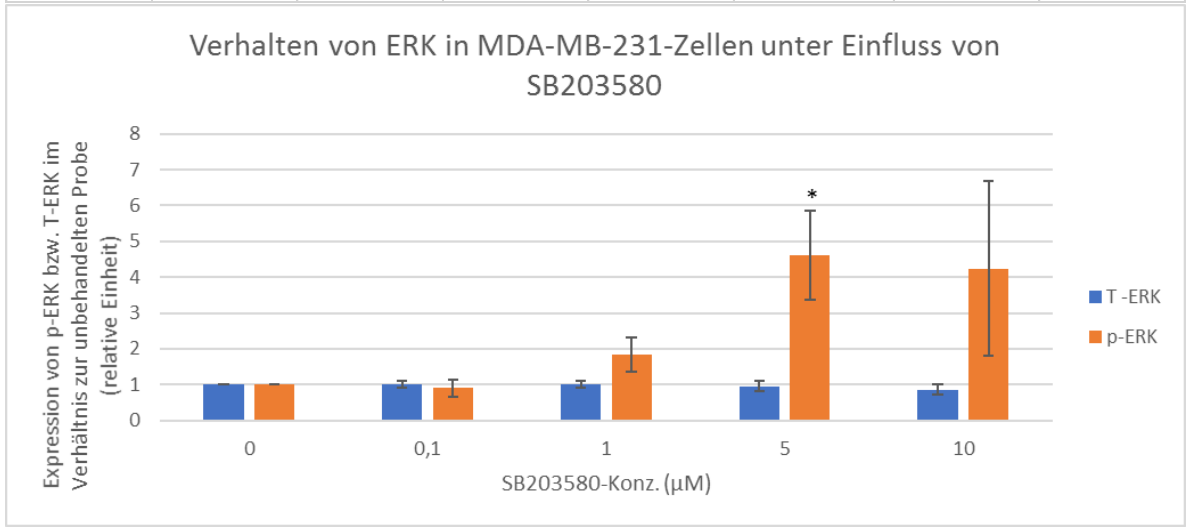
T-ERK1/2



# Anhang



	SB203580-Konz. (μM)	Expression von p-ERK bzw. T-ERK (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
		VR1	VR2	VR3			
T-ERK	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,0	1,1	0,9	1,00	0,10	
	1	1,0	1,1	1,0	1,02	0,10	
	5	0,9	1,1	0,8	0,95	0,14	
	10	0,9	1,0	0,7	0,86	0,14	
p-ERK	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,2	0,8	0,7	0,90	0,24	
	1	2,4	1,7	1,4	1,83	0,48	
	5	6,0	3,8	4,0	4,62	1,25	
	10	6,8	3,9	2,0	4,24	2,43	

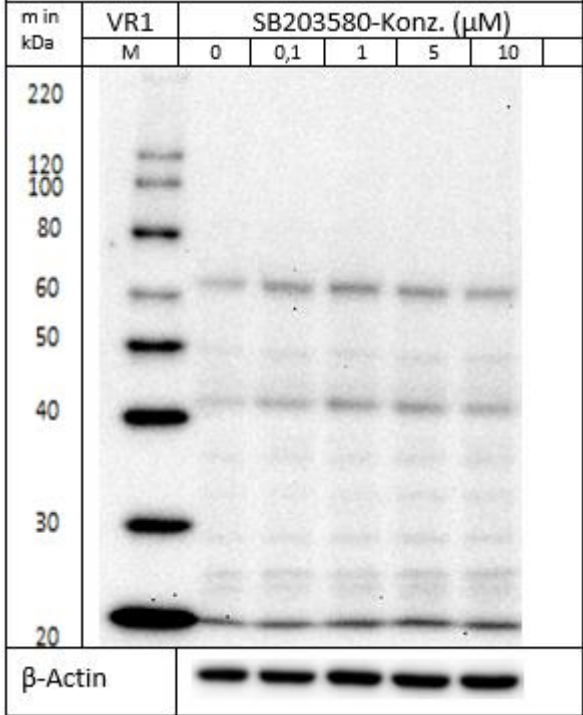


Anhang

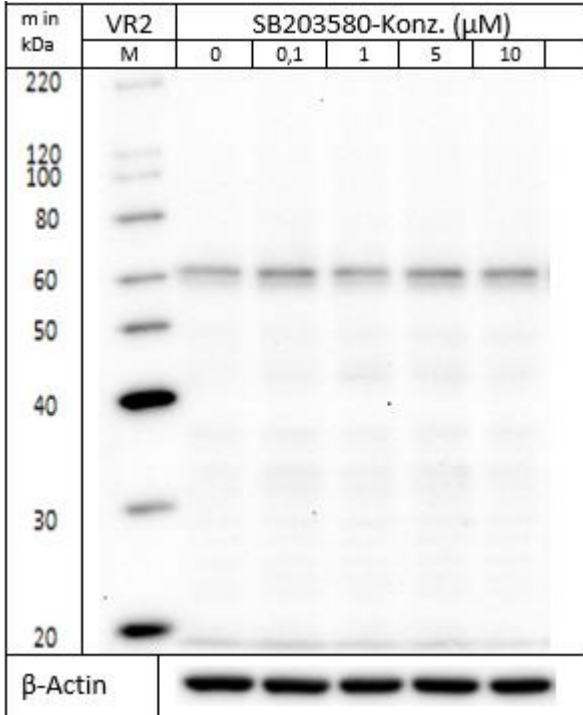
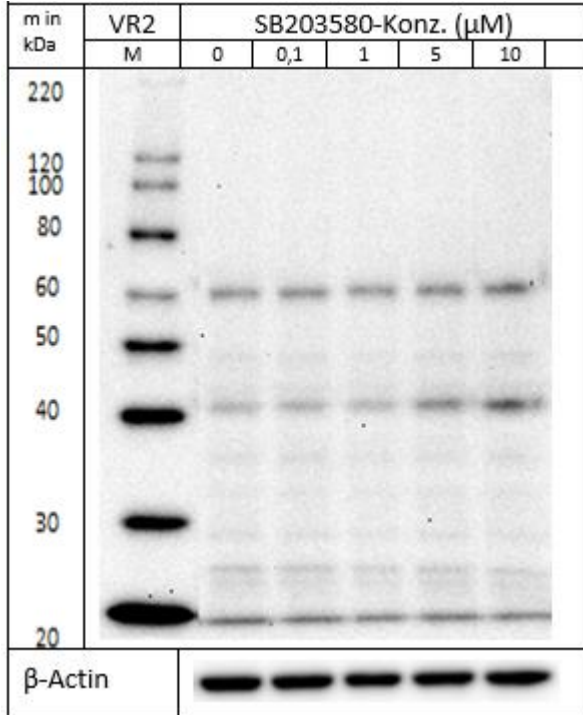
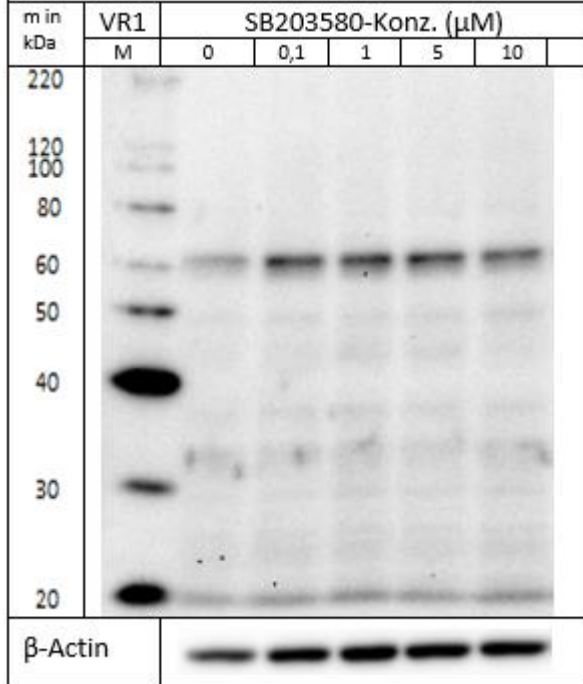
9.1.2 AKT

9.1.2.1 Verhalten von T-AKT und p-AKT S473 (60 kDa) in MCF-10A-Zellen

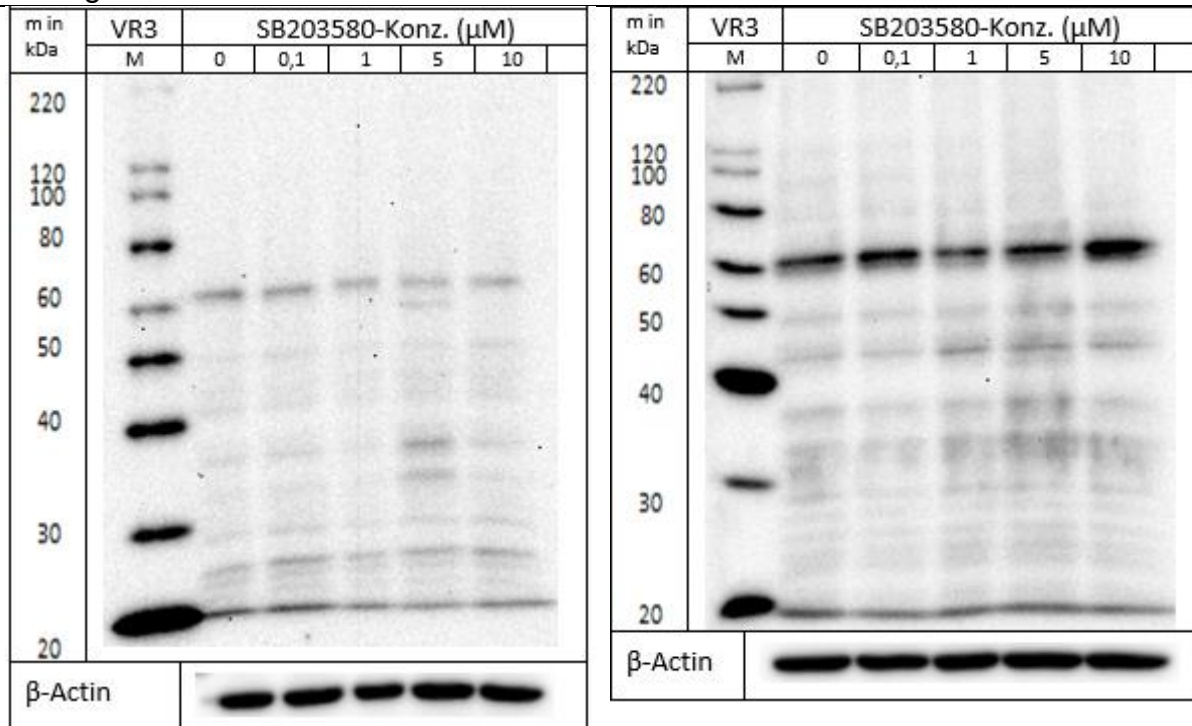
p-AKT S473



T-AKT

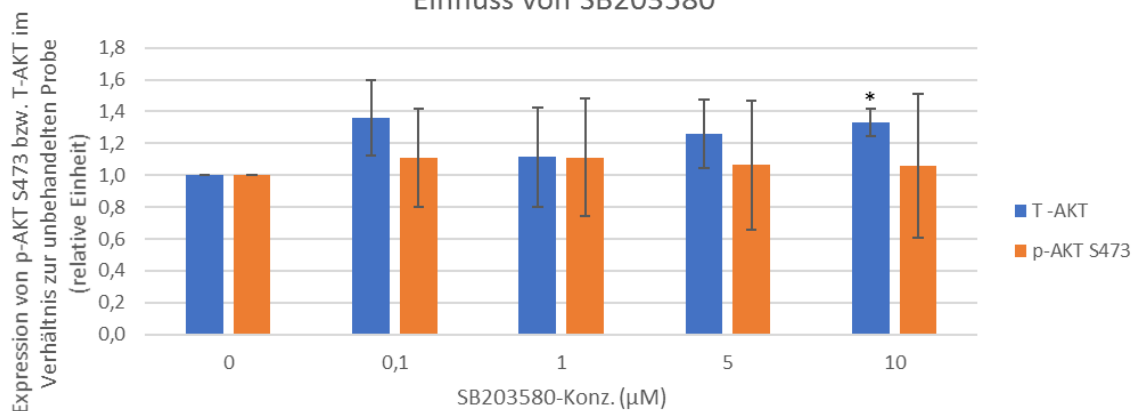


# Anhang



	SB203580-Konz. (μM)	Expression von p-AKT S473 bzw. T-AKT (relative Einheit)			Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3		
T -AKT	0	1,0	1,0	1,0	1,00	
	0,1	1,6	1,4	1,1	1,36	0,118
	1	1,4	1,1	0,8	1,11	0,591
	5	1,4	1,4	1,0	1,26	0,174
	10	1,2	1,3	1,4	1,33	0,022
p-AKT S473	0	1,0	1,0	1,0	1,00	
	0,1	1,4	1,1	0,8	1,11	0,599
	1	1,5	1,2	0,7	1,11	0,650
	5	1,3	1,3	0,6	1,06	0,813
	10	1,0	1,5	0,6	1,06	0,842

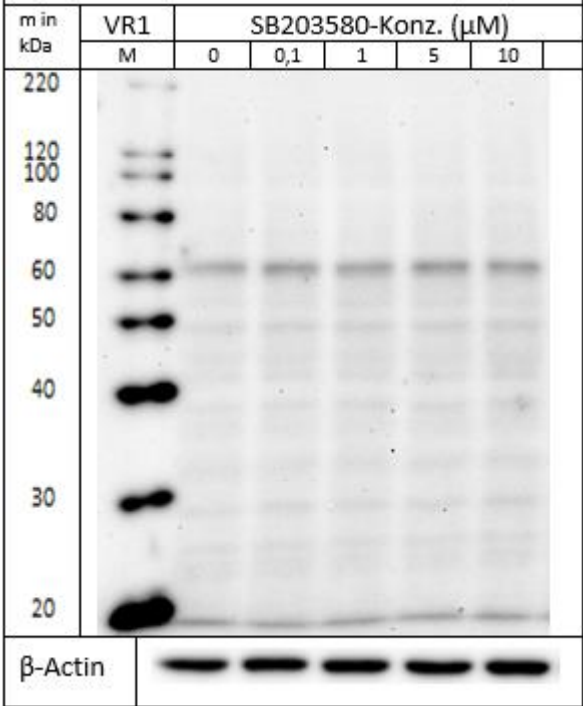
Verhalten von p-AKT S473 bzw. T-AKT in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580



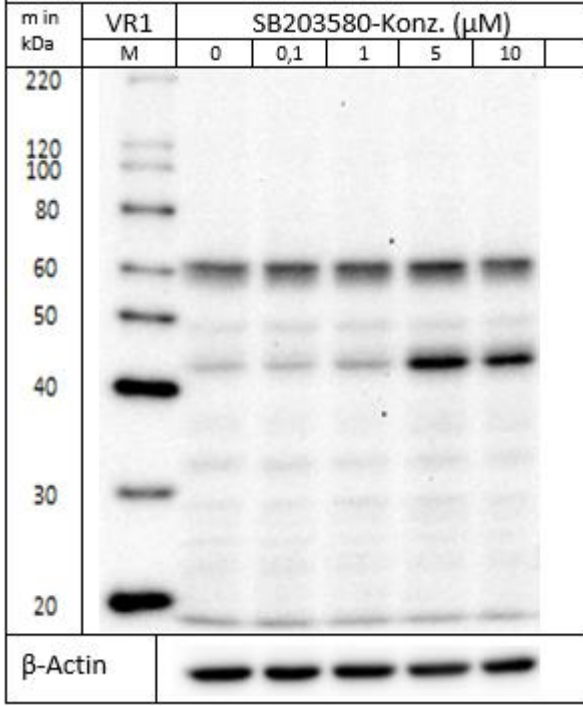
Anhang

9.1.2.2 Verhalten von T-AKT und p-AKT S473 (60 kDa) in MCF-7-Zellen

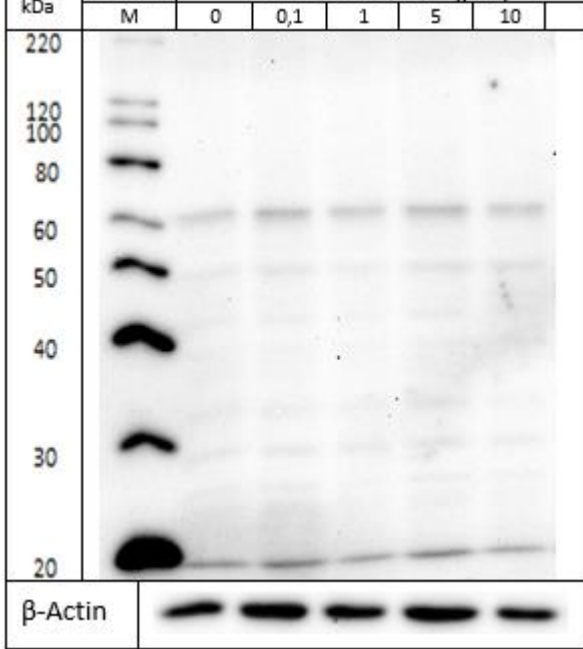
p-AKT S473



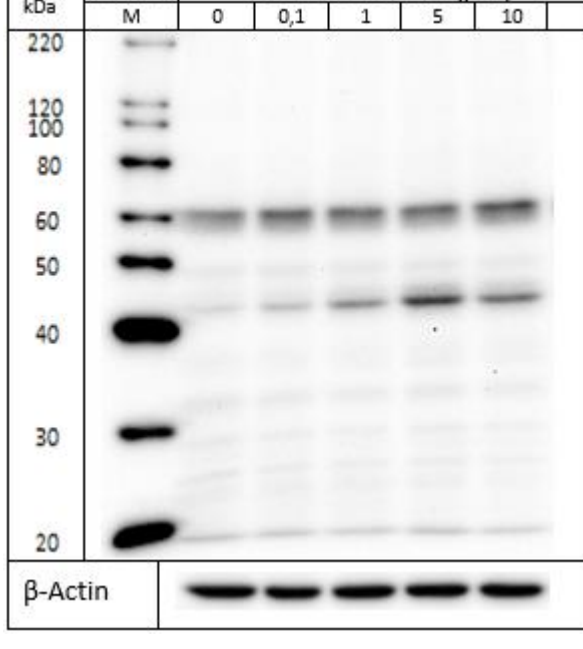
T-AKT



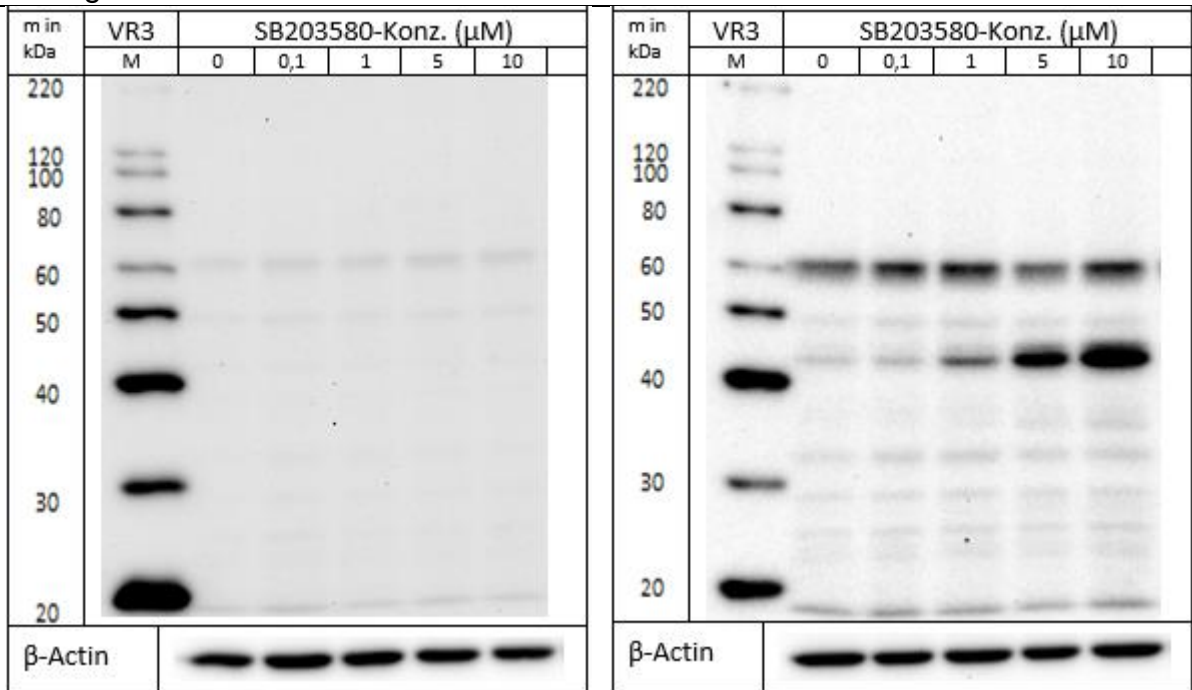
p-AKT S473



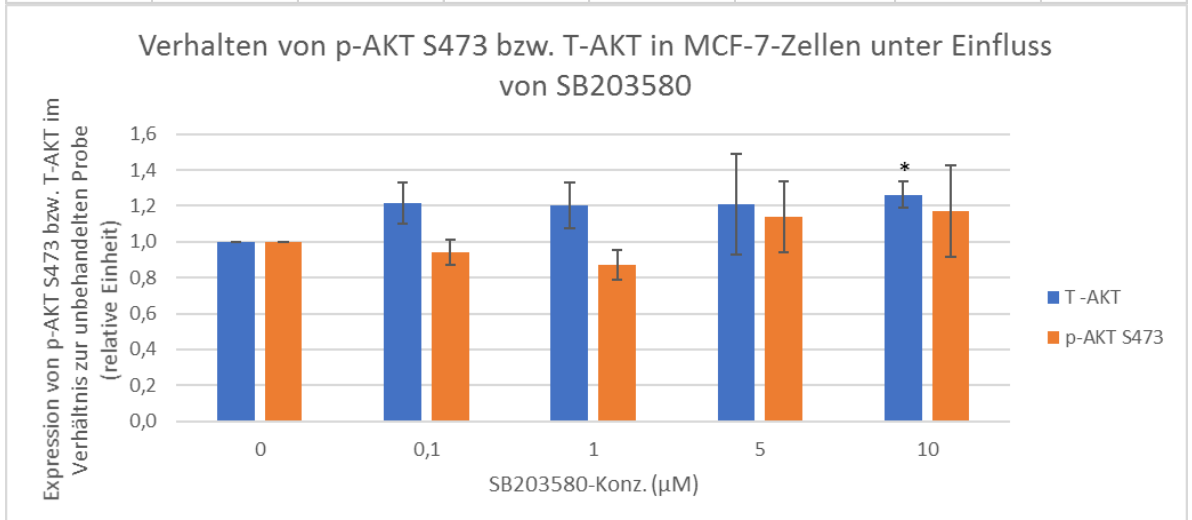
T-AKT



# Anhang



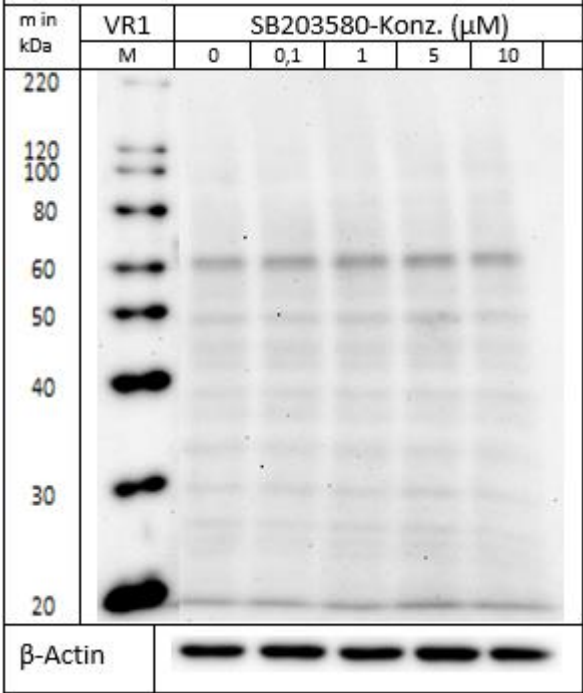
	SB203580-Konz. (μM)	Expression von p-AKT S473 bzw. T-AKT (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
		VR1	VR2	VR3			
T-AKT	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,1	1,3	1,3	1,21	0,12	0,085
	1	1,2	1,1	1,3	1,20	0,13	0,109
	5	1,5	1,1	1,0	1,21	0,28	0,330
	10	1,2	1,3	1,3	1,26	0,07	0,025
p-AKT S473	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,0	0,9	1,0	0,94	0,07	0,286
	1	0,9	0,8	0,9	0,87	0,08	0,115
	5	1,1	1,0	1,4	1,14	0,20	0,348
	10	0,9	1,2	1,4	1,17	0,25	0,366



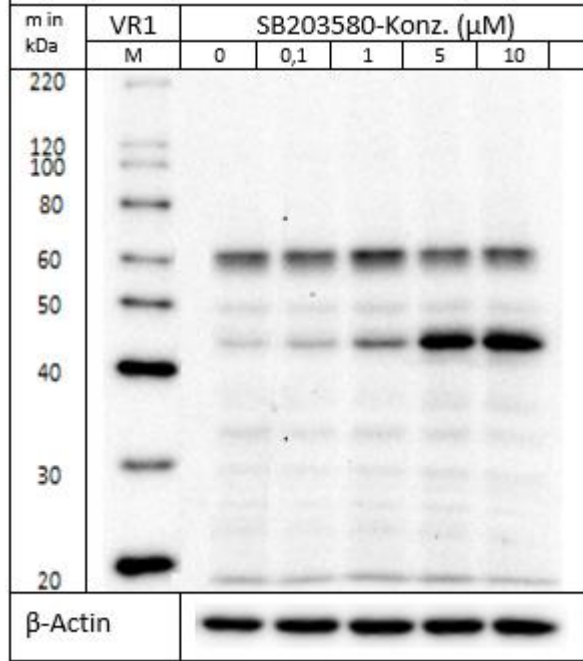
Anhang

9.1.2.3 Verhalten von T-AKT und p-AKT S473 (60 kDa) in MDA-MB-231-Zellen

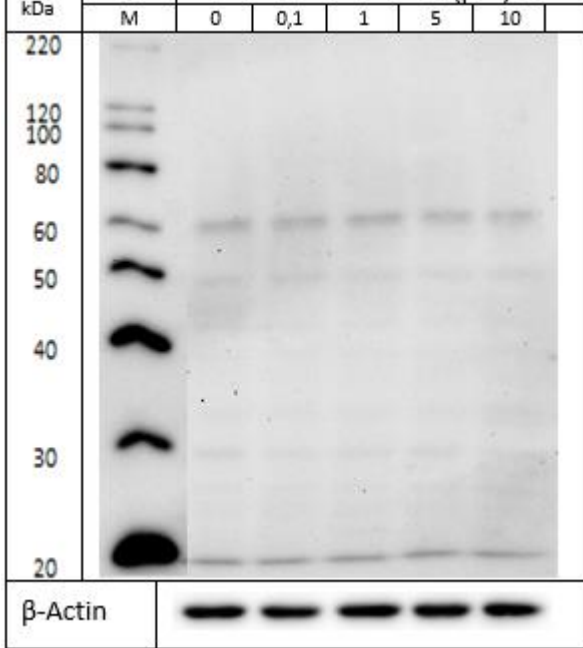
p-AKT S473



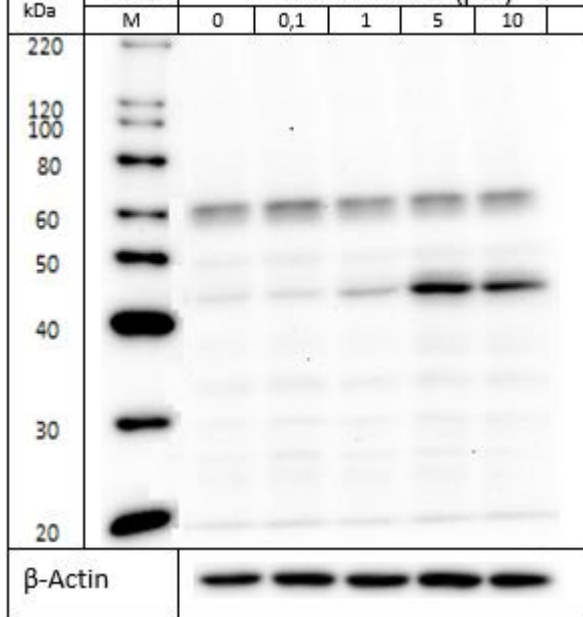
T-AKT



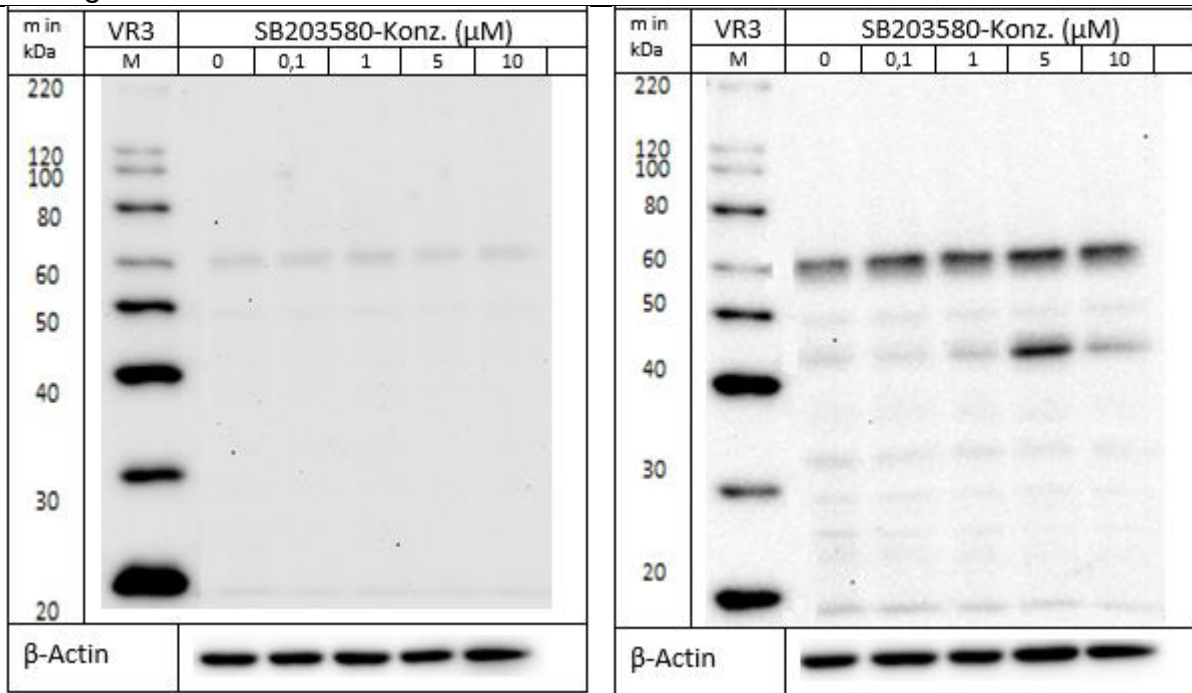
p-AKT S473



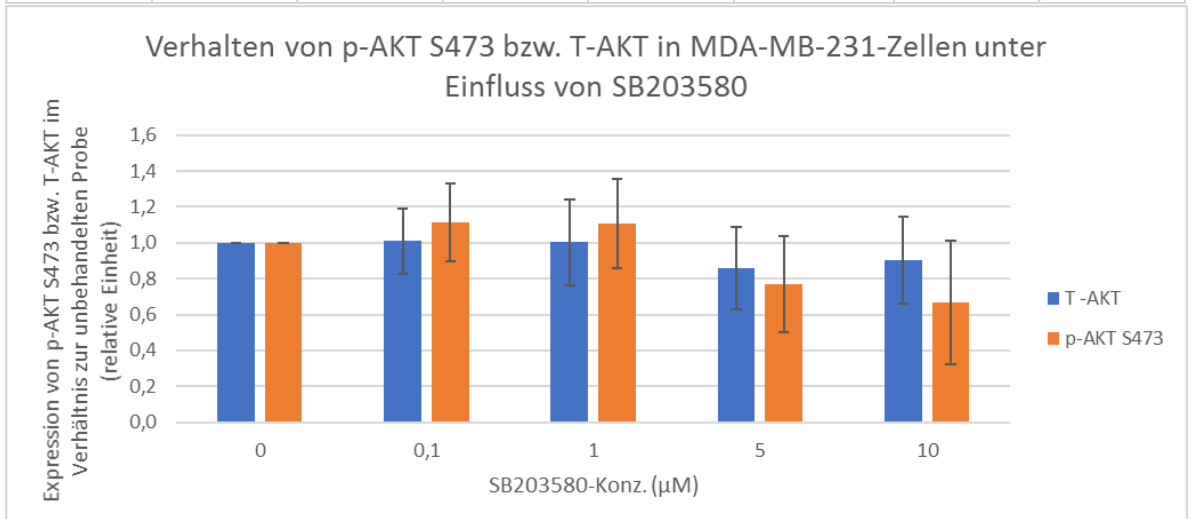
T-AKT



# Anhang



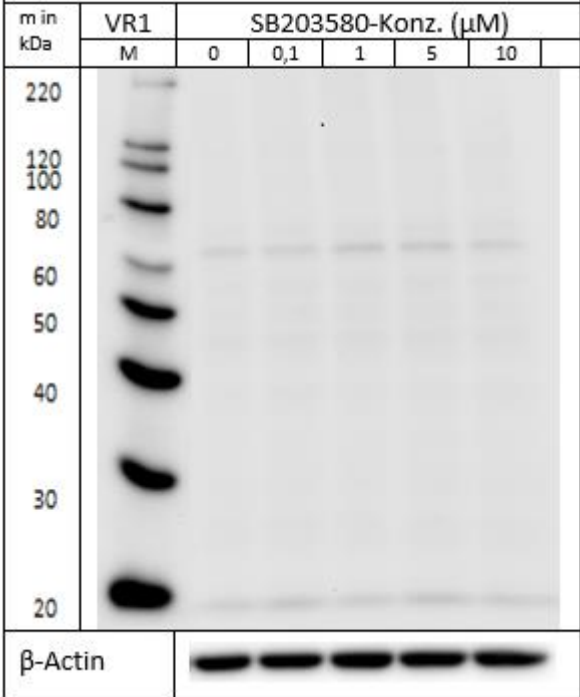
	SB203580-Konz. (μM)	Expression von p-AKT S473 bzw. T-AKT (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
		VR1	VR2	VR3			
T-AKT	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	0,9	0,9	1,2	1,01	0,18	
	1	1,0	0,7	1,2	1,00	0,24	
	5	0,8	0,7	1,1	0,86	0,23	
	10	0,8	0,7	1,2	0,90	0,24	
p-AKT S473	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,2	1,3	0,9	1,11	0,22	
	1	1,4	0,9	1,1	1,11	0,25	
	5	1,1	0,6	0,7	0,77	0,27	
	10	1,0	0,4	0,6	0,67	0,34	



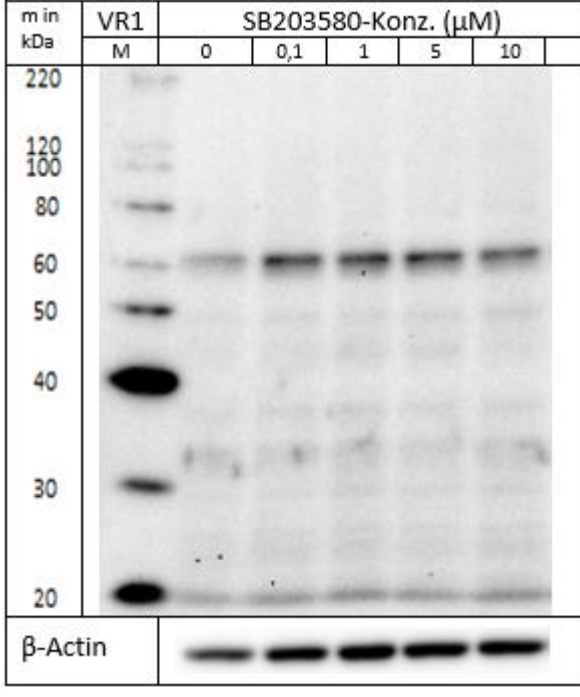
Anhang

9.1.2.4 Verhalten von T-AKT und p-AKT T308 (60 kDa) in MCF-10A-Zellen

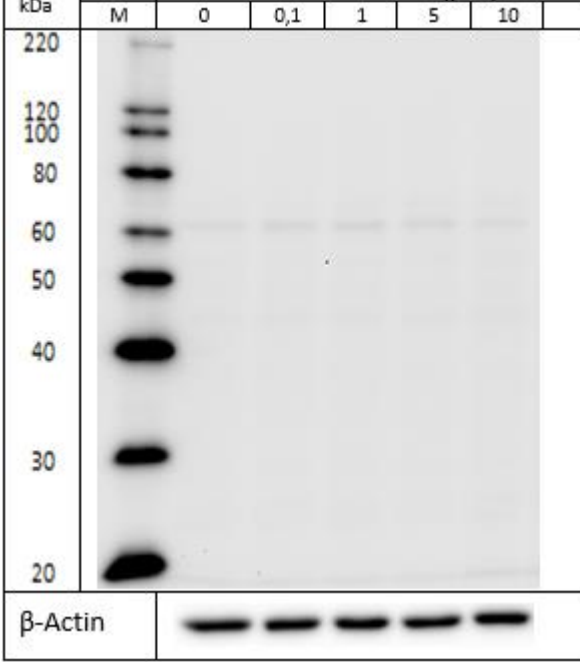
p-AKT T308



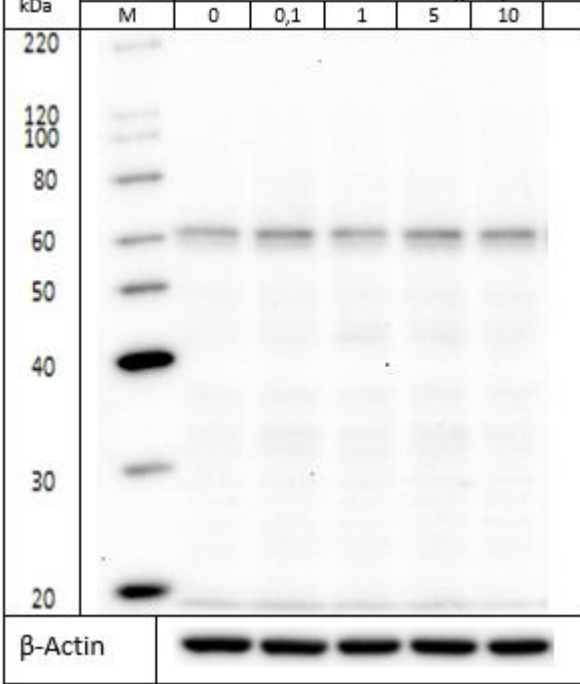
T-AKT



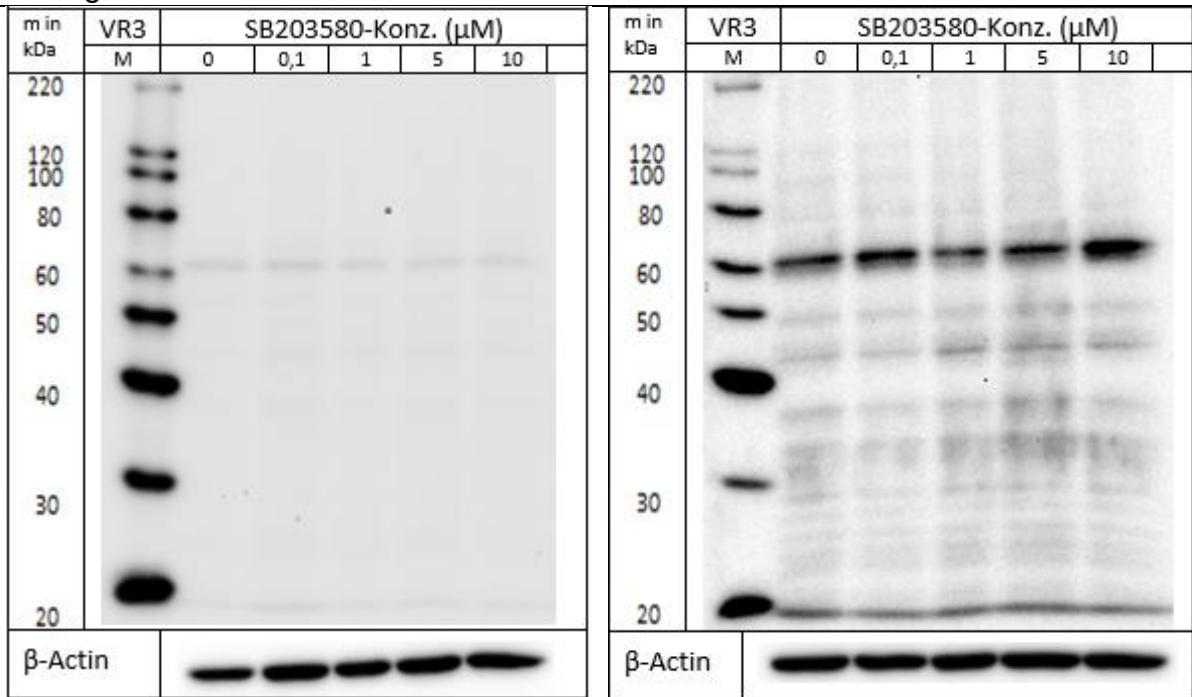
p-AKT T308



T-AKT

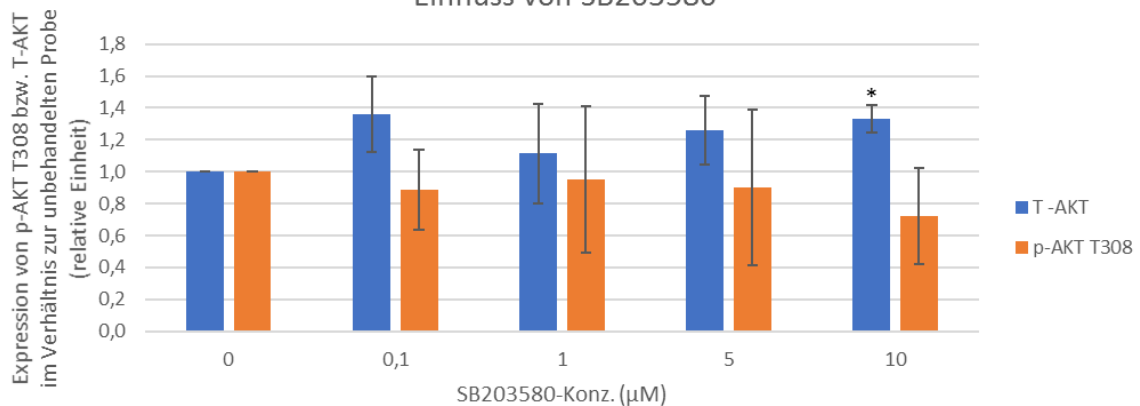


# Anhang



	SB203580-Konz. (μM)	Expression von p-AKT T308 bzw. T-AKT (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
		T -AKT	0	1,0			
	0,1	1,6	1,4	1,1	1,36	0,24	0,118
	1	1,4	1,1	0,8	1,11	0,31	0,591
	5	1,4	1,4	1,0	1,26	0,22	0,174
	10	1,2	1,3	1,4	1,33	0,09	0,022
p-AKT T308	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,1	1,0	0,6	0,89	0,25	0,518
	1	1,4	1,0	0,5	0,95	0,46	0,872
	5	1,4	1,0	0,4	0,90	0,49	0,761
	10	1,0	0,7	0,4	0,72	0,30	0,247

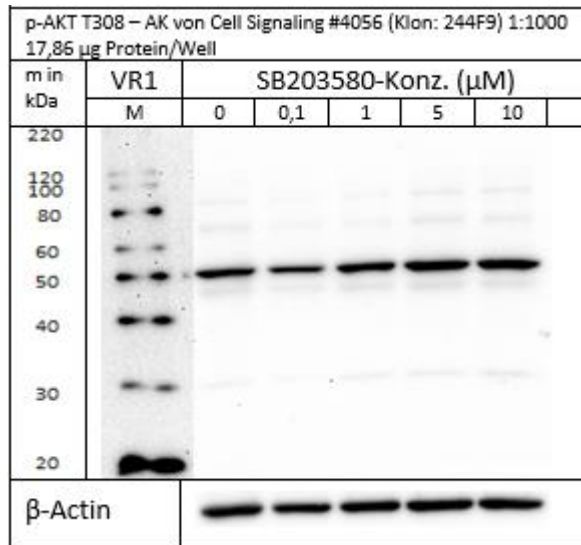
Verhalten von p-AKT T308 bzw. T-AKT in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580



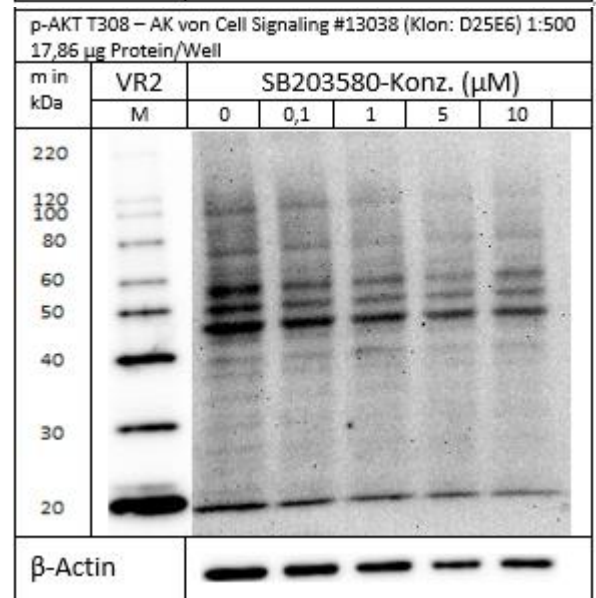
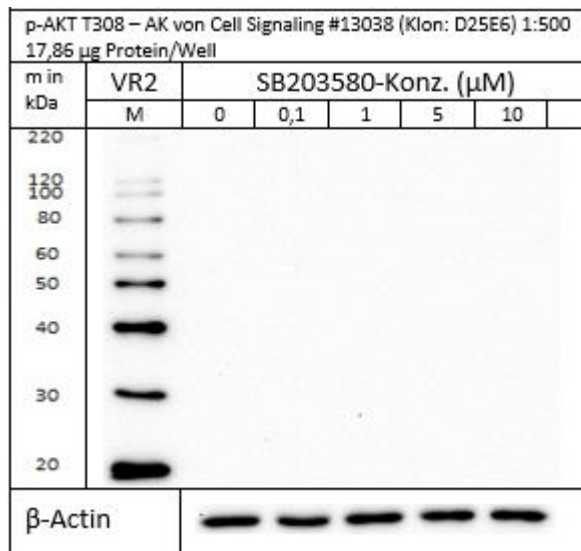
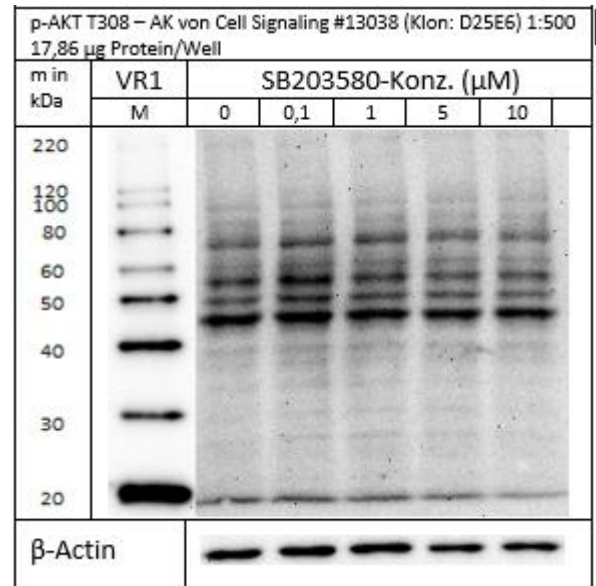
# Anhang

## 9.1.2.5 Verhalten von p-AKT T308 (60 kDa) in MCF-7-Zellen und MDA-MB-231-Zellen

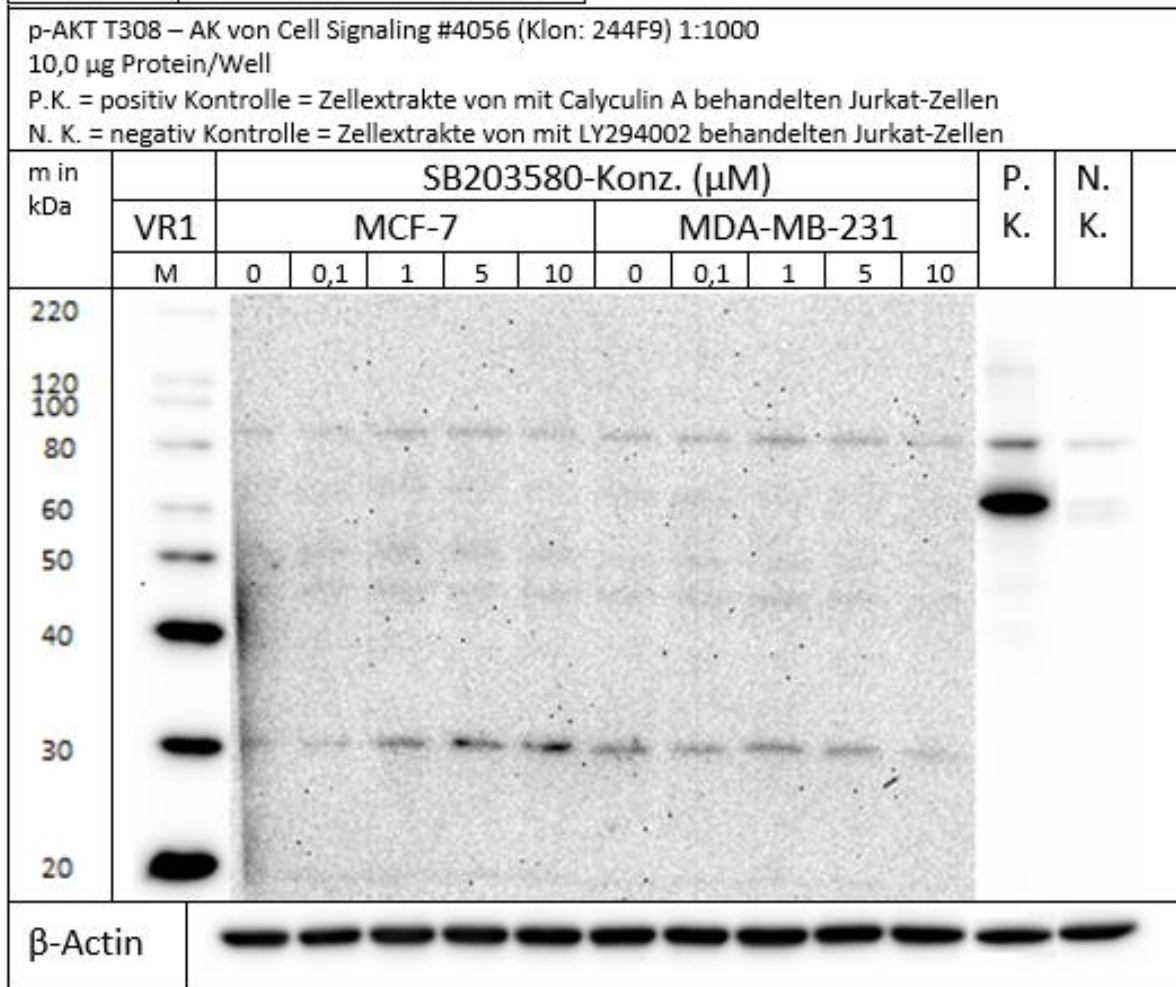
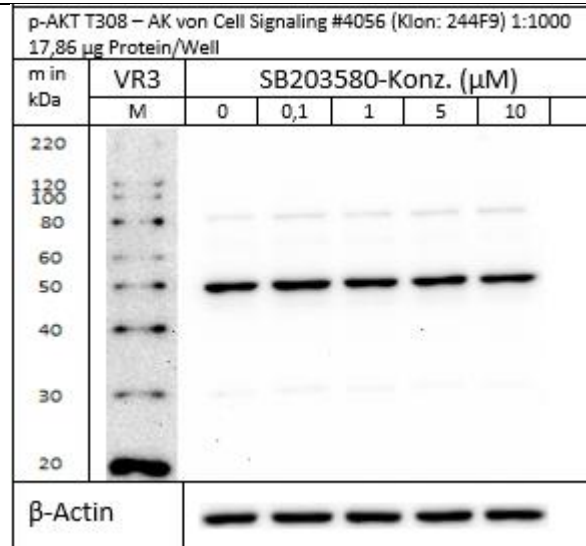
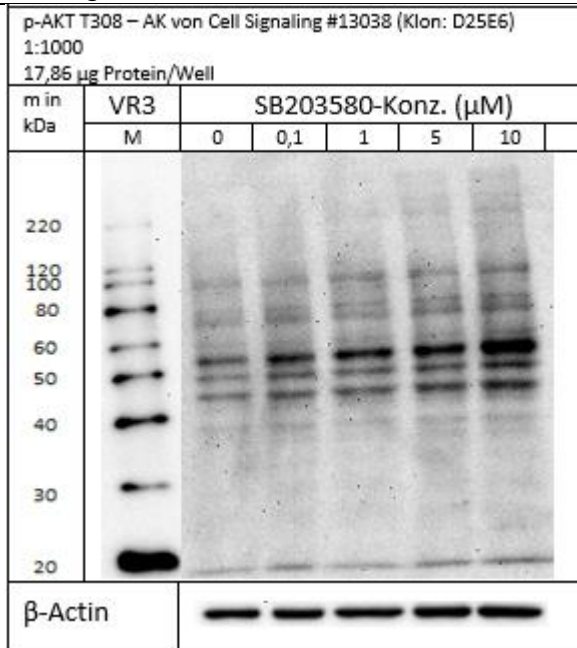
### MCF-7-Zellen



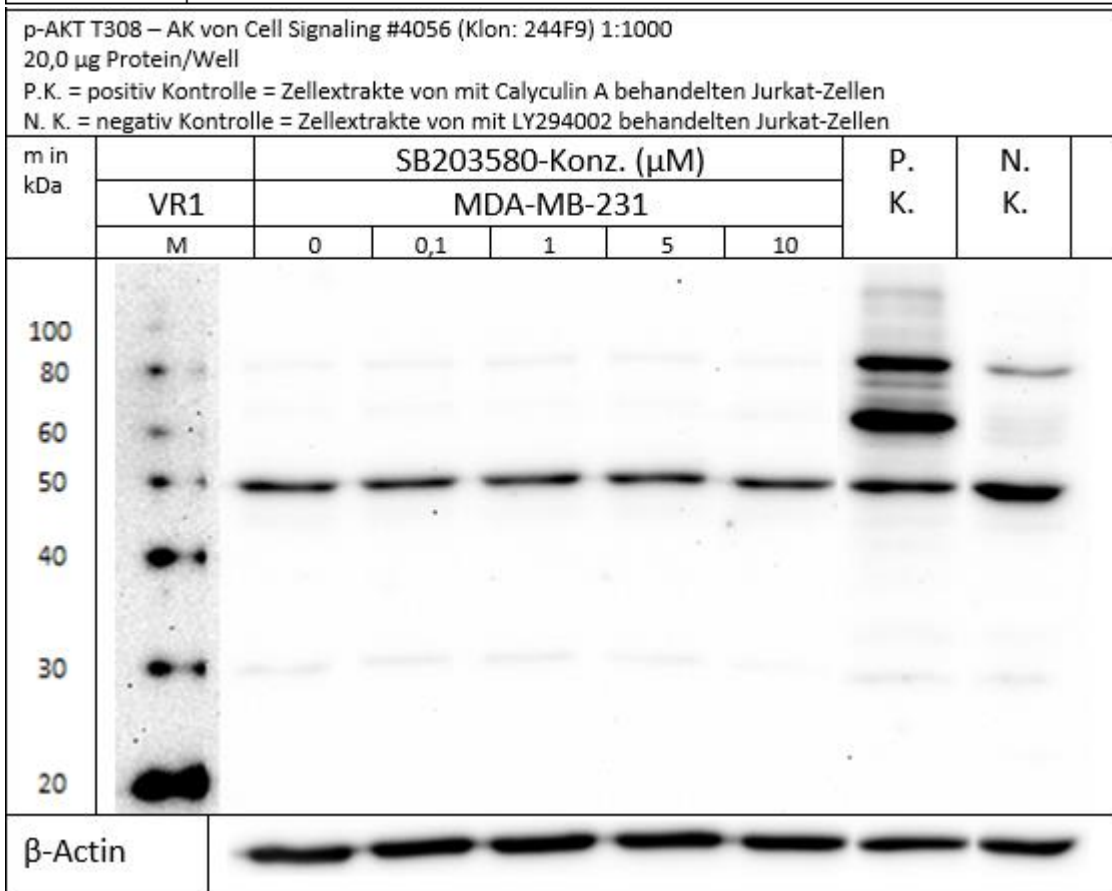
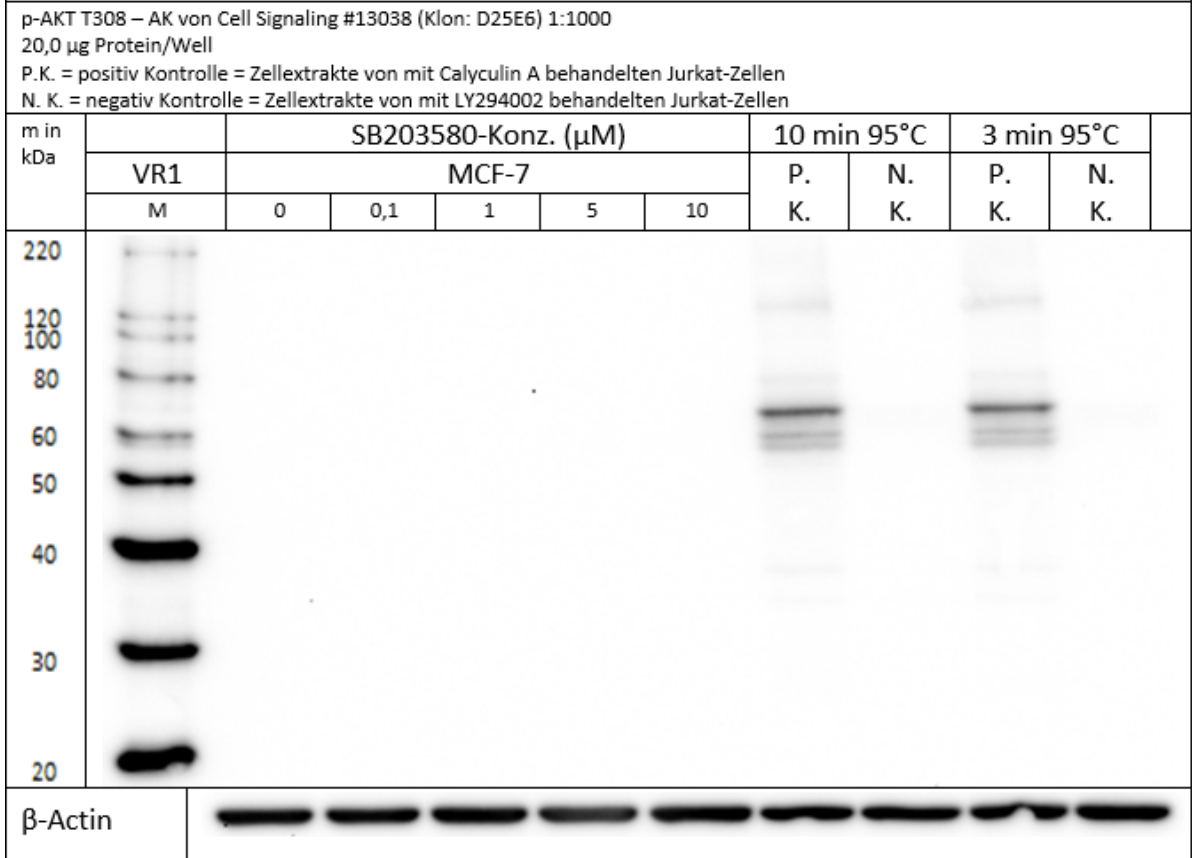
### MDA-MB-231-Zellen



# Anhang



# Anhang



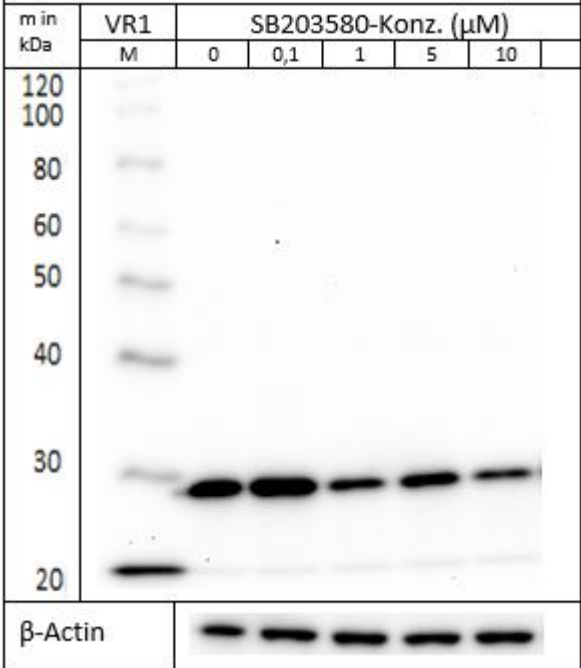


Anhang

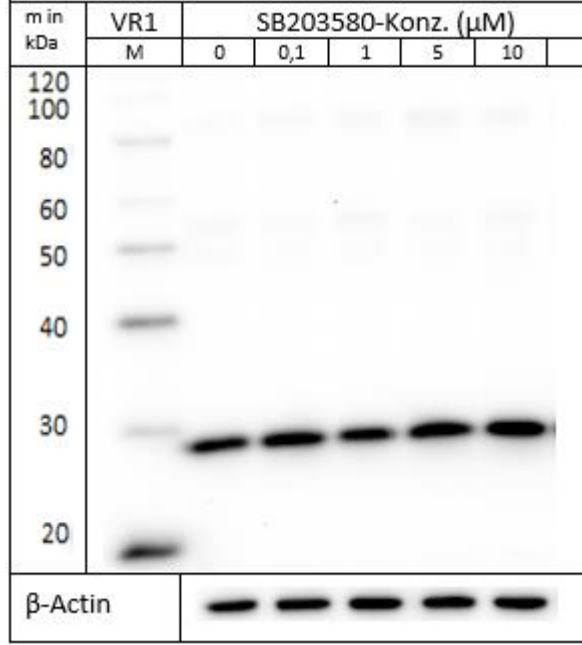
9.1.3 HSP27

9.1.3.1 Verhalten von HSP27 (27 kDa) in MCF-10A-Zellen

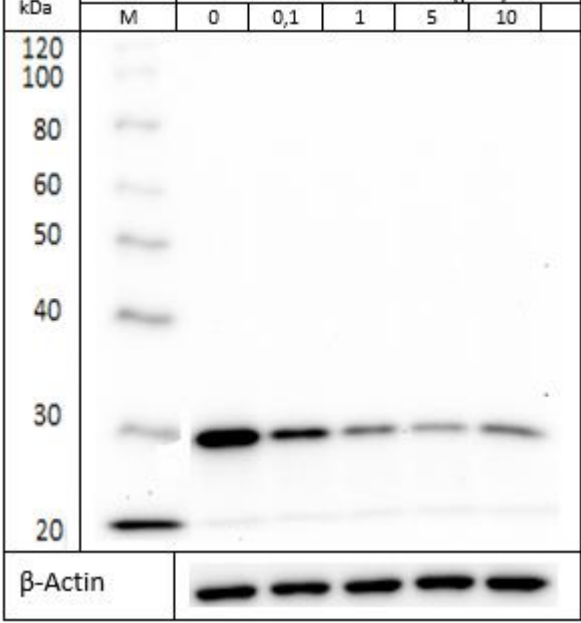
p-HSP27



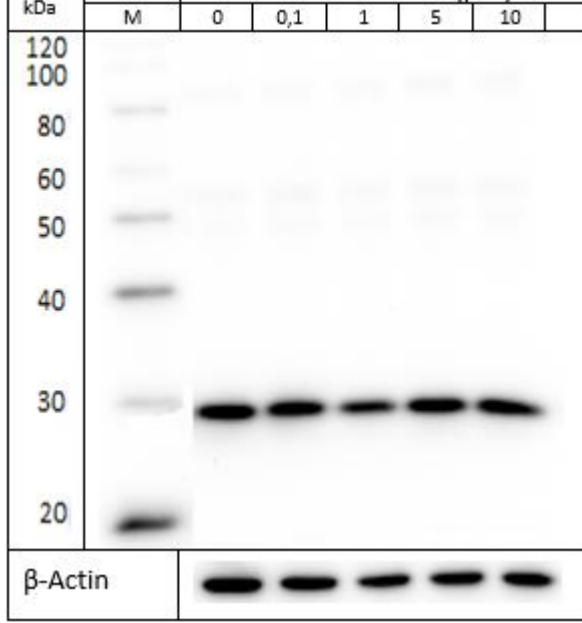
T-HSP27



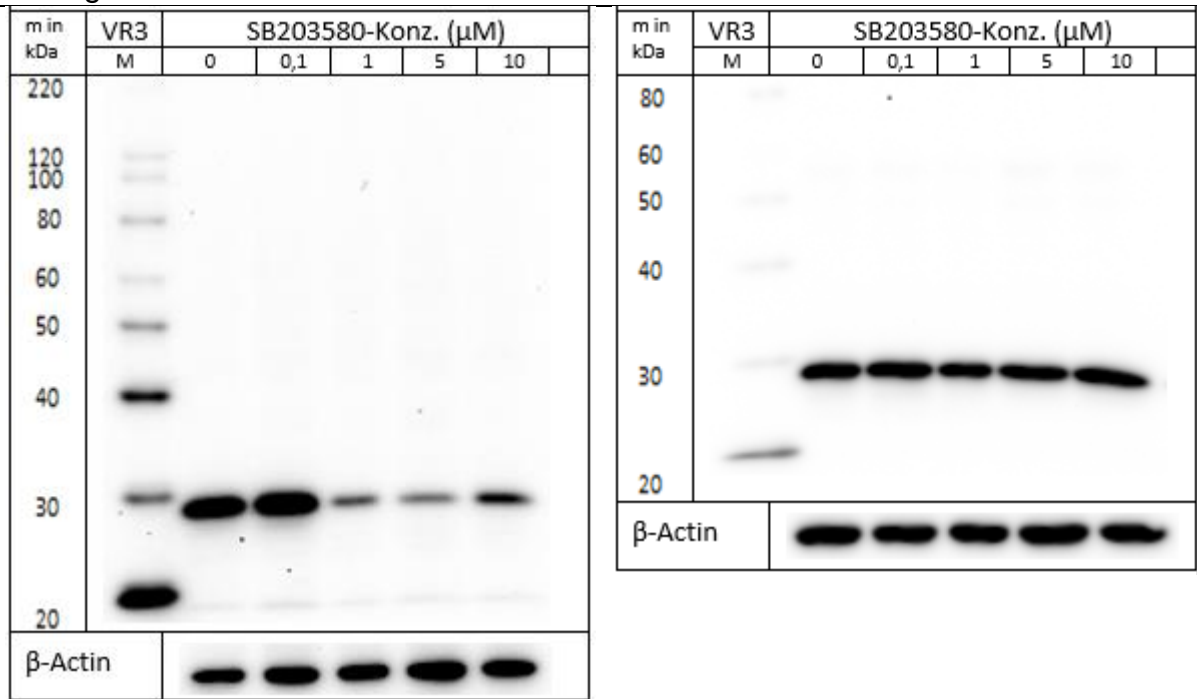
p-HSP27



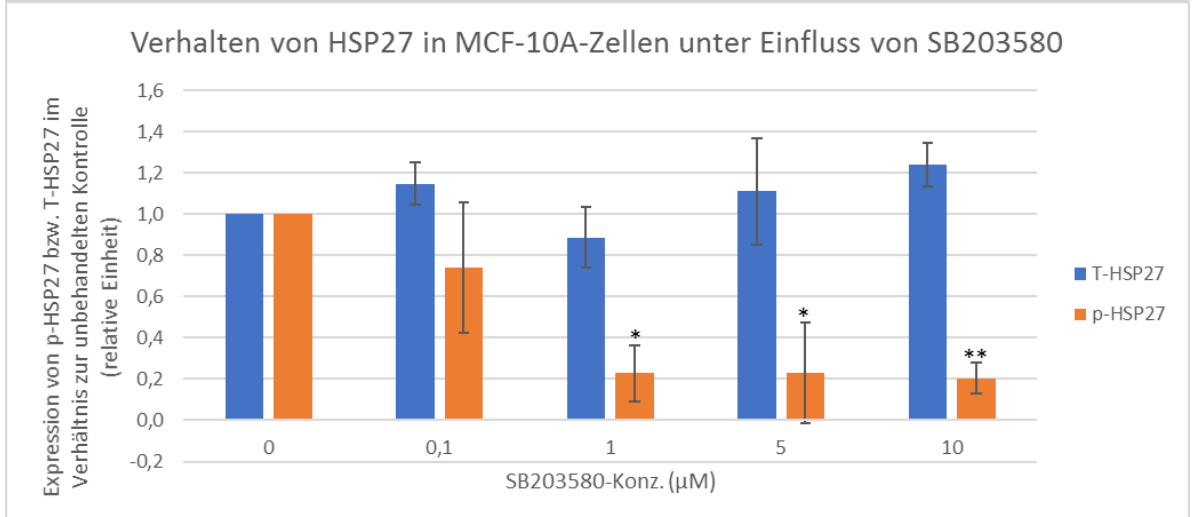
T-HSP27



# Anhang



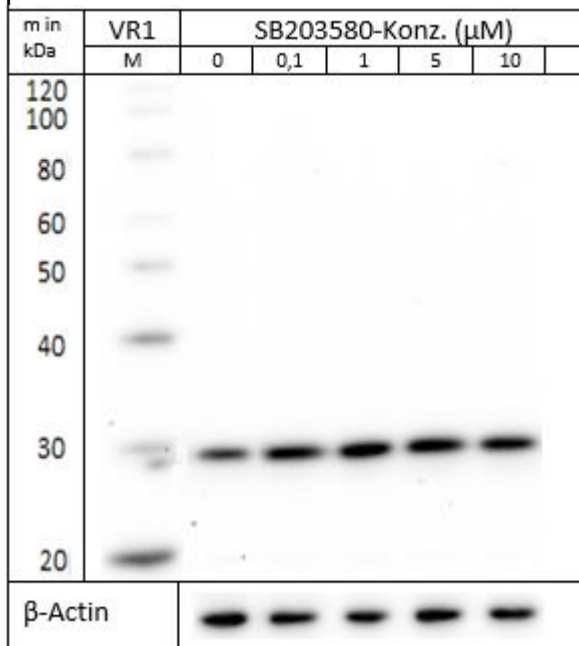
	SB203580-Konz. (μM)	Expression von p-HSP27 bzw. T-HSP27 (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
T-HSP27	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,0	1,2	1,2	1,15	0,10	0,1323
	1	0,7	1,0	0,9	0,89	0,15	0,3137
	5	1,0	1,4	0,9	1,11	0,26	0,5387
	10	1,1	1,3	1,2	1,24	0,10	0,0580
p-HSP27	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,0	0,4	0,8	0,74	0,32	0,2931
	1	0,4	0,2	0,1	0,23	0,14	0,0102
	5	0,5	0,1	0,1	0,23	0,24	0,0320
	10	0,3	0,2	0,2	0,20	0,08	0,0029



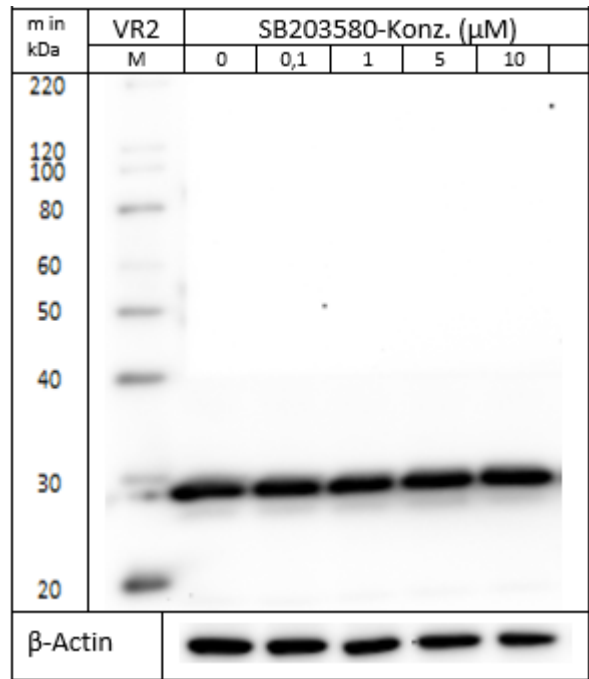
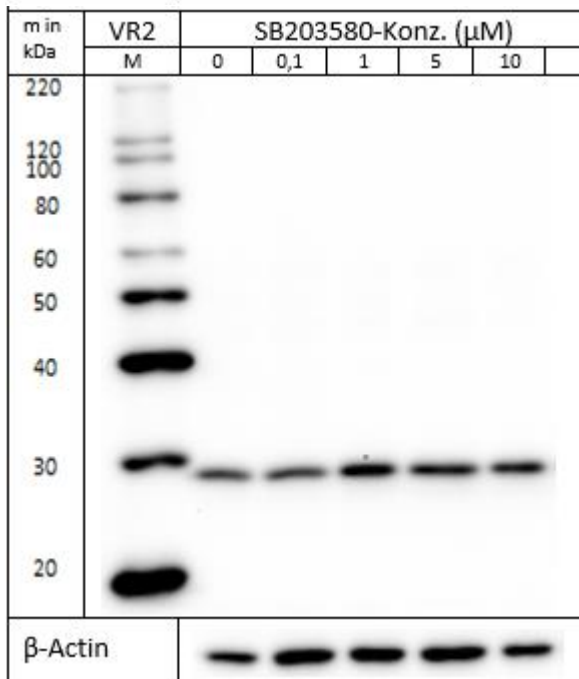
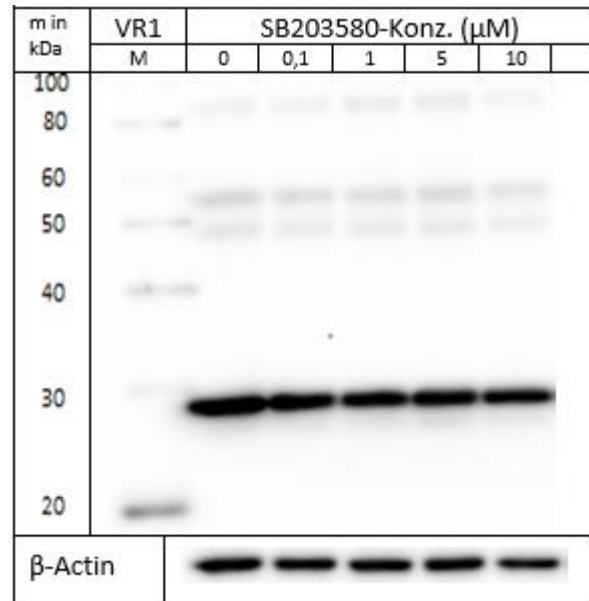
# Anhang

## 9.1.3.2 Verhalten von HSP27 (27 kDa) in MCF-7-Zellen

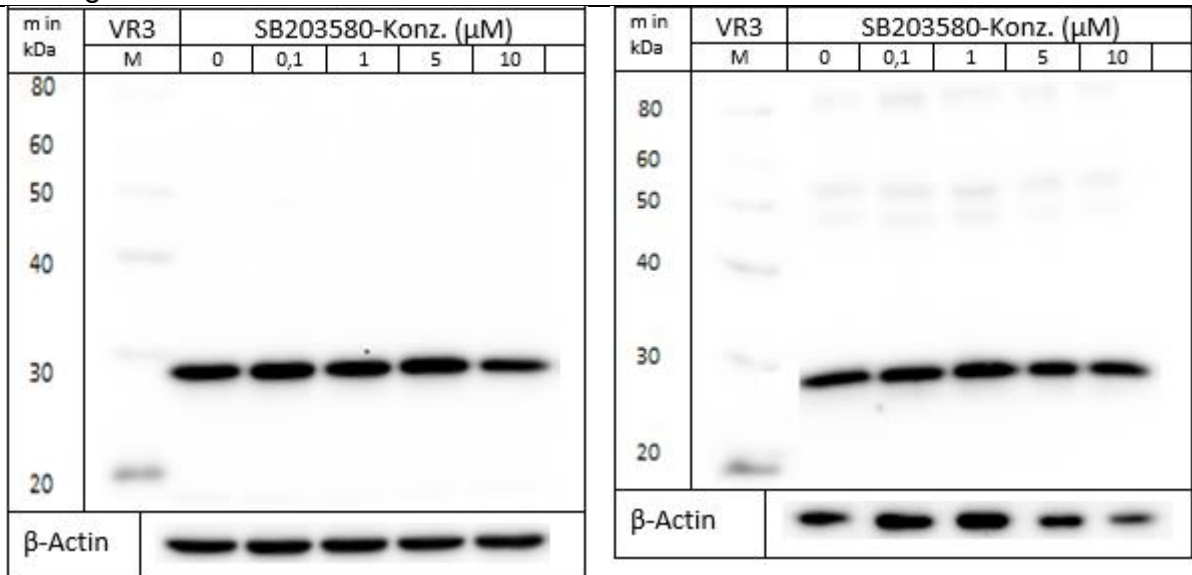
### p-HSP27



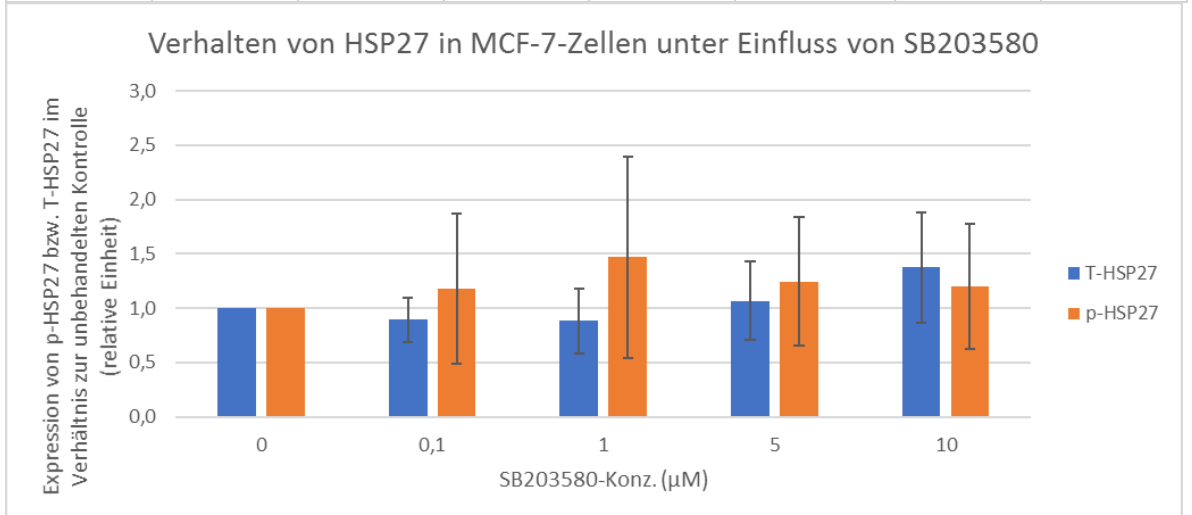
### T-HSP27



# Anhang



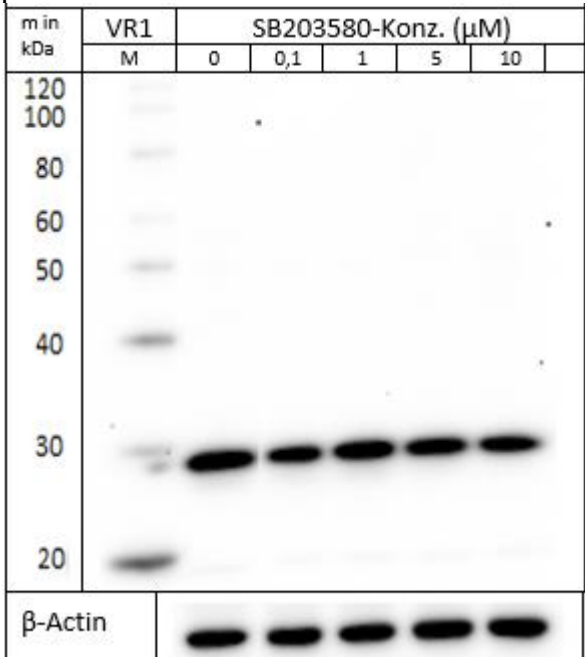
	SB203580-Konz. (μM)	Expression von p-HSP27 bzw. T-HSP27 (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
		VR3	VR3	VR3			
T-HSP27	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	0,9	1,1	0,7	0,89	0,20	
	1	0,7	1,2	0,7	0,89	0,30	
	5	0,7	1,5	1,0	1,07	0,36	
	10	0,8	1,8	1,6	1,38	0,51	
p-HSP27	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,9	0,5	1,2	1,18	0,69	
	1	2,5	0,8	1,1	1,47	0,93	
	5	1,8	0,6	1,3	1,25	0,59	
	10	1,8	1,0	0,7	1,20	0,58	



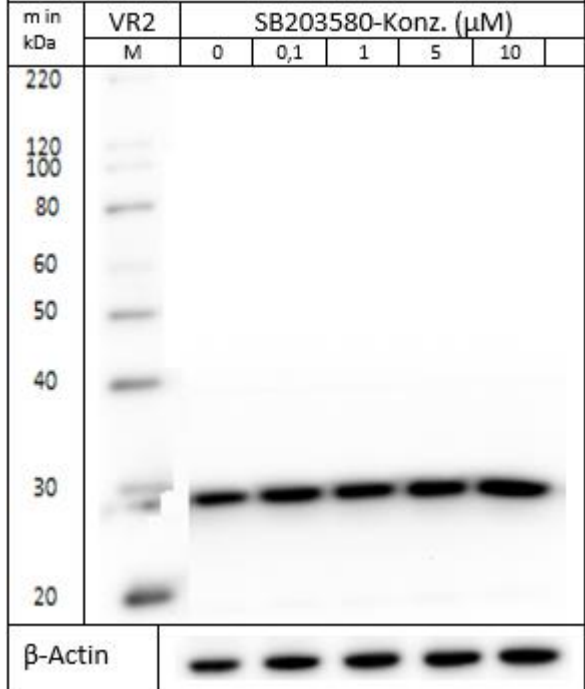
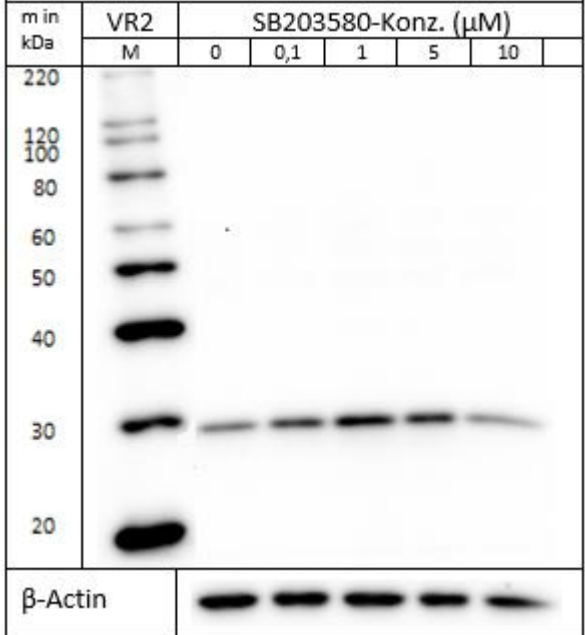
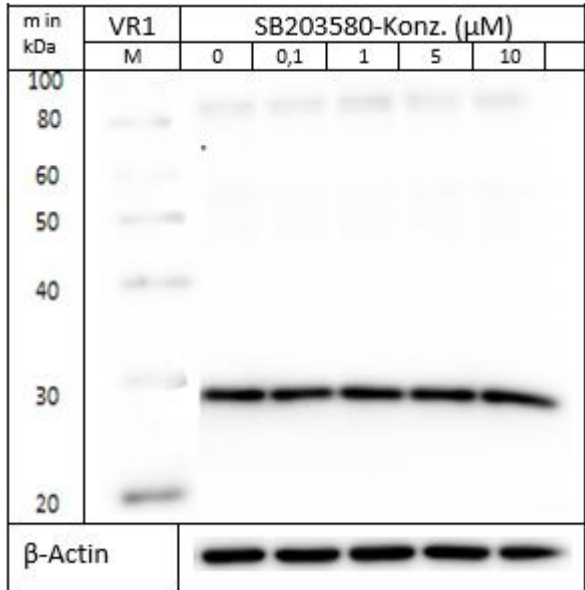
Anhang

9.1.3.3 Verhalten von HSP27 (27 kDa) in MDA-MB-231-Zellen

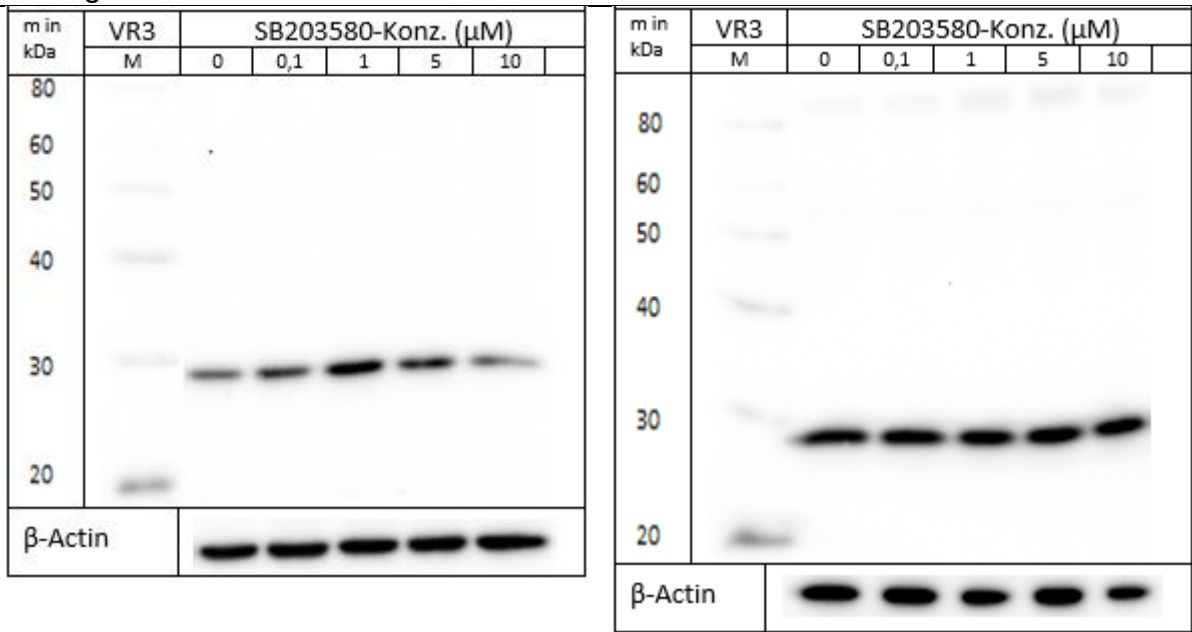
p-HSP27



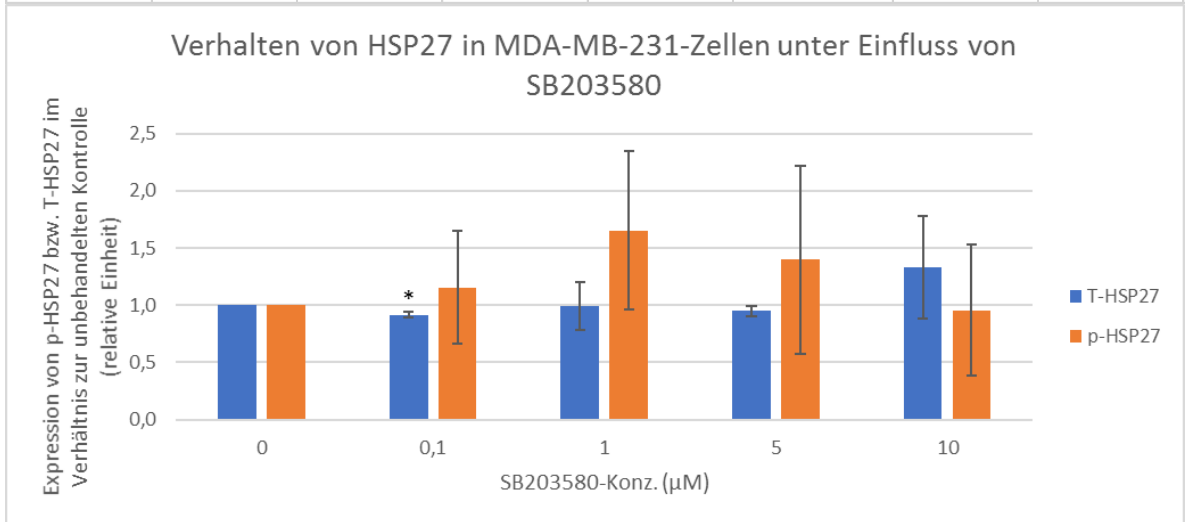
T-HSP27



# Anhang



	SB203580-Konz. (μM)	Expression von p-HSP27 bzw. T-HSP27 (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
T-HSP27	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	0,9	0,9	0,9	0,92	0,02	0,023
	1	0,9	0,8	1,2	0,99	0,21	0,932
	5	1,0	0,9	1,0	0,95	0,05	0,191
	10	1,3	0,9	1,8	1,34	0,45	0,325
p-HSP27	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	0,6	1,6	1,2	1,15	0,49	0,642
	1	0,9	2,2	1,9	1,65	0,69	0,245
	5	0,6	2,3	1,3	1,40	0,82	0,491
	10	0,5	1,6	0,7	0,96	0,57	0,905

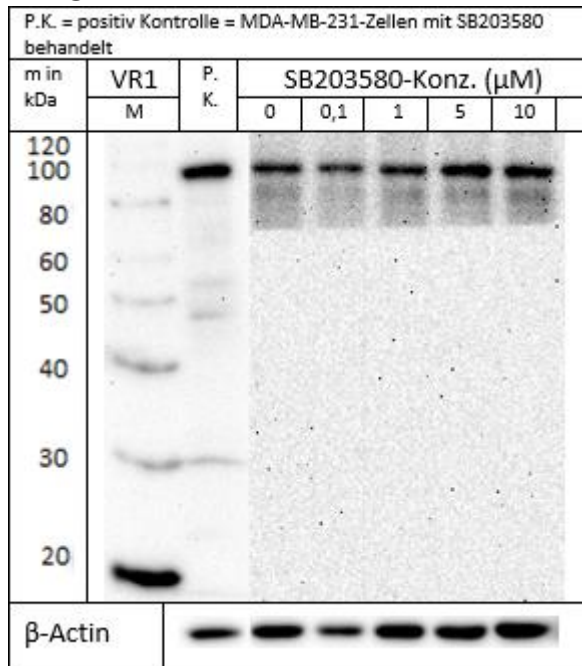


# Anhang

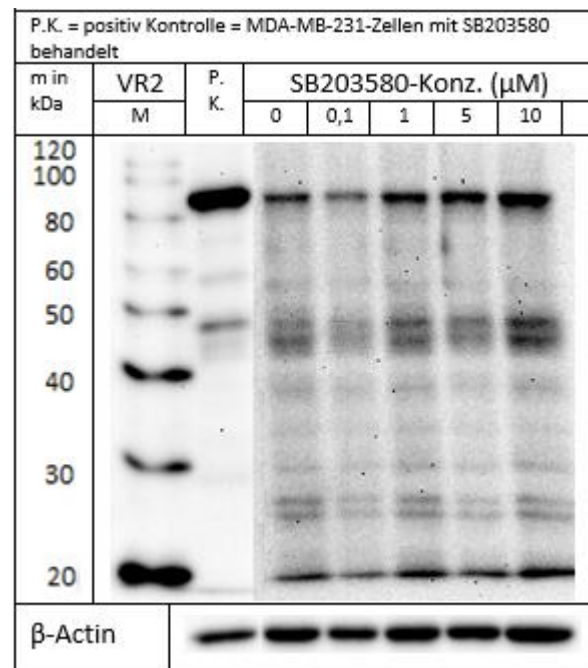
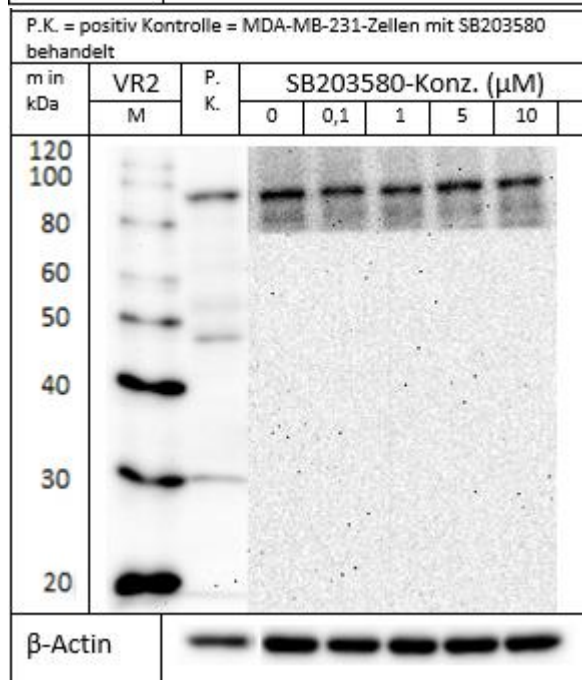
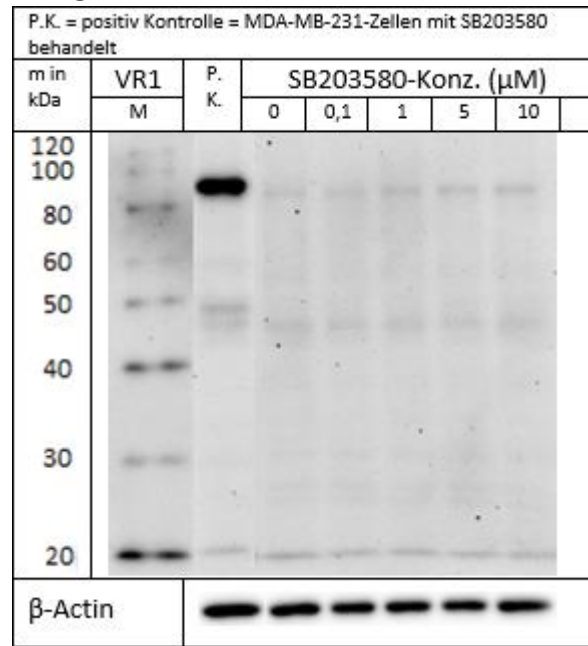
## 9.1.4 MSK1/2

### 9.1.4.1 Verhalten von MSK1/2 (90 kDa) in MCF-10A-Zellen

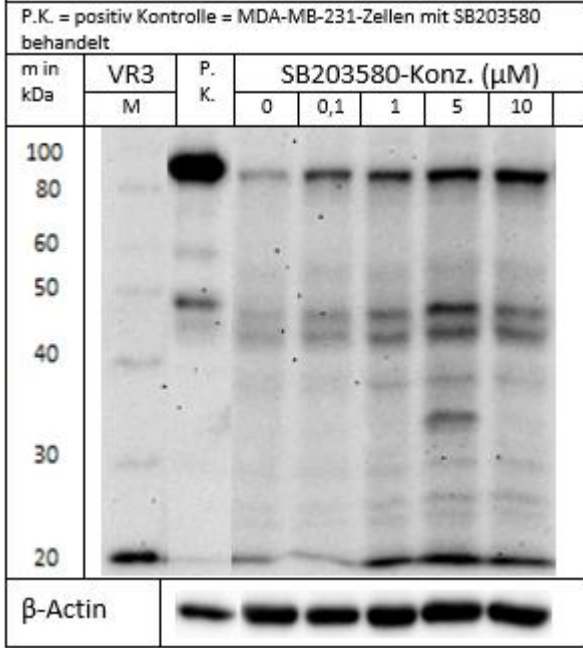
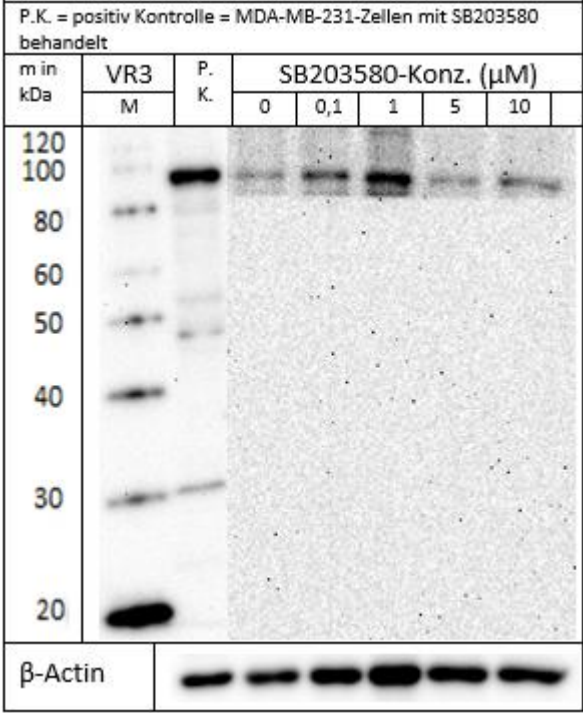
#### T-MSK1



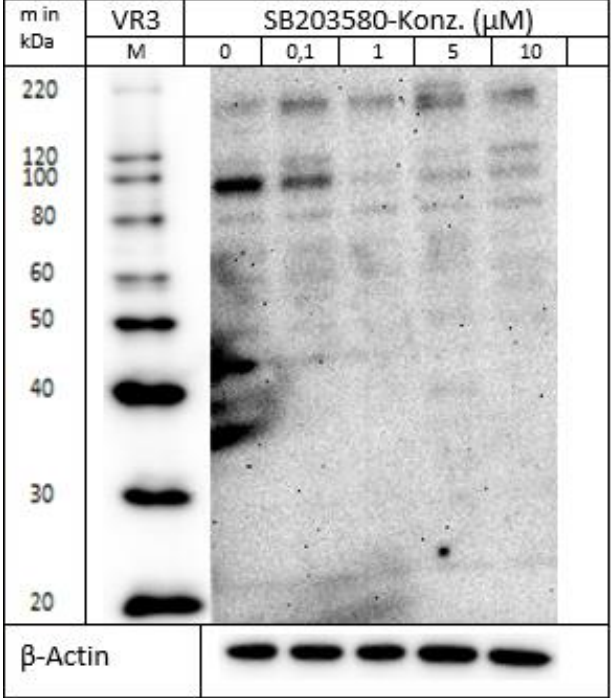
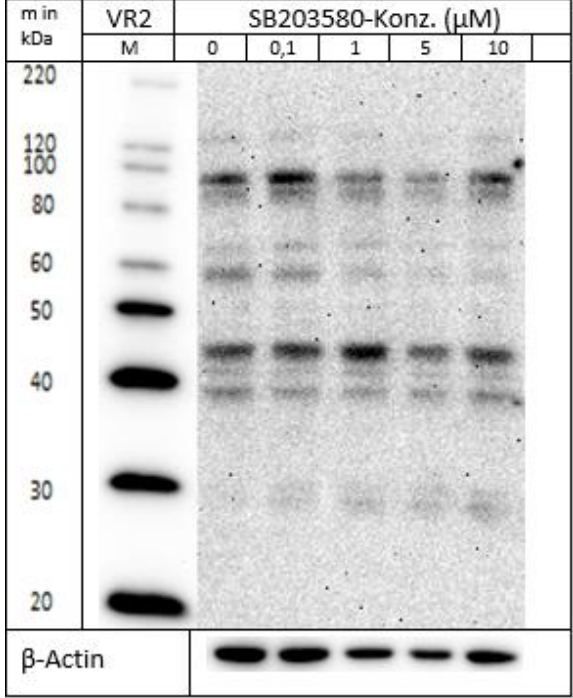
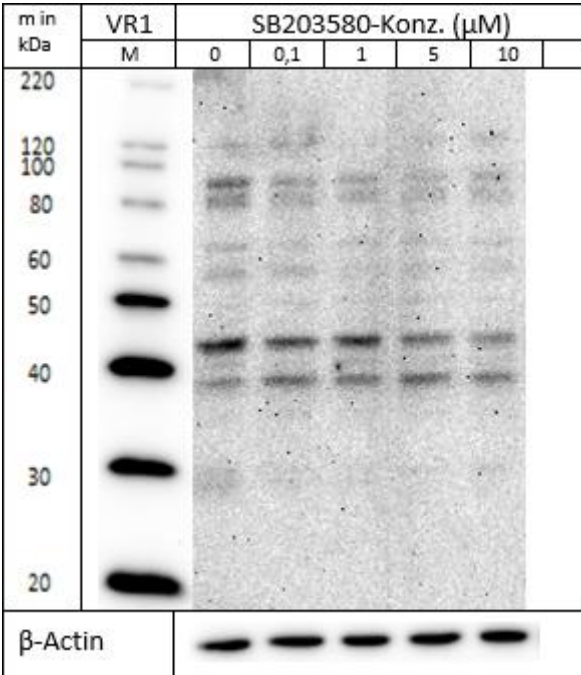
#### T-MSK2



Anhang

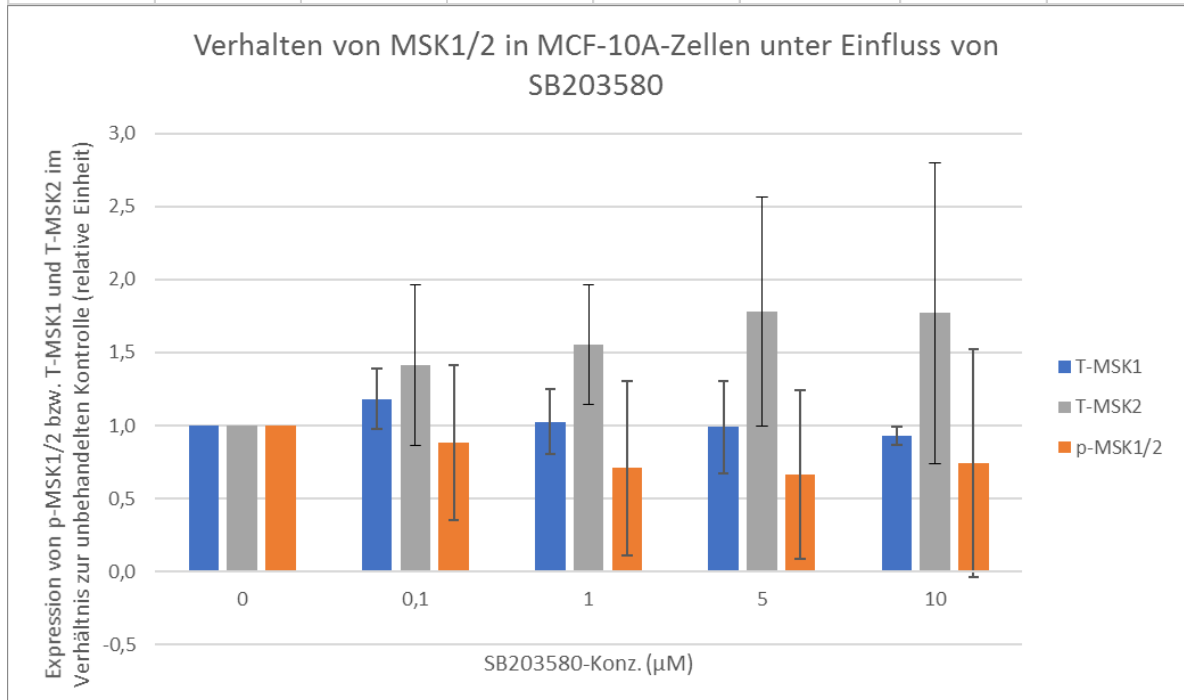


Anhang  
 p-MSK1/2



## Anhang

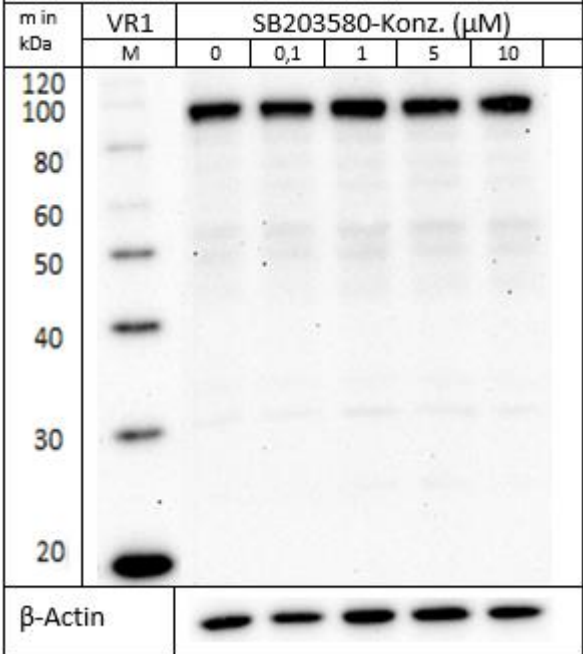
	SB203580-Konz. ( $\mu\text{M}$ )	Expression von p-MSK1/2 bzw. T-MSK1 und T-MSK2 (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
T-MSK1	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,4	1,0	1,1	1,18	0,21	0,27
	1	0,9	0,9	1,3	1,03	0,22	0,86
	5	1,3	1,0	0,6	0,99	0,32	0,96
	10	0,9	0,9	1,0	0,93	0,06	0,19
T-MSK2	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,3	0,9	2,0	1,41	0,55	0,32
	1	1,5	1,2	2,0	1,55	0,41	0,15
	5	1,3	1,3	2,7	1,78	0,78	0,23
	10	1,0	1,3	3,0	1,77	1,03	0,33
p-MSK1/2	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	0,6	1,5	0,5	0,88	0,53	0,74
	1	0,7	1,3	0,1	0,71	0,60	0,49
	5	0,6	1,3	0,1	0,67	0,58	0,42
	10	0,4	1,6	0,2	0,74	0,78	0,63



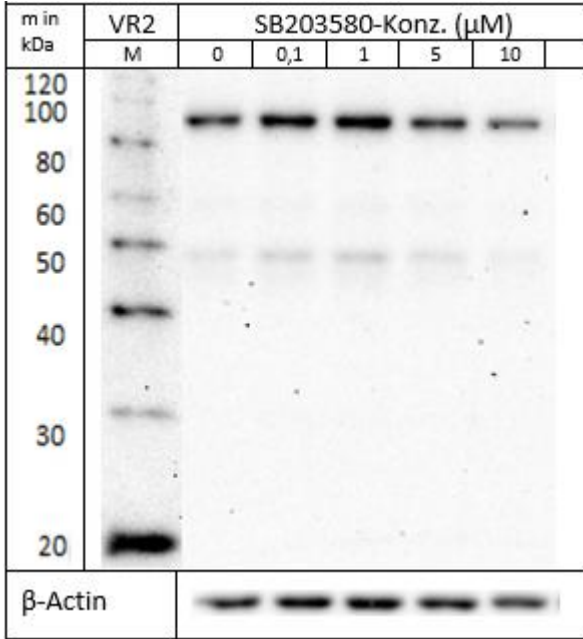
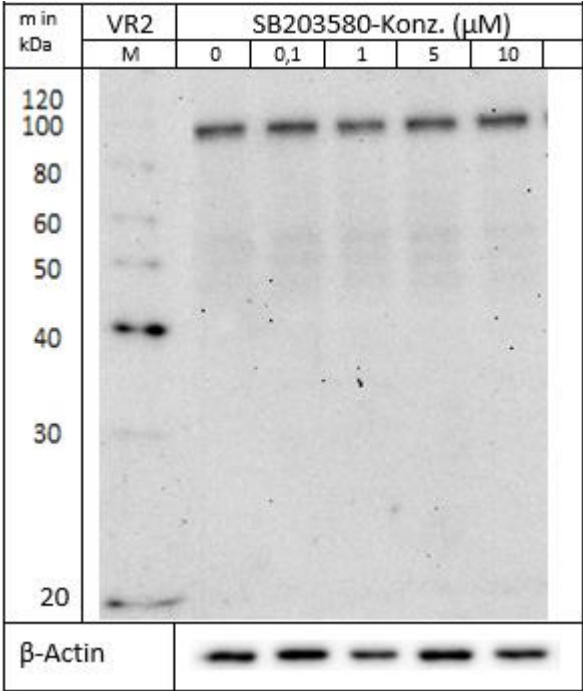
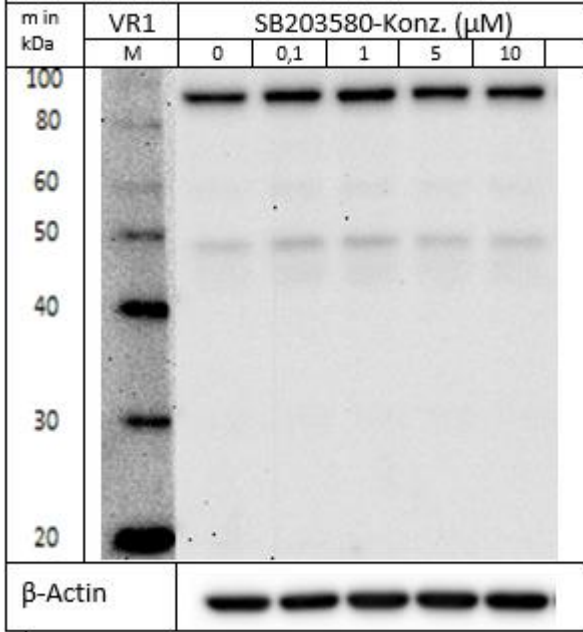
Anhang

9.1.4.2 Verhalten von MSK1/2 (90 kDa) in MCF-7-Zellen

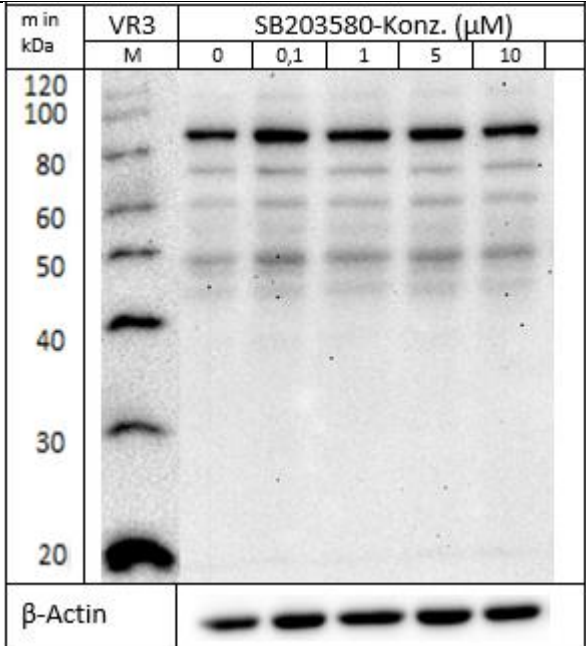
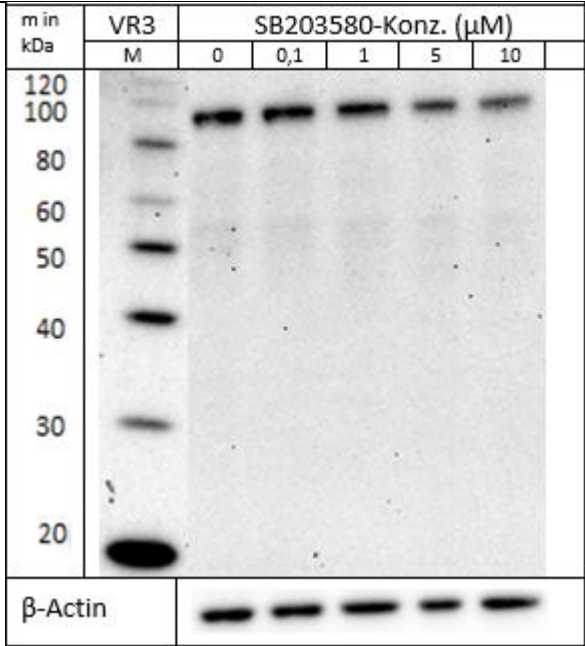
T-MSK1



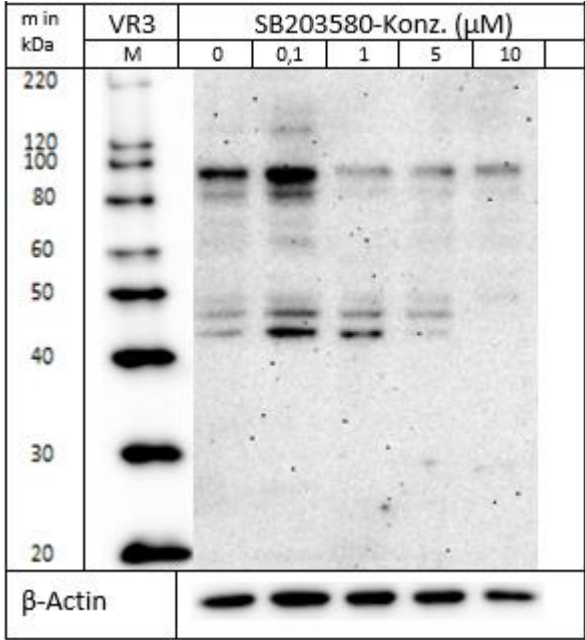
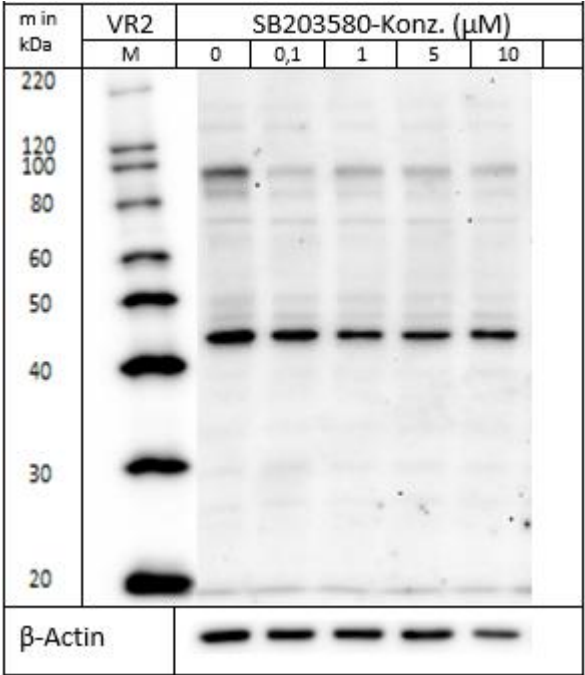
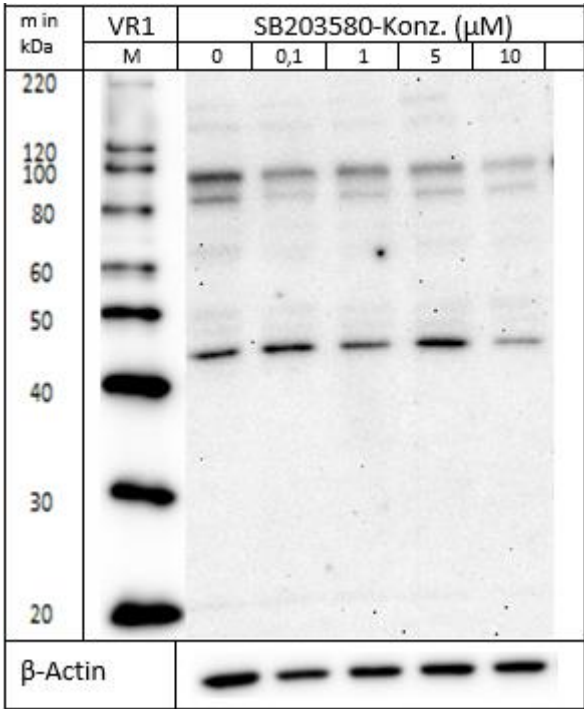
T-MSK2



Anhang

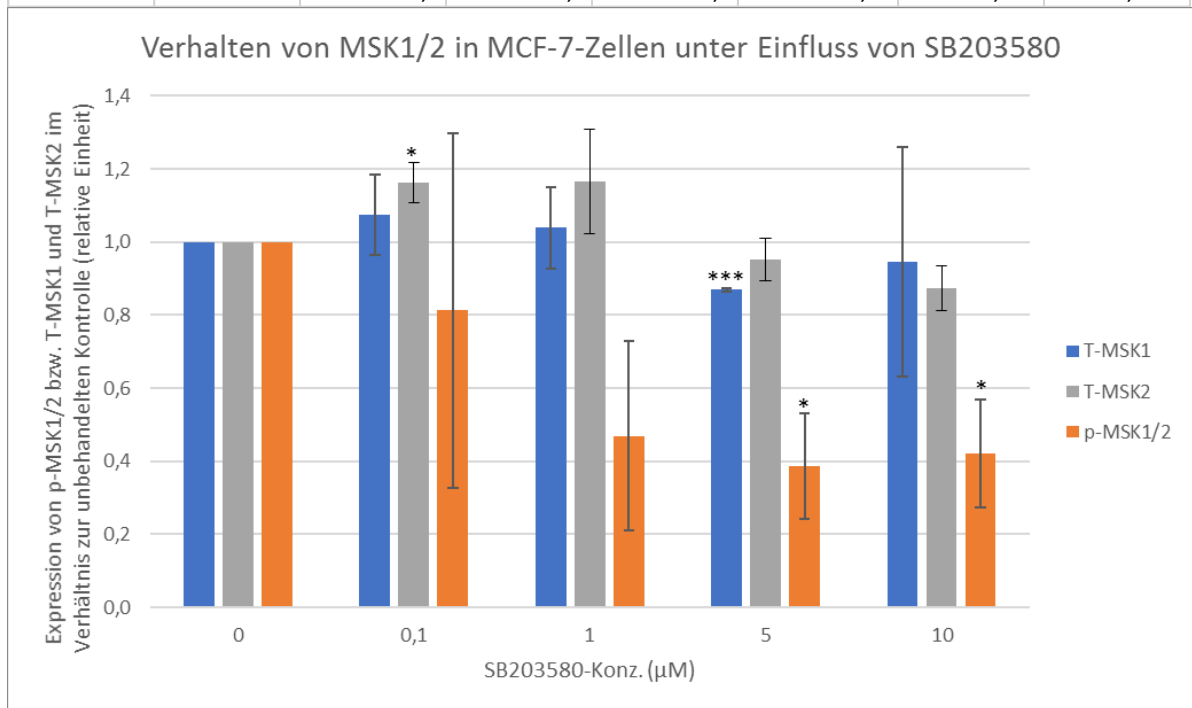


Anhang  
p-MSK1/2



## Anhang

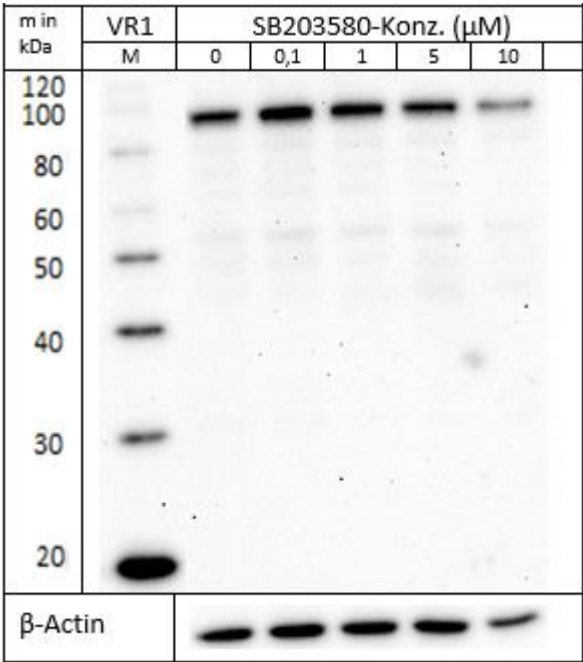
	SB203580-Konz. ( $\mu\text{M}$ )	Expression von p-MSK1/2 bzw. T-MSK1 und T-MSK2 (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
T-MSK1	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,1	0,9	1,2	1,07	0,111	0,3666
	1	1,0	1,1	0,9	1,04	0,112	0,6123
	5	0,9	0,9	0,9	0,87	0,004	0,0003
	10	1,0	1,2	0,6	0,95	0,314	0,7966
T-MSK2	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,2	1,1	1,2	1,16	0,055	0,0369
	1	1,2	1,3	1,0	1,16	0,143	0,1830
	5	1,0	0,9	1,0	0,95	0,059	0,2971
	10	0,9	0,8	0,9	0,87	0,061	0,0681
p-MSK1/2	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	0,8	0,3	1,3	0,81	0,486	0,5726
	1	0,7	0,5	0,2	0,47	0,258	0,0708
	5	0,5	0,4	0,2	0,39	0,143	0,0177
	10	0,3	0,6	0,4	0,42	0,148	0,0211



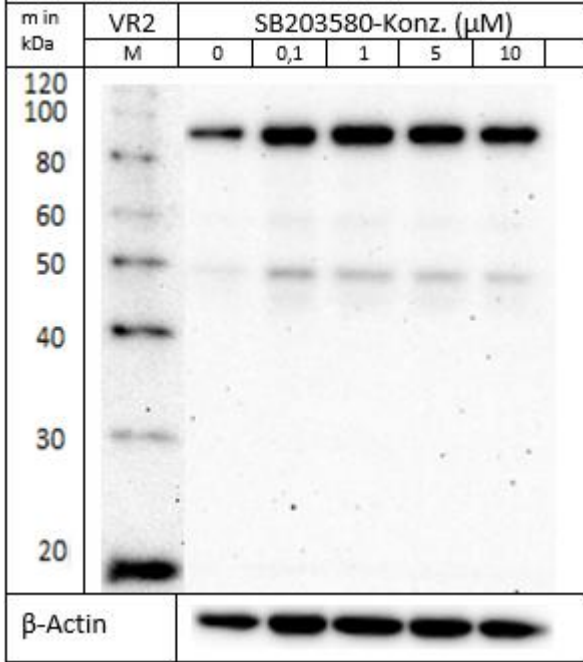
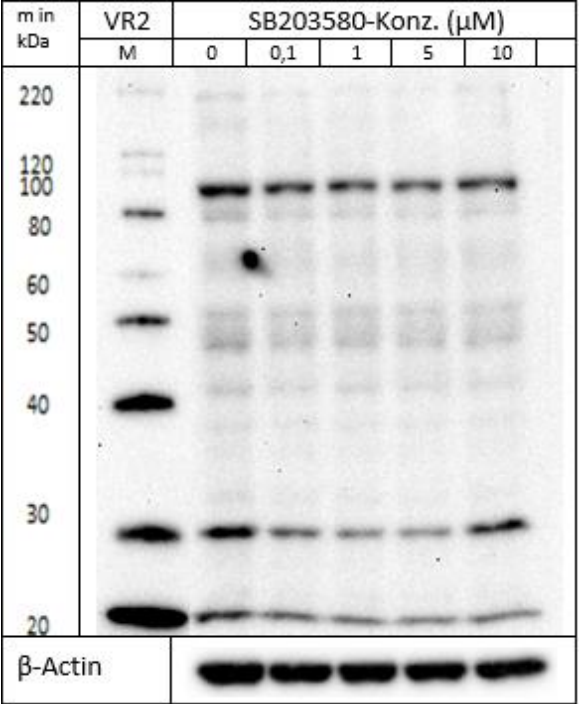
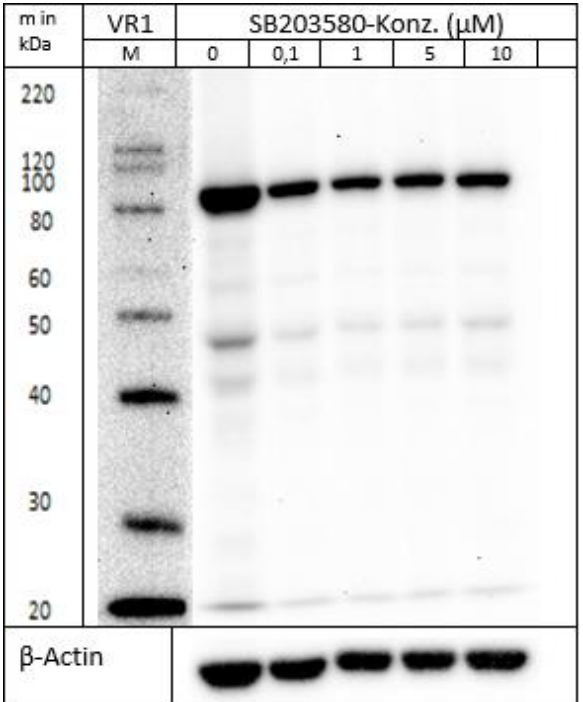
Anhang

9.1.4.3 Verhalten von MSK1/2 (90 kDa) in MDA-MB-231-Zellen

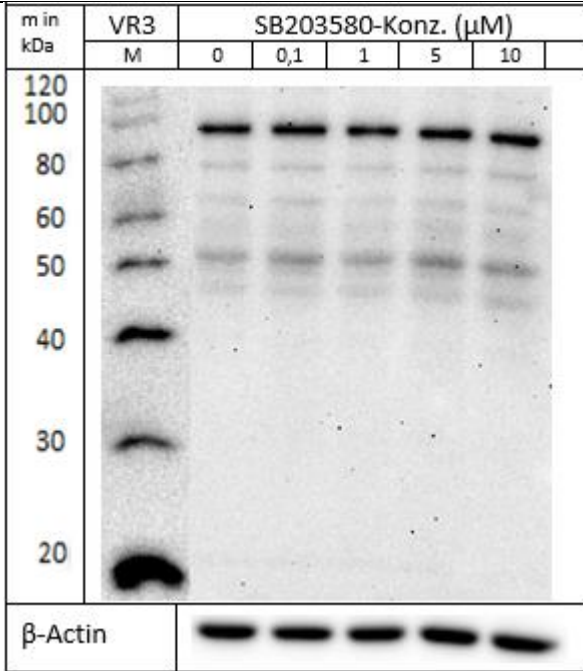
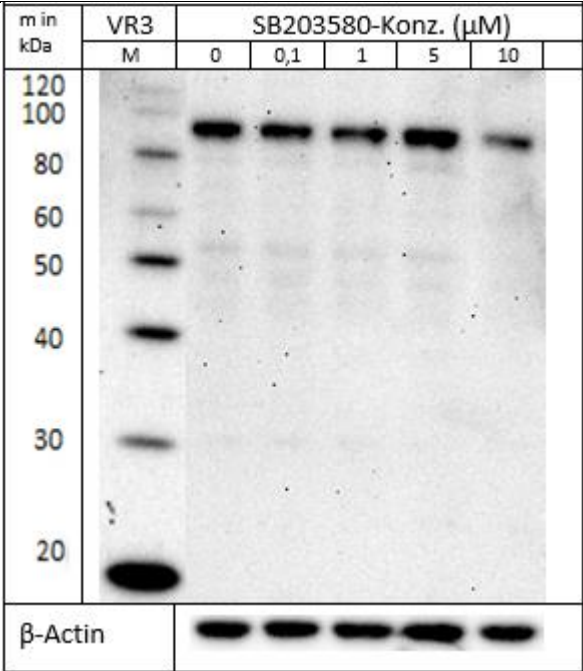
T-MSK1



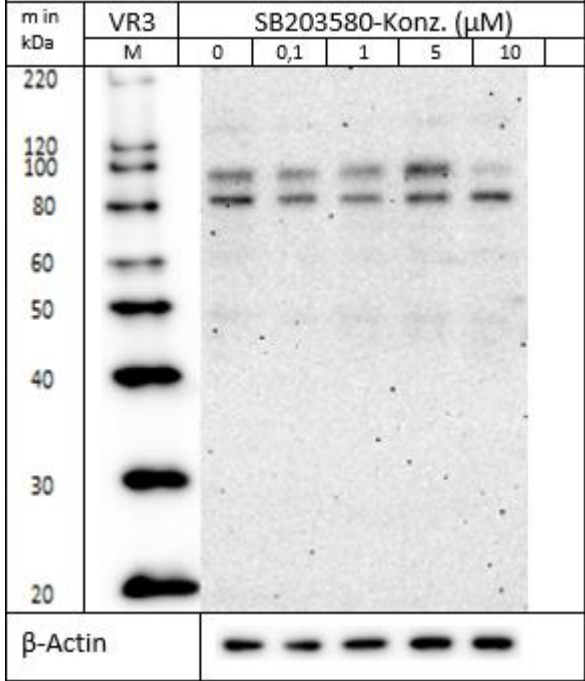
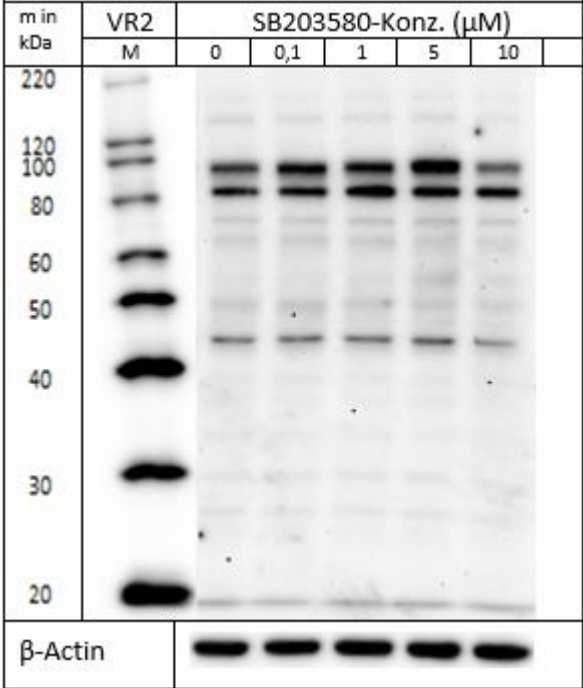
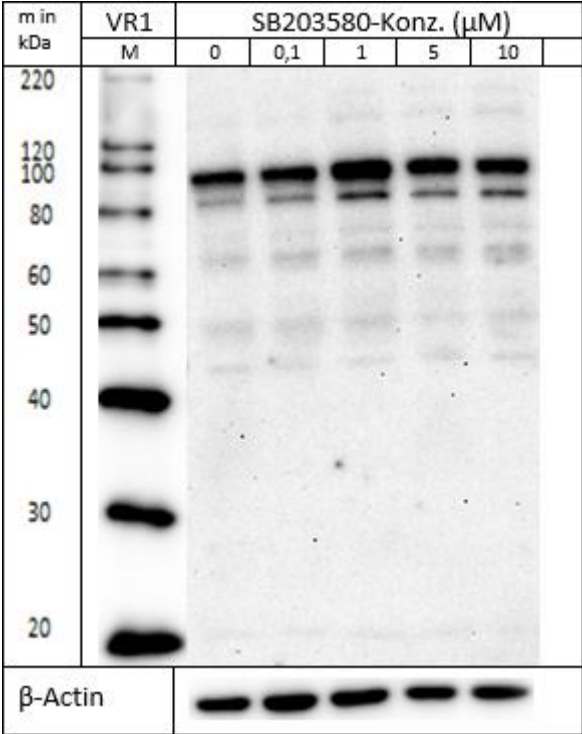
T-MSK2



Anhang

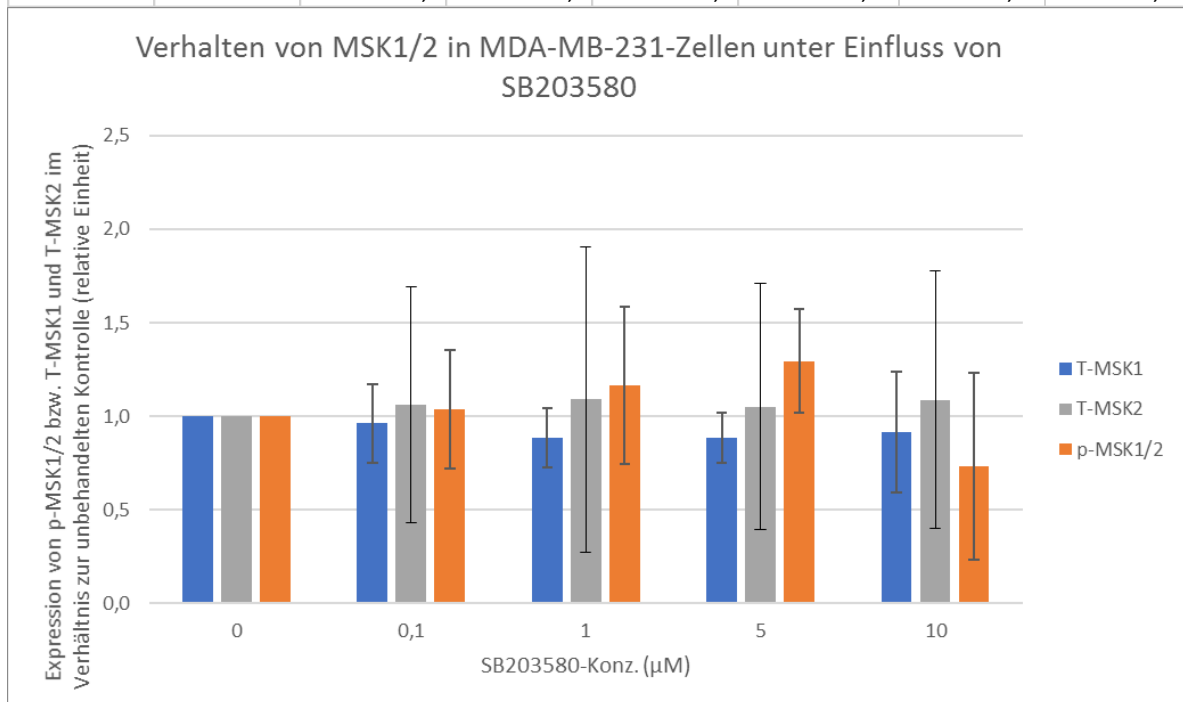


Anhang  
p-MSK1/2



## Anhang

	SB203580-Konz. ( $\mu\text{M}$ )	Expression von p-MSK1/2 bzw. T-MSK1 und T-MSK2 (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
T-MSK1	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,2	0,8	0,9	0,96	0,21	0,78
	1	1,1	0,8	0,8	0,88	0,16	0,33
	5	0,9	0,7	1,0	0,89	0,13	0,28
	10	0,9	1,2	0,6	0,92	0,32	0,70
T-MSK2	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	0,4	1,6	1,2	1,06	0,63	0,88
	1	0,3	1,9	1,0	1,09	0,82	0,87
	5	0,4	1,7	1,1	1,05	0,66	0,91
	10	0,4	1,8	1,1	1,09	0,69	0,84
p-MSK1/2	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	0,8	1,4	0,9	1,04	0,32	0,87
	1	1,6	1,2	0,7	1,16	0,42	0,57
	5	1,4	1,5	1,0	1,30	0,27	0,20
	10	1,2	0,7	0,3	0,73	0,50	0,45

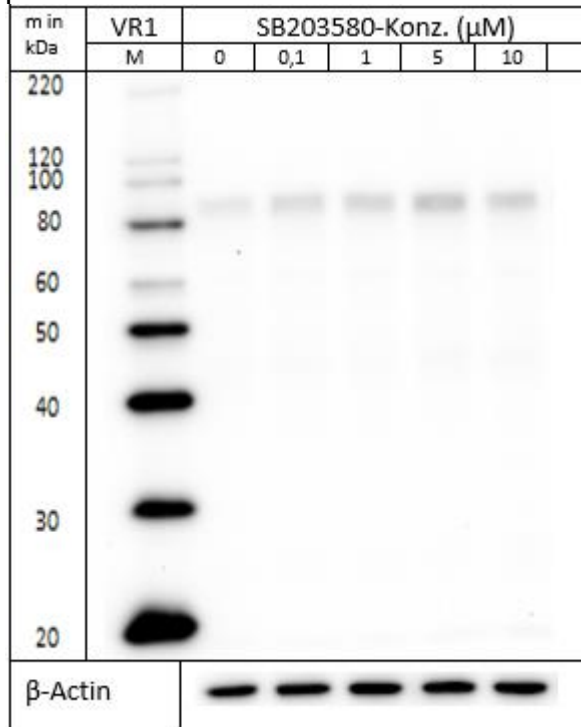


# Anhang

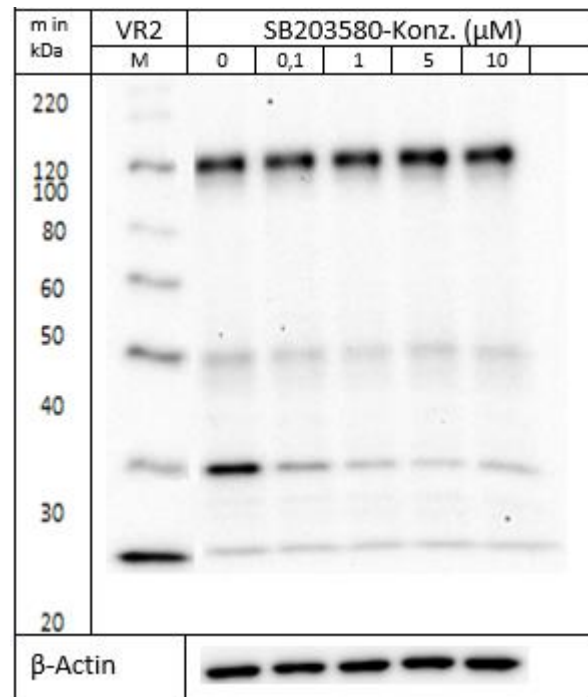
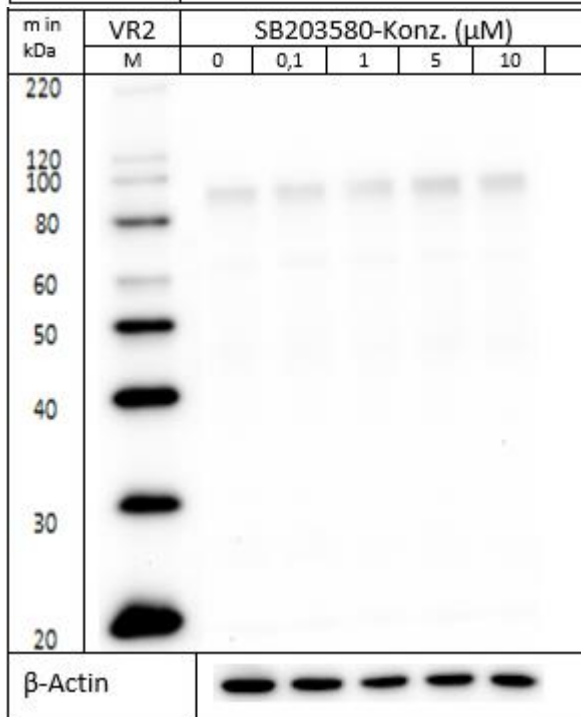
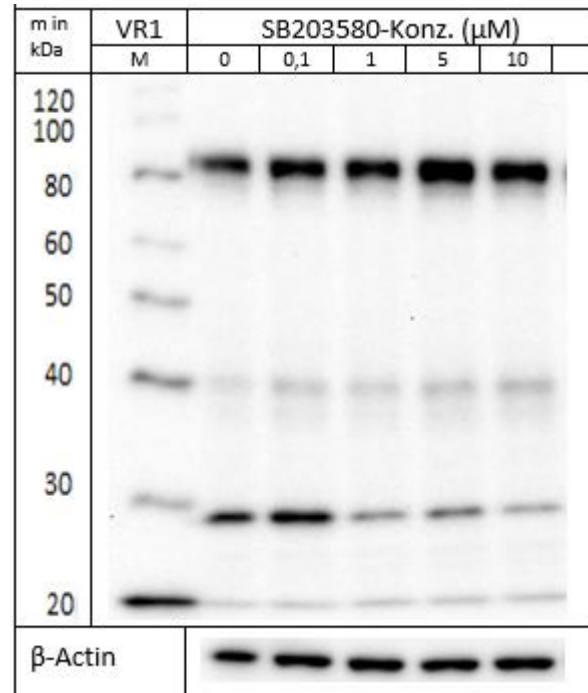
## 9.1.5 RSK

### 9.1.5.1 Verhalten von RSK (90 kDa) in MCF-10A-Zellen

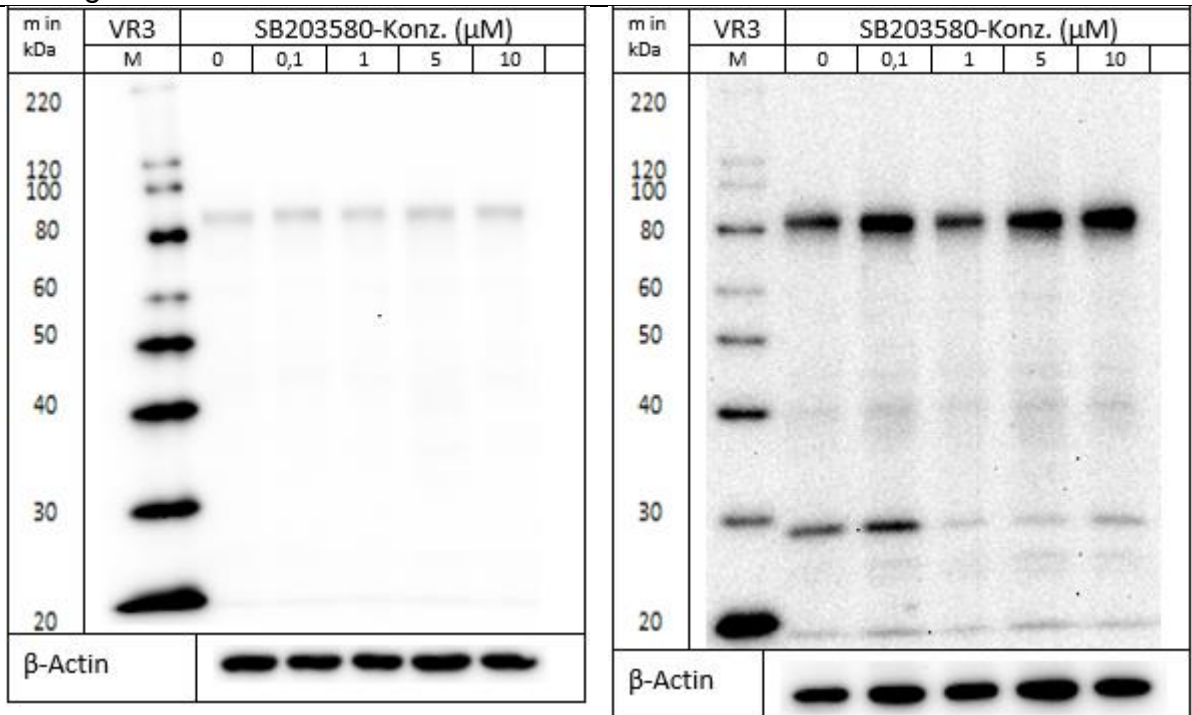
#### p-RSK



#### T-RSK

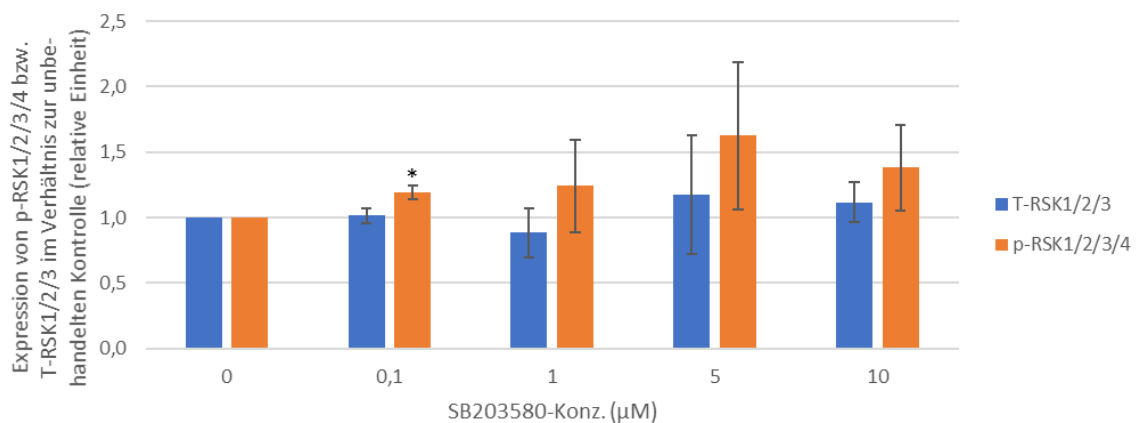


# Anhang



	SB203580-Konz. (μM)	Expression von p-RSK1/2/3/4 bzw. T-RSK1/2/3 (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
T-RSK1/2/3	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,0	1,1	1,0	1,01	0,05	0,70
	1	1,0	1,0	0,7	0,88	0,19	0,39
	5	1,7	1,1	0,8	1,17	0,45	0,57
	10	1,1	1,0	1,3	1,12	0,15	0,31
	p-RSK1/2/3/4	0	1,0	1,0	1,0	1,00	
	0,1	1,2	1,3	1,2	1,19	0,05	0,02
	1	1,1	1,6	1,0	1,24	0,36	0,36
	5	1,6	2,2	1,1	1,63	0,56	0,19
	10	1,2	1,8	1,2	1,38	0,33	0,18

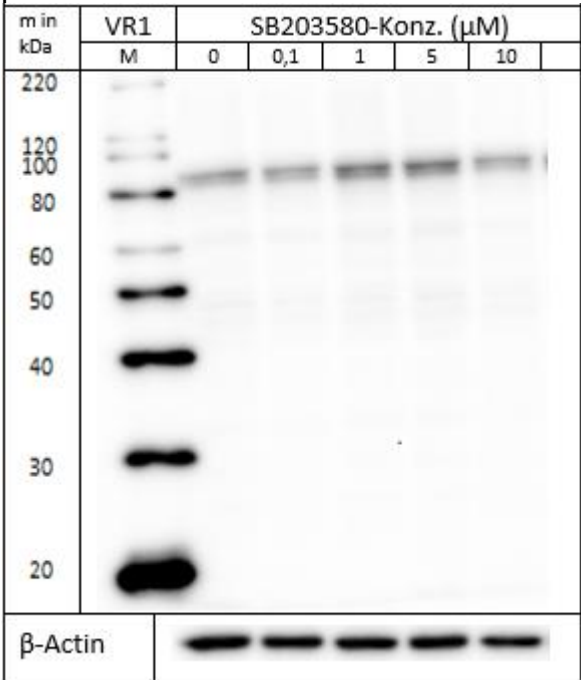
Verhalten von RSK in MCF-10A-Zellen unter Einfluss von SB203580



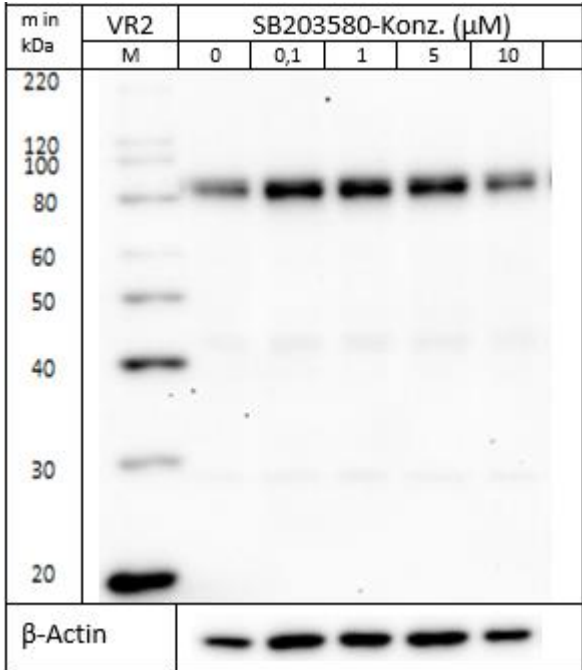
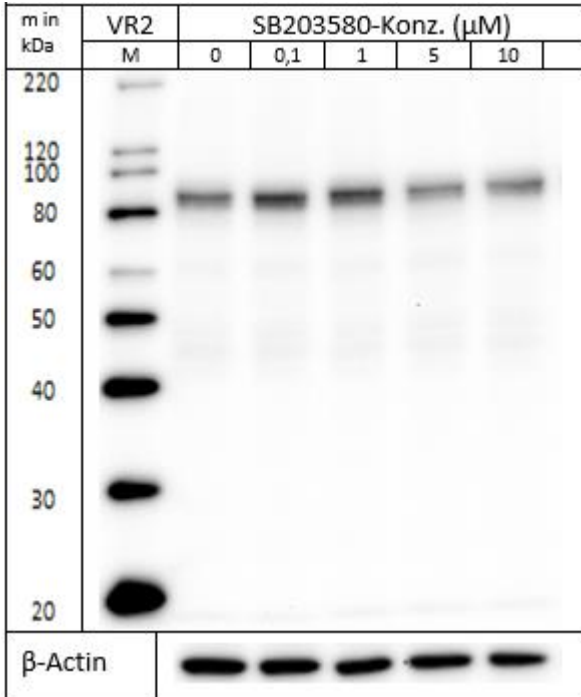
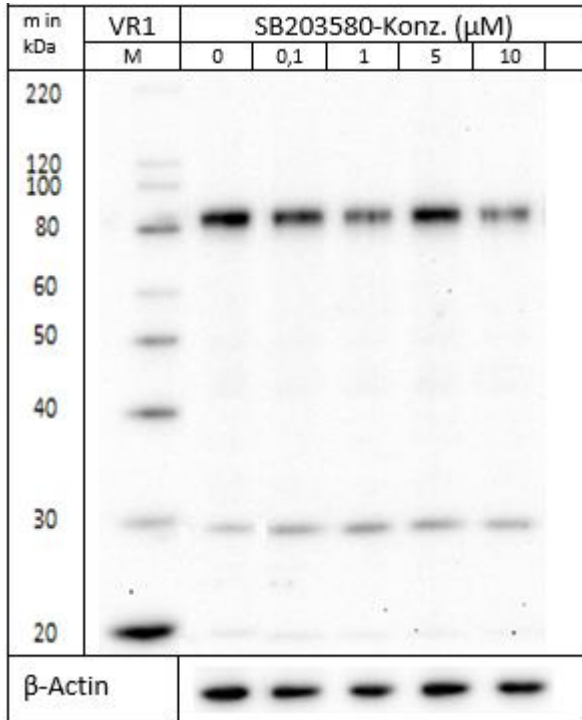
Anhang

9.1.5.2 Verhalten von RSK (90 kDa) in MCF-7-Zellen

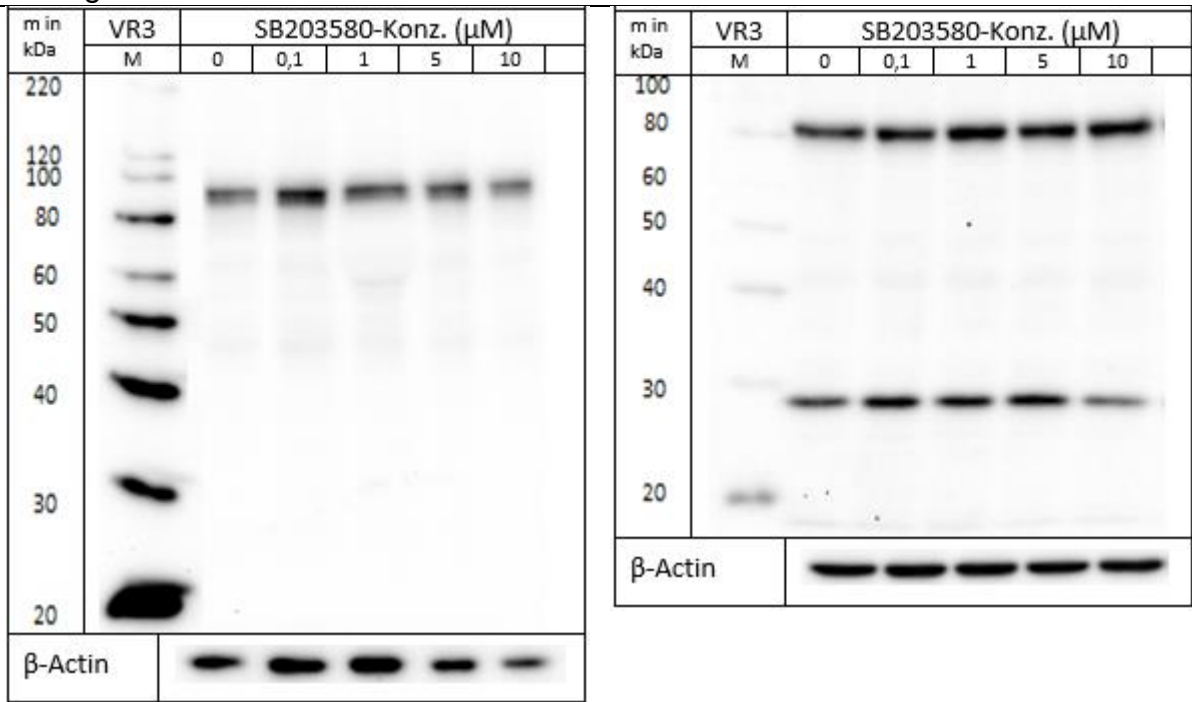
p-RSK



T-RSK

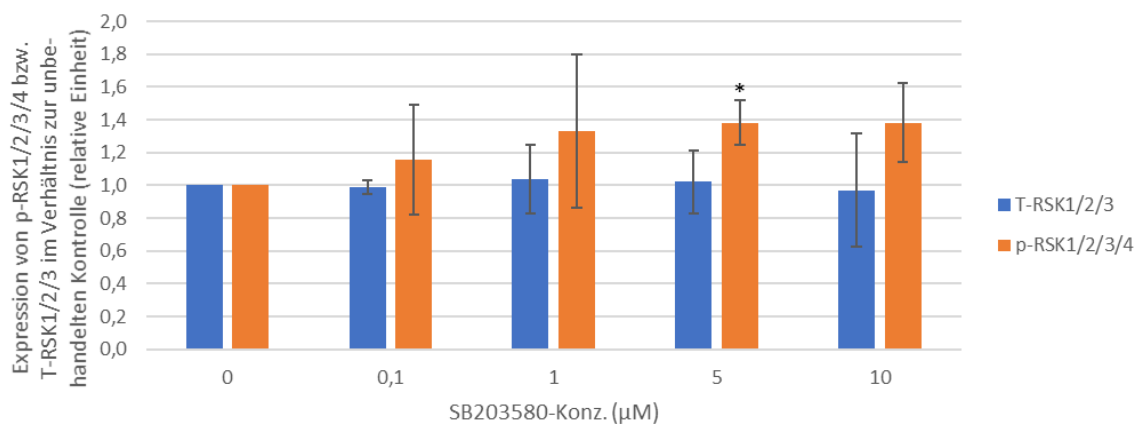


# Anhang



	SB203580-Konz. (µM)	Expression von p-RSK1/2/3/4 bzw. T-RSK1/2/3 (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
T-RSK1/2/3	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,0	0,9	1,0	0,99	0,04	0,63
	1	0,9	1,0	1,3	1,04	0,21	0,77
	5	1,0	0,8	1,2	1,02	0,19	0,87
	10	0,7	0,9	1,3	0,97	0,34	0,89
p-RSK1/2/3/4	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,0	1,5	0,9	1,15	0,34	0,51
	1	1,5	1,7	0,8	1,33	0,47	0,34
	5	1,5	1,3	1,4	1,38	0,14	0,04
	10	1,1	1,6	1,5	1,38	0,24	0,11

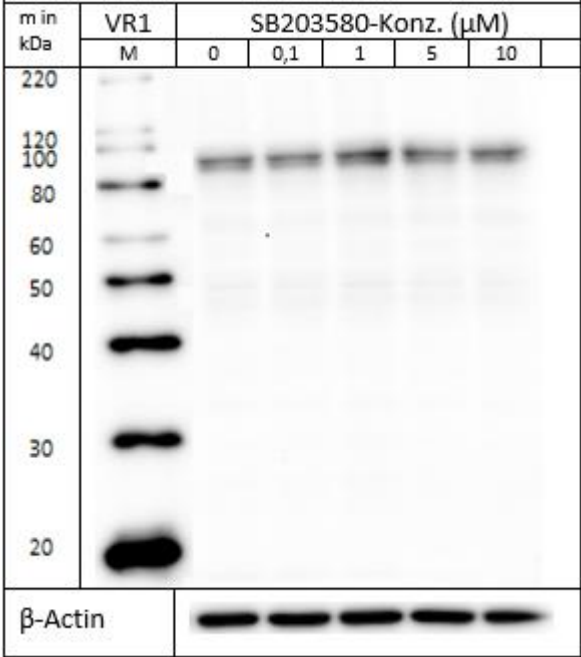
Verhalten von RSK in MCF-7-Zellen unter Einfluss von SB203580



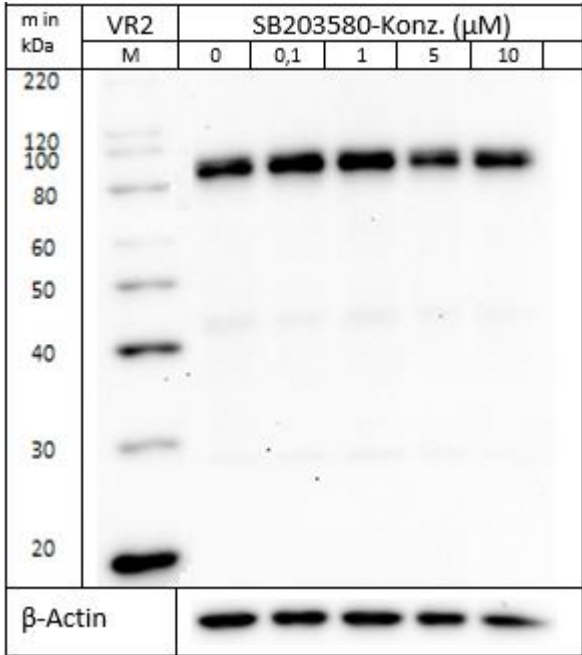
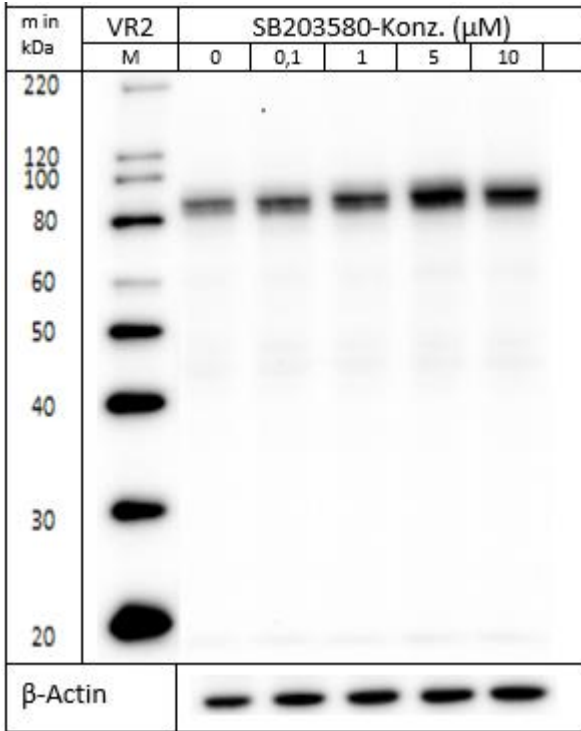
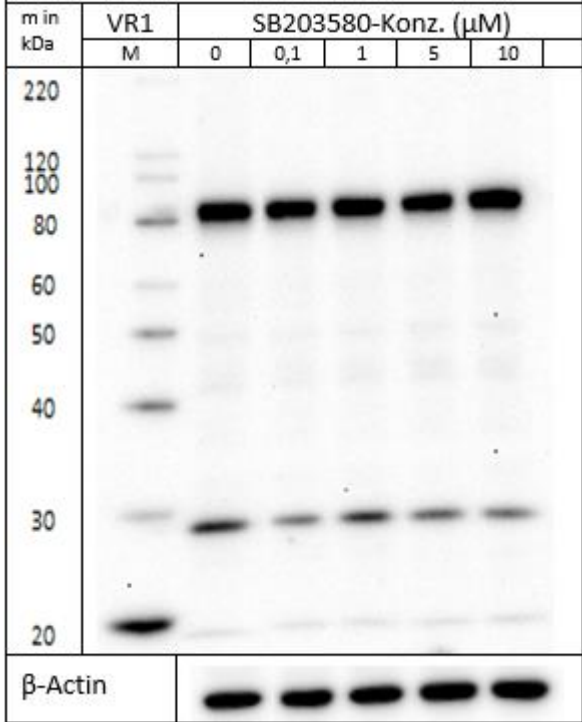
Anhang

9.1.5.3 Verhalten von RSK (90 kDa) in MDA-MB-231-Zellen

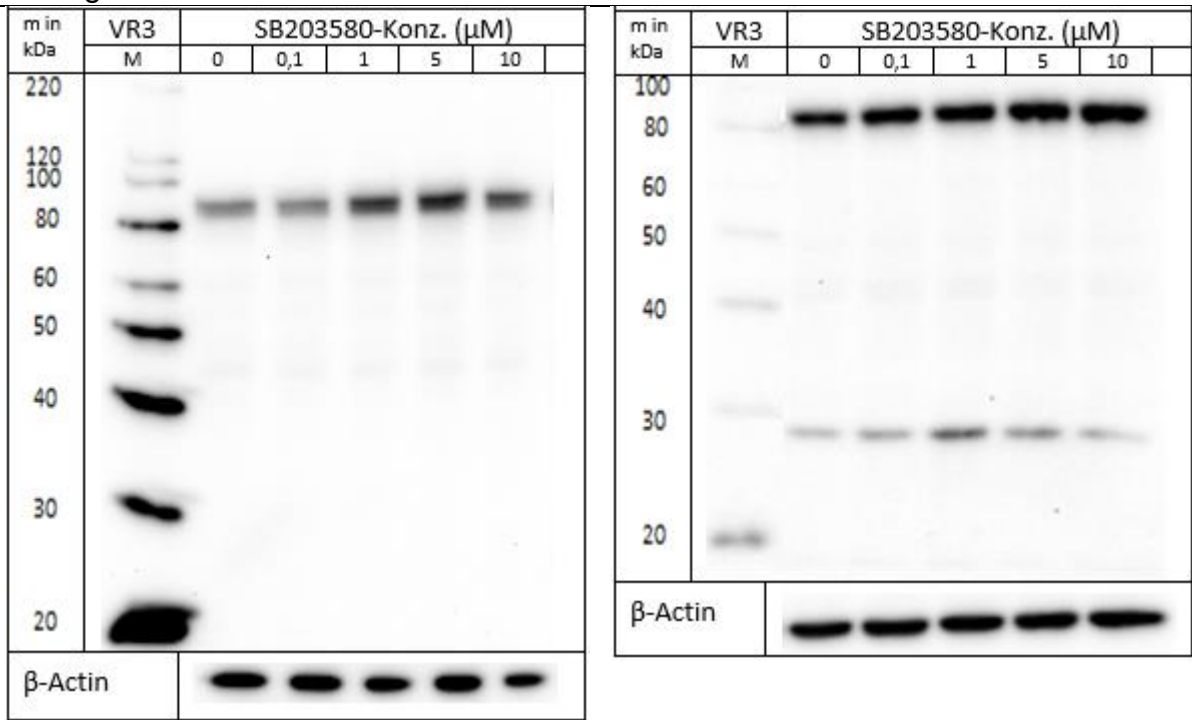
p-RSK



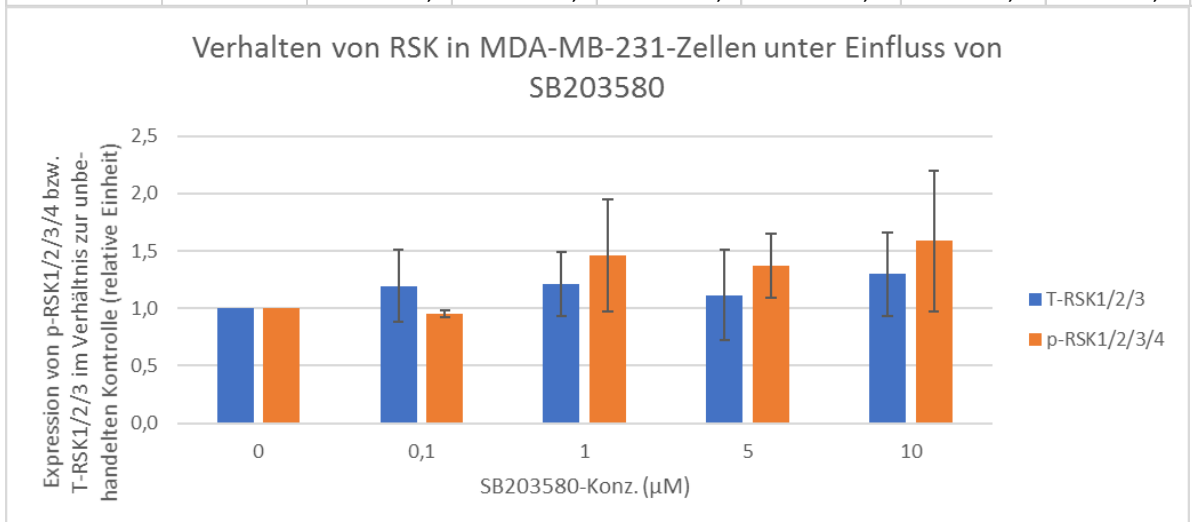
T-RSK



# Anhang



	SB203580-Konz. (μM)	Expression von p-RSK1/2/3/4 bzw. T-RSK1/2/3 (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
		T-RSK1/2/3	0	1,0			
	0,1	0,9	1,5	1,2	1,20	0,32	0,40
	1	0,9	1,5	1,3	1,21	0,28	0,32
	5	0,7	1,2	1,4	1,12	0,39	0,66
	10	0,9	1,6	1,4	1,30	0,36	0,29
p-RSK1/2/3/4	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,0	1,0	0,9	0,96	0,03	0,13
	1	1,3	1,1	2,0	1,46	0,49	0,25
	5	1,1	1,4	1,6	1,37	0,28	0,15
	10	1,4	1,1	2,3	1,59	0,62	0,24

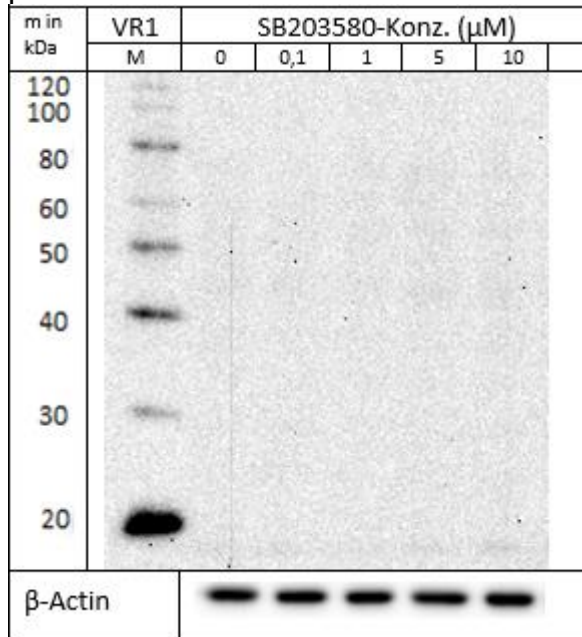


# Anhang

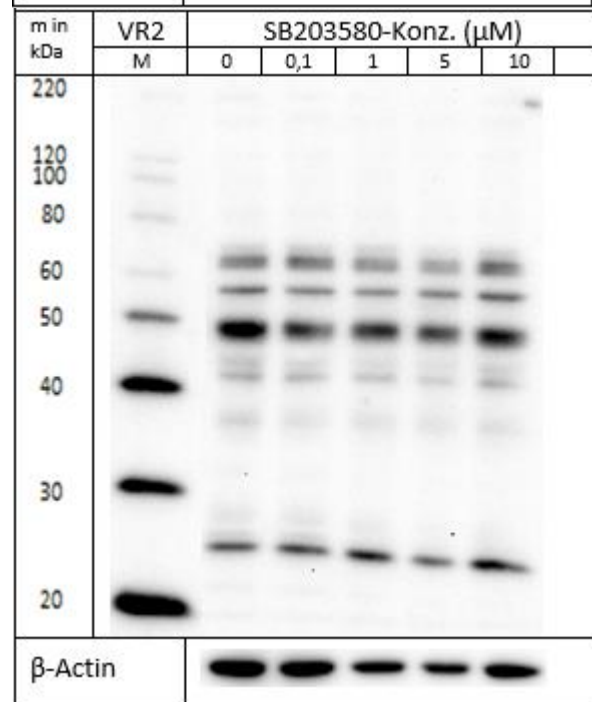
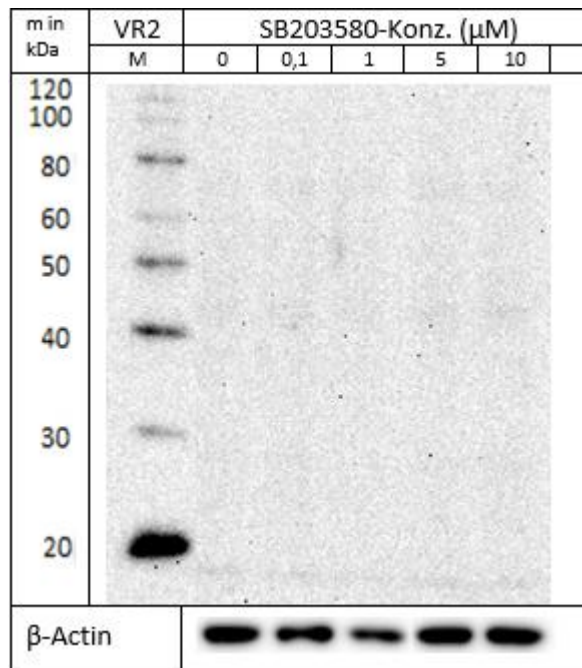
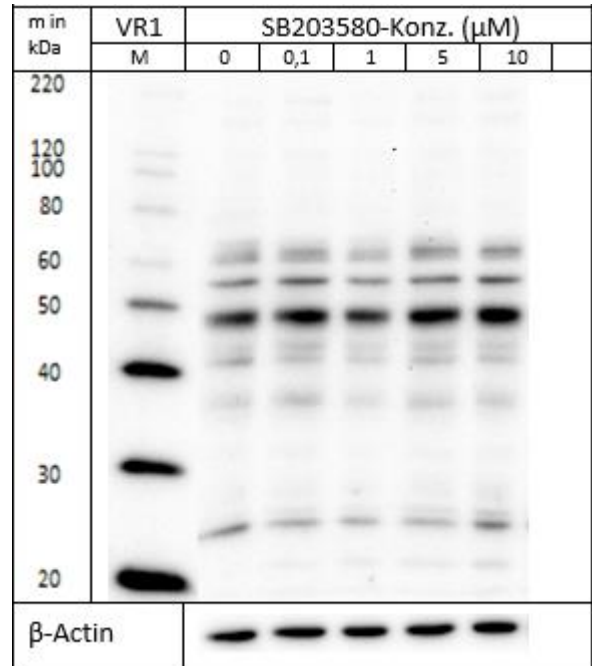
## 9.1.6 c-JUN

### 9.1.6.1 Verhalten von c-JUN (48 kDa) in MCF-10A-Zellen

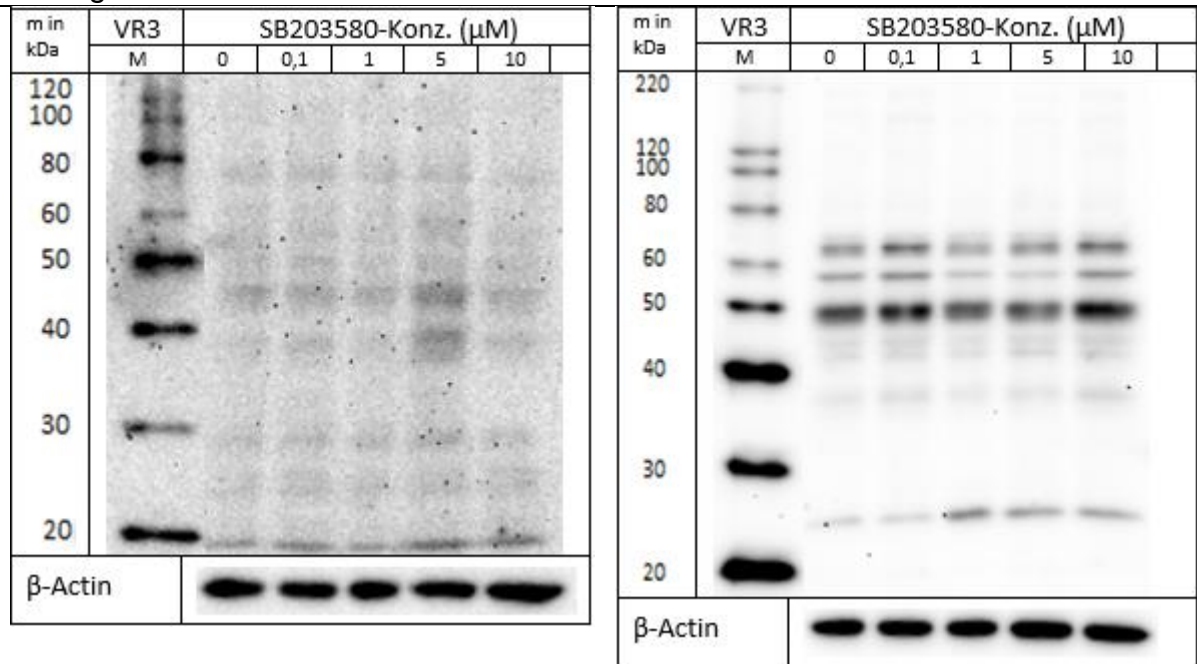
#### p-c-JUN



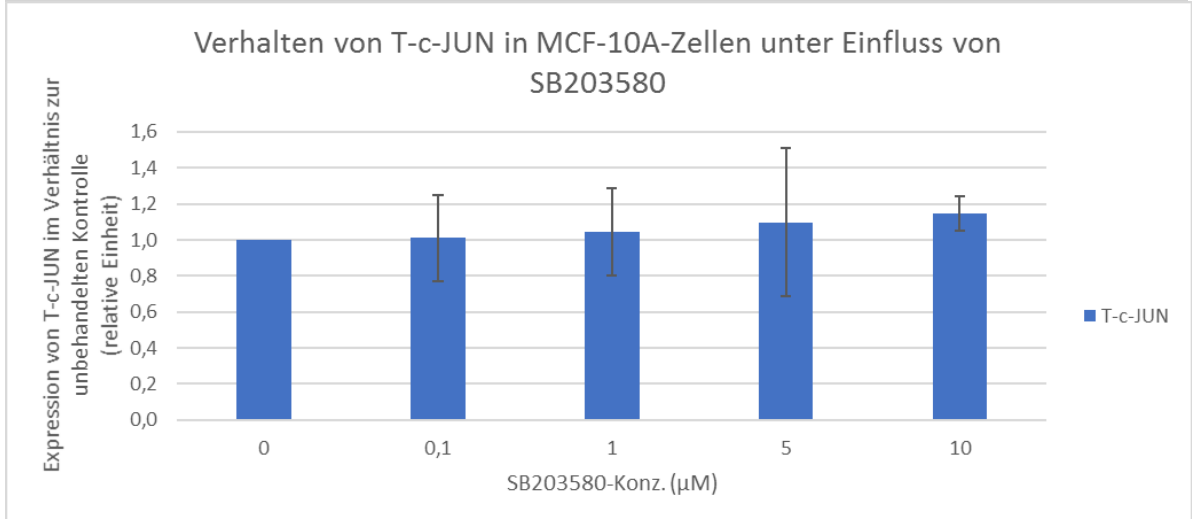
#### T- c-JUN



# Anhang



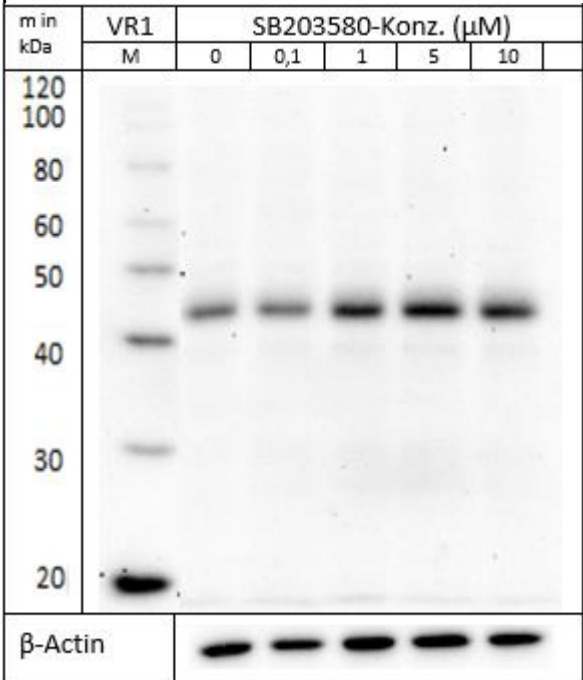
	SB203580-Konz. (μM)	Expression von T-c-JUN (relative Einheit)			Mittelwert	Standard-abweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
T-c-JUN	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,2	0,7	1,1	1,01	0,24	
	1	0,9	1,3	0,9	1,04	0,24	
	5	1,2	1,4	0,6	1,10	0,41	
	10	1,2	1,2	1,0	1,15	0,09	



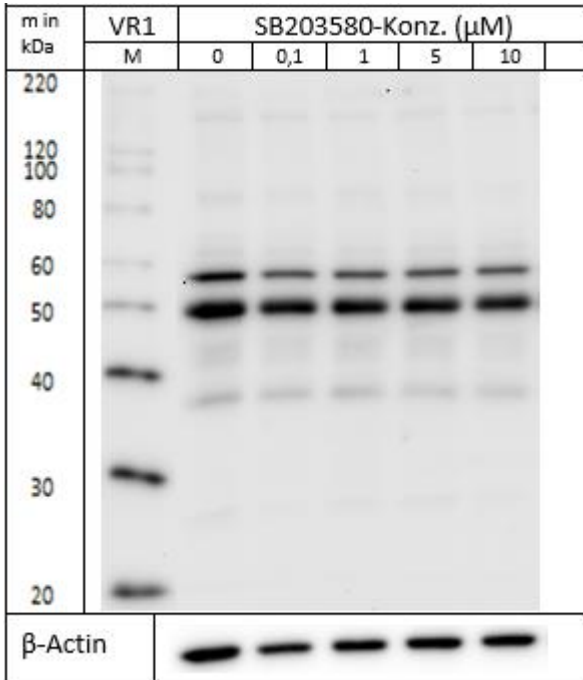
Anhang

9.1.6.2 Verhalten von c-JUN (48 kDa) in MCF-7-Zellen

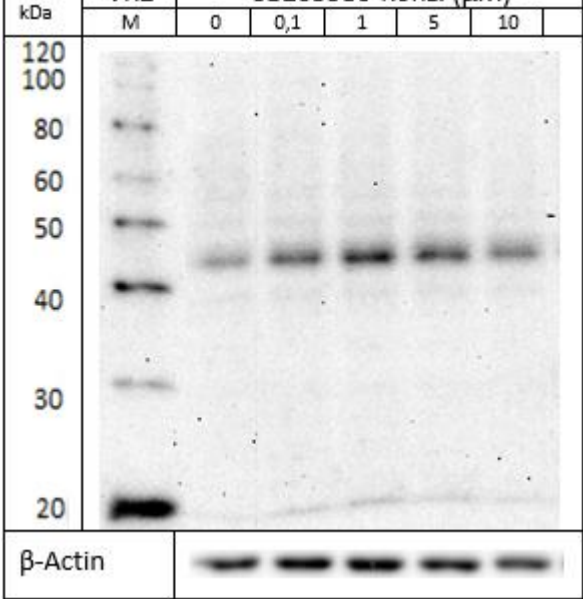
p-c-JUN



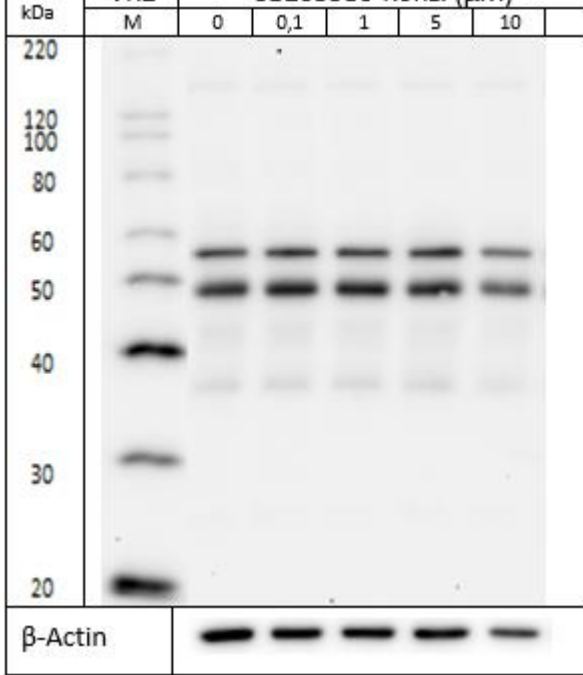
T- c-JUN



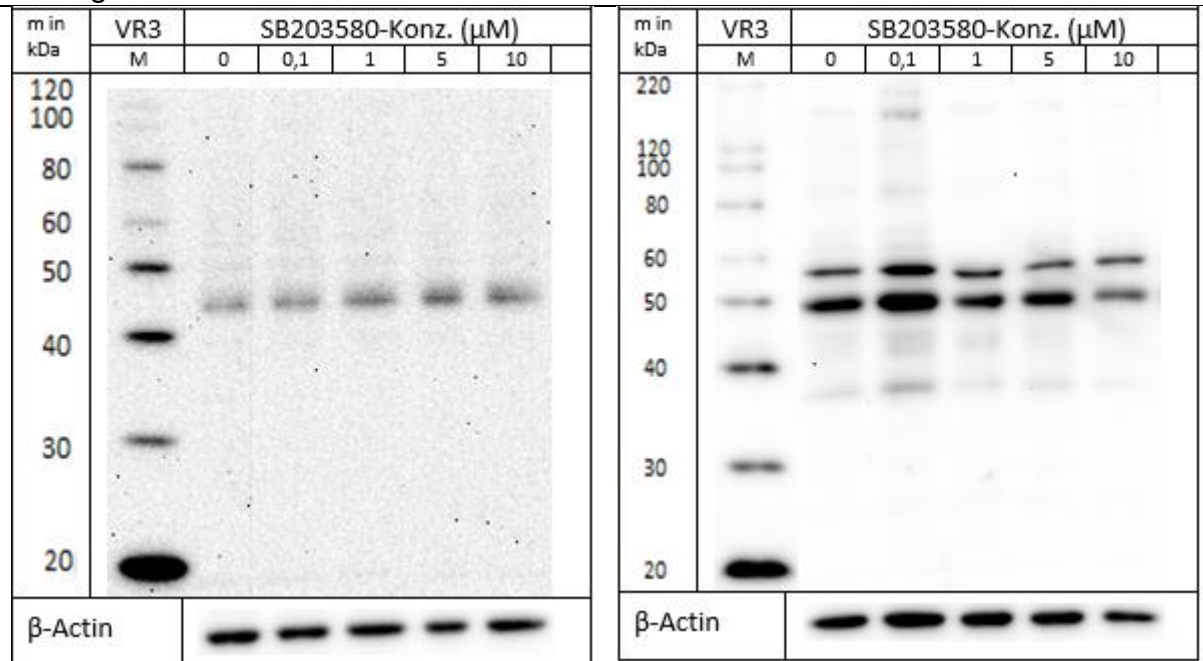
p-c-JUN



T- c-JUN

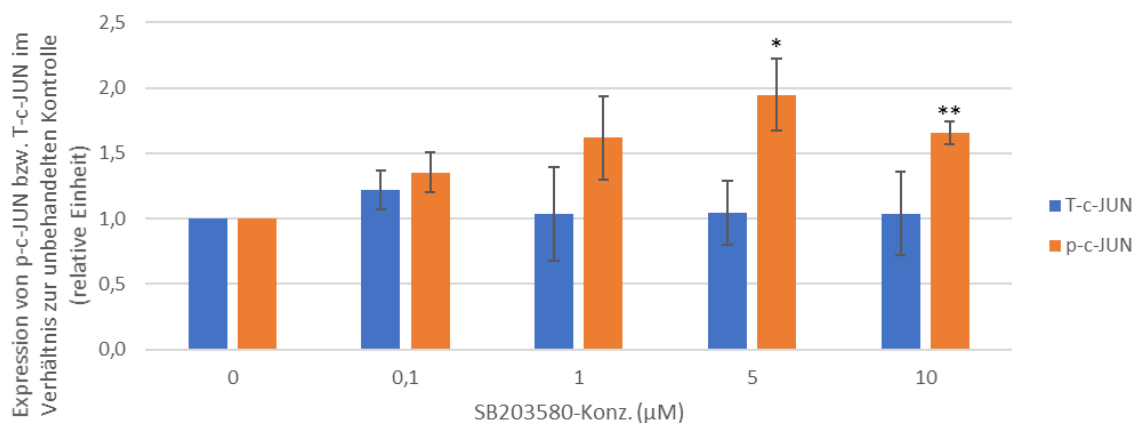


# Anhang



	SB203580-Konz. (μM)	Expression von p-c-JUN bzw. T-c-JUN (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
T-c-JUN	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,1	1,4	1,1	1,22	0,15	0,123
	1	1,0	1,4	0,7	1,04	0,36	0,880
	5	0,9	1,3	0,9	1,05	0,25	0,781
	10	0,8	1,4	0,9	1,04	0,32	0,852
p-c-JUN	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,3	1,5	1,2	1,35	0,15	0,058
	1	1,3	1,9	1,6	1,62	0,32	0,079
	5	1,7	2,0	2,2	1,95	0,28	0,027
	10	1,8	1,6	1,6	1,65	0,08	0,006

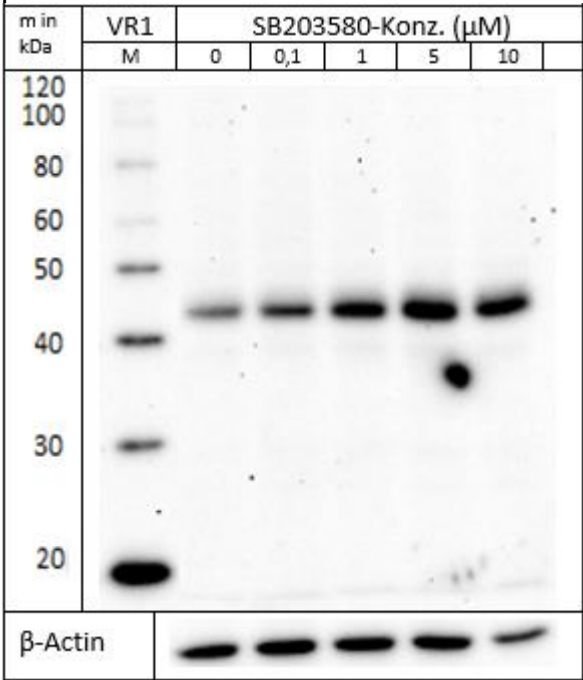
Verhalten von c-JUN in MCF-7-Zellen unter Einfluss von SB203580



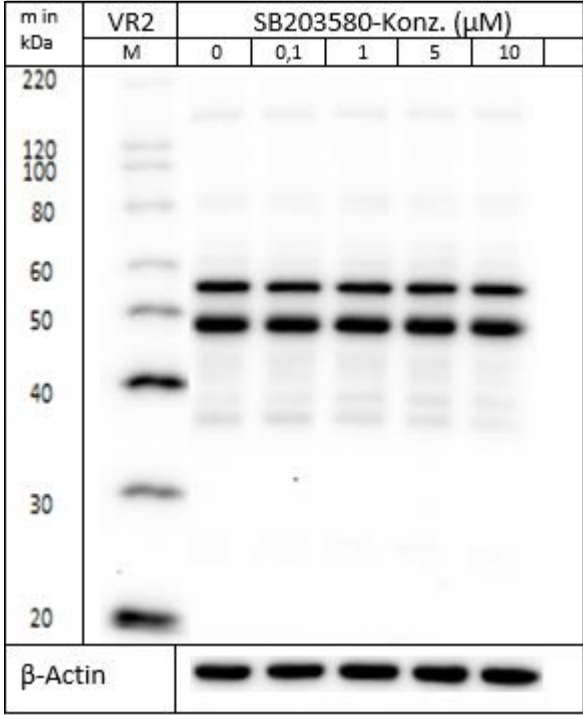
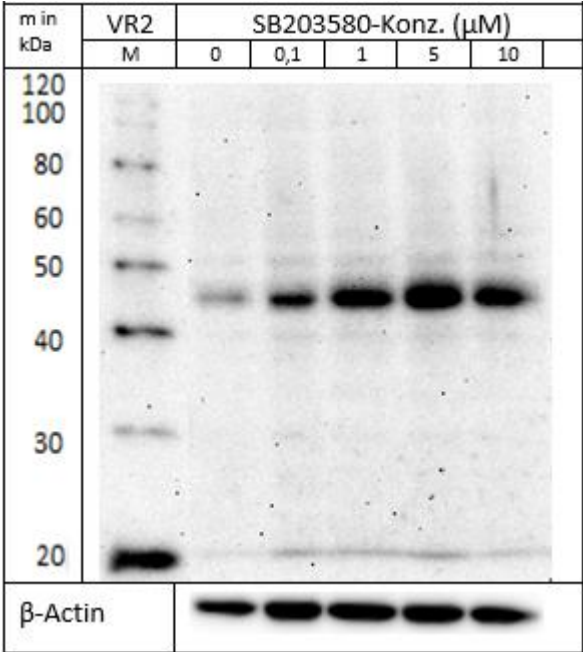
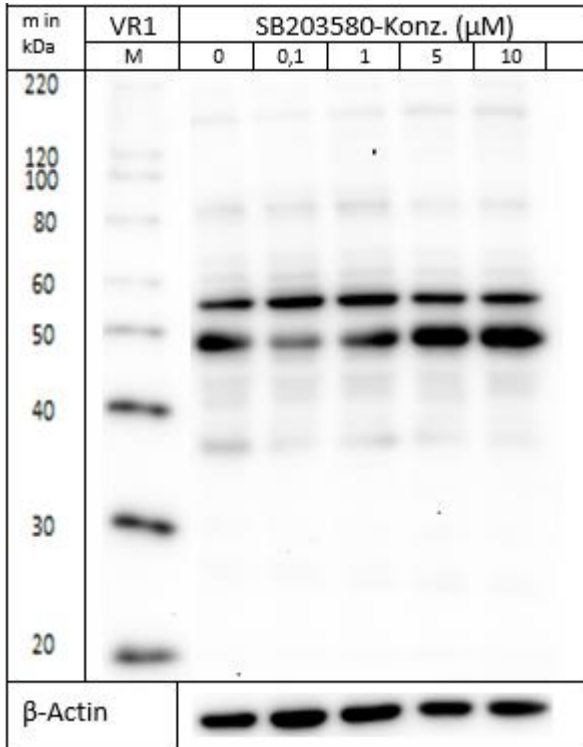
Anhang

9.1.6.3 Verhalten von c-JUN (48 kDa) in MDA-MB-231-Zellen

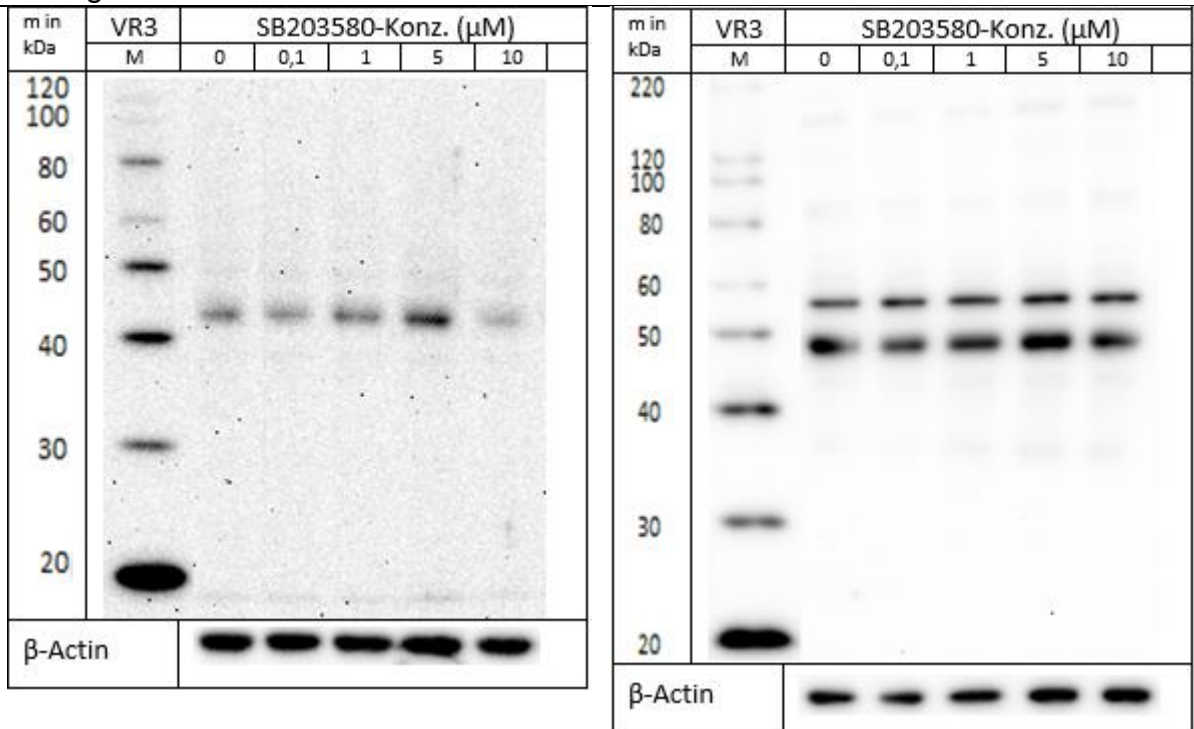
p-c-JUN



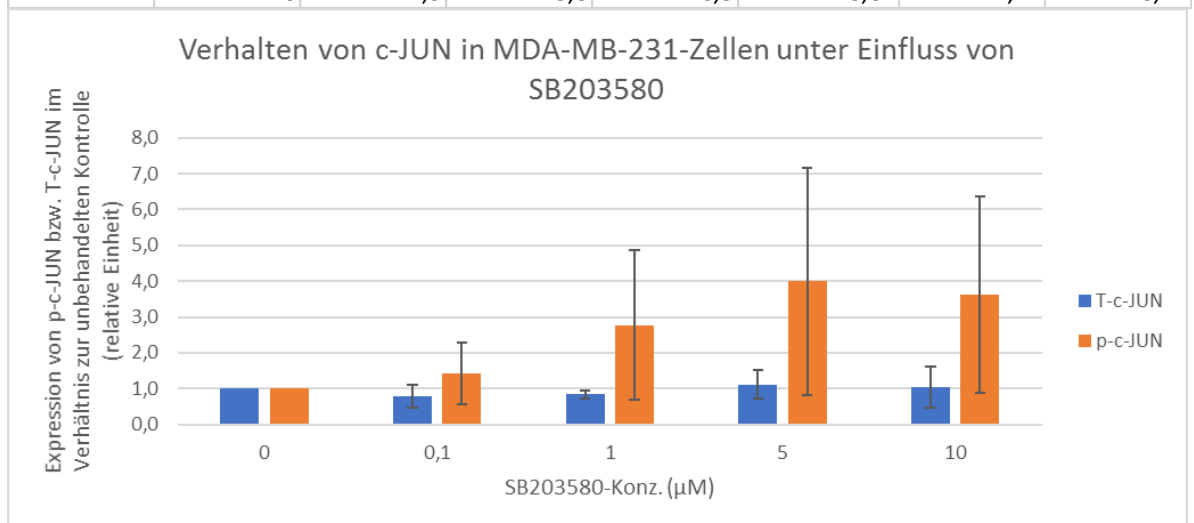
T- c-JUN



# Anhang



	SB203580-Konz. (μM)	Expression von p-c-JUN bzw. T-c-JUN (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
T-c-JUN	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	0,4	1,0	1,0	0,77	0,32	0,34
	1	0,7	0,9	0,9	0,84	0,11	0,12
	5	1,6	0,8	0,9	1,12	0,41	0,67
	10	1,7	0,8	0,7	1,04	0,57	0,91
p-c-JUN	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,1	2,4	0,8	1,43	0,85	0,48
	1	2,0	5,2	1,2	2,78	2,09	0,28
	5	2,8	7,6	1,6	3,99	3,18	0,24
	10	4,5	5,8	0,5	3,62	2,74	0,24

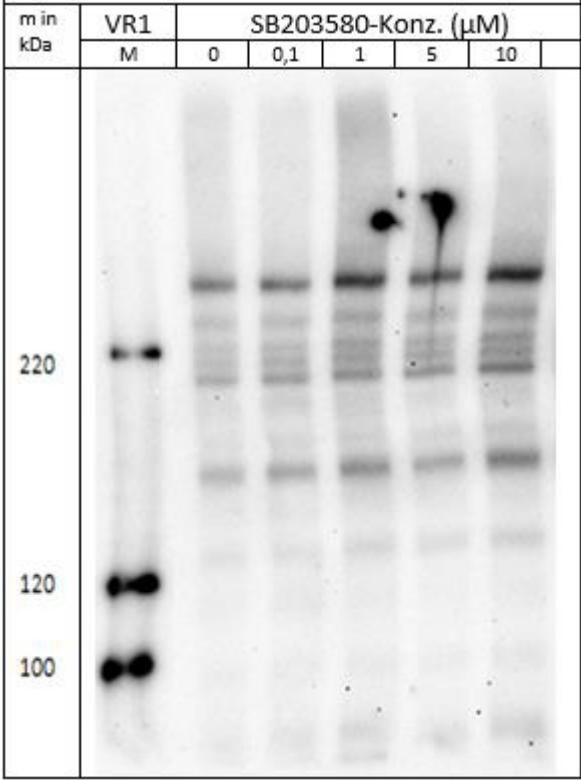


Anhang

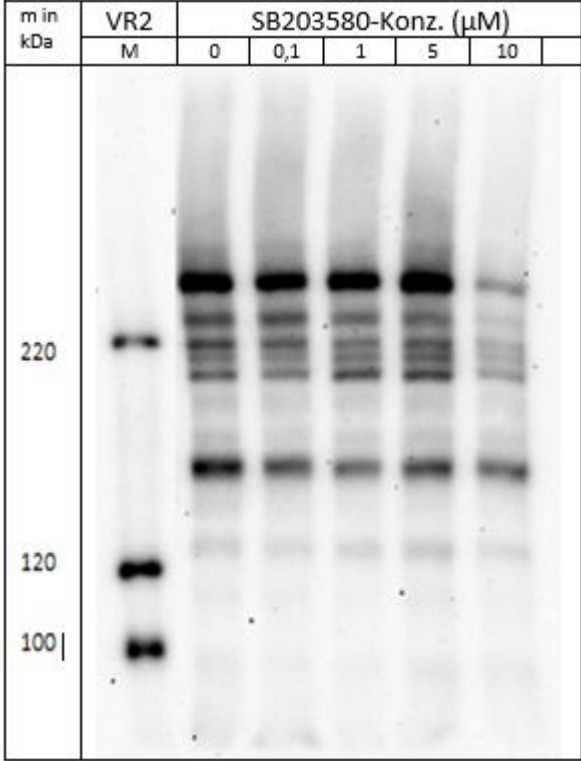
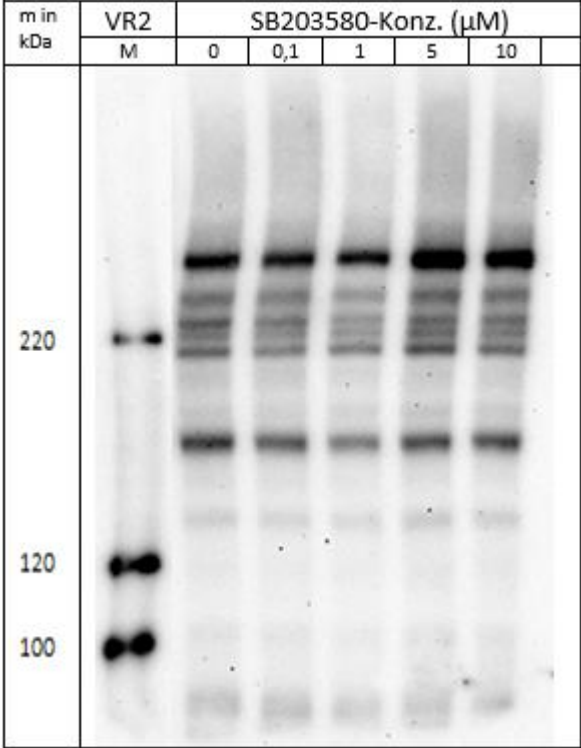
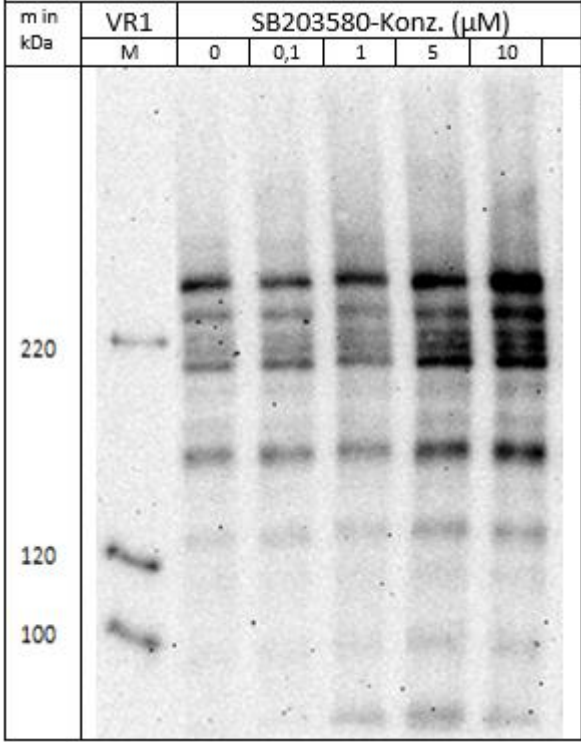
9.1.7 mTOR

9.1.7.1 Verhalten von mTOR (289 kDa) in MCF-10A-Zellen

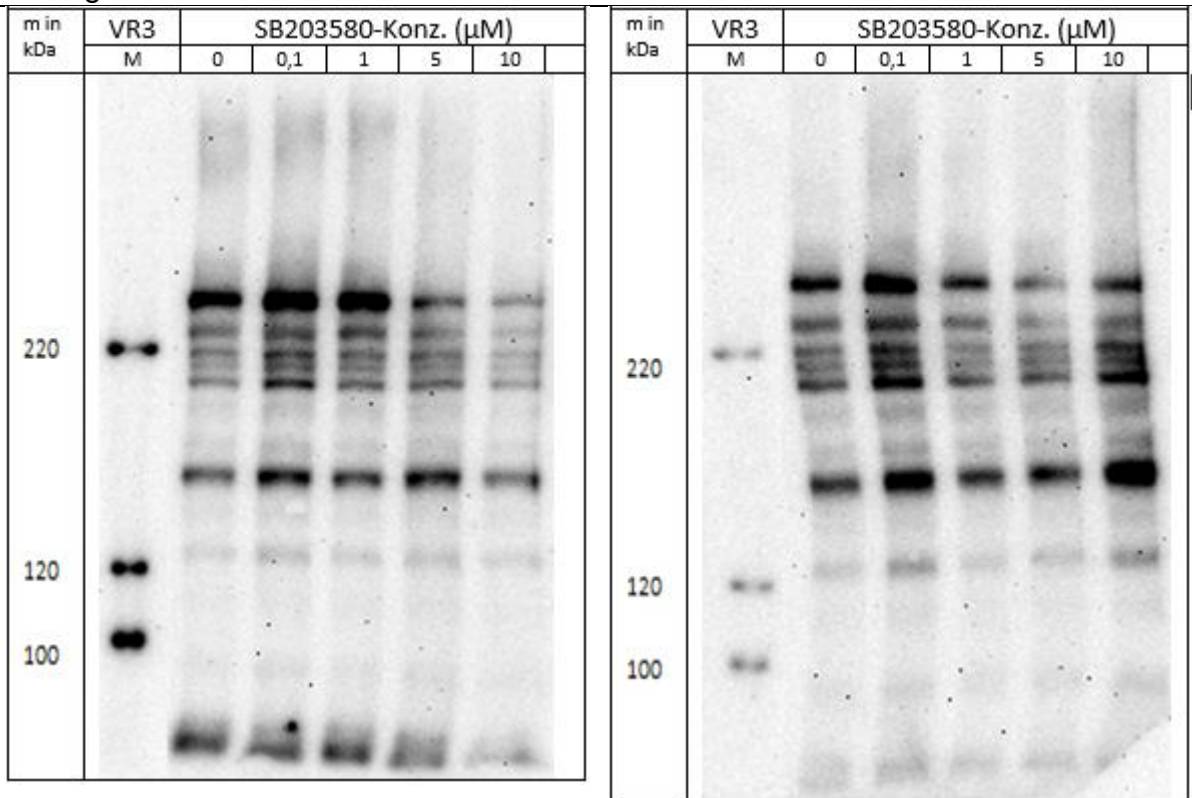
p-mTOR



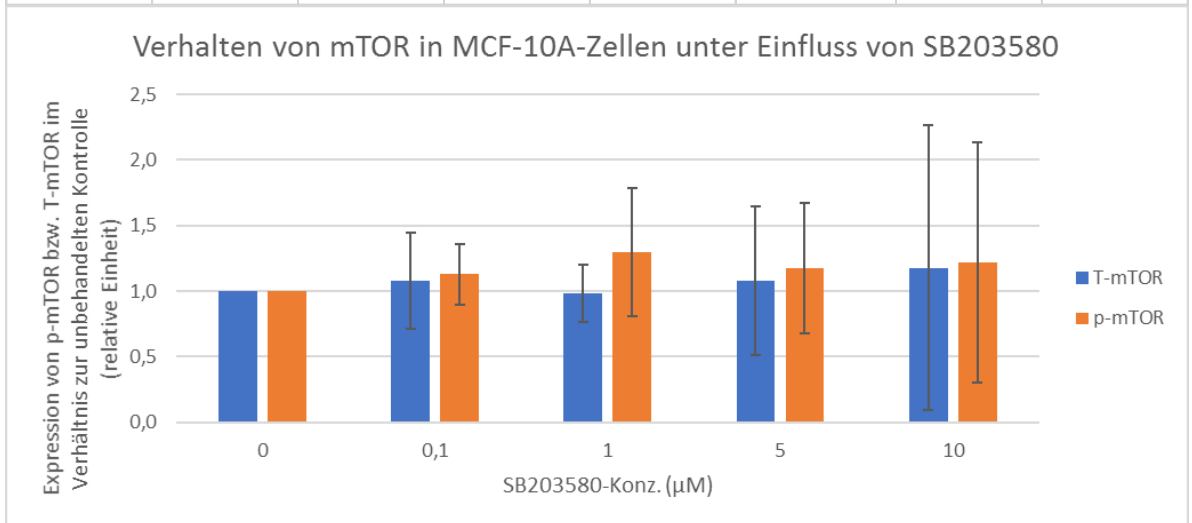
T-mTOR



# Anhang



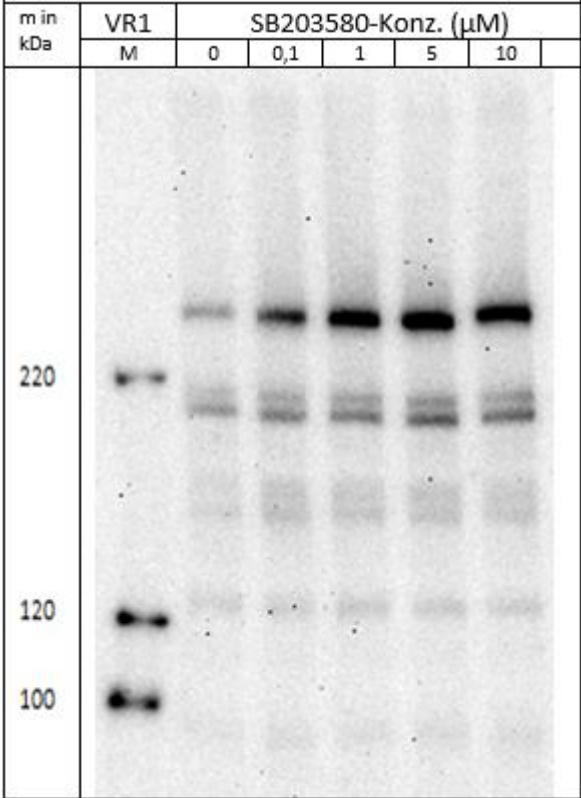
	SB203580-Konz. (μM)	Expression von p-mTOR bzw. T-mTOR (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
T-mTOR	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	0,9	0,8	1,5	1,08	0,36	0,74
	1	1,2	0,9	0,8	0,99	0,22	0,92
	5	1,7	1,1	0,5	1,08	0,57	0,83
	10	2,4	0,3	0,9	1,18	1,09	0,80
p-mTOR	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,1	0,9	1,4	1,13	0,23	0,44
	1	1,8	0,8	1,2	1,30	0,49	0,40
	5	1,5	1,4	0,6	1,17	0,50	0,61
	10	2,2	1,2	0,3	1,22	0,92	0,72



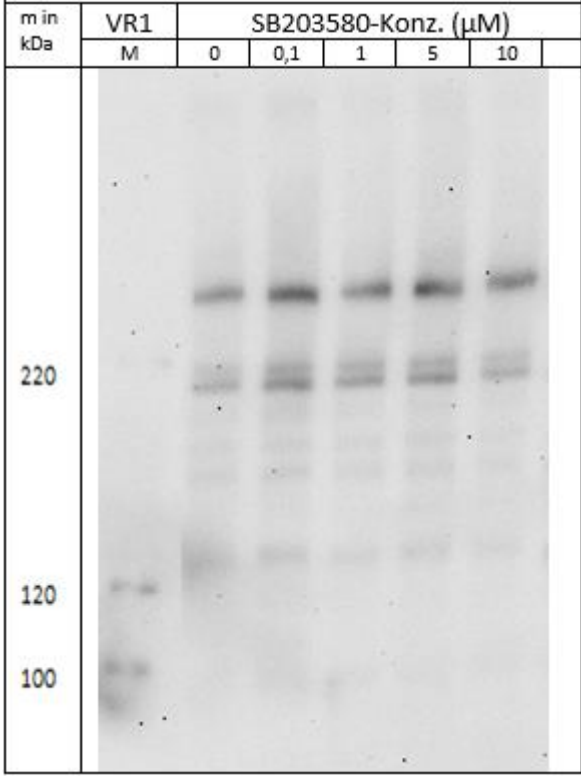
Anhang

9.1.7.2 Verhalten von mTOR (289 kDa) in MCF-7-Zellen

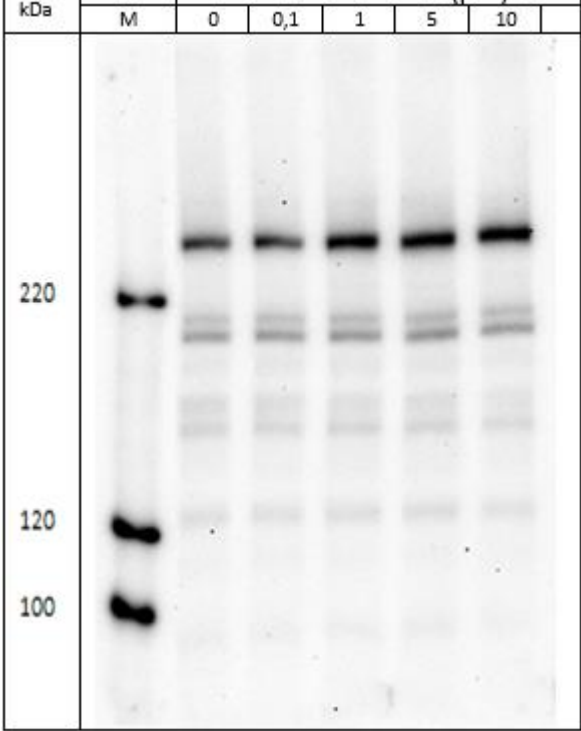
p-mTOR



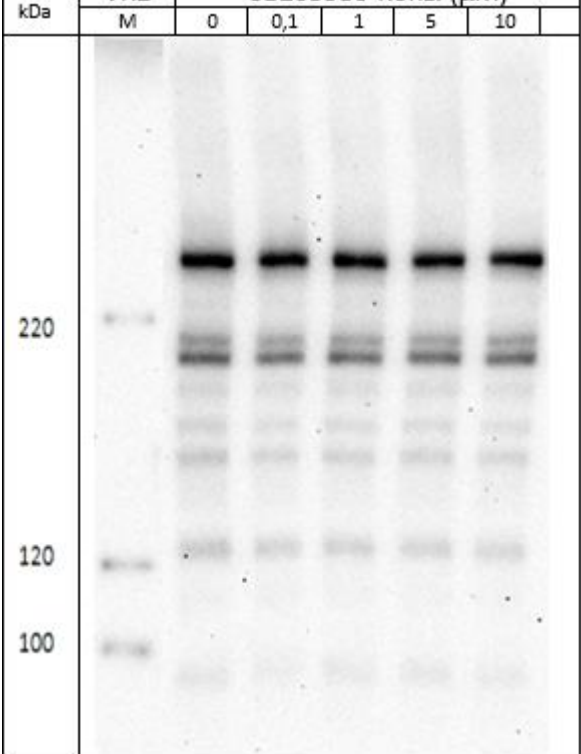
T-mTOR



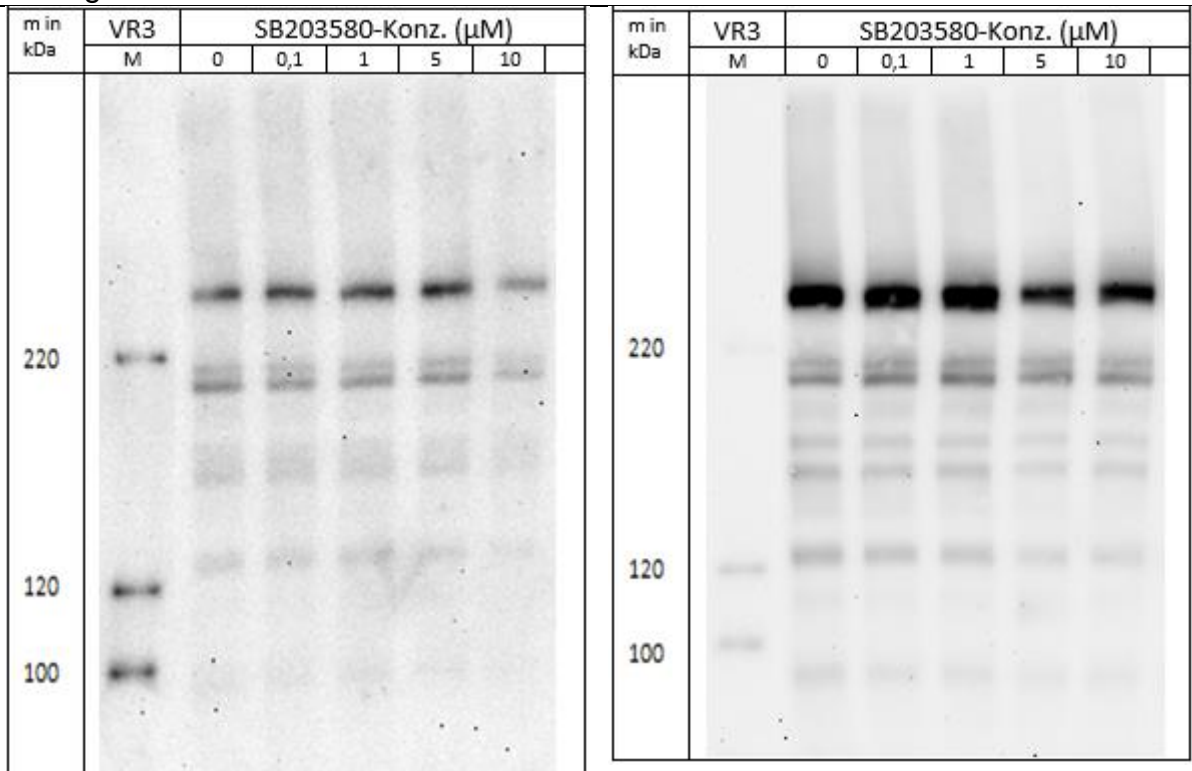
p-mTOR



T-mTOR

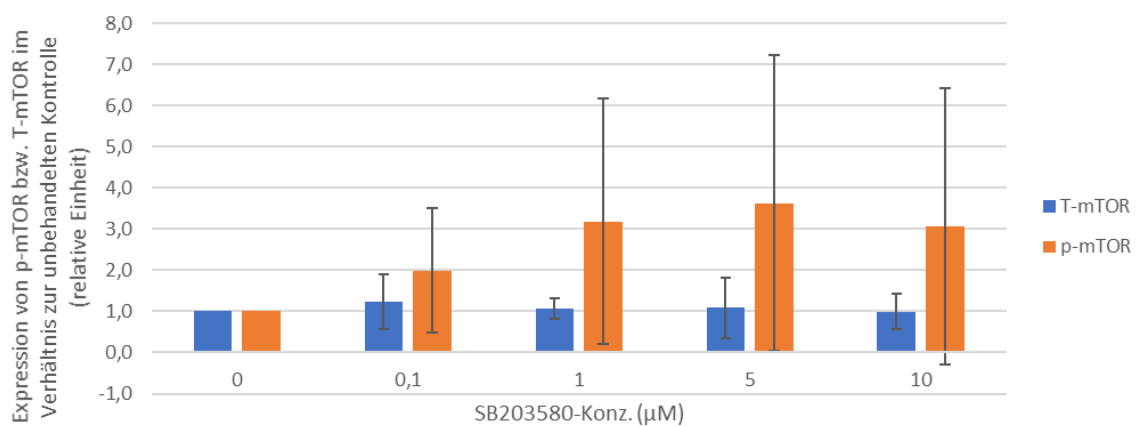


# Anhang



	SB203580-Konz. (μM)	Expression von p-mTOR bzw. T-mTOR (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
		VR1	VR2	VR3			
<b>T-mTOR</b>	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	2,0	0,9	0,9	1,24	0,67	
	1	1,4	0,9	1,0	1,08	0,25	
	5	1,9	0,8	0,5	1,09	0,73	
	10	1,5	0,9	0,6	0,99	0,43	
<b>p-mTOR</b>	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	3,7	1,0	1,2	1,99	1,52	
	1	6,6	1,6	1,4	3,19	2,98	
	5	7,8	1,7	1,5	3,63	3,58	
	10	6,9	1,6	0,6	3,06	3,37	

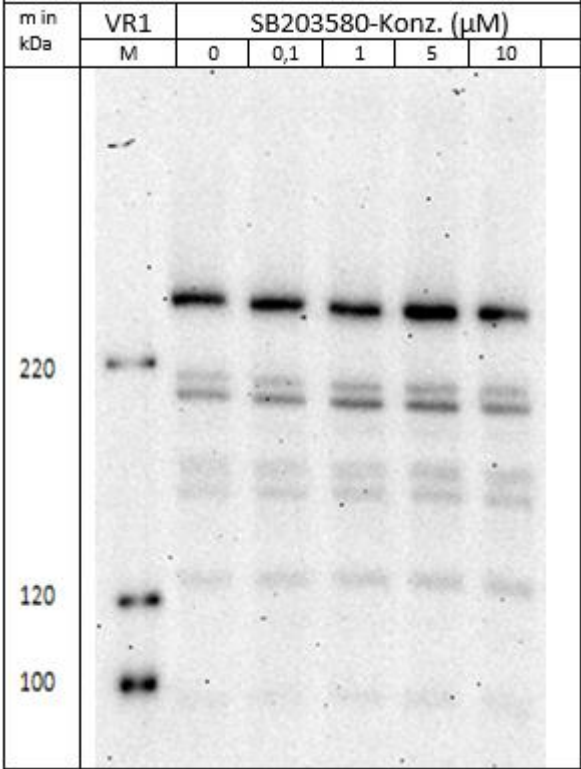
Verhalten von mTOR in MCF-7-Zellen unter Einfluss von SB203580



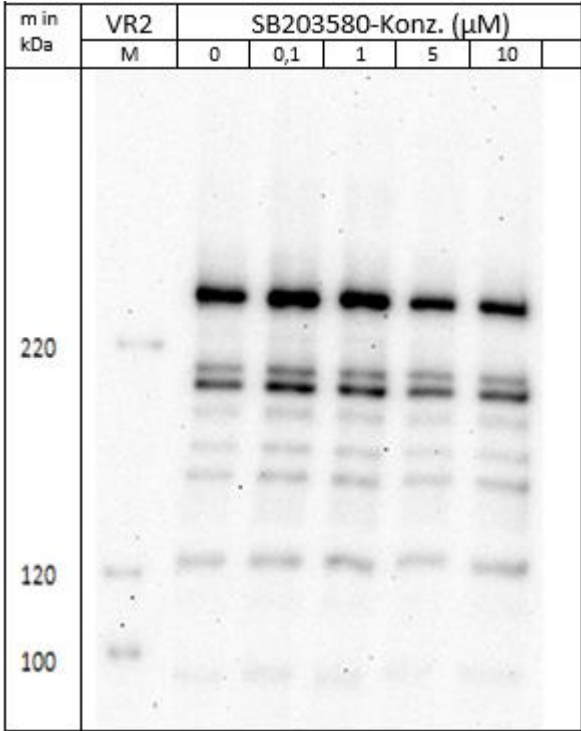
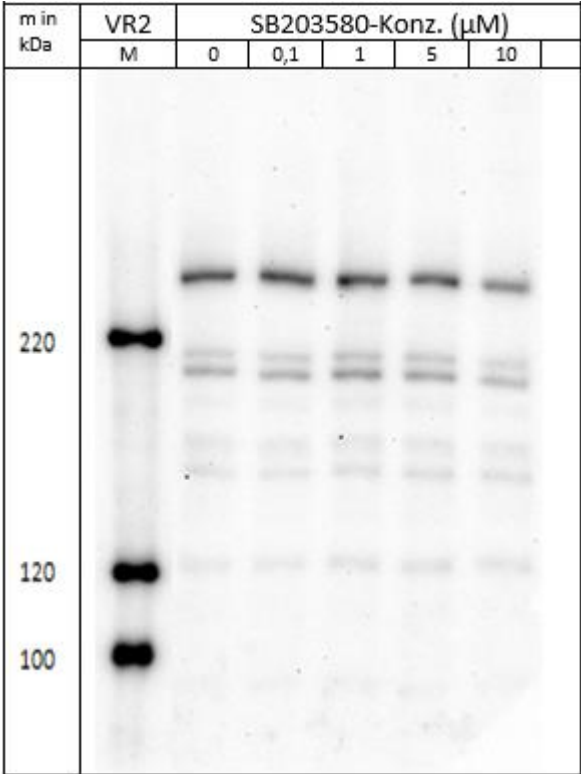
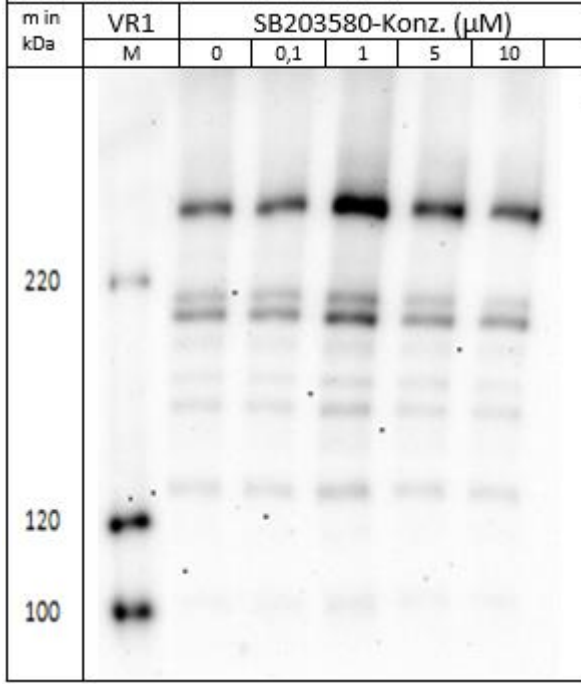
Anhang

9.1.7.3 Verhalten von mTOR (289 kDa) in MDA-MB-231-Zellen

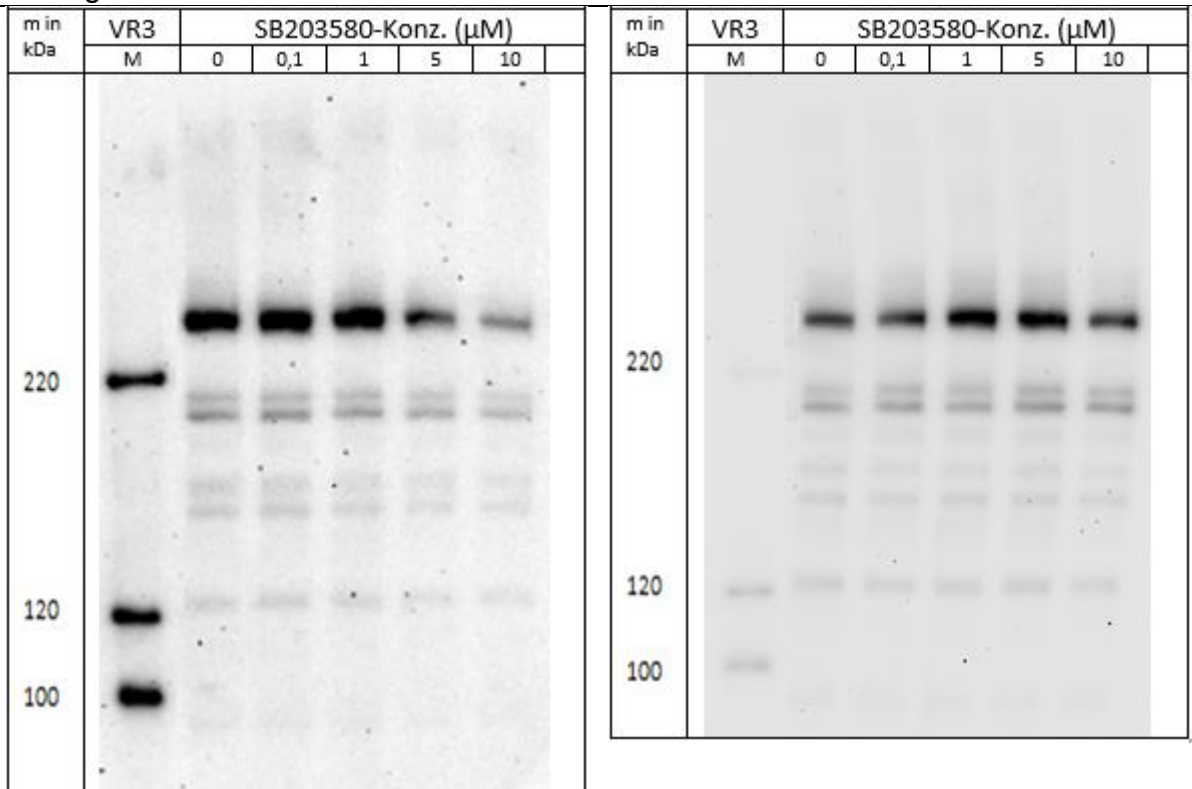
p-mTOR



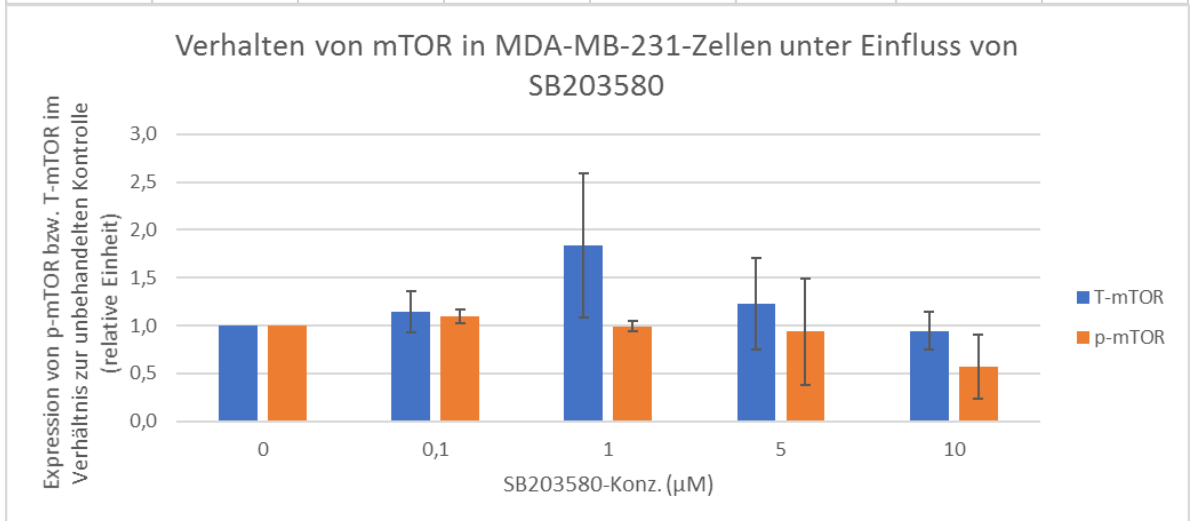
T-mTOR



# Anhang

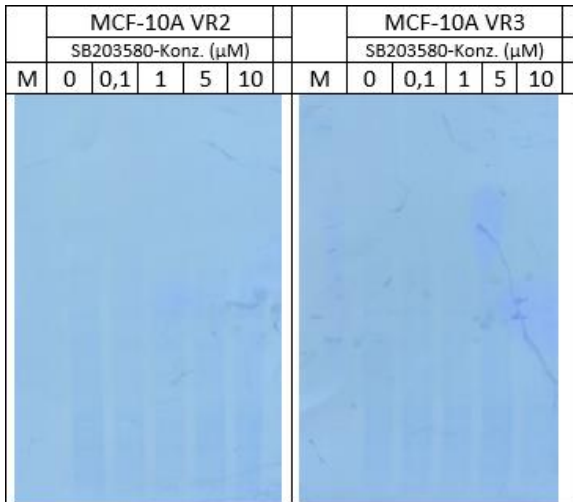


	SB203580-Konz. (μM)	Expression von p-mTOR bzw. T-mTOR (relative Einheit)			Mittelwert	Standardabweichung	p-Wert des t-Test
		VR1	VR2	VR3			
T-mTOR	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,0	1,4	1,0	1,14	0,21	0,36
	1	2,7	1,2	1,6	1,84	0,75	0,19
	5	1,4	0,7	1,6	1,22	0,48	0,51
	10	1,1	0,7	1,0	0,94	0,20	0,66
p-mTOR	0	1,0	1,0	1,0	1,00		
	0,1	1,2	1,0	1,0	1,09	0,07	0,16
	1	1,0	1,0	0,9	0,99	0,05	0,78
	5	1,5	0,8	0,5	0,94	0,56	0,86
	10	0,9	0,5	0,2	0,57	0,34	0,16

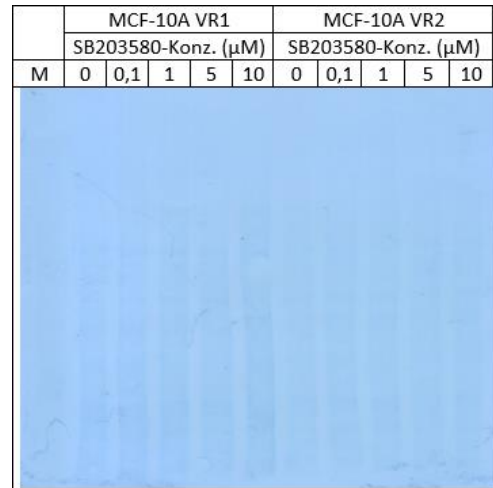


# Anhang

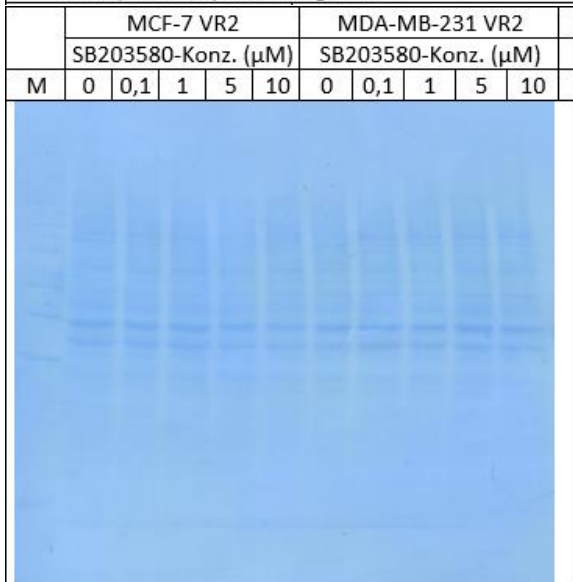
## 9.1.7.4 Coomassie-Färbung



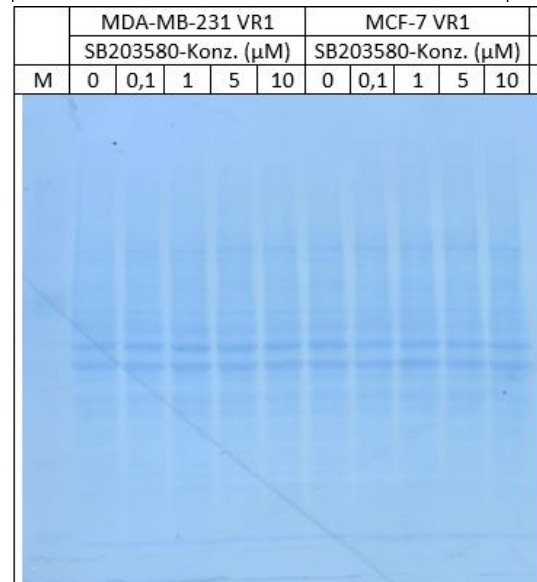
10 µg Protein/Geltasche  
 Membran wurde für folgende Antikörper verwendet:  
 - p-mTOR – AK von Cell signaling Technologie, Cambridge UK  
 #5536 (Klon: D9C2) Verdünnung: 1:400



10 µg Protein/Geltasche  
 Membran wurde für folgende Antikörper verwendet:  
 - p-mTOR – AK von Cell signaling Technologie, Cambridge UK  
 #5536 (Klon: D9C2) Verdünnung: 1:400  
 - (Western-Blot ist nicht in Auswertung einbezogen wurden)



10 µg Protein/Geltasche  
 Membran wurde für folgende Antikörper verwendet:  
 - p-MSK1/2 – AK von RD Systems, Minneapolis USA MAB1094  
 (Klon: 1013D) Verdünnung: 1:1000 (0,5 µg/ml)  
 - (Western-Blot ist nicht in Auswertung einbezogen wurden)



10 µg Protein/Geltasche  
 Membran wurde für folgende Antikörper verwendet:  
 - p-AKT S473 – AK von Cell signaling Technologie, Cambridge UK  
 #9271 (polyclonal) Verdünnung: 1:500  
 - (Western-Blot ist nicht in Auswertung einbezogen wurden)

## Danksagung

---

### 10 Danksagung

Vielen Dank,

an meine wundervolle \_\_\_\_\_, die mich tatkräftig bei dieser Arbeit unterstützt und ausgehalten hat. Das Promotionsvorhaben gemeinsam mit meiner geliebten Frau umzusetzen war etwas ganz Besonderes.

an meine Eltern, die uns die gemeinsame Promotion ermöglicht haben und deren Unterstützung wir uns immer sicher sein dürfen.

an meinen Bruder \_\_\_\_\_ für die Unterstützung und an ihn und Tante \_\_\_\_\_ Dank für die gute Beratung in der Frage: „Wo finde ich die bestmögliche Betreuung für ein Promotionsvorhaben?“

an Frau Prof. \_\_\_\_\_ und \_\_\_\_\_ für die aufgebrauchte Zeit und die unermüdliche Beantwortung von unzähligen Fragen und Lösung von ebenso vielen Problemen.

an Herrn Univ.-Prof. \_\_\_\_\_ für die Zweitkorrektur dieser Arbeit.

an \_\_\_\_\_ das gesamte Team der AG Prof. \_\_\_\_\_ für die schöne Zeit im Labor, die Unterstützung und das angenehme Miteinander.

an meine Schwägerin und meinen Schwager für die Notfall-Cantuccinis wenn der Blutzucker wieder mal im Keller war.

an \_\_\_\_\_ unsere gesamte Familie und unsere Freunde für die Unterstützung in diesem Jahr. Danke auch für das aufgebrauchte Verständnis dafür, dass wir oft keine Zeit hatten und das Verständnis für viele von uns erteilte Absagen.

## 11 Lebenslauf

### Zur Person:

Name: cand. med. Josef Siegfried Engelhardt  
Geburtsdaten: 17. Dezember 1993 in Sömmerda  
Religionszugehörigkeit: römisch – katholisch  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Bildung:

2012	Juli	Abitur (Staatliches Albert-Schweitzer-Gymnasium Sömmerda)
	Bis Nov.	Ausbildung zum Rettungssanitäter
2013	Bis Aug.	FSJ auf der ITS des DRK-Krankenhauses in Sömmerda
	Ab Okt.	Studium der Medizin an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
2015	Sept.	1. Staatsexamen Medizin (M1 - Physikum)
2019	April	2. Staatsexamen (M2)
2020	Bis Mai	PJ im <ul style="list-style-type: none"><li>- Klinikum Worms</li><li>- Christa-Marianne-Mission Hospital of the - Franciscan Sisters of St. Joseph Asumbi - in Kisii, Kenia</li></ul>
	19. Mai	Bestehen der Ärztlichen Prüfung (M3)
	Ab Mai	Promotionsvorhaben zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz in der AG Prof. _____, Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit

## 12 Eidesstattliche Erklärung

Ich – Engelhardt, Josef Siegfried – erkläre hiermit, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt wurde. Alle von mir benutzten Veröffentlichungen, ungedruckten Materialien, sonstige Hilfsmittel sowie Textstellen, die ich wörtlich oder inhaltlich aus gedruckten oder ungedruckten Arbeiten übernommen habe, habe ich als solche gekennzeichnet und mit den erforderlichen bibliographischen Angaben nachgewiesen. Unterstützungsleistungen, die ich von anderen Personen erhalten habe, wurden in der Dissertationsschrift als solche benannt. Die Dissertation wurde bei keiner anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich vorgelegt, weder im In- noch im Ausland. Überdies bin ich nicht im Besitz eines anderen Doktorgrades. Ein bisher erworbener Doktorgrad wurde mir nicht aberkannt. Ich habe bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet.

Sömmerda, den 27. Juli 2021

Josef Siegfried Engelhardt