

Aus der Klinik Gynäkologie und Geburtshilfe
(Prof. Dr. med. J. Gallwas)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Einfluss einer ERK1/2-Resistenz auf Zellwachstum und Invasivität von triple-negativen Mammakarzinomzellen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Judith Vera Buse

aus

Lingen (Ems)

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. H. Hahn

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. H. Hahn

Drittreferent/in: Prof. Dr. mult. T. Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 09.02.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Einfluss einer ERK1/2-Resistenz auf Zellwachstum und Invasivität von triple-negativen Mammakarzinomzellen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Mammakarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2 Histopathologische Klassifikation	1
1.1.3 Therapie	3
1.2 TNBC.....	4
1.2.1 Therapie des TNBC.....	4
1.2.2 Zielgerichtete Therapie des TNBC.....	5
1.3 MAPK-Signalweg.....	6
1.3.1 Zielgerichtete Therapien in der MAPK-Kaskade	9
1.3.2 ERK1/2-Inhibitor.....	10
1.4 GnRH.....	11
1.5 CTGF	12
1.6 Zielsetzung und Fragestellung.....	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Geräte.....	15
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	17
2.1.3 Chemikalien.....	17
2.1.4 Lösungen und Puffer	18
2.1.5 Kommerzielle Reaktionssysteme	21
2.1.6 Nährmedien.....	21
2.1.7 Matrigel®.....	22
2.1.8 Zelllinien	22
2.1.9 ERK1/2-Inhibitoren	22
2.1.10 GnRH-Analogon.....	22
2.1.11 Antikörper	23
2.1.12 Software	24
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Zellkultur	24
2.2.2 Proteinchemische Methoden.....	27
2.2.3 Immunfluoreszenz	31
2.2.4 Statistische Analysen.....	32
3 Ergebnisse.....	33

3.1	Einfluss von ERK1/2-Inhibitoren auf die Expression von ERK1/2 und Phospho-ERK1/2.....	33
3.2	Einfluss von ERK1/2-Inhibitoren auf die 3D-Sphäroid-Invasion.....	37
3.3	Resistente TNBC-Zelllinien.....	41
3.4	Einfluss einer GnRH-Behandlung auf ERK1/2-resistente Zellen.....	43
3.5	Einfluss einer GnRH-Behandlung auf die 3D-Sphäroid-Invasion ERK1/2-resistenter Zellen.....	50
3.6	Viabilitätsvergleich der 3D-Sphäroide mittels AlamarBlue.....	54
3.7	CTGF- und Phalloidin-Expression in ERK1/2-resistenten Zellen.....	56
4	Diskussion.....	61
4.1	Inhibition von ERK1/2.....	61
4.1.1	SCH772984 reduziert die pERK1/2-Expression.....	62
4.1.2	Ulixertinib reduziert die pERK1/2-Expression nicht.....	62
4.1.3	ERK1/2-Inhibitoren reduzieren die 3D-Sphäroid-Invasion in TNBC-Zellen.....	63
4.2	Resistente TNBC-Zelllinie.....	63
4.3	Auswirkungen einer ERK1/2-Resistenz und GnRH-Behandlung.....	65
4.3.1	ERK1/2-resistente Zellen exprimieren weniger pERK1/2.....	65
4.3.2	SCH772984 reduziert die pERK1/2-Expression in ERK1/2-resistenten Zellen.....	65
4.3.3	Triptorelin hat keinen signifikanten Einfluss auf die pERK1/2-Expression in ERK1/2-resistenten Zellen.....	66
4.3.4	ERK1/2-Resistenz führt zur gesteigerten 3D-Sphäroid-Invasion.....	68
4.3.5	SCH772984 reduziert die 3D-Sphäroid-Invasion von ERK1/2-resistenten Zellen.....	68
4.3.6	Triptorelin hat keinen signifikanten Einfluss auf die 3D-Sphäroid-Invasion von ERK1/2-resistenten Zellen.....	69
4.3.7	ERK1/2-Resistenz hat keinen Einfluss auf das Zellwachstum.....	70
4.3.8	SCH772984 reduziert das Zellwachstum in ERK1/2-resistenten Zellen.....	71
4.3.9	Triptorelin hat keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum von ERK1/2-resistenten Zellen.....	72
4.4	CTGF- und Phalloidin-Expression.....	72
4.5	Ausblick.....	76
5	Zusammenfassung.....	79
6	Literaturverzeichnis.....	81

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MAPK-Signalweg.....	7
Abbildung 2: Einfluss der ERK1/2-Inhibitoren auf pERK1/2 und ERK1/2 in der Zelllinie HCC1806.	34
Abbildung 3: Einfluss der ERK1/2-Inhibitoren auf pERK1/2 und ERK1/2 auf die Zelllinie HCC70.....	36
Abbildung 4: 3D-Sphäroide der Zelllinie HCC1806 zum Zeitpunkt t_{0h} und t_{48h}	38
Abbildung 5: Einfluss der ERK1/2-Inhibitoren SCH772984 und Ulixertinib auf die 3D-Sphäroid-Invasion der Zelllinie HCC1806.	39
Abbildung 6: 3D-Sphäroide der Zelllinie HCC70 zum Zeitpunkt t_{0h} und t_{48h}	40
Abbildung 7: Einfluss der ERK1/2-Inhibitoren SCH772984 und Ulixertinib auf die 3D-Sphäroid-Invasion der Zelllinie HCC70.	41
Abbildung 8: ERK1/2-Resistenztest der Zelllinie HCC1806 gegenüber Ulixertinib.....	42
Abbildung 9: ERK1/2-Resistenztest der Zelllinie HCC1806 gegenüber SCH772984.	42
Abbildung 10: ERK1/2-Resistenztest der Zelllinie HCC70 gegenüber Ulixertinib.....	43
Abbildung 11: pERK1/2- und ERK1/2-Expression in nicht resistenten und resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806.	44
Abbildung 12: Einfluss von SCH772984 und Triptorelin auf pERK1/2 in nicht resistenten und resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806.	46
Abbildung 13: Einfluss von SCH772984 und Triptorelin auf ERK1/2 in nicht resistenten und resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806.	48
Abbildung 14: Verhältnis pERK1/2-Expression zur ERK1/2-Expression in nicht resistenten und resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806.	50
Abbildung 15: 3D-Sphäroide der nicht resistenten und resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 zum Zeitpunkt t_{0h} und t_{48h}	51
Abbildung 16: Einfluss von SCH772984 und Triptorelin auf die 3D-Sphäroid-Invasion nicht resistenter und resistenter Zellen der Zelllinie HCC1806.	53
Abbildung 17: Einfluss von SCH772984 und Triptorelin auf die Zellviabilität der 3D-Sphäroide nicht resistenter und resistenter Zellen der Zelllinie HCC1806.....	55
Abbildung 18: Immunfluoreszenz der nicht resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806.	57
Abbildung 19: Immunfluoreszenz der resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806.	58
Abbildung 20: Intensität von CTGF und Phalloidin in nicht resistenten und resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806.....	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Geräte	15
Tabelle 2: verwendete Chemikalien	17
Tabelle 3: verwendete Lösungen und Puffer	18
Tabelle 4: verwendete Reaktionssysteme.....	21
Tabelle 5: verwendete Nährmedien	21
Tabelle 6: verwendete Zelllinien.....	22
Tabelle 7: verwendete Primärantikörper.....	23
Tabelle 8: verwendete Sekundärantikörper	23
Tabelle 9: verwendete Software.....	24
Tabelle 10: verwendete Konzentrationen.....	27
Tabelle 11: Verdünnungsreihe.....	28
Tabelle 12: Sammelgel 5 %	29
Tabelle 13: Trenngel 7,5 %	30
Tabelle 14: Konzentrationen der ERK1/2-Inhibitoren.....	33

Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V.
BRCA	<i>breast cancer</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
CYR61	<i>cysteine-rich angiogenic inducer 61</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ER	Östrogenrezeptor
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
ERK1/2	<i>extracellular-signal regulated kinase 1/2</i>
FBS	<i>fetale bovine serum superior</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
GnRH	<i>gonadotropin-releasing hormone</i>
GRB2	<i>growth-factor-receptor bound protein 2</i>
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
KCl	Kaliumchlorid
LD ₅₀	Mittlere letale Dosis
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK/MEK	MAPK-Kinase
MAPKKK/ MEKK	MAPK-Kinase-Kinase
MEM	<i>minimum essential medium</i>
mTOR	<i>mechanistic target of Rapamycin</i>
n	Anzahl durchgeführter Versuche
NaCl	Natriumchlorid
NOV	<i>nephroblastoma overexpressed</i>

NST	<i>no special type</i> , Invasives Mammakarzinom ohne besonderen Typ
n-res	nicht resistent
P/S	Penicillin/Streptomycin
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Enzym
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PD-L1	<i>programmed cell death ligand 1</i>
PD-1-Rezeptor	<i>programmed cell death protein 1</i>
pERK	Phospho-ERK
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PR	Progesteronrezeptor
PTP	Phosphotyrosin Phosphatase
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i>
p70S6K	p70 ribosomale S6-Kinase
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
res	resistent
RhoA	RAS-homologes-Familienmitglied A
RKI	Robert Koch-Institut
rpm	<i>revolutions per minute</i>
rpS6	ribosomales Protein S6
RSK	p90-ribosomale-S6-Kinase
SEM	Standardfehler
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBST	Tween®-TBS Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNBC	<i>triple-negative breast cancer</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
w/	<i>with</i>
w/o	<i>without</i>
3D	dreidimensional

1 Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Mammakarzinom ist eine maligne Entartung der Brustdrüse und laut Robert Koch-Institut (RKI) die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Etwa eine von acht Frauen erkrankt in ihrem Leben am Mammakarzinom. In Deutschland selbst erkranken jährlich rund 70.000 Frauen (RKI 2018). Weltweit betrachtet gab es 2018 rund 2,1 Millionen Neudiagnosen Brustkrebs und über 625.000 Frauen starben letztendlich an der Krebserkrankung (Harbeck et al. 2019). Im Vergleich zu anderen Krebsentitäten ist das Mammakarzinom die Krebsart, an der am meisten Frauen versterben (Bray et al. 2018).

Für das Erkrankungsrisiko spielen genetische Faktoren, Hormone und Lebensstilfaktoren eine Rolle. Dies sind Lebensstilfaktoren wie beispielsweise Übergewicht und Bewegungsmangel nach den Wechseljahren. Als Risikofaktoren gelten eine frühe Menarche und eine späte Menopause, Kinderlosigkeit (Nullipara) und eine erste Schwangerschaft im höheren Alter. Gesteigert werde das Erkrankungsrisiko beispielsweise auch durch eine längere kombinierte Östrogen-Gestagen-Hormonersatztherapie (RKI und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) 2019). Die familiäre Häufung von Brustkrebs weist auf das Vorliegen gemeinsamer genetischer Faktoren hin, wobei das Risiko für eine Erkrankung am Mammakarzinom bei Mutationen in den Genen *breast cancer*(BRCA)1 und BRCA2 als erhöht gilt (Antoniou und Easton 2006). Faktoren wie Alter, Tumorstadium, Grading des Tumors, Subtyp und lymphovaskulärer Status sind entscheidend für die Prognose (Harbeck et al. 2019). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für erkrankte Frauen liegt bei 88 % (RKI 2018).

1.1.2 Histopathologische Klassifikation

Es gibt verschiedene histopathologische Unterschiede und molekulare Merkmale, wodurch diese Brustkrebserkrankung charakterisiert werden kann. Die Einteilung des Mammakarzinoms ist insbesondere für die therapeutischen Optionen und die daraus resultierenden Prognosen wichtig.

Histologisch kann das Mammakarzinom nach seinem Ursprungsgewebe in zwei größere Untertypen unterschieden werden: In das invasive lobuläre Karzinom, welches von den Zellen des Drüsenläppchenepithels ausgeht und das invasive Mammakarzinom ohne besonderen Typ (*no special type*, NST; vorher bezeichnet als invasives duktales Karzinom), ausgehend vom Milchgangsepithel (Sinn und Kreipe 2013). Für beide Typen gibt es eine nichtinvasive Vorstufe, ein Carcinoma in situ. Die invasiven Mammakarzinome vom NST kommen mit ca. 70 % am häufigsten vor. Neben diesen zwei Untertypen gibt es noch weitere spezielle Unterformen (Harbeck et al. 2019).

Hinsichtlich der späteren Therapieoptionen sind vor allem die Expressierung von Östrogenrezeptoren (ER) und Progesteronrezeptoren (PR) sowie des *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) und des Proliferationsmarkers Ki67 entscheidend (Harbeck et al. 2019). Östrogen kodiert, beispielsweise durch Bindung an den Östrogenrezeptor, Transkriptionsfaktoren. Liegen mutierte Krebszellen vor, können Östrogene oder auch andere extrazelluläre Signale das Wachstum dieser Zellen stark stimulieren und so die weitere Krebsentwicklung unterstützen. Daher ist es wichtig herauszufinden, ob Hormonrezeptoren exprimiert werden und ob diese als therapeutische Zielstruktur dienen können (Williams und Lin 2013). Es können vier molekulare Subtypen anhand des Rezeptorstatus unterteilt werden, wobei im Folgenden „positiv“ für eine Expressierung des Rezeptors steht und „negativ“ für keine Expressierung. Für den „*luminal A-like*“ Subtyp gilt: ER- und PR-positiv sowie HER2-negativ und Ki67 niedrig. Der „*luminal B-like*“ Typ wird nochmal unterschieden in einen HER2-negativen (ER-positiv und PR-negativ oder Ki67 hoch) und einen HER2-positiven (ER-positiv und Ki67 niedrig oder hoch) Subtyp. Für den „HER2-überexprimierten“ Subtyp gilt: HER2-überexprimiert sowie ER- und PR-negativ. Der „*basal like*“ Subtyp (ER- und PR- sowie HER2-negativ) zeigt eine weitgehende Übereinstimmung mit dem *triple-negative breast cancer* (TNBC) (ER- und PR-negativ, HER2 nicht überexprimiert) (Coates et al. 2015).

Für das Grading werden die Anzahl der zu Tubuli differenzierten Tumorzellen, der pleomorphen Zellen und der Mitosen betrachtet und zur Beurteilung der Wachstumsgeschwindigkeit und somit der Aggressivität des Tumors in einem dreistufigen System von G1 - G3 bewertet (Elston und Ellis 1991). Das Staging des Mammakarzinoms erfolgt anhand der TNM-Klassifikation. Diese Klassifikation basiert auf Arbeiten von Pierre Denoix aus den 1940er Jahren und wurde seitdem durch die Union Internationale Contre le Cancer (UICC) weiterentwickelt (Cserni et al. 2018). Die Primärtumorgröße (T), befallene

Lymphknoten (N) und Fernmetastasen (M) sind für die Stadieneinteilung je nach Tumorausbreitung und somit für mögliche Therapien des Mammakarzinoms relevant.

1.1.3 Therapie

Es gibt verschiedene Therapiemöglichkeiten beim Mammakarzinom. Die Auswahl des jeweiligen Therapieschemas ist vom Stadium und der Ausbreitung des Tumors abhängig.

Für ein lokales Karzinom ohne Fernmetastasen erfolgt in der Regel eine operative Therapie mit Ausräumung der axillären Lymphknoten sowie mit Strahlen- und/oder Systemtherapie. Die Systemtherapie, Chemo- oder zielgerichtete Therapie, kann dabei neoadjuvant oder adjuvant erfolgen. Die Strahlentherapie wird nach der operativen Therapie durchgeführt (Leitlinienprogramm Onkologie 2021).

Für eine mögliche zielgerichtete Therapie des Mammakarzinoms sind sein Hormonrezeptor- und sein HER2-Status relevant. Bei HER2-positiven Tumoren wird simultan zur Chemotherapie eine zielgerichtete Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab über ein Jahr empfohlen (Wolff et al. 2013; Leitlinienprogramm Onkologie 2021). Auch für den Ki67-Proliferationsindex konnte bereits ein Zusammenhang mit der Prognose des Mammakarzinoms aufgezeigt werden, jedoch wird dieser in der aktuellen Leitlinie weiterhin nicht als Entscheidungskriterium über die Durchführung einer Therapie empfohlen (Harris et al. 2016; Leitlinienprogramm Onkologie 2021).

Bei Hormonrezeptor-positiven Karzinomen, das heißt bei ER- und/oder PR-positiven Tumoren, wird zu einer endokrinen Therapie mittels Tamoxifen geraten (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) et al. 2011; Leitlinienprogramm Onkologie 2021). Bei prämenopausalen Frauen mit ER-positivem Brustkrebs, die kein Tamoxifen erhalten können oder wollen, ist eine Behandlung mit einem *gonadotropin-releasing hormone*-(GnRH-)Agonisten empfohlen, um die ovarielle Östrogenproduktion zu unterdrücken (Emons et al. 2003; Leitlinienprogramm Onkologie 2021). Ebenso kann eine Therapie mit GnRH-Agonisten zusätzlich zu Tamoxifen bei hohem Rezidivrisiko abgewogen werden (Hackshaw et al. 2009; Leitlinienprogramm Onkologie 2021).

Mit den derzeit verfügbaren Therapieoptionen gilt ein fortgeschrittenes Mammakarzinom mit Fernmetastasen allerdings weiterhin als unheilbar, einzig die Überlebenszeit kann verlängert und die Symptome gelindert werden (Cardoso et al. 2018).

1.2 TNBC

10 - 20 % der Brustkrebserkrankungen macht der Subtyp des *triple-negative breast cancer* (TNBC) aus. Oft betrifft dieser vor allem jüngere Patientinnen (Morris et al. 2007).

TNBC-Zellen sind charakterisiert durch die fehlende Expressierung von ER und PR sowie keiner Überexpressierung von HER2 (Harbeck et al. 2019). Jedoch zeigte sich in Untersuchungen bereits, dass der Subtyp des TNBC in sich noch wesentlich heterogener und komplexer ist und sich weiter in Unterformen einteilen lässt. Lehmann et al. präsentierten 2011 sechs Arten des TNBC: eine *basal-like* 1, eine *basal-like* 2, eine mesenchymale, eine stammartige mesenchymale, eine immunmodulatorische und eine luminale Androgenrezeptor Unterform. Wenige Jahre später wurden diese auf vier Unterformen verfeinert: eine *basal-like* 1 immunaktivierte, eine *basal-like* 2 immunsupprimierte, eine mesenchymale und eine luminale Androgenrezeptor Gruppe (Lehmann et al. 2016). Nach Untersuchungen der RNA- und DNA-Profile von TNBC identifizierten Burstein et al. (2015) eine ähnliche Klassifikation wie Lehmann et al. Die einzelnen Unterformen des TNBC zeichnen sich dabei durch verschiedene Gensignaturen und dementsprechend unterschiedlichen Prognosen aus (Bareche et al. 2018).

Fernrezidive treten beim TNBC im Vergleich zu anderen Subtypen häufiger und früher auf (Dent et al. 2007). Zudem neigt das Mammakarzinom vom TNBC-Typ mit höherer Wahrscheinlichkeit zur Bildung von Metastasen in Lunge und Gehirn, was die Überlebensprognose verschlechtert (Lin et al. 2012). Gegenüber anderen Subtypen zeigt das TNBC vor allem durch sein aggressiveres klinisches Verhalten eine schlechtere Prognose auf. Patientinnen mit der Diagnose TNBC haben eine höhere Wahrscheinlichkeit zu versterben, als Patientinnen mit anderen Brustkrebsarten (Dent et al. 2007).

1.2.1 Therapie des TNBC

Die allgemeine Therapie des Mammakarzinoms besteht, wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben, aus einer operativen und einer systemischen Therapie sowie einer Strahlentherapie.

Als medikamentöse Therapie ist derzeit eine Chemotherapie mit Anthrazyklinen und Taxanen oder mit Docetaxel und Cyclophosphamid empfohlen (Nitz et al. 2019; Leitlinienprogramm Onkologie 2021). Außerdem kann eine Zugabe von Carboplatin zur Therapie erwogen werden, da dies die Wahrscheinlichkeit einer pathologischen Komplettremission erhöht (Hahnen et al. 2017; Leitlinienprogramm Onkologie 2021).

Die Kenntnis über Subtypen des TNBC und die weitere Forschung über die Heterogenität des TNBC kann für die therapeutischen Optionen von großer Bedeutung sein. Des Weiteren rückt so die zielgerichtete Therapie des TNBC (siehe 1.2.2) immer mehr in den Vordergrund.

1.2.2 Zielgerichtete Therapie des TNBC

Zielgerichtete Therapien, auch *targeted therapy*, sind medikamentöse Therapien, die sich spezifisch auf wachstumsfördernde Mechanismen in Tumorzellen auswirken (Baudino 2015). Bei HER2-positiven Tumoren, wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben, ist beispielsweise eine zielgerichtete Therapie mit einem HER2-Inhibitor empfohlen.

Allerdings sind die Optionen für den Subtyp des TNBC im Bereich der systemischen zielgerichteten Therapie eingeschränkt, da die Angriffspunkte an den Progesteron- und Östrogenrezeptoren sowie am HER2-Rezeptor durch die fehlende Expressierung dieser als therapeutische Zielstruktur nicht gegeben sind (Harbeck et al. 2019).

In vielzähligen Studien wurden mögliche neue Angriffspunkte zur Therapie von TNBC geprüft. Dabei wurden Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Enzym-(PARP-)Inhibitoren, Checkpoint-Inhibitoren des Immunsystems und Konjugate gegen Wirkstoffe von Antikörpern untersucht. Zwei PARP-Inhibitoren und ein Checkpoint-Inhibitor erhielten die Zulassung durch die US-Arzneimittelbehörde FDA (Lyons 2019).

PARP-Enzyme reparieren Schäden der DNA. Liegt eine BRCA-Mutation vor, führt dies dazu, dass die homologen Rekombinations-Reparaturmechanismen der DNA defekt sind und die Tumorzellen unkontrolliert wachsen. PARP-Inhibitoren hemmen die Reparatur beschädigter DNA und führen zum programmierten Zelltod (Farmer et al. 2005). Robson et al. (2017) konnten aufzeigen, dass Olaparib zu einem signifikant verlängerten progressionsfreien Überleben von ca. 3 Monaten im Vergleich zur Chemotherapie führt (ClinicalTrials.gov Nr.: NCT02000622). Ebenso konnte der Vorteil einer Therapie mit Talazoparib im Hinblick auf ein verlängertes progressionsfreies Überleben aufgezeigt werden (Litton et al. 2018, ClinicalTrials.gov Nr.: NCT01945775). Diese beiden PARP-Inhibitoren Olaparib und Talazoparib erhielten von der FDA die Zulassung für BRCA-mutierte TNBC (Lyons 2019).

In Forschungen zu möglichen therapeutischen Ansatzpunkten konnte nachgewiesen werden, dass in Brustkrebsgewebe und vor allem in TNBC tumorinfiltrierende Lymphozyten aufzufinden sind. Dadurch nimmt das Immunsystem Einfluss auf das Ansprechen einer Chemotherapie in stark proliferierenden Tumoren (Denkert et al. 2010; Loi et al. 2013). Die

Konzentration der tumorinfiltrierenden Lymphozyten korreliert dabei mit dem Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie und mit einem Überlebensvorteil beim TNBC (Denkert et al. 2018). Beim Mammakarzinom vom Subtyp TNBC wird auf diesen tumorinfiltrierenden Lymphozyten der *programmed cell death ligand 1* (PD-L1) exprimiert, welcher gegen die Tumorzellen gerichtete Immunantworten inhibieren kann (Chen und Mellman 2013; Mittendorf et al. 2014). Der PD-L1-Inhibitor Atezolizumab greift in diesen Mechanismus des Immunsystems ein, indem er die Wechselwirkung mit dem *programmed cell death protein 1* (PD-1-Rezeptor) auf T-Zellen unterbindet und wurde als erster Checkpoint-Inhibitor zur Therapie von metastasiertem TNBC von der US-Arzneimittelbehörde FDA zugelassen (Lyons 2019). Schmid et al. (2018) konnten nachweisen, dass die Kombination von Atezolizumab mit nab-Paclitxel bei Patientinnen mit metastasiertem TNBC zu einem längeren progressionsfreien Überleben führt (ClinicalTrials.gov Nr.: NCT02425891).

Weitere Studien zu PARP-Inhibitoren als Therapieoption für Mammakarzinome, wie beispielsweise für Veliparib (ClinicalTrials.gov Nr.: NCT02163694) oder für Olaparib kombiniert mit einer Immuntherapie mit Durvalumab (ClinicalTrials.gov Nr.: NCT03167619), werden durchgeführt. Auch wird weiter an Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten, wie Sacituzumab, als mögliche Therapie von TNBC geforscht (ClinicalTrials.gov Nr.: NCT02574455). Die Identifizierung neuer Angriffspunkte beim TNBC und die Untersuchungen zu zielgerichteten Therapien dieser scheinen ein großes Spektrum an therapeutischen Möglichkeiten für die Zukunft zu bieten.

1.3 MAPK-Signalweg

Die am häufigsten mutierte Signalkaskade in menschlichen Krebszellen ist der *mitogen-activated protein kinase*-(MAPK-)Signalweg. Daher setzen viele Strategien der Tumorthherapie hier an (Liu et al. 2018). Dieser mehrstufige Transduktionsweg über einzelne Proteinkinasen reguliert zelluläre Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Migration und Apoptose. Die Aktivierung der einzelnen Serin- und Threonin-Kinasen erfolgt dabei jeweils durch Phosphorylierung: die MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK/MEKK) aktiviert die MAPK-Kinase (MAPKK/MEK) und diese aktiviert MAPK. MAPK kann dann weitere Substrate, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, aktivieren (Schaeffer und Weber 1999). Stimuli der Signalkaskade können extrazelluläre Signale wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Zellstress sein. Treten Mutationen im MAPK-Signalweg auf, so können diese zu erhöhten Proliferationsraten der Tumorzellen führen (Johnson und Lapadat 2002).

Es sind mehrere MAPK-Kaskaden bekannt, die nach der vorherigen beschriebenen Abfolge ablaufen. Der allgemeine Aufbau eines MAPK-Signalweges ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

Das Interesse der Forschung zur Tumorthherapie gilt aber vor allem der *extracellular signal-regulated kinase*-(ERK-)MAPK-Kaskade, da viele genetische Mutationen im Rahmen von Krebserkrankungen beobachtet wurden, die genau diesen Signalweg beeinflussen (Roberts und Der 2007). Die ERK-MAPK-Kaskade besteht aus dem vorgeschalteten G-Protein *rat sarcoma* (RAS) und den folgenden Kinasen: *rapidly accelerated fibrosarcoma* (RAF), MEK und ERK (Liu et al. 2018). Sie ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

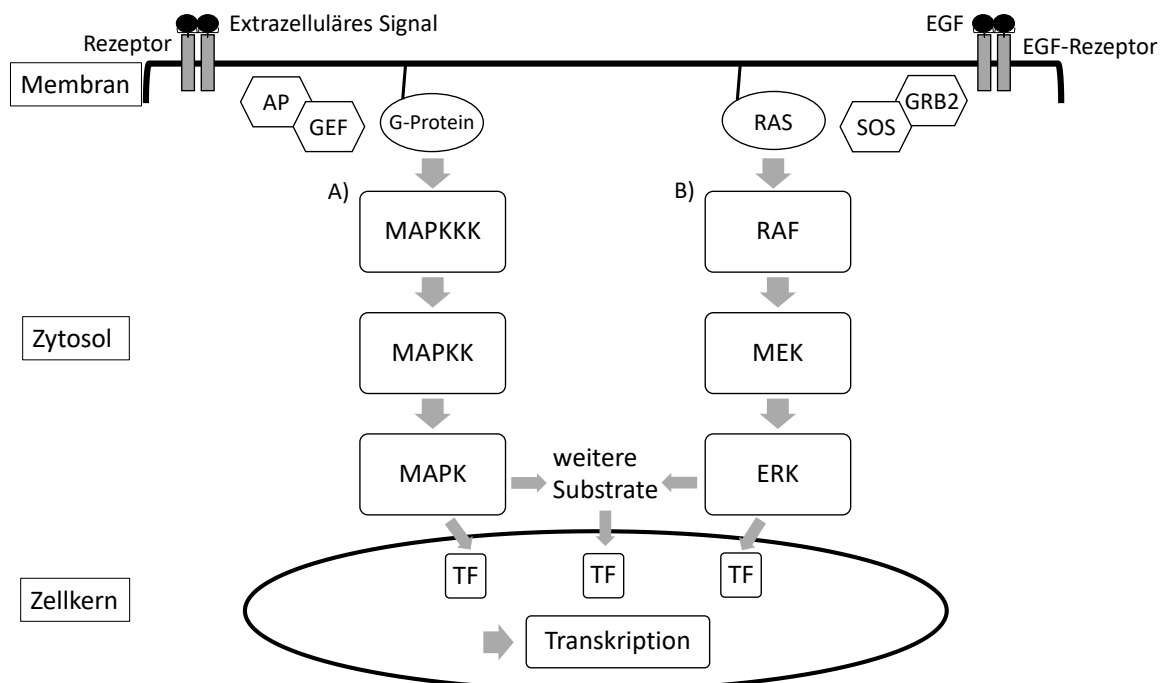


Abbildung 1: MAPK-Signalweg. Dargestellt ist A) der allgemeine Aufbau eines MAPK-Signalweges und B) die ERK-MAPK-Kaskade. Durch ein extrazelluläres Signal, wie in der ERK-MAPK-Kaskade EGF, kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und dadurch zur Rekrutierung des AP-GEF-Komplexes zur Membran. In der ERK-MAPK-Kaskade ist der AP-GEF-Komplex der GRB2-SOS-Komplex. Dieser Komplex sorgt für die Aktivierung eines G-Proteins, wie RAS. Das G-Protein bzw. RAS phosphoryliert MAPKKK bzw. RAF und setzt somit die Phosphorylierungskaskade in Gang. Die letzte Kinase kann direkt oder über weitere Substrate im Zytosol Transkriptionsfaktoren im Zellkern aktivieren. Eigene Darstellung basierend auf Kolch 2000; Roberts und Der 2007; Liu et al. 2018. AP: Adapterprotein, GEF: *guanine nucleotide exchange factor*, TF: Transkriptionsfaktor, EGF: *epidermal growth factor*, GRB2: *growth-factor-receptor bound protein*, SOS: *son of sevenless*.

Der RAS-RAF-MEK-ERK-Weg wird durch Wachstumsfaktoren über die Stimulation von Oberflächenrezeptoren an der Zelle aktiviert, während die anderen bekannten MAPK-Kaskaden durch Wachstumsfaktoren sowie auch Zellstress aktiviert werden (Roberts und Der 2007). Mit der allgemeinen Bezeichnung MAPK-Kinase ist oft eben diese ERK-MAPK-Signalkaskade gemeint (Liu et al. 2018).

Durch einen extrazellulären Stimulus, wie zum Beispiel durch einen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) kommt es zu Dimerisierung und Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors an der Plasmamembran (Huang und Fu 2015).

Im Zytosol befindet sich ein Komplex aus einem *growth-factor-receptor bound protein* (GRB2) als Adapterprotein und einem stabil vereinigten Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF), wie beispielsweise *son of sevenless* (SOS). Dieser GRB2-SOS-Komplex gelangt durch den Stimulus am Rezeptor zur Membran und bindet am aktivierten EGF-Rezeptor. Nun kann SOS am membrangebundenen RAS den Austausch von GDP zu GTP katalysieren und das G-Protein RAS aktivieren (Mitin et al. 2005; Liu et al. 2018).

RAS phosphoryliert und aktiviert im nächsten Schritt RAF, sodass es zur Dimerisierung von RAF kommt (Weber et al. 2001). RAF hat drei sich ähnelnde Isoformen ARAF, BRAF und CRAF (Samatar und Poulidakos 2014). Das aktivierte RAF aktiviert dann MEK – wobei die Isoform BRAF die stärkste Aktivität in der Aktivierung von MEK zeigt (Liu et al. 2018). Aktiviertes MEK phosphoryliert im letzten Schritt ERK und stellt den entscheidenden Schritt als Pfortner der Kaskade dar (Caunt et al. 2015).

Aktiviertes ERK kann dann mit vielen weiteren Substraten interagieren. Es aktiviert zum einen direkt Transkriptionsfaktoren im Nucleus und zum anderen Zielstrukturen im Zytosol, wie zum Beispiel die p90-ribosomale-S6-Kinase (RSK), welche ebenfalls Transkriptionsfaktoren im Nucleus aktivieren kann (Frödin und Gammeltoft 1999). Dadurch können Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose reguliert werden (Samatar und Poulidakos 2014). Die MAPK-Kaskade läuft allerdings nicht nur linear ab, sondern es erfolgt eine Kommunikation mit einem Netzwerk von anderen Signalwegen, wodurch es zur Aktivierung und Auslösung von weiteren Signalen kommen kann (Schaeffer und Weber 1999). Auch kommt es durch ERK zu einer Aktivierung von Rückkopplungsschleifen, die sich dann auf die Kontrolle und die Regulierung der MAPK-Kaskade und somit auch auf ERK selber auswirken (Samatar und Poulidakos 2014).

1.3.1 Zielgerichtete Therapien in der MAPK-Kaskade

Es gestaltet sich schwierig, Ansatzpunkte zur direkten Hemmung von RAS zu finden. Ist RAS mutiert, dann ist dieses G-Protein unempfindlich gegenüber der GTP-Hydrolyse und so bleibt GTP dauerhaft mit hoher Affinität gebunden. Die derzeit in Versuchen genutzten RAS-Inhibitoren kommen nicht gegen diese hohe Affinität von GTP zum RAS an. Der weitere Fokus liegt nun auf der Erforschung einer Möglichkeit zur indirekten Inhibition eines mutierten RAS-Proteins (Baines et al. 2011).

Bei der Aktivierung von RAF im nächsten Schritt der Kaskade kommt es durch die Phosphorylierung von RAS zur Dimerisierung von RAF (Weber et al. 2001). Diese stellt den entscheidenden Ansatzpunkt für die derzeitigen Therapien dar. Gegenwärtig existieren bereits mehrere RAF-Inhibitoren. Vemurafenib und Dabrafenib sind für die Behandlung eines RAF-mutierten, metastasierten Melanoms bereits zugelassen (Samatar und Poulidakos 2014). Poulidakos et al. (2011) fanden heraus, dass mutiertes BRAF keine Aktivierung durch RAS für die Dimerisierung benötigt und auch ohne Dimerisierung als Monomer weitere Signale in der Kaskade geben kann. Präklinische Versuche mit den RAF-Inhibitoren zeigten auch, dass diese RAF und auch ERK in Tumoren ohne BRAF-Mutation nicht inhibieren, sondern paradoxerweise die MAPK-Kaskade und ERK aktivieren und teilweise sogar Resistenzen entwickeln. Somit bieten diese Medikamente bislang nur eine mögliche therapeutische Option bei Tumoren mit BRAF-Mutation (Halaban et al. 2010; Samatar und Poulidakos 2014).

Anfängliche Versuche mit MEK-Inhibitoren wurden oft durch Toxizität begrenzt und erforderten weitere Studien (Rinehart et al. 2004; Haura et al. 2010). Der MEK-Inhibitor Trametinib ist derzeit, wie auch die oben aufgeführten RAF-Inhibitoren, für die Behandlung eines RAF-mutierten, metastasierten Melanoms zugelassen (Samatar und Poulidakos 2014). In Versuchen zu MEK-Inhibitoren in RAS-mutierten Tumoren konnte ebenso eine gute Wirksamkeit beobachtet werden (Hatzivassiliou et al. 2013). Allerdings zeigten einige MEK-Inhibitoren bei Patienten mit RAF-mutiertem, metastasiertem Melanom, die vorher eine Behandlung mit RAF-Inhibitoren erhielten, keinen Erfolg (Kim et al. 2013). Mögliche Gründe dafür sind, dass der Tumor Resistenzen gegen die Inhibitoren entwickelt oder über die Kommunikation mit anderen Signalkaskaden die Kinase ERK aktiviert werden kann. Es laufen weitere Studien, in denen mögliche Therapien mit RAF- und MEK-Inhibitoren einzeln und in Kombination untersucht werden. Auch scheint für den Therapieerfolg relevant zu sein, in welcher vorgeschalteten Kinase der MAPK-Kaskade die Mutation vorliegt (Samatar und Poulidakos 2014).

Einige RAF- und MEK-Inhibitoren befinden sich derzeit bereits in klinischer Anwendung. Jedoch treten immer mehr Resistenzen gegen diese Inhibitoren auf. Durch die Resistenzen kann es zu einer Reaktivierung von ERK und somit seiner Signalweiterleitung kommen. Dies kann über parallele Wege zu einer Wiederherstellung der MAPK-Kaskade und somit zur Aktivierung von ERK-Signalen führen (Sullivan et al. 2018). Deshalb richtet sich das Interesse nunmehr auf die direkte Hemmung von ERK als neuen Ansatzpunkt.

1.3.2 ERK1/2-Inhibitor

Es gibt mehrere ERK-Kinasen, wobei die Kinasen ERK1 und ERK2 den letzten Schritt der ERK-MAPK-Kaskade darstellen (siehe 1.3). Da die ERK1- und ERK2-Kinasen zu 90 % ähnlich in der Abfolge ihrer Aminosäuren sind und eine ähnliche Funktionalität haben, werden sie im Folgenden als ERK1/2 zusammengefasst (Boulton et al. 1991).

Bis vor Jahren sah man ERK1/2 nur als Zielstruktur von MEK an, weswegen sie bis dato nicht im Fokus stand (Samatar und Poulikakos 2014). Nach Erkenntnissen aus präklinischen Untersuchungen und Studien ist nun aber bekannt, dass ERK1/2-Inhibitoren Resistenzentstehung hemmen und auch die Resistenzen gegen RAF- und MEK-Inhibitoren bewältigen können. Der Inhibitor Ulixertinib (BVD-523) wurde dabei als erster ERK1/2-Inhibitor überhaupt in die klinische Phase aufgenommen (Sullivan et al. 2018, ClinicalTrials.gov Nr.: NCT01781429). Zum Beispiel wird Ulixertinib auch in Kombination mit einem CDK4/6-Inhibitor in Anwendung bei Pankreastumoren und anderen soliden Tumoren untersucht (ClinicalTrials.gov Nr.: NCT03454035). Des Weiteren befindet sich Ulixertinib derzeit in einer klinischen Studie bei Patienten mit MAPK-Kaskade veränderten fortgeschrittenen, soliden Tumoren (ClinicalTrials.gov Nr.: NCT04566393).

SCH772984, ein weiterer ERK1/2-Inhibitor, inhibiert die intrinsische Aktivität als Kinase von ERK1/2 und die Phosphorylierung von ERK1/2 durch MEK (Samatar und Poulikakos 2014). Durch Morris et al. (2013) wurde bereits beschrieben, dass durch SCH772984 in RAS- oder BRAF-mutierten Tumorzellen die Proliferation gehemmt und die Apoptose induziert werden kann – und das auch in Zellen, die sich auf BRAF- oder MEK-Inhibitoren resistent zeigten. Daher scheint auch SCH772984 eine vielversprechende Therapieoption darzustellen.

Wie beschrieben, ist aus ersten präklinischen Untersuchungen und Studien bekannt, dass ERK1/2-Inhibitoren Resistenzen gegenüber Inhibitoren der vorgeschalteten Kinasen im MAPK-Signalweg und auch die dadurch resultierende Reaktivierung dieses Signalweges überwinden können (Germann et al. 2017). Außerdem scheinen ERK1/2-Inhibitoren

weniger sensitiv gegenüber Resistenzen zu sein (Sullivan et al. 2018). Die Inhibition von ERK1/2 als mögliche neue Therapie könnte in Zukunft erfolgreich werden, was die Notwendigkeit und Bedeutsamkeit der weiteren Forschung über die Wirkung und pharmakokinetischen Eigenschaften von ERK1/2-Inhibitoren aufzeigt.

1.4 GnRH

Das hypothalamische *gonadotropin-releasing-hormone* (GnRH) wurde erstmalig von Schally et al. 1971 beschrieben. Im Menschen gibt es zwei Subtypen GnRH-I und GnRH-II mit übereinstimmendem Genom (White et al. 1998). In gynäkologischen Tumoren gleicht die Signaltransduktion nach Aktivierung des GnRH-II-Rezeptors dem Signalweg des GnRH-I-Rezeptors (Eicke et al. 2006).

GnRH reguliert die Sekretion vom Luteinisierenden Hormon und vom Follikelstimulierenden Hormon in der Hypophyse. Die beiden sezernierten Hormone stimulieren daraufhin in den Ovarien die Östrogen- und Progesteronsynthese sowie die Follikelreifung (Stojilkovic et al. 1994). Auch in gynäkologischen Tumoren wie in ca. 80 % der Ovarial- und Endometriumkarzinome und in ca. 50 % der Mammakarzinome konnten Rezeptoren für GnRH nachgewiesen werden (Irmer et al. 1994; Emons et al. 1997; Völker et al. 2002). In vorherigen Untersuchungen konnte zudem belegt werden, dass über 70 % der Mammakarzinome vom Subtyp TNBC GnRH-Rezeptoren exprimieren (Buchholz et al. 2009; Föst et al. 2011).

Im Mammakarzinom hat GnRH einen großen Einfluss auf das Zellwachstum und die Metastasierung. Der Einsatz von GnRH-Analoga bietet somit interessante therapeutische Möglichkeiten (Gründker und Emons 2017). Studien legten nahe, dass die getrennte Zuordnung in Agonisten und Antagonisten des GnRH-Systems in Tumorzellen nicht zutrifft, sondern Antagonisten sich in den meisten Krebszelllinien wie Agonisten verhalten (Emons et al. 1993; 1997).

Eine Behandlung mit GnRH-Analoga hemmt, neben der beschriebenen Östrogenproduktion (siehe 1.1.3), über die Aktivierung einer Phosphotyrosinphosphatase die Tyrosin-Autophosphorylierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Dadurch wird die durch den Wachstumsfaktor EGF induzierte Aktivierung der ERK-MAPK-Signalkaskade inhibiert (Emons et al. 1997; Gründker et al. 2000; 2001). Die Proliferation in menschlichen Brustkrebszellen kann so durch GnRH-Agonisten wie auch GnRH-Antagonisten inhibiert werden (Emons und Schally 1994, zitiert nach Gründker et al. 2002). Zudem konnten von

Alten et al. (2006) nachweisen, dass eine Behandlung mit dem GnRH-Agonisten Triptorelin oder dem GnRH-Antagonisten Cetrorelix eben nicht nur die Proliferation von Mammakarzinomzellen beeinflussen kann, sondern auch die Invasion und Migration der Zellen und somit die metastatische Fähigkeit signifikant reduziert. Auch die Ergebnisse von Schubert et al. (2011) bestätigten, dass durch GnRH-Analoga die Metastasenbildung in TNBC reduziert werden kann.

1.5 CTGF

Der *connective tissue growth factor* (CTGF) ist ein Wachstumsfaktor des Bindegewebes und gehört zur CCN-Familie. Namensgebend für die CCN-Familie waren die ersten identifizierten Proteine: *cysteine-rich angiogenic inducer 61* (CYR61), CTGF und *nephroblastoma overexpressed* (NOV) (Bork 1993).

CCN-Proteine haben Einfluss auf die Zellproliferation, Migration und auf die Tumorgenese (Lau und Lam 1999; Perbal 2004). Dass speziell ein hoher CTGF-Spiegel in Brustkrebszellen mit dem Krebsstadium, der Tumorgröße und dem Lymphknotenstatus korreliert, konnten Xie et al. (2001) nachweisen. In umfassenden Versuchen von Chen et al. (2007) zeigte sich zudem, dass sich durch die vermehrte Expression von CTGF die Zellmorphologie verändert und die Zelle eine erhöhte Migrationsfähigkeit aufweist. Auch wird der Wachstumsfaktor während der epithelialen-mesenchymalen Transition in Mammakarzinomzellen erhöht exprimiert (Ziegler et al. 2014).

Diesen Einfluss auf intrazelluläre Vorgänge und Signalwege nehmen die CCN-Proteine mittels Signalgebung über Integrin-Rezeptoren. Zu den bekannten Oberflächenrezeptoren von CTGF zählt auch der Integrin- $\alpha v \beta 3$ -Rezeptor (Babic et al. 1999). Im Gegensatz zu den anderen mit CCN-Proteinen interagierenden Integrinen, ist das aktive Integrin $\alpha v \beta 3$ mit einer Zunahme des metastasierenden Potenzials und somit der Invasivität in menschlichem Brustkrebs und fortgeschrittenen Tumoren assoziiert (Liapis et al. 1996; Felding-Habermann et al. 2001). In Versuchen von Chen et al. (2007) konnte gezeigt werden, dass die CTGF-vermittelte Zellmigration von der ERK1/2-Phosphorylierung abhängig ist. Ebenso konnte in CTGF-überexprimierten Zellen eine Hochregulierung von S100A4, einem Calcium bindenden Protein, beobachtet werden. Durch Inhibierung des ERK-MAPK-Signalwegs ließ sich diese wieder runterregulieren (Gründker et al. 2016). Folglich konnte nachgewiesen werden, dass CTGF durch die Bindung an den Integrin- $\alpha v \beta 3$ -Rezeptor über den ERK-MAPK-Signalweg zu einer gesteigerten S100A4-Expression und zu einer gesteigerten Zellinvasion von Brustkrebszellen führt (Chen et al. 2007). Die Identifizierung von CTGF

als extrazellulärer Treiber für die Zellinvasion stellt eine interessante Option für die Behandlung von invasivem Brustkrebs dar. Eine Verminderung der CTGF-Expression führt zu einer verminderten Phosphorylierung von ERK1/2 und mindert so die Fähigkeit zur Invasion. CTGF könnte dementsprechend als therapeutischer Ansatz sehr bedeutsam sein (Hellinger et al. 2019; 2020).

1.6 Zielsetzung und Fragestellung

Es laufen viele Studien zu zielgerichteten Therapien mit RAF- und MEK-Inhibitoren in der ERK-MAPK-Kaskade. Es konnte jedoch bereits beobachtet werden, dass es durch Resistenzen oder Signale von parallelen Kaskaden zu einer Reaktivierung von ERK1/2 kommen kann. Daher kommen ERK1/2-Inhibitoren als neue Therapieoption für die Behandlung von aggressiven Mammakarzinomen eine große Bedeutung zu. Die Folgen einer möglichen ERK1/2-Resistenz in TNBC sind bisweilen allerdings nicht bekannt und auch fehlen mögliche Therapieansätze, die bei einer gebildeten Resistenz zum Einsatz kommen können. Daher soll die Auswirkung einer ERK1/2-Resistenz auf das Zellwachstum und die dreidimensionale (3D) Sphäroid-Invasion in TNBC-Zellen analysiert werden und Thema dieser Arbeit sein. Es wird angenommen, dass eine ERK1/2-Resistenz in TNBC-Zellen zu einer gesteigerten 3D-Sphäroid-Invasion und CTGF-Expression führt.

Zuerst soll der Einfluss von den ERK1/2-Inhibitoren Ulixertinib und SCH772984 auf die Aktivierung und Expression von ERK1/2 in TNBC-Zellen im Vergleich zur Expression in resistenten TNBC-Zellen untersucht werden. Für die Versuche soll mindestens eine ERK1/2-resistente Zelllinie generiert werden. Gegenüber flachen 2D-Modellen auf festen Membranen ahmen Versuche mit 3D-Sphäroiden viel getreuer die Morphologie von Tumoren nach (Vinci et al. 2015). Daher soll im Weiteren die Auswirkung einer ERK1/2-Resistenz auf die 3D-Sphäroid-Invasion und der Einfluss von ERK1/2-Inhibitoren auf die Invasion der nicht resistenten sowie der resistenten TNBC-Zellen analysiert werden. Zusätzlich soll mittels AlamarBlue-Assay der Einfluss der ERK1/2-Resistenz auf das Zellwachstum dargestellt werden.

Wie in Kapitel 1.4 aufgeführt liefern Studien zur Behandlung von Mammakarzinomen mit GnRH-Analoga vielversprechende Ergebnisse. Als mögliche Therapieoption von ERK1/2-resistenten TNBC-Zellen soll eine Behandlung mit dem GnRH-Agonisten Triptorelin untersucht werden. Aus Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte zudem bereits aufgezeigt werden, dass CTGF einen wichtigen Treiber für die Zellinvasion darstellt und attraktive therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung von invasiven Mammakarzinomen

eröffnet (Hellinger et al. 2020). Daher soll zuletzt eine mögliche Korrelation der CTGF-Expression und der ERK1/2-Resistenz in TNBC untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage BP 161 P	Sartorius, Göttingen, DE
Arium® mini	Sartorius, Göttingen, DE
Autoklav KSG 112	KSG-Sterilisatoren GmbH, Olching, DE
Biofuge® pico	Heraeus, Hanau, DE
Bunsenbrenner Flammy S	schuett-biotec GmbH, Göttingen, DE
C-DiGit® Blot Scanner	LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA
CO ₂ -Inkubator SANYO (MCO-18AC)	Sanyo Electric Co. Ltd., Osaka, Japan
Eisflockenbereiter EFBH358-N	GGM Gastro International GmbH, Ochtrup, DE
ErgoOne® FAST Pipette Controller	STARLAB International GmbH, Hamburg, DE
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX51 + Olympus U-RFL-T	Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan
Flüssigstickstoffbehälter Arpege 140	Air Liquide, Paris, Frankreich
Gefrierschrank -30 °C und -25 °C	Liebherr, Biberach, DE
Kühl-Gefrierkombi	Bosch, Stuttgart, DE
Kühlschrank	Liebherr, Biberach, DE
Labofuge® 400R	Heraeus, Hanau, DE
Laborgefrierschrank -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Gerät	Hersteller
Labormikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen, DE
Laborschüttler IKA MTS 4	IKA, Staufen im Breisgau, DE
Magnetrührer RCT basic	IKA, Staufen im Breisgau, DE
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Minizentrifuge MCF-2360	LMS, Hongo, Tokio, Japan
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pipetten „Pipetman“ (1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl, 2,5 µl)	Gilson, Middleton, Wisconsin, USA
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Präzisionswaage M-Power AZ1502	Sartorius, Göttingen, DE
qTower 2.2	Analytikjena, Jena, DE
Reax top Schüttel- und Mischgerät	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Rollenmischer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & CO. KG, Sondheim vor der Rhön, DE
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel, DE
Sterilwerkbank	Clean Air Technik; jetzt CleanAir by Baker, Utrecht, NL
Synergy HT Microplate Reader	BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA
Taumelschüttler 3011	GFL, Burgwedel, DE
Titramax 1000 Schüttel- und Mischgerät	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Universalzentrifuge Megafuge® 1.0 R	Heraeus, Hanau, DE
Vakuumpumpe EcoVac	schuett-biotec GmbH, Göttingen, DE
Vibrax Schüttler	Serono; jetzt Merck KGaA, Darmstadt, DE

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Bemis (Neenah, Wisconsin, USA), Brand GmbH + Co. KG (Wertheim, DE), Corning (New York, USA), Eppendorf (Hamburg, DE), Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Oberösterreich), Kimberly-Clark Professional (Roswell, Georgia, USA), Merck KGaA (Darmstadt, DE), Nexcelom Bioscience (Lawrence, USA), Paul Hartmann AG (Heidenheim an der Brenz, DE), Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE), STARLAB International GmbH (Hamburg, DE), Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) und Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, DE) bezogen. Die Materialien waren steril verpackt oder wurden vor ihrem Einsatz gereinigt oder autoklaviert.

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 2: verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
AlamarBlue	Bio-Rad, Hercules, California, USA
Ampuwa	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, DE
Ammoniumperoxodisulfat (APS 10 %)	Sigma-Aldrich, jetzt Merck KGaA, Darmstadt, DE
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, DE
DAPI Lösung (NBP2-31156, Lot. 1770272)	Novus Biologicals, Centennial, Colorado, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, jetzt Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Affymetrix; jetzt Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Formaldehyd Lösung 37 %	Sigma-Aldrich; jetzt Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich; jetzt Merck KGaA, Darmstadt, DE

Chemikalien	Hersteller
Methanol	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Phalloidin <i>fluorescent dye</i> 555-I (Lot. 1170272)	Abnova, Taipei, Taiwan
<i>phosphate buffered saline</i> (PBS)	Pan Biotech GmbH, Aidenbach, DE
<i>protein assay dye reagent concentrate</i>	Bio-Rad, Hercules, California, USA
<i>sodium dodecyl sulfate</i> (SDS) 10 %	Sigma-Aldrich; jetzt Merck KGaA, Darmstadt, DE
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Alfa Aesar; jetzt Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich; jetzt Merck KGaA, Darmstadt, DE
Trypanblau (T8154)	Sigma-Aldrich; jetzt Merck KGaA, Darmstadt, DE
Tween®-20	PanReac AppliChem GmbH (ITW Reagents), Darmstadt, DE

2.1.4 Lösungen und Puffer

Zum Ansetzen der verwendeten Lösungen und Puffer, die in Tabelle 3 aufgelistet sind, wurde doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) der Reinstwasseranlage der Firma Sartorius (Göttingen, DE) genutzt.

Tabelle 3: verwendete Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Hersteller/ Zusammensetzung
<i>antibody stripping buffer</i>	Interchim, Montluçon, Frankreich
<i>blocking solution</i>	TBS; 0,1 % Tween®-20; 5 % Milchpulver

Lösungen und Puffer	Hersteller/ Zusammensetzung
Bradford Lösung	<i>protein assay dye reagent concentrate</i> 1 : 5 Verdünnung auf ddH ₂ O
CellLytic™ <i>buffer</i>	Sigma-Aldrich; jetzt Merck KGaA, Darmstadt, DE
<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> (DPBS) w/o Calcium, w/o Magnesium	Pan Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Elphopuffer (5 x)	15,1 g Tris; 72 g Glycin; ad 1000 ml ddH ₂ O
<i>fetale calf serum</i> (FCS), <i>charcoal-stripped</i>	Pan Biotech GmbH, Aidenbach, DE
<i>fetale bovine serum superior</i> (FBS)	Biochrom GmbH, jetzt Merck KGaA, Darmstadt, DE
Fluoreszenzfärbelösung	2 % BSA + 0,25 % Triton™ X-100 in PBS
Gibco® Penicillin/Streptomycin (P/S; Pen-Strep, 15140-122)	Gibco, Life Technologies™, jetzt Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Glycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Holo-Transferrin (t0665), <i>human plasma</i> , gelöst in PBS (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich; jetzt Merck KGaA, Darmstadt, DE
Insuman® Rapid, Insulin <i>human</i> 40 I.E./ml	Sanofi, Paris, Frankreich
L-Alanyl-L-Glutamin	Biochrom GmbH, jetzt Merck KGaA, Darmstadt, DE
Laemmli-Puffer	5 ml Ampuwa, 5 ml <i>LDS sample buffer</i> (4 x), 1 ml <i>sample reducing agent</i> (10 x)
Lösung A = ProSieve™ 50 <i>acrylamide gel solution</i>	Lonza Bioscience, Basel, Schweiz
Lösung B	90,9 g Tris Puffer (1,5 M Tris pH 8,8) in 400 ml ddH ₂ O mit 1,5 M HCL auf pH 8,8 einstellen

Lösungen und Puffer	Hersteller/ Zusammensetzung
Lösung C	10 g 10 % SDS in 90 ml ddH ₂ O
Lösung D	30,3 g Tris Puffer (1,0 M Tris pH 6,8) 400 ml ddH ₂ O mit HCL konzentriert auf pH 6,8 einstellen
Lysepuffer	10 ml CellLytic™ <i>buffer</i> , 100 µl Protease- Inhibitor (0,01 %), 100 µl Phosphatase- Inhibitor (0,01 %)
Magermilchpulver	PanReac AppliChem GmbH (ITW Reagents), Darmstadt, DE
PBS-EDTA	200 mg EDTA erst in 10 ml PBS lösen, dann zu 90 ml PBS geben
Phosphatase-Inhibitor	Sigma-Aldrich; jetzt Merck KGaA, Darmstadt, DE
Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich; jetzt Merck KGaA, Darmstadt, DE
SDS-Elektrophoresepuffer	100 ml Elpho-Puffer (5 x); 5 ml SDS 10 %; ad 500 ml ddH ₂ O
Transferpuffer	3,03 g Tris; 14,41 g Glycin; 20 % Methanol ad 1000 ml H ₂ O (pH 8,3)
<i>tris-buffered saline</i> (TBS) 10 x	30 g Tris; 80 g NaCl; 2 g KCL ad 1000 ml (pH 7,6)
Trypsin/EDTA	c-c-pro GmbH, Oberdorla, DE
Tween®-TBS-Puffer (TBST)	100 ml TBS (10x); 10 ml Tween®-20 (10 %); ad 1000 ml ddH ₂ O

2.1.5 Kommerzielle Reaktionssysteme

Tabelle 4: verwendete Reaktionssysteme

Reaktionssystem	Hersteller
Immobilion® Western (Chemilumineszenz HRP-Substrat) Cat. No. WBKLS0100	Merck KGaA, Darmstadt, DE
NuPage® <i>LDS sample buffer</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NuPage® <i>sample reducing agent</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Westar Supernova (Chemilumineszenz Substrat, <i>luminol-enhancer solution and peroxide solution</i>) Lot MA21A-LB-1, Cod. XLS3,0100	Cyanagen, Bologna, Italien

2.1.6 Nährmedien

Für die Herstellung der Medien zur Kultivierung der Zellen wurde *minimum essential medium* (MEM) *w/ Earle's Salts, w/ stable Glutamine* von Biowest (Nuaille, Frankreich) verwendet. Die genaue Zusammensetzung der Medien ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: verwendete Nährmedien

Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium	<ul style="list-style-type: none"> - MEM - 10 % FCS - 1 % Penicillin/Streptomycin - 0,1 % Transferrin - 26 IU Insulin
Einfrüermedium	<ul style="list-style-type: none"> - MEM - 20 % FCS - 5 % DMSO

2.1.7 Matrigel®

Für die 3D-Sphäroid-Versuche wurde das Matrigel® Matrix Basalmembranpräparat der Firma Corning (New York, USA; Lot. Nr. 8332348 und 3220662) verwendet. Dieses wurde aus einem Engelbreth-Holm-Swarm-Maussarkom extrahiert (Corning). Es wurde nach Herstellerangaben bei -20 °C gelagert, vor Gebrauch über Nacht im Kühlschrank aufgetaut und auf Eis verwendet.

2.1.8 Zelllinien

Die Zelllinien HCC1806 und HCC70 wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA) beschafft.

Tabelle 6: verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Beschreibung	Referenz
HCC70	Primärtumor	CRL-2315 TM , duktales Karzinom, Stadium IIIA, Grad 3	ATCC (Gazdar et al. 1998)
HCC1806	Primärtumor	CRL-2335 TM , Plattenepithelkarzinom, Stadium IIB, Grad 2	ATCC (Gazdar et al. 1998)

2.1.9 ERK1/2-Inhibitoren

Für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurden die ERK1/2-Inhibitoren Ulixertinib (BVD-523, VRT752271) und SCH772984 verwendet. Bezogen wurden beide ERK1/2-Inhibitoren von Selleck Chemicals (Houston, Texas, USA).

2.1.10 GnRH-Analogen

In den Versuchen wurde der *gonadotropin-releasing hormone*-(GnRH-)Agonist Triptorelin genutzt. In diesem Dekapeptid wurde an Position 6 die Aminosäure Glycin durch D-Tryptophan ausgetauscht [D-Trp⁶]. Das Triptorelinacetat wurde in PBS entsprechend der Verdünnungen 10⁻⁷M und 10⁻⁹M gelöst.

2.1.11 Antikörper

Die aufgeführten Antikörper wurden nach Herstellerangaben eingesetzt.

Tabelle 7: verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Herkunft/Verdünnung	Hersteller
Anti-CTGF/CCN2 (#NB100-724)	<i>rabbit</i> , 1 : 50	Novus Biologicals, Centennial, Colorado, USA
Anti-ERK1/2 (137F5), p44/42 MAPK (#4695)	<i>rabbit</i> , 1 : 1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-GAPDH (D16H11) XP® (#5174)	<i>rabbit</i> , 1 : 1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), Phospho-p44/42 MAPK (#9101)	<i>rabbit</i> , 1 : 1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

Tabelle 8: verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Herkunft	Hersteller
Anti- <i>rabbit</i> , IgG, Amersham™ ECL™ <i>horseradish</i> Peroxidase- gekoppelt (NA 9340)	<i>donkey</i>	GE Healthcare; jetzt Cytiva, Washington, USA
Anti- <i>rabbit</i> , IgG, Alexa Fluor™ 488	<i>donkey</i>	Invitrogen; jetzt Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.1.12 Software

Tabelle 9: verwendete Software

Software	Firma
cellSens Standard 2.3	Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan
Gen5™	BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA
GraphPad Prism® 6.01 und 9.02	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ Version 1.52a	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Image Studio™ Digits Software 4.0	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA
KC4™ <i>data analysis software</i>	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, DE
Microsoft® Office 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
ZEN-Software	Zeiss, Oberkochen, DE
Zotero Version 5.0	Roy Rosenzweig Center for History and New Media, Washington DC, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung und Passagieren

Die verwendeten Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm², Sarstedt) mit jeweils 10 ml Nährmedium in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37 °C inkubiert. Das Nährmedium (siehe 2.1.6) wurde zweimal pro Woche gewechselt. Bei einer Konfluenz von 70 - 80 % wurden die Zellen passagiert. Zur Vorbereitung wurden Medium und Trypsin/EDTA im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Nachdem das alte Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 5 ml PBS gewaschen wurde, wurden 3 ml Trypsin/EDTA hinzugegeben. Die Zellkulturflaschen wurden geschwenkt und bei 37 °C inkubiert, bis sich die Zellen lösten. Dann wurde 7 ml Medium hinzugegeben, die Zellsuspension resuspendiert und ein

Anteil dieser auf andere Zellkulturflaschen aufgeteilt, in ein Reagiergefäß für weitere Versuche überführt oder verworfen. Die in der Flasche verbliebende Zellsuspension wurde mit Nährmedium auf 10 ml aufgefüllt.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (Blaubrand®; Brand, Wertheim, DE) bestimmt. Diese ist unterteilt in neun große Quadrate mit einer Tiefe von 0,1 mm und einer Fläche von jeweils 1 mm². Die Zellsuspension wurde nach dem Passagieren der Zellen in ein Reagiergefäß überführt und danach bei 1300 rcf für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in geeignetem Volumen Medium resuspendiert. Diese neue Zellsuspension wurde mit Trypanblau verdünnt (1 : 2), um vitale Zellen besser differenzieren zu können. 10 µl der Verdünnung wurden auf die Zählkammer pipettiert. Mithilfe eines Lichtmikroskops wurden die vier großen Eckquadrate ausgezählt (ausgezählte Fläche 4 mm²) und die Gesamtzellzahl pro ml wie folgt berechnet:

$$\text{Zellzahl: } \frac{\text{gezählte Zellen} \times 2}{4} \times 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$$

Mit der berechneten Gesamtzellzahl wurde der Verdünnungsfaktor bestimmt und das entsprechende Volumen der Zellsuspension zum entsprechenden Medium hinzugegeben.

2.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen

Für die Konservierung der Zellen wurde das Zellpellet in 1 µl Einfriermedium (siehe 2.1.6) resuspendiert und in einem Kryoröhrchen (Nalgene™ Cryogenic Vials, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bei -80 °C langsam im Mr. Frosty™ Gefrierbehälter eingefroren. Die längerfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen wurden die gefrorenen Zellen für kurze Zeit im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in einer Zellkulturflasche mit 9 ml Nährmedium (siehe 2.1.6) kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Austausch des Nährmediums.

2.2.1.4 3D-Sphäroid-Invasionsassay

Die 3D-Sphäroid-Assays wurden nach Vinci mit kleinen Änderungen durchgeführt (Vinci et al. 2015). Für die Versuche wurden 10.000 Zellen/ml benötigt. Jeweils 1 x 10³ Brustkrebszellen in 100 µl wurden pro *well* auf eine *96-well* Zellkulturplatte (*ultra-low-adherence u-bottom*; Nexcelom, Cenibra GmbH, Bramsche, Deutschland) überführt. Nach 48 Stunden wurde die Sphäroidbildung unter dem Mikroskop überprüft. Danach wurden vorsichtig 50 µl Medium entfernt und 50 µl Matrigel® (siehe 2.1.7) auf Eis und mit eiskalten Spitzen

hinaufgegeben. Die Position der Sphäroide wurde nochmals kontrolliert, damit die Sphäroide gleichmäßig mittig in jedem *well* liegen. Gegebenenfalls wurde die Platte bei 300 x g für drei Minuten bei 4 °C zentrifugiert, um die Sphäroide in das Zentrum zu bringen. Zum Verfestigen des Matrigels® wurde die Zellkulturplatte für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurden 50 µl Medium in jedes *well* dazugegeben und Bilder unter dem Mikroskop gemacht zum Zeitpunkt t_{0h} . Je nach Indikation wurde nun die Behandlung (SCH772984, Ulixertinib, Triptorelin 10⁻⁷M, Triptorelin 10⁻⁹M) dazugegeben. Nach 48 Stunden wurde ein zweites Bild (t_{48h}) gemacht. Das Wachstum der Sphäroide wurde mittels ImageJ *polygonal selection* und *measurement* ausgewertet. Zum Vergleichen des prozentualen Wachstums zur jeweiligen Kontrolle wurden die Mittelwerte berechnet.

2.2.1.5 Proliferationsassay AlamarBlue

Mit AlamarBlue (siehe 2.1.3) kann die Proliferation von Zellen gemessen und dies zur quantitativen Bestimmung der Viabilität genutzt werden. Es enthält den Indikatorfarbstoff Resazurin, der bei metabolischer Reduktion einen Farbumschlag vollzieht. Von der oxidierten Form in blauer Farbe zur reduzierten Form. Die reduzierte Form Resorufin ist rosa und fluoreszierend und die Intensität proportional zur Anzahl lebender Zellen (O'Brien et al. 2000).

Es sollten ERK1/2-resistente TNBC-Zelllinien generiert und die Resistenz durch einen LD₅₀-Viabilitätstest mittels AlamarBlue nachgewiesen werden. Dazu wurden jeweils in Dreifachbestimmung zum einen 10.000 Zellen in 100 µl und zum anderen 5.000 Zellen in 100 µl der jeweiligen Zelllinie pro *well* in einer 96 *well*-Platte (Falcon®, *clear flat bottom, TC-treated*; Corning, New York, USA) angesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Zugabe des entsprechenden ERK1/2-Inhibitors in unterschiedlicher Konzentration (100 nM - 10.000 nM) je Reihe, wie in Tabelle 10 beschrieben. Nach 72 Stunden wurden 10 µl AlamarBlue je *well* hinzugegeben und die Mikroplatte für 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 570 nm und 630 nm gemessen und aus den Werten die relative AlamarBlue-Reduktion bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism®. So wurden zudem die Konzentrationen der ERK1/2-Inhibitoren für die Behandlungen der beiden TNBC-Zelllinien in den Versuchen abgeleitet.

Tabelle 10: verwendete Konzentrationen

Reihe	Konzentration	Reihe	Konzentration
1	unbehandelt	7	3200 nM
2	100 nM	8	4000 nM
3	400 nM	9	5000 nM
4	800 nM	10	7500 nM
5	1600 nM	11	10.000 nM
6	2400 nM	12	<i>blank</i>

Des Weiteren wurde AlamarBlue zum Viabilitätsvergleich der 3D-Sphäroide der resistenten Zellen im Vergleich zu den nicht resistenten Zellen genutzt. Dazu wurde in den Versuchen zu den 3D-Sphäroid-Invasionsassays (siehe 2.2.1.4) nach den erfolgten Mikroskopieaufnahmen zum Zeitpunkt t_{48h} jeweils 15 μ l AlamarBlue in die einzelnen *wells* aufgetragen. Nach vier Stunden Inkubationszeit bei 37 °C wurde die Absorption mit dem Synergy HT Microplate Reader bei 570 nm und 630 nm gemessen, mittels Gen5™ Software ausgewertet und die prozentuale Differenz der AlamarBlue-Reduktion der resistenten Zellen im Vergleich zu den nicht resistenten Zellen und unter Einfluss der Behandlungen mit einem GnRH-Analogon bestimmt. Ausgewertet und graphisch dargestellt wurden die Daten ebenfalls mittels GraphPad Prism®.

2.2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.2.1 Proteinproben

Für die Versuche wurden mindestens 500.000 Zellen/ml der jeweiligen Zelllinie in einer Zellkulturflasche (25 cm²) angesät. Nach 24 Stunden wurde je nach Indikation die Behandlung dazugegeben (SCH772984, Ulixertinib, Triptorelin). Die Konzentration der Behandlung (siehe Tabelle 14, Kapitel 3.1) wurde anhand der LD₅₀ des AlamarBlue-Tests abgeleitet (siehe 2.2.1.5). Nach insgesamt 48 Stunden erfolgte die Proteinisolation.

2.2.2.2 Proteinisolation

Zur Proteinbestimmung mussten die Proteine zunächst isoliert werden. Dazu wurde das alte Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und 2 ml PBS-EDTA (2 %) hinzugegeben.

Nach zehn Minuten Inkubation wurden die Zellen mit einem Zellen-Schaber (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE) vom Boden gelöst und in ein 15 ml Reagiergefäß überführt. Durch Hinzugabe von 3 ml PBS in die Zellkulturflasche wurden die restlichen Zellen gespült und in das gleiche Reagiergefäß gegeben. Die Zellsuspension wurde dann für fünf Minuten bei 1300 rcf zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 30 µl Lysepuffer (siehe 2.1.4) lysiert. Die Proben konnten direkt für die Proteinbestimmung genutzt oder bei -20 °C eingefroren werden.

2.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Proteine in der Zellsuspension wurde nach der Methode von Bradford bestimmt (Bradford 1976). Für die Kalibrierungsgerade wurde eine Verdünnungsreihe (siehe Tabelle 11) aus BSA-Stammlösung und PBS hergestellt. Die BSA-Stammlösung wurde hierbei in einem Verhältnis von 10 mg BSA pro 1 ml PBS angesetzt.

Tabelle 11: Verdünnungsreihe

Konzentration [mg/ml] (Verdünnung)	BSA-Stammlösung [µl]	PBS [µl]
1 (1 : 10)	100	900
0,75 (1 : 13,33)	75	925
0,5 (1 : 20)	50	950
0,25 (1 : 40)	25	975
0,1 (1 : 100)	10	990

Je 10 µl wurden in Doppelbestimmung auf eine auf Eis gelegte 96-well Mikroplatte (*F-bottom, clear*; Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Oberösterreich) aufgetragen. Zudem wurde für die Nullwertbestimmung noch ddH₂O und PBS auf die Mikroplatte aufgetragen. Zur Konzentrationsbestimmung wurden die Proben, welche vorher isoliert wurden, bei 13000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und eine Verdünnung (1 : 10) hergestellt. Dafür wurde 5 µl Proteinlösung aus dem Überstand in ein Reagiergefäß zu 45 µl vorgelegtem ddH₂O gegeben. Je 10 µl dieser Verdünnung wurden in Doppelbestimmung aufgetragen. Der restliche Überstand der Probe wurde in einem neuen Reagiergefäß mit Laemmli-Puffer (siehe 2.1.4) im Verhältnis 1 : 2 versetzt und bis zur Nutzung der Proben eingefroren. Pro *well* wurden 200 µl Bradford Lösung (siehe 2.1.4) hinzugegeben und die Platte für fünf Minuten

bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm mit dem Synergy HT Microplate Reader gemessen und mittels Gen5™ Software ausgewertet. Das *protein assay dye reagent concentrate* in der Bradford Lösung enthält den Farbstoff *coomassie brilliant blue G-250*, welcher bei Bindung an Aminosäurereste sein Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm verändert und so gemessen werden kann.

2.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der *sodium dodecyl sulfate*-(SDS-)Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Die Proteinproben wurden aufgetaut, SDS wurde im Überschuss dazugegeben und die Proben wurden für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Dies führte zur Denaturierung der Proteine und zur Bindung von SDS, wodurch negative Ladungen entstanden, die proportional zu ihrer Molekülgröße waren und die Eigenladung der Proteine überdeckten. In den Versuchen zu dieser Arbeit wurde nach Laemmli verfahren (Laemmli 1970). Die Proteine wurden zuerst in einem Sammelgel (siehe Tabelle 12) konzentriert. Danach folgte die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe im Trenngel (siehe Tabelle 13), wodurch ein spezifisches Bandenmuster erzeugt wurde. Die Elektrophorese-Apparatur (siehe 2.1.1) wurde nach Herstellerangaben zusammengesetzt und mit SDS-Elektrophoresepuffer (siehe 2.1.4) gefüllt. Damit die Proteine auf dem Polyacrylamidgel wanderten, wurde an die Gelelektrophorese zuerst für 30 Minuten eine Spannung von 80 Volt und danach für eine Stunde eine Spannung von 100 Volt angelegt. Mittels Western Blot (siehe 2.2.2.5) wurden die Proteine danach auf eine Membran übertragen.

Tabelle 12: Sammelgel 5 %

Zusammensetzung	Einsatz
H ₂ O	5 ml
Lösung A	0,75 ml
Lösung C	75 µl
Lösung D	1,9 ml
TEMED	22 µl
APS 10 %	37 µl

Tabelle 13: Trenngel 7,5 %

Zusammensetzung	Einsatz
H ₂ O	5,7 ml
Lösung A	2,3 ml
Lösung B	2,8 ml
Lösung C	110 µl
TEMED	20 µl
APS 10 %	37 µl

2.2.2.5 Western Blot

Mithilfe eines Western Blots können Proteine, welche vorher mittels Elektrophorese aufgetrennt wurden, auf eine *polyvinylidene difluoride*-(PVDF-)Membran (Immobilion®-P Transfer Membran, Merck KGaA, Darmstadt, DE) übertragen und durch Antikörper sichtbar gemacht werden. Dazu wurde senkrecht zu dem Polyacrylamidgel für ca. eine Stunde eine elektrische Spannung von 100 Volt angelegt, so dass die Proteine auf die Trägermembran wanderten. Die Transfer-Apparatur wurde hierfür wie folgt aufgebaut: Kathode, Schwämmchen, 3 x Filterpapier, Gel, PVDF-Membran, 3 x Filterpapier, Schwämmchen, Anode und mit Transferpuffer (siehe 2.1.4) gefüllt. Zur Aktivierung der PVDF-Membran wurde diese vor dem *blotting* in Methanol geschwenkt, mit ddH₂O gewaschen und danach in TBST geschwenkt.

2.2.2.6 Detektion, Visualisierung und Auswertung

Nach dem Transfer und vor dem spezifischen Antikörper-Nachweis wurde die PVDF-Membran mit einer *blocking solution* (siehe 2.1.4) für eine Stunde inkubiert, damit freie Bindungsstellen für Antikörper blockiert werden konnten. Danach wurde die Membran dreifach mit TBST gewaschen und im Anschluss der Primärantikörper (siehe 2.1.11, Tabelle 7) aufgetragen. Der Antikörper inkubierte über Nacht bei 4 °C auf einer Schüttelplatte. Bevor der Sekundärantikörper (siehe 2.1.11, Tabelle 8) am nächsten Tag für mindestens eine Stunde aufgetragen werden konnte, wurde die Membran dreifach mit TBST gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Der zusammen mit *horseradish peroxidase*-(HRP-)gekoppelte Sekundärantikörper wurde mindestens eine Stunde langsam geschwenkt.

Danach wurde die Membran mehrfach gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen.

Durch Zugabe des chemilumineszierenden Substrats aus *luminol-enhancer solution* und *peroxide solution* für die Primärantikörper Anti-ERK1/2 und Anti-pERK1/2 oder des chemilumineszierenden HRP-Substrats von Immobilon® Western für Anti-GAPDH (siehe 2.1.5) wurden die an die Antikörper gebundenen Proteine detektiert und mittels C-DiGit® Blot Scanner visualisiert. Mit dem Programm Image Studio™ Digits wurden die spezifischen Banden ausgelesen und die Farbintensität gemessen. Zum quantitativen Abgleich der Proteinexpression in den einzelnen Proben wurde in den Western Blots zu dieser Arbeit Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet und die Ergebnisse auf GAPDH normiert. Die Auswertung und graphische Darstellung erfolgten mit GraphPad Prism®.

2.2.2.7 Membran stripfen

Um dieselbe PVDF-Membran für neue Antikörper zu nutzen, wurde diese zuerst in TBST geschwenkt und ausgewaschen. Danach wurde die PVDF-Membran für zwei Minuten bei Raumtemperatur in einem *antibody stripping buffer* (siehe 2.1.4) inkubiert, um gebundene Antikörper zu lösen. Dieser wurde abgegossen und die PVDF-Membran kurz mit ddH₂O gespült. Bevor ein neuer Primärantikörper aufgetragen wurde, musste die PVDF-Membran erneut mit *blocking solution* inkubieren.

2.2.3 Immunfluoreszenz

Zur immunzytochemischen Färbung der HCC1806-Zellen benötigt man 40.000 Z./ml, es wurden jeweils 250 µl in den *wells* des Glasobjektträgers (*8-well*, auf Glas ablösbar, LOT No. 0022321, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE) angezüchtet. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte die Behandlung mit dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984 oder dem GnRH-Analgon Triptorelin in den Konzentrationen 10⁻⁷M oder 10⁻⁹M. Nach weiteren 24 Stunden wurde der Überstand abgesaugt und mit 100 µl PBS gespült. Zur Fixierung wurde danach die Oberfläche der einzelnen Vertiefungen des Objektträgers jeweils mit 200 µl Formaldehyd (3,7 %) für 30 Minuten benetzt. Nachdem der Objektträger mit DPBS gewaschen und mit Fluoreszenzfärbelösung (siehe 2.1.4) permeabilisiert wurde, gab man den Primärantikörper gegen CTGF (1 : 50) mit jeweils 120 µl pro *well* dazu. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde mit PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper Alexa Fluor™ 488 (siehe 2.1.11, Tabelle 8), die DAPI Lösung (Novus Biologicals, Centennial, Colorado, USA)

und Phalloidin *fluorescent dye* (Abnova, Taipei, Taiwan) wurden dann in die einzelnen *wells* gegeben und für mindestens 30 Minuten vor Licht geschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Der hier genutzte Phalloidin-Fluoreszenzfarbstoff färbt die Aktinfilamente der Zellen rot. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher die DNA der Zellkerne anfärbt.

Im Folgenden wurde der Objektträger zuerst mit Fluoreszenzfärbelösung und danach mit DPBS gewaschen. Zum Eindecken wurde der Überstand abgekippt, fluoreszierendes Eindeckmedium (*Dako fluorescence mounting medium*, Agilent, Californien, USA) aufgetropft und ein Menzel-Deckglas (24 x 60 mm; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) langsam auf den Objektträger festgedrückt. Der Objektträger wird im Dunkeln gelagert. Zum Auswerten wurde die Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop und mittels ZEN-Software sichtbar gemacht. Es wurden Bilder mit 10-facher und 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Farbintensität der Bilder mit 10-facher Vergrößerung wurde mit ImageJ und der Funktion *hue-saturation-brightness-(HSB-)stack* bestimmt, welcher das Bild in Farbton-, Sättigungs- und Helligkeitsbilder teilt. Mittels *measurement* wurde die integrierte Dichte der Helligkeitsbilder analysiert, welche die Summe der Pixelwerte des Bildes darstellt. Die Werte von CTGF und Phalloidin wurden zum quantitativen Abgleich auf DAPI normiert und in GraphPad Prism® ausgewertet und graphisch dargestellt.

2.2.4 Statistische Analysen

Für die statistische Auswertung wurden Microsoft® Excel und GraphPad Prism® genutzt. Die Signifikanzen wurden wie jeweils angegeben entweder mittels *unpaired one-way ANOVA* oder *unpaired t-test (two-tailed)* ermittelt. Die im Ergebnisteil beschriebenen Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler (SEM).

Für die Resistenzbestimmung durch einen LD₅₀-Vibilitätstest wurden die Werte mittels F-Test in einer nicht linearen Regression ermittelt, wobei die Nullhypothese besagt, dass der LD₅₀-Wert für alle Datensätze gleich ist. Die ungerichtete Alternativhypothese besagt, dass der LD₅₀-Wert für alle Datensätze unterschiedlich ist. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von ERK1/2-Inhibitoren auf die Expression von ERK1/2 und Phospho-ERK1/2

Zuerst wurde der Einfluss der ERK1/2-Inhibitoren SCH772984 und Ulixertinib auf die Expression von ERK1/2 und Phospho-ERK1/2 (pERK) in TNBC-Zellen der Zelllinie HCC1806 und HCC70 untersucht. Dazu wurden die Zelllinien mit der Konzentration der initialen mittleren letalen Dosis (LD₅₀) der Inhibitoren Ulixertinib und SCH772984 nach 24 Stunden behandelt (siehe Tabelle 14). Diese ließ sich aus dem LD₅₀-Viabilitätstest mit AlamarBlue ableiten (siehe 2.2.1.5). Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot (siehe 2.2.2.5) nachgewiesen. Mindestens fünf Experimente mit unterschiedlichen Passagen wurden durchgeführt.

Tabelle 14: Konzentrationen der ERK1/2-Inhibitoren

Zelllinie	ERK1/2-Inhibitor	cLD ₅₀ [µM]	Verdünnungsfaktor (Stock 1000 µM)	Zugabe [µl] auf 2 ml
HCC1806	SCH772984	9,525	105	19,05
	Ulixertinib	8,93	112,1	17,84
HCC70	SCH772984	12,04	83,1	24,07
	Ulixertinib	12,59	79,4	25,19

Es konnte nachgewiesen werden, dass der ERK1/2-Inhibitor SCH772984 die Proteinexpression von pERK1/2 in der Zelllinie HCC1806 nach 48 Stunden signifikant senkt (Abbildung 2; SCH772984 $31,07 \pm 14,85$ vs. Kontrolle; $n = 12$; $P = 0,0077$). Es konnte eine signifikante Erhöhung der pERK1/2-Expression nach 48 Stunden bei Behandlung mit dem ERK1/2-Inhibitor Ulixertinib festgestellt werden (Abbildung 2; Ulixertinib $194,5 \pm 44,15$ vs. Kontrolle; $n = 5$; $P = 0,005$). Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss der ERK1/2-Inhibitoren SCH772984 und Ulixertinib auf die ERK1/2-Expression im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 2; SCH772984 $101,8 \pm 23,46$ vs. Kontrolle; $n = 11$ und Ulixertinib $75,50 \pm 38,24$ vs. Kontrolle; $n = 5$).

Das Verhältnis der Expression von pERK1/2 zu ERK1/2 zeigte sich in den mit SCH772984 behandelten Zellen der Zelllinie HCC1806 signifikant vermindert, in den mit Ulixertinib

behandelten Zellen signifikant erhöht (Abbildung 2; SCH772984 $46,29 \pm 21,66$ vs. Kontrolle; $n = 11$; $P = 0,0169$ und Ulixertinib $503,5 \pm 141,2$ vs. Kontrolle; $n = 5$; $P = 0,0003$).

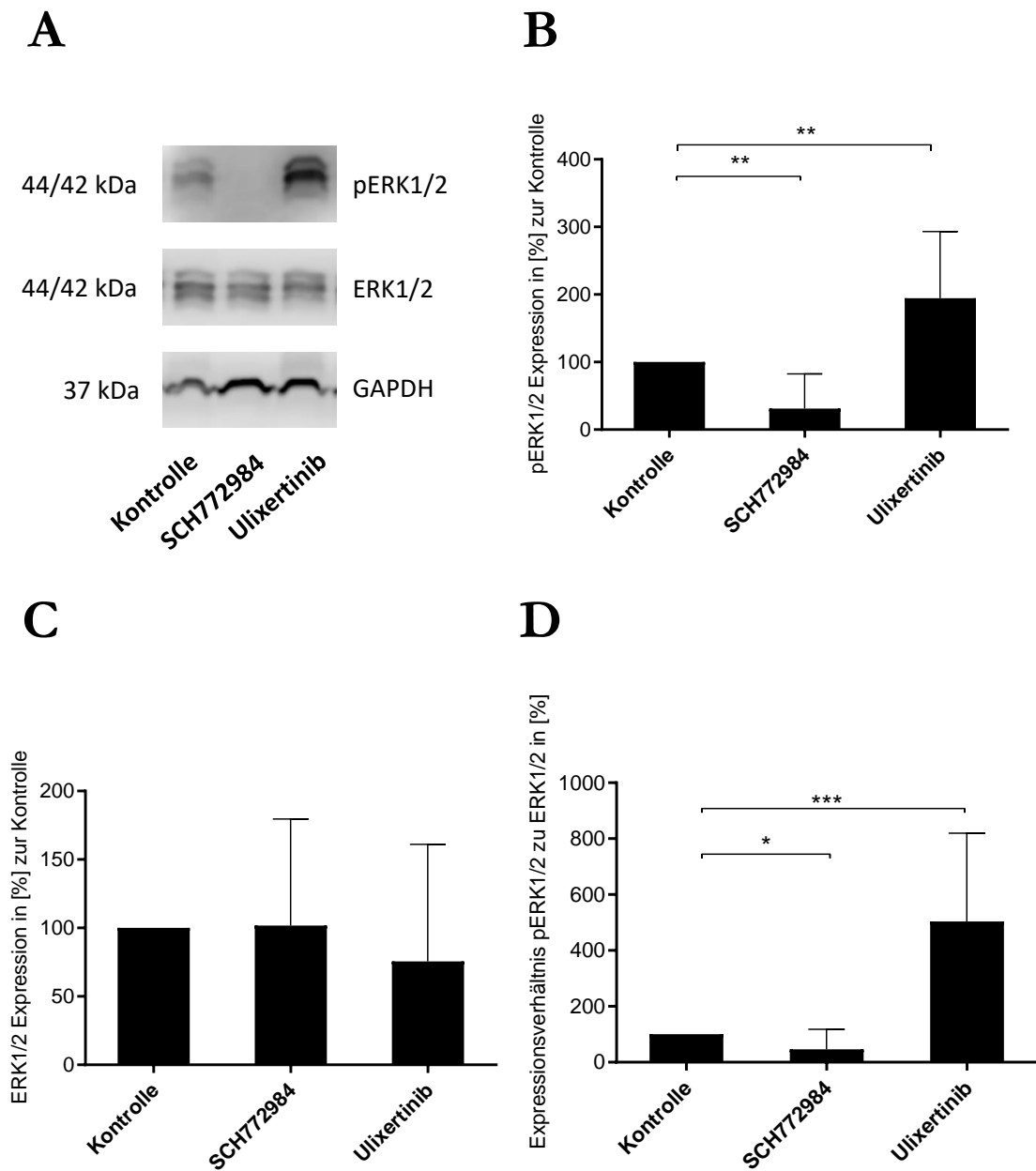


Abbildung 2: Einfluss der ERK1/2-Inhibitoren auf pERK1/2 und ERK1/2 in der Zelllinie HCC1806.

A: Die Proteinexpression von pERK1/2 und ERK1/2 in der Zelllinie HCC1806 wurde nach Zugabe von SCH772984 und Ulixertinib nach 48 Stunden mittels Western Blot im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

B: Dargestellt ist der Einfluss der ERK1/2-Inhibitoren SCH772984 und Ulixertinib auf die Expression von pERK1/2 in der Zelllinie HCC1806 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zum quantitativen Abgleich

der Proteinexpression wurde GAPDH verwendet. Die Signifikanzen wurden mittels *unpaired one-way ANOVA* ermittelt.

C: Dargestellt ist der Einfluss der ERK1/2-Inhibitoren SCH772984 und Ulixertinib auf die Expression von ERK1/2 in der Zelllinie HCC1806 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zum quantitativen Abgleich der Proteinexpression wurde GAPDH verwendet. Es konnten keine Signifikanzen ermittelt werden.

D: Dargestellt ist das Expressionsverhältnis von pERK1/2 zu ERK1/2 in der Zelllinie HCC1806 nach der Behandlung mit den ERK1/2-Inhibitoren SCH772984 und Ulixertinib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Signifikanzen wurden mittels *unpaired t-test (two-tailed)* ermittelt.

Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

In der Zelllinie HCC70 konnte nachgewiesen werden, dass der ERK1/2-Inhibitor SCH772984 die Proteinexpression von pERK1/2 nach 48 Stunden signifikant senkt (Abbildung 3; SCH772984 $51,52 \pm 12,46$ vs. Kontrolle; $n = 7$; $P = 0,0021$). Es konnte keine signifikante Veränderung der pERK1/2-Expression nach 48 Stunden bei Behandlung mit dem ERK1/2-Inhibitor Ulixertinib festgestellt werden (Abbildung 3; Ulixertinib $92,91 \pm 48,20$ vs. Kontrolle; $n = 5$).

Es konnte eine signifikante Abnahme der ERK1/2-Expression nach 48 Stunden nach Behandlung mit dem Inhibitor Ulixertinib beobachtet werden (Abbildung 3; Ulixertinib $49,06 \pm 19,6$ vs. Kontrolle; $n = 5$; $P = 0,0404$). Der ERK1/2-Inhibitor SCH772984 zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die ERK1/2-Expression (Abbildung 3; SCH772984 $87,86 \pm 14,67$ vs. Kontrolle; $n = 7$).

Für die Zelllinie HCC70 konnte dargelegt werden, dass das Expressionsverhältnis von pERK1/2 zu ERK1/2 in den mit SCH772984 behandelten Zellen vermindert wurde (Abbildung 3; SCH772984 $60,3 \pm 11,92$ vs. Kontrolle; $n = 7$; $P = 0,0060$). Für das Verhältnis der Expression von pERK1/2 zu ERK1/2 in den mit Ulixertinib behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (Abbildung 3; Ulixertinib $224,2 \pm 101,3$ vs. Kontrolle; $n = 5$).

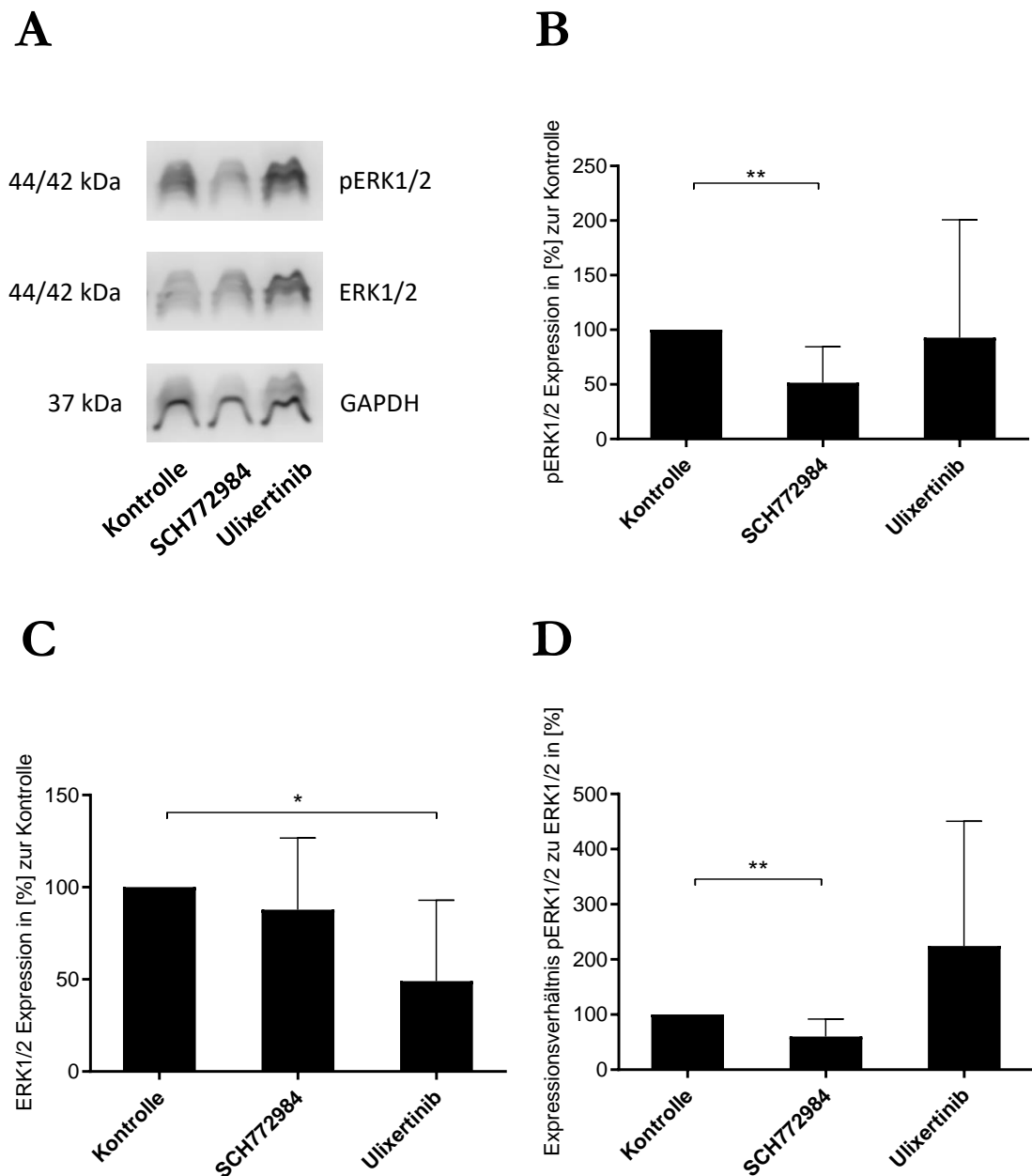


Abbildung 3: Einfluss der ERK1/2-Inhibitoren auf pERK1/2 und ERK1/2 auf die Zelllinie HCC70.

A: Die Proteinexpression von pERK1/2 und ERK1/2 in der Zelllinie HCC70 wurde nach Zugabe von SCH772984 und Ulixertinib nach 48 Stunden mittels Western Blot im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

B: Dargestellt ist der Einfluss der ERK1/2-Inhibitoren SCH772984 und Ulixertinib auf die Expression von pERK1/2 in der Zelllinie HCC70 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zum quantitativen Abgleich der Proteinexpression wurde GAPDH verwendet. Die Signifikanzen wurden mittels *unpaired t-test (two-tailed)* ermittelt. Für Ulixertinib vs. Kontrolle konnte keine Signifikanz ermittelt werden.

C: Dargestellt ist der Einfluss der ERK1/2-Inhibitoren SCH772984 und Ulixertinib auf die Expression von ERK1/2 in der Zelllinie HCC70 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zum quantitativen Abgleich der Proteinexpression wurde GAPDH verwendet. Die Signifikanzen wurden mittels *unpaired one-way ANOVA* ermittelt. Für SCH772984 vs. Kontrolle konnte keine Signifikanz ermittelt werden.

D: Dargestellt ist das Expressionsverhältnis von pERK1/2 zu ERK1/2 in der Zelllinie HCC70 nach der Behandlung mit den ERK1/2-Inhibitoren SCH772984 und Ulixertinib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Signifikanzen wurden mittels *unpaired t-test (two-tailed)* ermittelt. Für Ulixertinib vs. Kontrolle konnte keine Signifikanz ermittelt werden.

Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM. * P < 0,05; ** P < 0,01

3.2 Einfluss von ERK1/2-Inhibitoren auf die 3D-Sphäroid-Invasion

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss einer Behandlung mit ERK1/2-Inhibitoren auf die Invasion von 3D-Sphäroiden der Zelllinien HCC1806 und HCC70 analysiert. Die Bilder unter dem Mikroskop der 3D-Sphäroid-Invasionsassays erfolgten dabei zum Zeitpunkt t_{0h} und t_{48h} (siehe 2.2.1.4). Zur Auswertung wurden die Mittelwerte der prozentual invadierten Flächen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle berechnet. Es erfolgten mindestens sechs Experimente mit unterschiedlichen Passagen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit den ERK1/2-Inhibitoren SCH772984 (Abbildung 4, Abbildung 5; SCH772984 $11,58 \pm 6,932$ vs. Kontrolle; n = 6; P < 0,0001) und Ulixertinib (Abbildung 4, Abbildung 5; Ulixertinib $21,17 \pm 3,227$ vs. Kontrolle; n = 6; P < 0,0001) in der Zelllinie HCC1806 zu einem signifikant verminderten Flächenwachstum der 3D-Sphäroide führt.

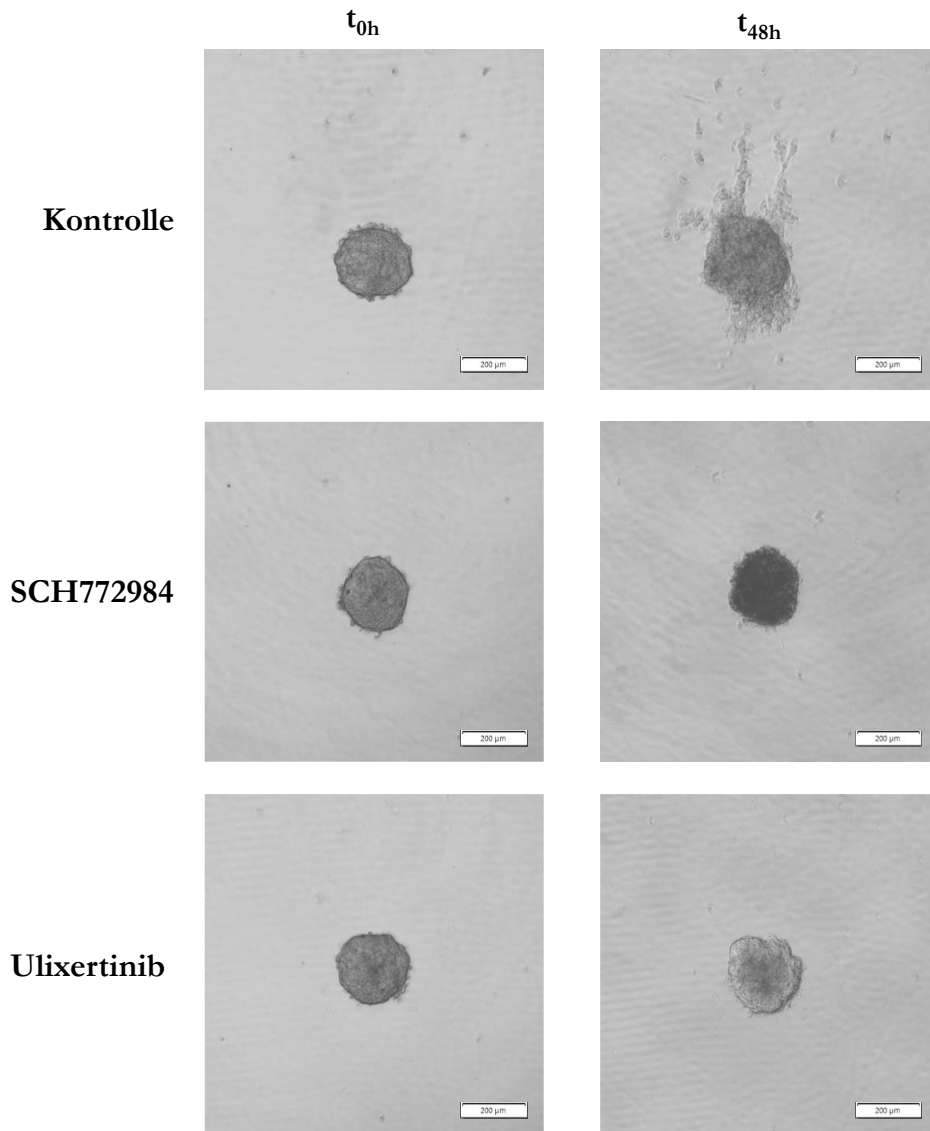


Abbildung 4: 3D-Sphäroide der Zelllinie HCC1806 zum Zeitpunkt t_{0h} und t_{48h} . Zum Zeitpunkt t_{0h} erfolgten die Fotos vor Zugabe der Behandlung mit SCH772984 und Ulixertinib. Zeitpunkt t_{48h} zeigt die Sphäroide nach der Behandlung mit den genannten ERK1/2-Inhibitoren. Die Ansicht erfolgte mit 4-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop, der Messbalken zeigt 200 μm .

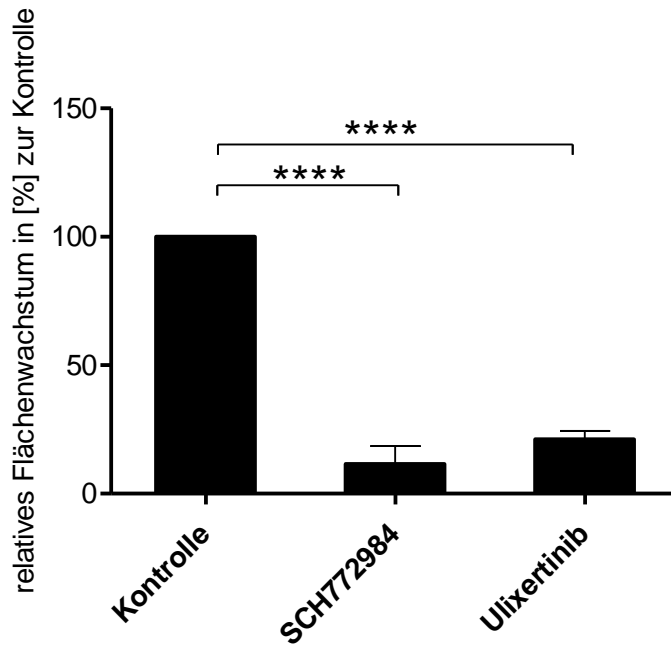


Abbildung 5: Einfluss der ERK1/2-Inhibitoren SCH772984 und Ulixertinib auf die 3D-Sphäroid-Invasion der Zelllinie HCC1806. Dargestellt ist der Einfluss der ERK1/2-Inhibitoren SCH772984 und Ulixertinib auf die Invasivität der 3D-Sphäroide der Zelllinie HCC1806 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Signifikanzen wurden mittels *unpaired one-way ANOVA* ermittelt. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM. **** $P < 0,0001$

Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit den ERK1/2-Inhibitoren SCH772984 (Abbildung 6, Abbildung 7; SCH772984 $44,19 \pm 10,44$ vs. Kontrolle; $n = 6$; $P = 0,0024$) und Ulixertinib (Abbildung 6, Abbildung 7; Ulixertinib $46,31 \pm 12,97$ vs. Kontrolle; $n = 9$; $P = 0,0009$) in der Zelllinie HCC70 zu einem signifikant verminderten Flächenwachstum der 3D-Sphäroide führt.

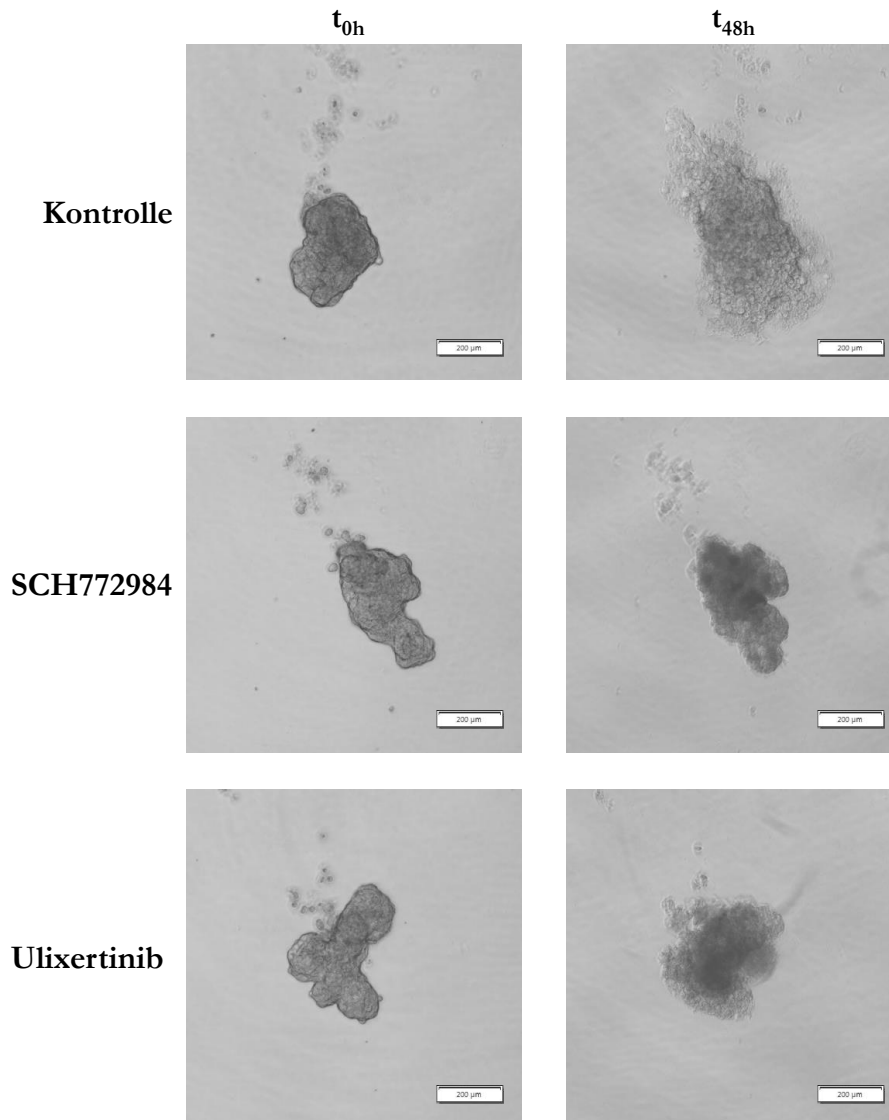


Abbildung 6: 3D-Sphäroide der Zelllinie HCC70 zum Zeitpunkt t_{0h} und t_{48h} . Zum Zeitpunkt t_{0h} erfolgten die Fotos vor Zugabe der Behandlung mit SCH772984 und Ulixertinib. Zeitpunkt t_{48h} zeigt die Sphäroide nach der Behandlung mit den genannten ERK1/2-Inhibitoren. Die Ansicht erfolgte mit 4-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop, der Messbalken zeigt 200 μm .

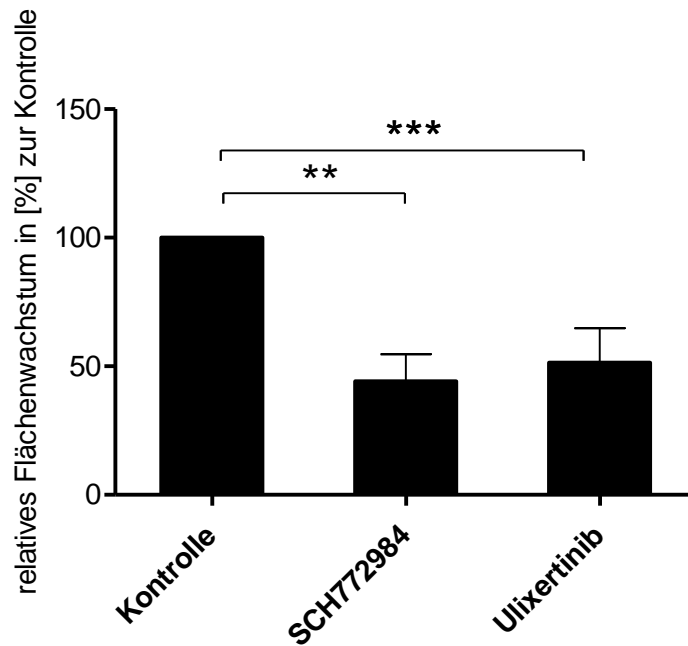


Abbildung 7: Einfluss der ERK1/2-Inhibitoren SCH772984 und Ulixertinib auf die 3D-Sphäroid-Invasion der Zelllinie HCC70. Dargestellt ist der Einfluss der ERK1/2-Inhibitoren SCH772984 und Ulixertinib auf die Invasivität der 3D-Sphäroide der Zelllinie HCC70 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Signifikanzen wurden mittels *unpaired one-way ANOVA* ermittelt. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM. ** P < 0,01; *** P < 0,001

3.3 Resistente TNBC-Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit sollten vier ERK1/2-resistente TNBC-Zelllinien generiert werden, um den Einfluss der Resistenz auf das Zellwachstum und die Invasivität von TNBC-Zellen zu analysieren. Die Resistenz wurde hierbei durch einen LD₅₀-Viabilitätstest mittels AlamarBlue (siehe 2.2.1.5) nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen mit den ERK1/2-Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und die AlamarBlue-Absorption bei 570 nm und 630 nm gemessen. Zur Auswertung wurde die relative AlamarBlue-Reduktion bestimmt.

In der Zelllinie HCC1806 konnten in einem Behandlungszeitraum von über vier Monaten keine resistenten Zellen gegenüber dem ERK1/2-Inhibitor Ulixertinib generiert werden (Abbildung 8).

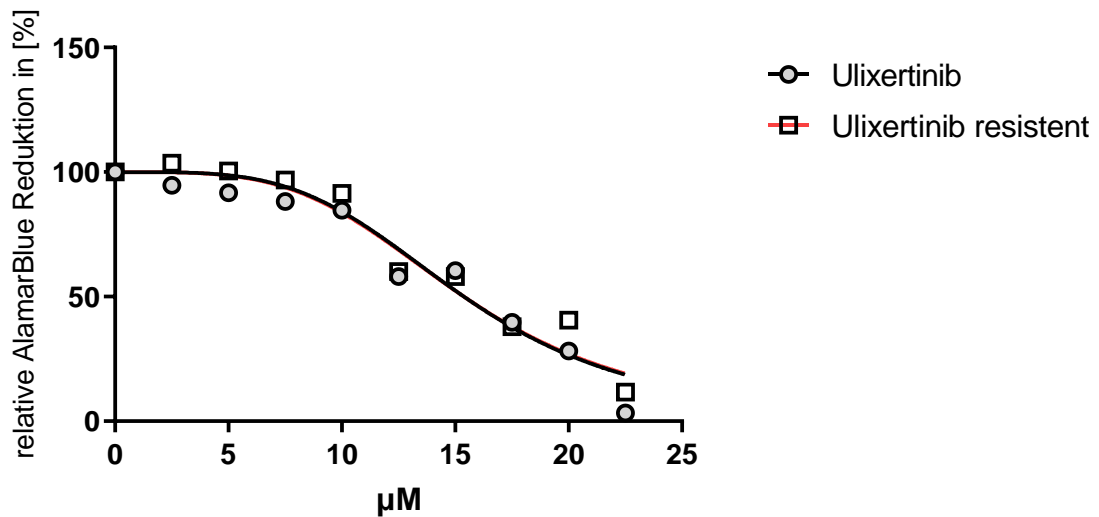


Abbildung 8: ERK1/2-Resistenztest der Zelllinie HCC1806 gegenüber Ulixertinib. Die Abbildung zeigt die relative AlamarBlue-Reduktion in [%] im Verhältnis zur Konzentration des Inhibitors Ulixertinib in [µM]. Es konnte keine Resistenz ermittelt werden.

Für die Zelllinie HCC1806 konnten weniger empfindliche Zellen gegenüber dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984 generiert werden. Die LD₅₀ lag bei den unbehandelten Zellen bei 15,4 µM. Im Vergleich dazu lag die LD₅₀ bei den resistenten Zellen bei 17,78 µM (Abbildung 9). Diese generierte, weniger sensible Zelllinie gegenüber SCH772984 wurde für die weiteren Resistenzversuche genutzt.

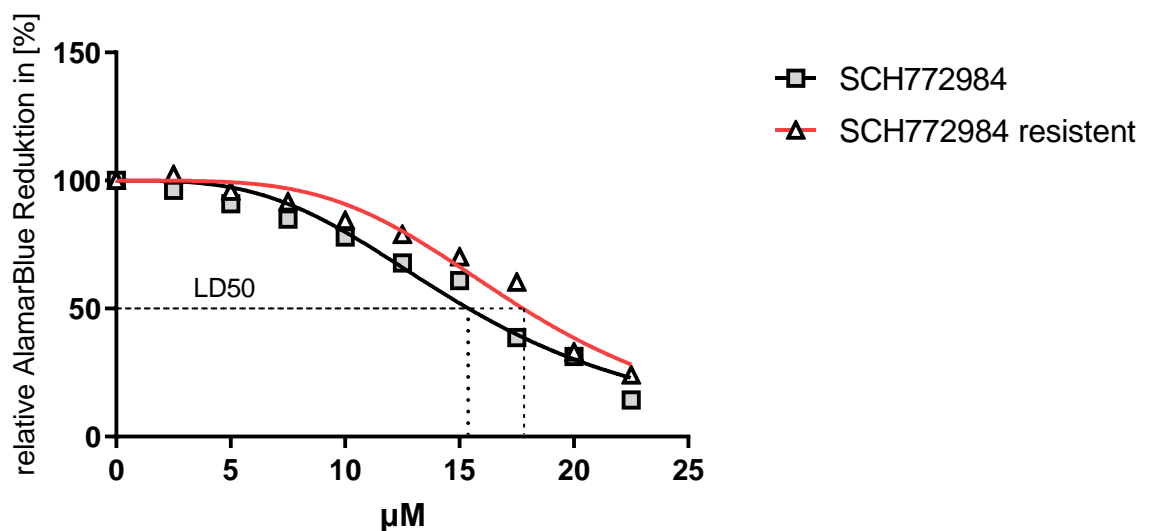


Abbildung 9: ERK1/2-Resistenztest der Zelllinie HCC1806 gegenüber SCH772984. Die Abbildung zeigt die relative AlamarBlue-Reduktion in [%] im Verhältnis zur Konzentration des Inhibitors SCH772984 in [µM]. Die Werte wurden mittels F-Test in einer nicht linearen Regression ermittelt, wobei das Signifikanzniveau

$\alpha = 0,05$ festgelegt wurde. Die Nullhypothese wurde mit $P = 0,0038$ abgelehnt und ist beweisend für einen signifikanten Unterschied. Die LD_{50} liegt bei den unbehandelten Zellen bei $15,4 \mu\text{M}$ und bei den resistenten Zellen bei $17,78 \mu\text{M}$.

In einem Behandlungszeitraum von über vier Monaten konnten in der Zelllinie HCC70 keine resistenten Zellen gegenüber dem ERK1/2-Inhibitor Ulixertinib generiert werden (Abbildung 10).

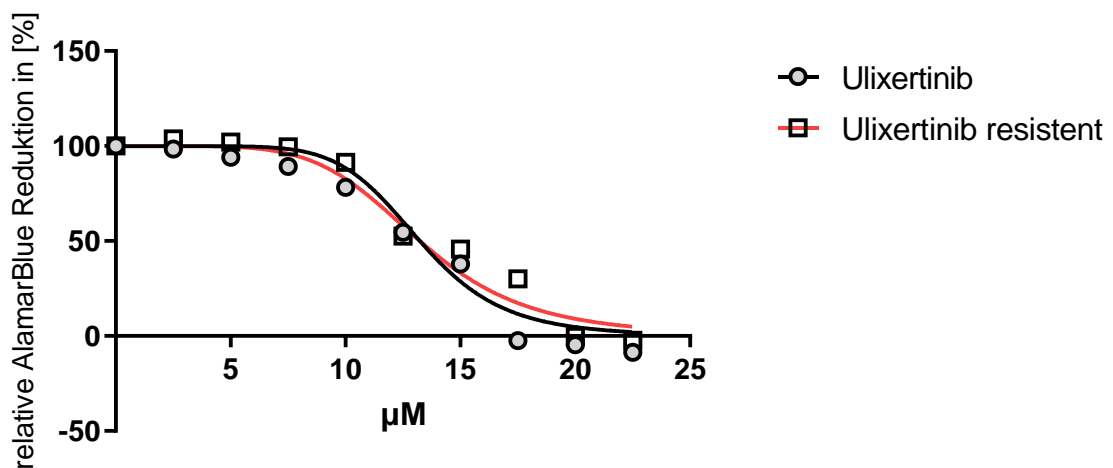


Abbildung 10: ERK1/2-Resistenztest der Zelllinie HCC70 gegenüber Ulixertinib. Die Abbildung zeigt die relative AlamarBlue-Reduktion in [%] im Verhältnis zur Konzentration des Inhibitors Ulixertinib in [µM]. Es konnte keine Resistenz ermittelt werden.

Es konnten zudem keine weiteren Resistenzversuche der Zelllinie HCC70 gegenüber dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984 durchgeführt werden, da sich die Zellen bei weiteren Dosisgaben letal zeigten.

3.4 Einfluss einer GnRH-Behandlung auf ERK1/2-resistente Zellen

Im Weiteren sollte, als mögliche Therapieoption bei einer ERK1/2-Resistenz, der Einfluss einer GnRH-Behandlung auf die resistenten TNBC-Zellen analysiert werden. Dazu wurde in den Versuchen mit denjenigen generierten Zellen der Zelllinie HCC1806 gearbeitet, die gegenüber dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984 resistent sind (siehe 3.3, Abbildung 9). Im Vergleich dazu wurden unbehandelte Zellen der Zelllinie HCC1806 genutzt. Als GnRH-Analogon wurde Triptorelin in den Konzentrationen 10^{-7}M und 10^{-9}M verwendet. Nach

erfolgreicher Proteinisolation (siehe 2.2.2.2) wurde die Proteinexpression von ERK1/2 und pERK1/2 mittels Western Blot (siehe 2.2.2.5) nachgewiesen. Mindestens vier Experimente mit unterschiedlichen Passagen wurden durchgeführt.

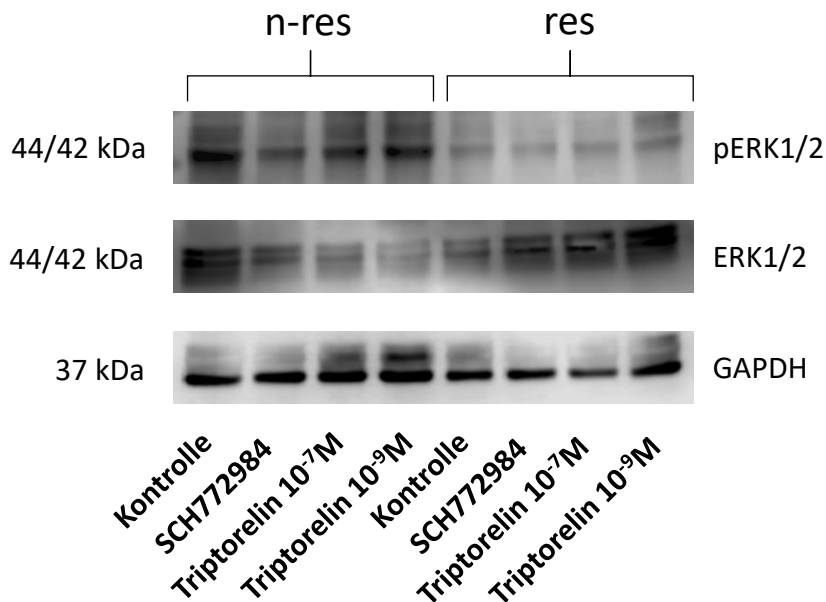


Abbildung 11: pERK1/2- und ERK1/2-Expression in nicht resistenten und resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806. Die Proteinexpression von pERK1/2 und ERK1/2 wurde nach Zugabe von SCH772984 und Triptorelin 10⁻⁷M bzw. 10⁻⁹M nach 48 Stunden mittels Western Blot im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen. Dargestellt sind hier Proben der nicht resistenten (n-res) und der resistenten (res) Zellen der Zelllinie HCC1806. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

Es konnte aufgezeigt werden, dass bei den resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806, vergleichend zu den nicht resistenten Zellen, tendenziell weniger pERK1/2 exprimiert wird (Abbildung 11, Abbildung 12; res Kontrolle $56,77 \pm 23,87$ vs. n-res Kontrolle; $n = 7$; $P = 0,0953$).

Der ERK1/2-Inhibitor SCH772984 führte in den nicht resistenten Zellen (Abbildung 11, Abbildung 12; n-res SCH772984 $27,17 \pm 11,48$ vs. n-res Kontrolle; $n = 5$; $P < 0,0001$) sowie auch in den resistenten Zellen (Abbildung 11, Abbildung 12; res SCH772984 $51,48 \pm 16,07$ vs. res Kontrolle; $n = 4$; $P = 0,0024$) der Zelllinie HCC1806 zu einer signifikanten Minderung der pERK1/2-Expression. Es konnte dargelegt werden, dass der ERK1/2-Inhibitor SCH772984 auf die pERK1/2-Expression in nicht resistenten Zellen aber einen größeren senkenden Effekt hat als auf die resistenten Zellen (Abbildung 12).

In den nicht resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 wurde eine signifikante Senkung der pERK1/2-Expression durch die Behandlung mit dem GnRH-Analogon Triptorelin 10⁻⁷M

nachgewiesen (Abbildung 11, Abbildung 12; n-res Triptorelin 10^{-7} M $63,26 \pm 13,09$ vs. n-res Kontrolle; n = 5; P = 0,0069). Die Behandlung der resistenten Zellen mit Triptorelin 10^{-7} M hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von pERK1/2 im Vergleich zur resistenten unbehandelten Kontrolle (Abbildung 11, Abbildung 12; res Triptorelin 10^{-7} M $98,27 \pm 29,44$ vs. res Kontrolle; n = 5). In Abbildung 12 wurde der senkende Effekt von Triptorelin 10^{-7} M auf die pERK1/2-Expression in den nicht resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 dargestellt, vergleichend dazu der minimale Effekt auf die pERK1/2-Expression der resistenten Zellen bezogen auf die Kontrolle.

Die Expression von pERK1/2 wurde in den nicht resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 durch die Behandlung mit Triptorelin 10^{-9} M tendenziell eher erhöht (Abbildung 11, Abbildung 12; n-res Triptorelin 10^{-9} M $150,6 \pm 32,04$ vs. n-res Kontrolle; n = 5; P = 0,0858). Ebenso erkennt man einen Trend dahingehend, dass die pERK1/2-Expression in den mit Triptorelin 10^{-9} M behandelten resistenten Zellen im Vergleich zur resistenten unbehandelten Kontrolle erhöht wurde (Abbildung 11, Abbildung 12; res Triptorelin 10^{-9} M $187,3 \pm 54,80$ vs. res Kontrolle; n = 5; P = 0,0832). Vergleichend betrachtet, hatte Triptorelin 10^{-9} M in den resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 einen größeren erhöhenden Effekt auf die Expression von pERK1/2 als in den nicht resistenten Zellen (Abbildung 12).

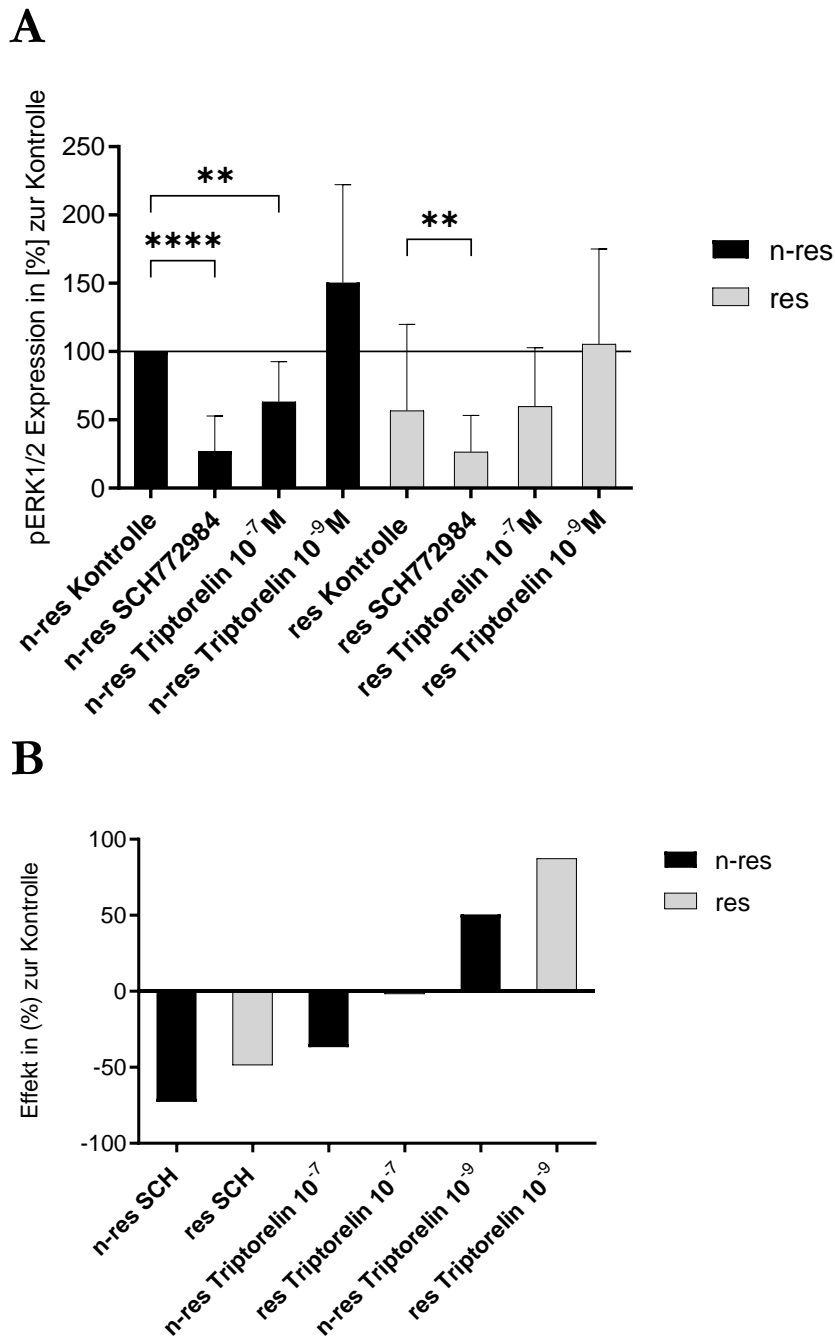


Abbildung 12: Einfluss von SCH772984 und Triptorelin auf pERK1/2 in nicht resistenten und resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806.

A: Dargestellt ist der Einfluss des ERK1/2-Inhibitors SCH772984 und des GnRH-Analogons Triptorelin auf die Expression von pERK1/2 in nicht resistenten (n-res) und resistenten (res) Zellen der Zelllinie HCC1806 bezogen auf die n-res unbehandelte Kontrolle. Zum quantitativen Abgleich der Proteinexpression wurde GAPDH verwendet. Die Signifikanzen wurden mittels *unpaired t-test (two-tailed)* ermittelt. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM, wobei die Werte durch den Bezug zur jeweiligen res bzw. n-res unbehandelten Kontrolle ermittelt wurden. ** P < 0,01; **** P < 0,0001

B: Dargestellt ist der Effekt in [%] von SCH772984 und Triptorelin auf pERK1/2 in resistenten (res) Zellen im Vergleich zur res Kontrolle und nicht resistenten (n-res) Zellen im Vergleich zur n-res Kontrolle in der

Zelllinie HCC1806. Der Effekt wurde aus der Differenz der Mittelwerte von den behandelten Zellen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle berechnet und graphisch aufgezeigt.

In den Analysen der ERK1/2-Expression in den mit SCH772984 oder Triptorelin behandelten nicht resistenten Zellen bzw. resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrolle konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (Abbildung 11, Abbildung 13). In Abbildung 13 wurde graphisch dargestellt, dass die Triptorelin-Behandlung mit 10^{-7} M und mit 10^{-9} M in den resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806, verglichen zu den nicht resistenten Zellen, eher einen erhöhenden Effekt auf die ERK1/2-Expression hat. Im Hinblick auf die Behandlung mit SCH772984 zeigte sich graphisch, dass der ERK1/2-Inhibitor in den nicht resistenten Zellen einen gering höheren steigernden Effekt auf die Expression von ERK1/2 als auf die resistenten Zellen hat.

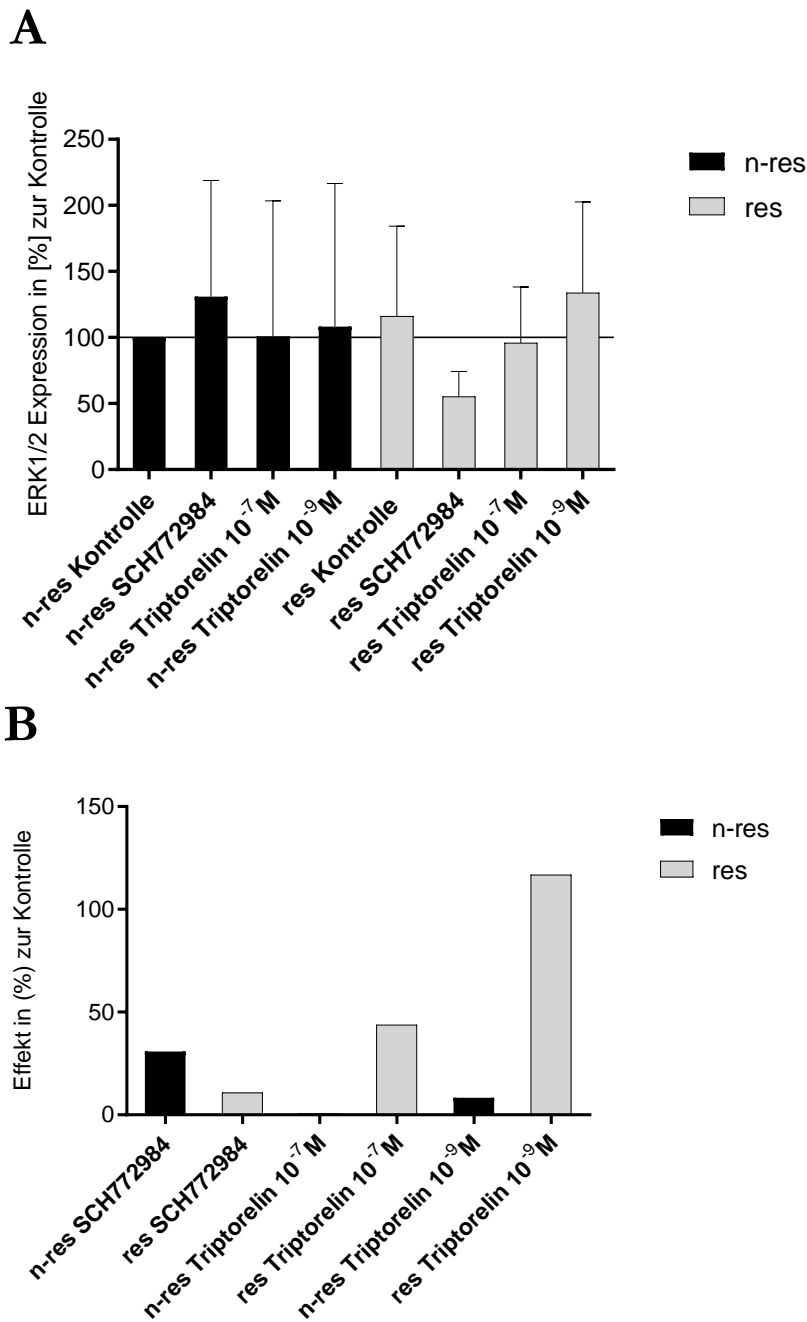


Abbildung 13: Einfluss von SCH772984 und Triptorelin auf ERK1/2 in nicht resistenten und resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806.

A: Dargestellt ist der Einfluss des ERK1/2-Inhibitors SCH772984 und des GnRH-Analogons Triptorelin auf die Expression von ERK1/2 in nicht resistenten (n-res) und resistenten (res) Zellen der Zelllinie HCC1806 bezogen auf die n-res unbehandelte Kontrolle. Zum quantitativen Abgleich der Proteinexpression wurde GAPDH verwendet. Es konnten keine Signifikanzen der Werte im Bezug zur jeweiligen res bzw. n-res unbehandelten Kontrolle ermittelt werden.

B: Dargestellt ist der Effekt in [%] von SCH772984 und Triptorelin auf ERK1/2 in resistenten (res) Zellen im Vergleich zur res Kontrolle und nicht resistenten (n-res) Zellen im Vergleich zur n-res Kontrolle in der Zelllinie

HCC1806. Der Effekt wurde aus der Differenz der Mittelwerte von den behandelten Zellen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle berechnet und graphisch aufgezeigt.

Die Expressionsverhältnisse von pERK1/2 zu ERK1/2 wurden anhand der graphischen Darstellung in Abbildung 14 verglichen, Signifikanzen konnten nicht ermittelt werden. Im Vergleich zur nicht resistenten unbehandelten Kontrolle zeigte sich, dass pERK1/2 im Verhältnis zu ERK1/2 in der resistenten unbehandelten Kontrolle (Abbildung 14; res Kontrolle $66,15 \pm 25,20$ vs. n-res Kontrolle; $n = 7$) sowie in den nicht resistenten und resistenten mit SCH772984 behandelten Zellen (Abbildung 14; n-res SCH772984 $54,27 \pm 38,12$ vs. n-res Kontrolle; $n = 5$ und res SCH772984 $41,98 \pm 20,74$ vs. res Kontrolle; $n = 4$) ähnlich vermindert exprimiert wurde. In den nicht resistenten mit Triptorelin 10^{-9} M behandelten Zellen wurde eher eine erhöhte Expression von pERK1/2 im Verhältnis zu ERK1/2 nachgewiesen (Abbildung 14; n-res Triptorelin 10^{-9} M $684,6 \pm 493,9$ vs. n-res Kontrolle; $n = 5$), in den nicht resistenten mit Triptorelin 10^{-7} M behandelten Zellen zeigte sich ein minimal erhöhter Trend der Expression (Abbildung 14; n-res Triptorelin 10^{-7} M $186,8 \pm 120$ vs. n-res Kontrolle; $n = 5$). In den resistenten mit Triptorelin 10^{-7} M und 10^{-9} M behandelten Zellen konnte ein ähnliches Verhältnis der pERK- zur ERK1/2-Expression im Vergleich zur resistenten Kontrolle ermittelt werden (Abbildung 14; res Triptorelin 10^{-7} M $59,56 \pm 12,09$ vs. res Kontrolle; $n = 5$ und res Triptorelin 10^{-9} M $92,96 \pm 29,17$ vs. res Kontrolle; $n = 5$).

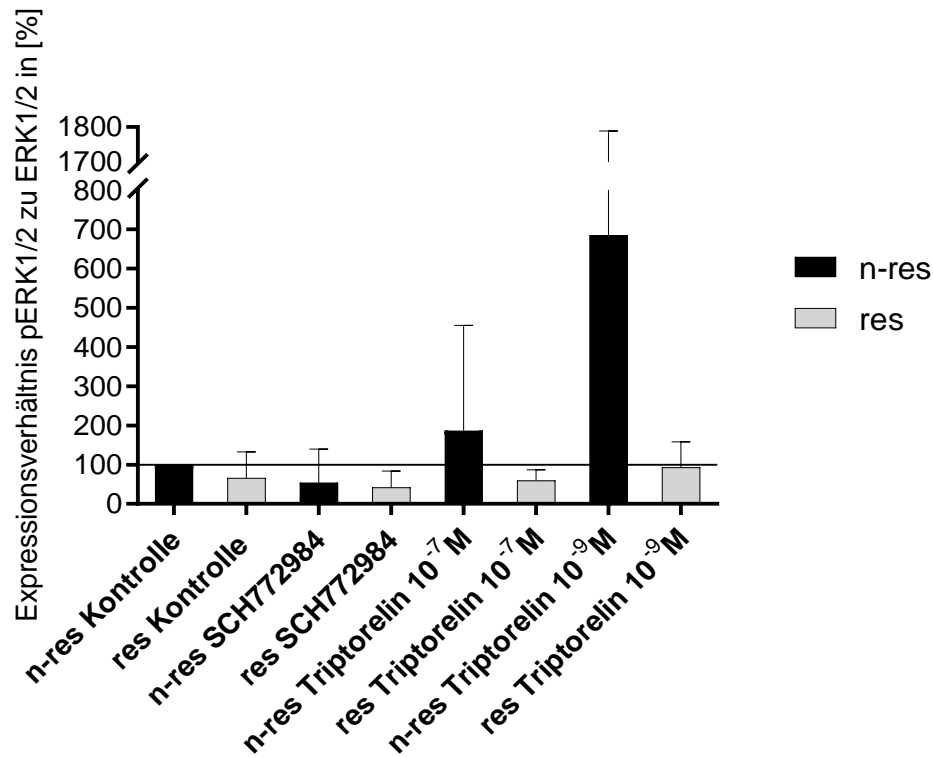


Abbildung 14: Verhältnis pERK1/2-Expression zur ERK1/2-Expression in nicht resistenten und resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806. Dargestellt ist das Expressionsverhältnis von pERK1/2 zu ERK1/2 nach der Behandlung mit dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984 und dem GnRH-Analogen Triptorelin der resistenten (res) Zellen und der nicht resistenten (n-res) Zellen bezogen auf die n-res unbehandelte Kontrolle. Es konnten keine Signifikanzen der Werte im Bezug zur jeweiligen res bzw. n-res unbehandelten Kontrolle ermittelt werden.

3.5 Einfluss einer GnRH-Behandlung auf die 3D-Sphäroid-Invasion ERK1/2-resistenter Zellen

Als eine mögliche Therapieoption für ERK1/2-resistente TNBC-Zellen wurde weiter der Einfluss einer GnRH-Behandlung auf die Invasion ERK1/2-resistenter 3D-Sphäroide untersucht. In diesen Versuchen wurde ebenfalls mit den auf SCH772984 resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 gearbeitet (siehe 3.3, Abbildung 9) und zum Vergleich nicht resistente Zellen der Zelllinie HCC1806 herangezogen. Als GnRH-Analogen wurde, wie auch in den vorherigen Versuchen, Triptorelin verwendet. Die Bilder unter dem Mikroskop der 3D-Sphäroid-Invasionsassays erfolgten zum Zeitpunkt t_{0h} und t_{48h} (siehe 2.2.1.4). Zur Auswertung wurden die Mittelwerte der prozentual invadierten Flächen im Vergleich zur

unbehandelten nicht resistenten Kontrolle berechnet. Es erfolgte die Durchführung von mindestens sechs Versuchen mit unterschiedlichen Passagen.

In Abbildung 15 sind die Bilder der 3D-Sphäroide der nicht resistenten Zellen im Vergleich zu den resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 zusammengestellt. Es wurde jeweils ein Foto vor der Behandlung zum Zeitpunkt t_{0h} und nach der Behandlung mit dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984 oder dem GnRH-Analogen Triptorelin zum Zeitpunkt t_{48h} abgebildet.

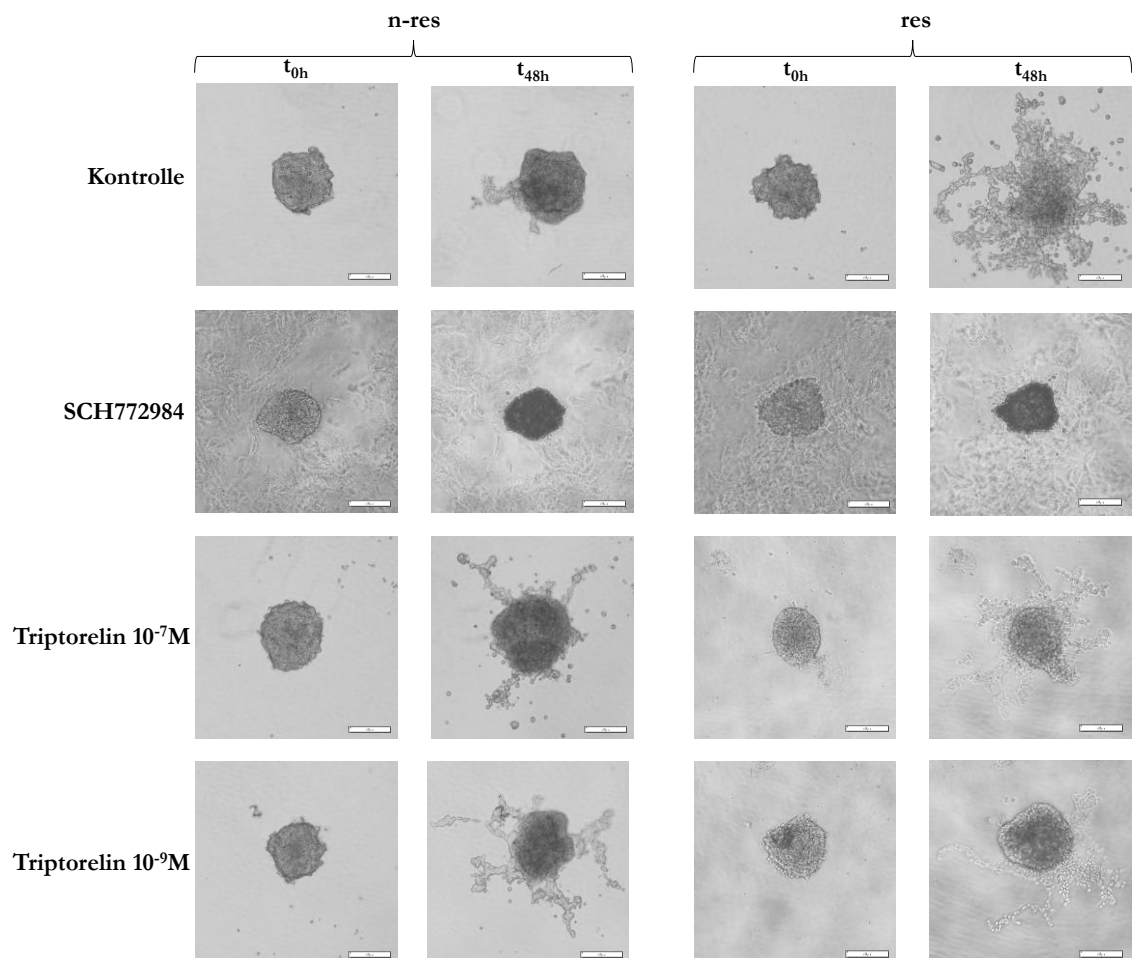


Abbildung 15: 3D-Sphäroide der nicht resistenten und resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 zum Zeitpunkt t_{0h} und t_{48h} . Abgebildet sind die 3D-Sphäroide der resistenten (res) Zellen und der nicht resistenten (n-res) Zellen der Zelllinie HCC1806. Zum Zeitpunkt t_{0h} erfolgten die Fotos vor Zugabe der Behandlung mit dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984 oder dem GnRH-Analogen Triptorelin. Zeitpunkt t_{48h} zeigt die Sphäroide nach der Behandlung mit SCH772984 oder Triptorelin. Die Ansicht erfolgte mit 4-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop, der Messbalken zeigt 200 μm .

Im direkten Vergleich von der resistenten unbehandelten Kontrolle zur nicht resistenten unbehandelten Kontrolle der 3D-Sphäroide wurde ein signifikant erhöhtes

Flächenwachstum bei den resistenten Zellen ermittelt (Abbildung 15, Abbildung 16; res Kontrolle $422,4 \pm 112,2$ vs. n-res Kontrolle; $n = 20$; $P = 0,0066$).

Es konnte eine signifikante Verminderung des relativen Flächenwachstums bei den nicht resistenten mit SCH772984 behandelten Sphäroiden vergleichend zu den nicht resistenten unbehandelten Kontroll-Sphäroiden nachgewiesen werden (Abbildung 16; n-res SCH772984 $-3,86 \pm 4,53$ vs. n-res Kontrolle; $n = 6$; $P < 0,0001$). Ebenso konnte eine signifikante Verminderung des relativen Flächenwachstums bei den resistenten mit SCH772984 behandelten Sphäroiden im Vergleich zu der resistenten unbehandelten Kontrolle ermittelt werden (Abbildung 16; res SCH772984 $-2,26 \pm 0,45$ vs. res Kontrolle; $n = 6$; $P < 0,0001$). Es konnte somit nachgewiesen werden, dass der ERK1/2-Inhibitor SCH772984 in den nicht resistenten sowie in den resistenten Sphäroiden der Zelllinie HCC1806 einen senkenden Effekt auf das relative Flächenwachstum aufzeigt.

Es wurde kein signifikanter Einfluss und kein ausgeprägter Effekt einer Behandlung mit Triptorelin 10^{-7} M auf die Invasion der nicht resistenten oder resistenten 3D-Sphäroide nachgewiesen (Abbildung 16; n-res Triptorelin 10^{-7} M $117,4 \pm 15,32$ vs. n-res Kontrolle; $n = 14$ und res Triptorelin 10^{-7} M $94,56 \pm 13,4$ vs. res Kontrolle; $n = 14$).

Bei den nicht resistenten mit Triptorelin 10^{-9} M behandelten Zellen wurde gegenüber der nicht resistenten unbehandelten Kontrolle ein erhöhtes relatives Flächenwachstum nachgewiesen (Abbildung 16; n-res Triptorelin 10^{-9} M $162,4 \pm 23,89$ vs. n-res Kontrolle; $n = 13$; $P = 0,0119$). In den resistenten Sphäroiden konnte kein erheblicher Einfluss auf das Flächenwachstum durch eine Behandlung mit Triptorelin 10^{-9} M im Vergleich zu den resistenten unbehandelten Kontroll-Sphäroiden dokumentiert werden (Abbildung 16; res Triptorelin 10^{-7} M $85,83 \pm 9,59$ vs. res Kontrolle; $n = 14$).

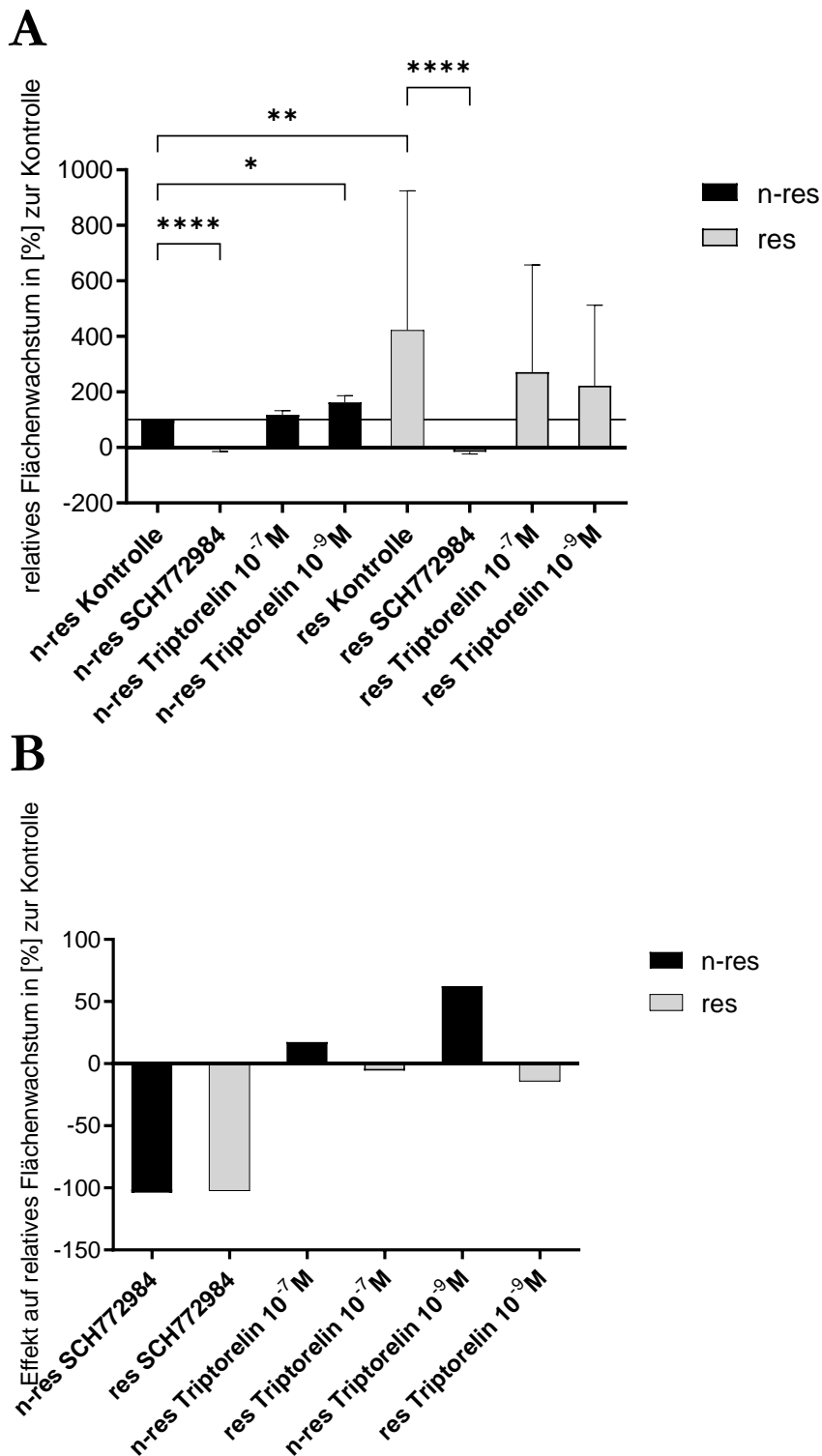


Abbildung 16: Einfluss von SCH772984 und Triptorelin auf die 3D-Sphäroid-Invasion nicht resistenter und resistenter Zellen der Zelllinie HCC1806.

A: Dargestellt ist der Einfluss des ERK1/2-Inhibitors SCH772984 und des GnRH-Analogons Triptorelin auf das relative Flächenwachstum der 3D-Sphäroide in resistenten (res) Zellen und nicht resistenten (n-res) Zellen der Zelllinie HCC1806 bezogen auf die n-res unbehandelte Kontrolle. Die Signifikanzen wurden mittels *unpaired t-test (two-tailed)* ermittelt. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM, wobei die Werte durch den Bezug zur

jeweiligen res bzw. n-res unbehandelten Kontrolle ermittelt wurden. * P < 0,05; ** P < 0,01; **** P < 0,0001

B: Dargestellt ist der Effekt in [%] von SCH772984 und Triptorelin auf das relative Flächenwachstum der resistenten (res) Zellen zur res Kontrolle und der nicht resistenten (n-res) Zellen zur n-res Kontrolle in der Zelllinie HCC1806. Der Effekt wurde aus der Differenz der Mittelwerte von den behandelten Zellen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle berechnet und graphisch aufgezeigt.

3.6 Viabilitätsvergleich der 3D-Sphäroide mittels AlamarBlue

Zusätzlich erfolgte nach den Versuchen zu der 3D-Sphäroid-Invasion (siehe 3.5) eine Viabilitätsanalyse der resistenten TNBC-Zellen im Vergleich zu den nicht resistenten TNBC-Zellen mittels AlamarBlue (siehe 2.2.1.5). Die prozentuale Differenz der relativen AlamarBlue-Reduktion der resistenten Zellen im Vergleich zu den nicht resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 wurde bestimmt und mittels GraphPad Prism® graphisch dargestellt. Mindestens drei Experimente mit unterschiedlichen Passagen wurden durchgeführt.

In den resistenten Kontrollzellen der Zelllinie HCC1806 konnte im Vergleich zur nicht resistenten Kontrolle kein signifikanter Unterschied in der AlamarBlue-Absorption gemessen werden (Abbildung 17; res Kontrolle $68,56 \pm 21,88$ vs. n-res Kontrolle; n = 7).

Die Behandlung der nicht resistenten Zellen mit dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984 hatte keinen repräsentativen Einfluss auf die Zellviabilität der Sphäroide im Vergleich zur nicht resistenten unbehandelten Kontrolle (Abbildung 17; n-res SCH772984 $69,97 \pm 22,68$ vs. n-res Kontrolle; n = 3). Wohingegen in den resistenten Sphäroiden durch eine Behandlung mit SCH772984 weniger viable Zellen vergleichend zur resistenten unbehandelten Kontrolle nachgewiesen wurden (Abbildung 17; res SCH772984 $50,6 \pm 18,84$ vs. res Kontrolle; n = 3; P = 0,0285). Der Effekt von SCH772984 auf die Viabilität der resistenten Zellen wird in Abbildung 17 dargestellt.

In den mit Triptorelin 10^{-7} M behandelten resistenten sowie nicht resistenten Sphäroiden konnte kein signifikanter Unterschied der AlamarBlue-Absorption im Vergleich zur resistenten bzw. nicht resistenten unbehandelten Kontrolle gemessen werden und somit kein eindeutiger Effekt dargestellt werden (Abbildung 17; n-res Triptorelin 10^{-7} M $61,13 \pm 36,30$ vs. n-res Kontrolle; n = 4 und res Triptorelin 10^{-7} M $104,3 \pm 78,48$ vs. res Kontrolle; n = 4).

Eine Behandlung der Sphäroide mit Triptorelin 10^{-9} M führte in den nicht resistenten Zellen im Vergleich zur nicht resistenten Kontrolle zu einer signifikant verminderten Zellviabilität (Abbildung 17; n-res Triptorelin 10^{-9} M $42,55 \pm 19,36$ vs. n-res Kontrolle; n = 4; P = 0,0250).

Dieser Effekt wird in Abbildung 17 nochmals verdeutlicht. Im Gegensatz dazu zeigte die Behandlung mit Triptorelin 10^{-9} M auf die resistenten Sphäroide keinen repräsentativen Effekt (Abbildung 17; res Triptorelin 10^{-9} M $150,8 \pm 65,65$ vs. res Kontrolle; $n = 4$).

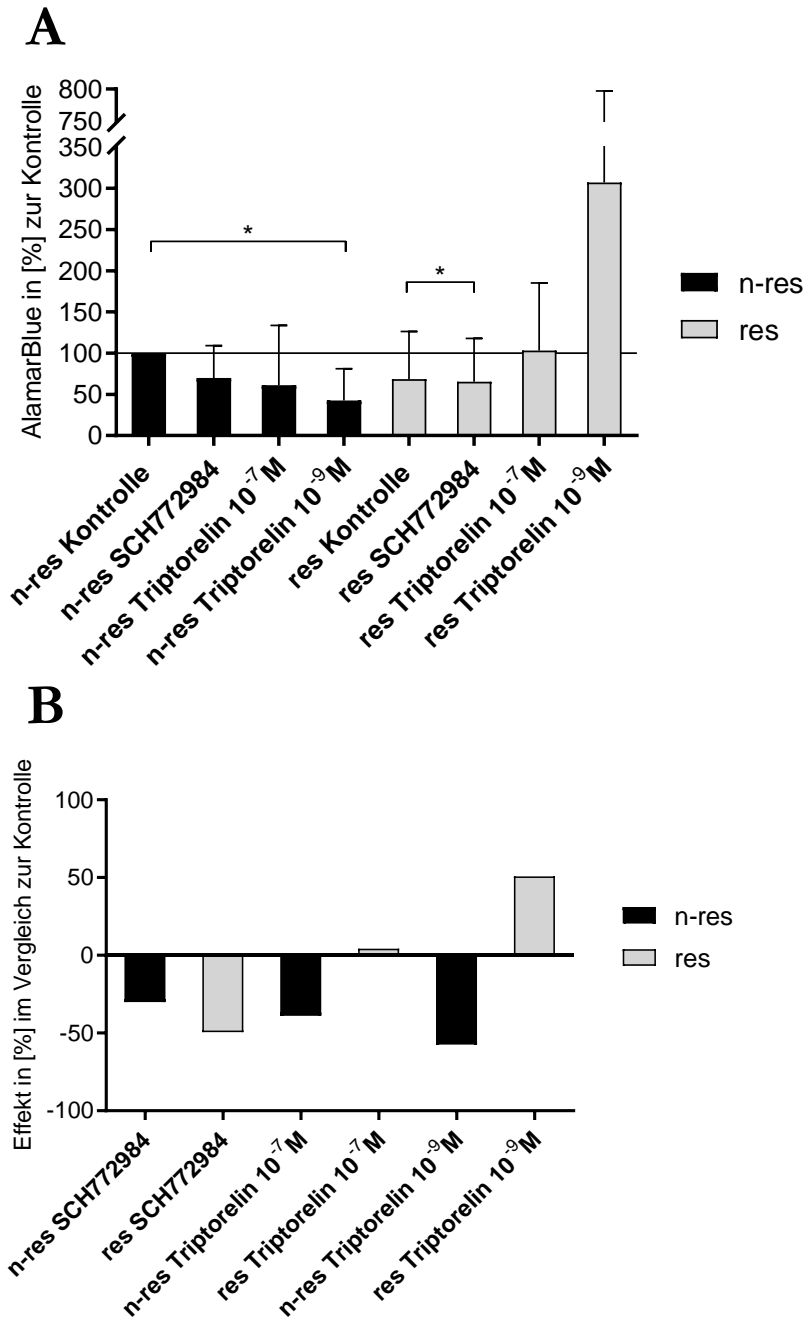


Abbildung 17: Einfluss von SCH72984 und Triptorelin auf die Zellviabilität der 3D-Sphäroide nicht resistenter und resistenter Zellen der Zelllinie HCC1806.

A: Dargestellt ist der Einfluss des ERK1/2-Inhibitors SCH72984 und des GnRH-Analogons Triptorelin auf die Viabilität der 3D-Sphäroide in resistenten (res) Zellen und nicht resistenten (n-res) Zellen der Zelllinie HCC1806 bezogen auf die n-res unbehandelte Kontrolle. Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte durch Absorptionsmessung von AlamarBlue. Die Signifikanzen wurden mittels *unpaired t-test (two-tailed)* ermittelt. Die

Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM, wobei die Werte durch den Bezug zur jeweiligen res bzw. n-res unbehandelten Kontrolle ermittelt wurden. * P < 0,05

B: Dargestellt ist der Effekt in [%] von SCH772984 und Triptorelin auf die Zellviabilität der 3D-Sphäroide der resistenten (res) Zellen zur res Kontrolle und der nicht resistenten (n-res) Zellen zur n-res Kontrolle in der Zelllinie HCC1806. Der Effekt wurde aus der Differenz der Mittelwerte von den behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle berechnet und graphisch aufgezeigt.

3.7 CTGF- und Phalloidin-Expression in ERK1/2-resistenten Zellen

Zuletzt wurde anhand einer Immunfluoreszenz die CTGF-Expression in ERK1/2-resistenten TNBC-Zellen im Vergleich zu nicht resistenten TNBC-Zellen dargestellt. Dazu wurden unbehandelte Zellen und die auf den ERK1/2-Inhibitor SCH772984 resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 verwendet (siehe 3.3, Abbildung 9). Die Zellen wurden in einem *8-well* Glasobjektträger angesät und nach Behandlung und mehreren Schritten der immunzytochemischen Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop mittels ZEN-Software und ImageJ ausgewertet (siehe 2.2.3). Zur Analyse der Farbintensitätsunterschiede wurde die Summe der Pixelwerte der einzelnen Bilder (10-fache Vergrößerung) ausgemessen und die Werte der CTGF- und Phalloidin-Intensität zum quantitativen Abgleich auf die DAPI-Intensität normiert. Die graphische Darstellung der Intensitätsunterschiede erfolgte in GraphPad Prism®.

In Abbildung 18 wurden die Bilder der Immunfluoreszenzfärbungen der nicht resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 zusammengestellt. Es wurde jeweils ein Bild mit CTGF + DAPI, vergleichend dazu ein Bild mit Phalloidin + DAPI und ein Bild mit CTGF + Phalloidin + DAPI Färbung abgebildet. In Abbildung 19 sind in gleicher Systematik die Bilder der Immunfluoreszenzfärbungen der resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 zusammengestellt.

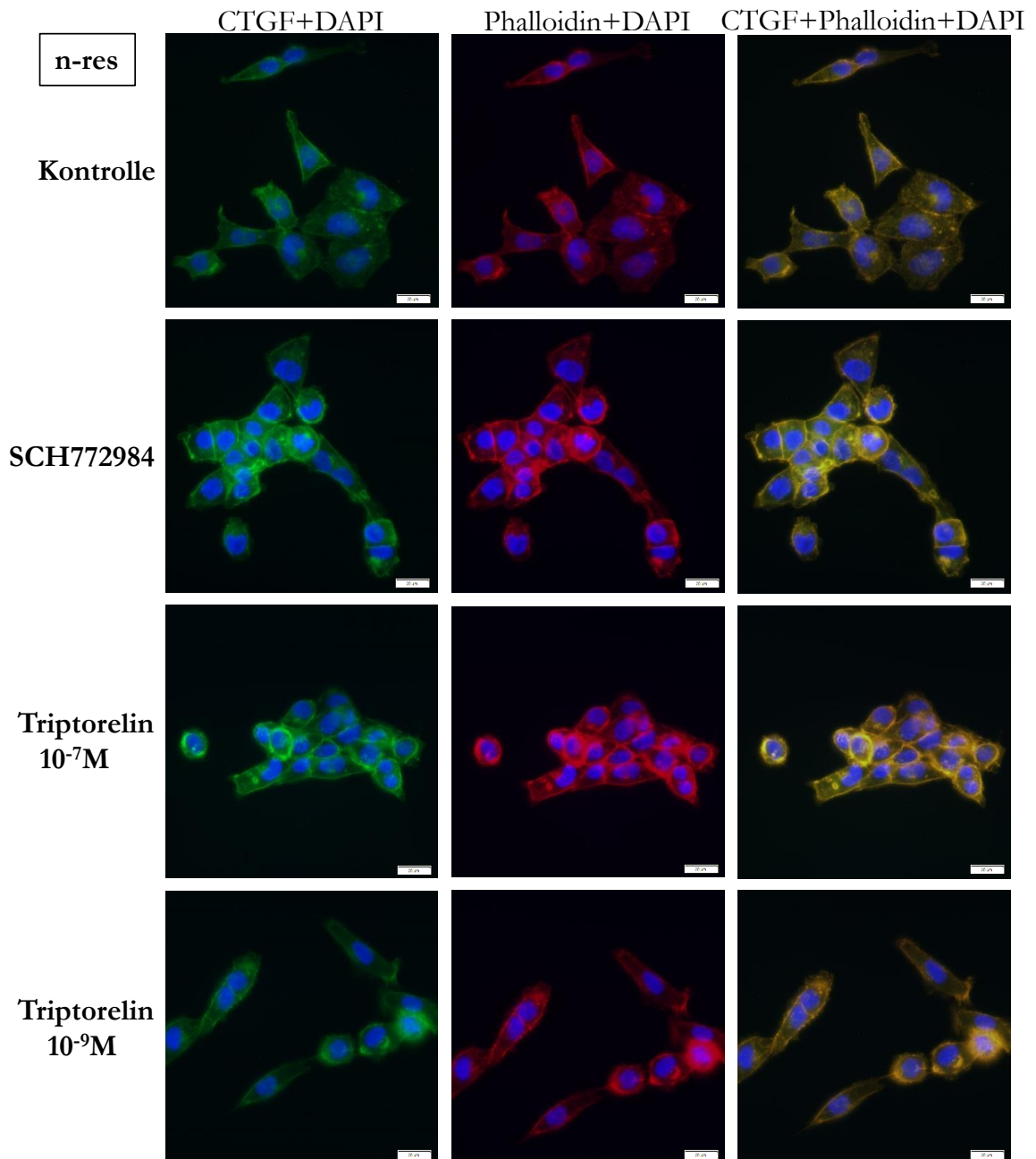


Abbildung 18: Immunfluoreszenz der nicht resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806. Abgebildet sind die Immunfluoreszenzfärbungen mit CTGF, Phalloidin und DAPI der nicht resistenten (n-res) Zellen der Zelllinie HCC1806 nach Behandlung mit dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984 bzw. dem GnRH-Analogon Triptorelin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Kernfärbung durch DAPI stellt sich blau dar, die Färbung von CTGF grün und durch Phalloidin rot. Die Ansicht erfolgte mit 40-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop und mittels Färbefilter, der Messbalken zeigt 20 μm .

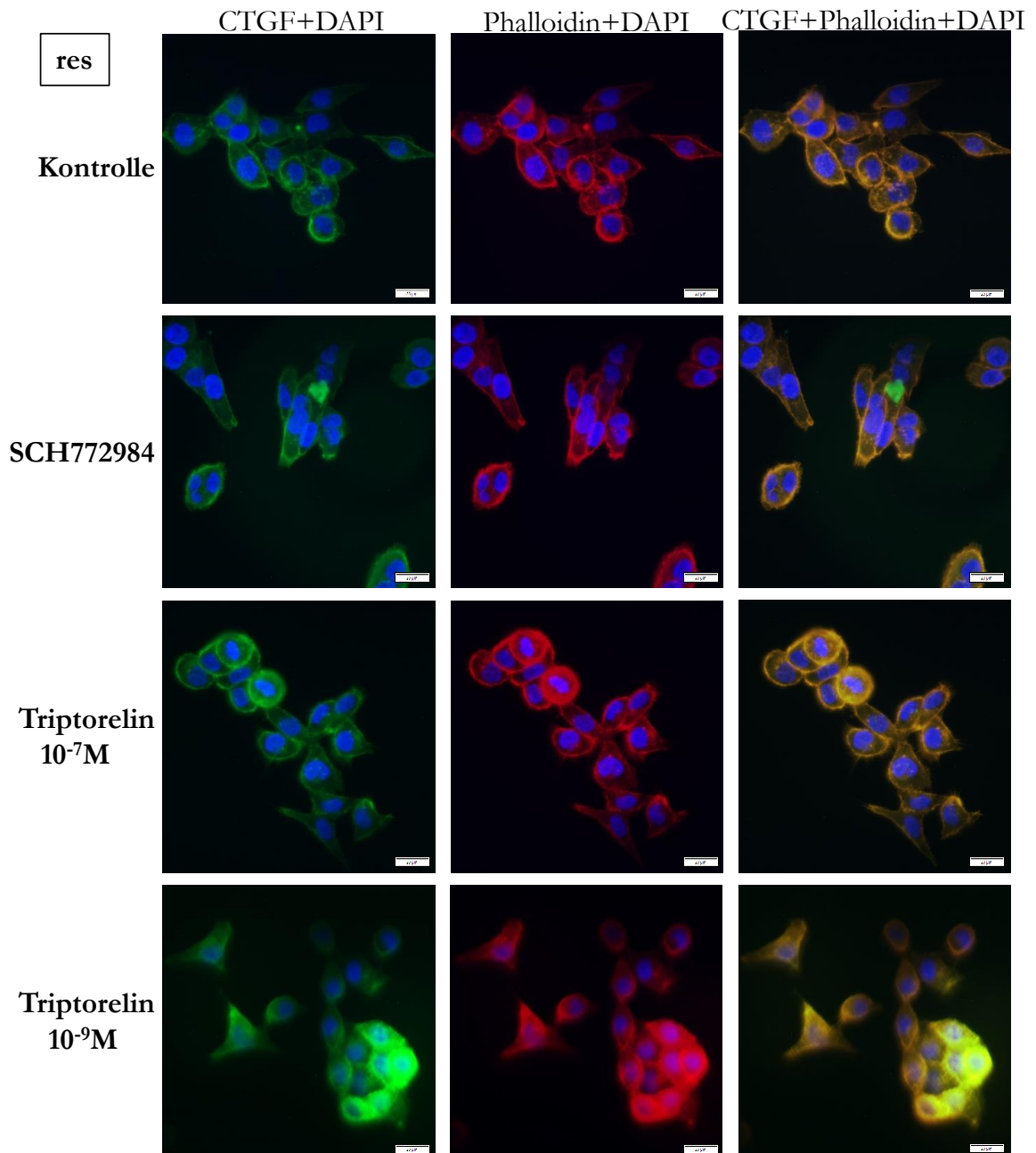


Abbildung 19: Immunfluoreszenz der resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806. Abgebildet sind die Immunfluoreszenzfärbungen mit CTGF, Phalloidin und DAPI der resistenten (res) Zellen der Zelllinie HCC1806 nach Behandlung mit dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984 bzw. dem GnRH-Analogen Triptorelin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Kernfärbung durch DAPI stellt sich blau dar, die Färbung von CTGF grün und durch Phalloidin rot. Die Ansicht erfolgte mit 40-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop und mittels Färbefilter, der Messbalken zeigt 20 μm .

Die Abbildung 20 dient zur graphischen Darstellung der Intensitätsunterschiede von CTGF in den nicht resistenten und resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806. Die CTGF-Werte aus

einem Versuch wurden mittels ImageJ Helligkeitsmessung gemessen und auf die DAPI Messwerte normiert.

Im Vergleich zur nicht resistenten Kontrolle wurde bei den nicht resistenten Zellen, welche mit dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984 behandelt wurden, vermindert CTGF angefärbt. Ebenso wurde bei den nicht resistenten mit Triptorelin 10^{-7}M sowie 10^{-9}M behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle eher etwas weniger CTGF angefärbt.

Allgemein wurde bei den resistenten Kontrollzellen im Vergleich zu den nicht resistenten Kontrollzellen weniger CTGF angefärbt. Innerhalb der resistenten Zelllinie ist bei den mit Triptorelin 10^{-7}M bzw. 10^{-9}M behandelten resistenten Zellen im Vergleich zur resistenten Kontrolle mehr CTGF detektiert worden. Nach SCH772984-Behandlung ist bei den resistenten Zellen vergleichend zu den resistenten unbehandelten Kontrollzellen kein großer Unterschied der Phalloidin-Intensität beobachtbar.

Die Intensitätsunterschiede von Phalloidin in den nicht resistenten und resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 wurden in Abbildung 20 zur Veranschaulichung graphisch dargestellt. Die Phalloidin-Werte aus einem Versuch wurden dazu mittels ImageJ Helligkeitsmessung gemessen und auf die DAPI-Messwerte normiert.

In der Zelllinie HCC1806 wurde im Vergleich zur nicht resistenten unbehandelten Kontrolle bei den nicht resistenten mit SCH772984 behandelten Zellen vermindert Phalloidin angefärbt. Ebenso war nach einer Behandlung der nicht resistenten Zellen mit Triptorelin 10^{-7}M eher etwas weniger Phalloidin detektiert worden, wobei nach einer Behandlung mit Triptorelin 10^{-9}M sogar wesentlich weniger Phalloidin detektiert worden war. Bei den resistenten Zellen war im Vergleich zu den nicht resistenten Kontrollzellen die Phalloidin-Intensität weniger intensiv. Innerhalb der resistenten Zelllinie wurde bei den mit dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984 behandelten Zellen und auch bei den Zellen, welche mit dem GnRH-Analogon Triptorelin 10^{-7}M bzw. 10^{-9}M behandelten wurden, weniger Phalloidin detektiert.

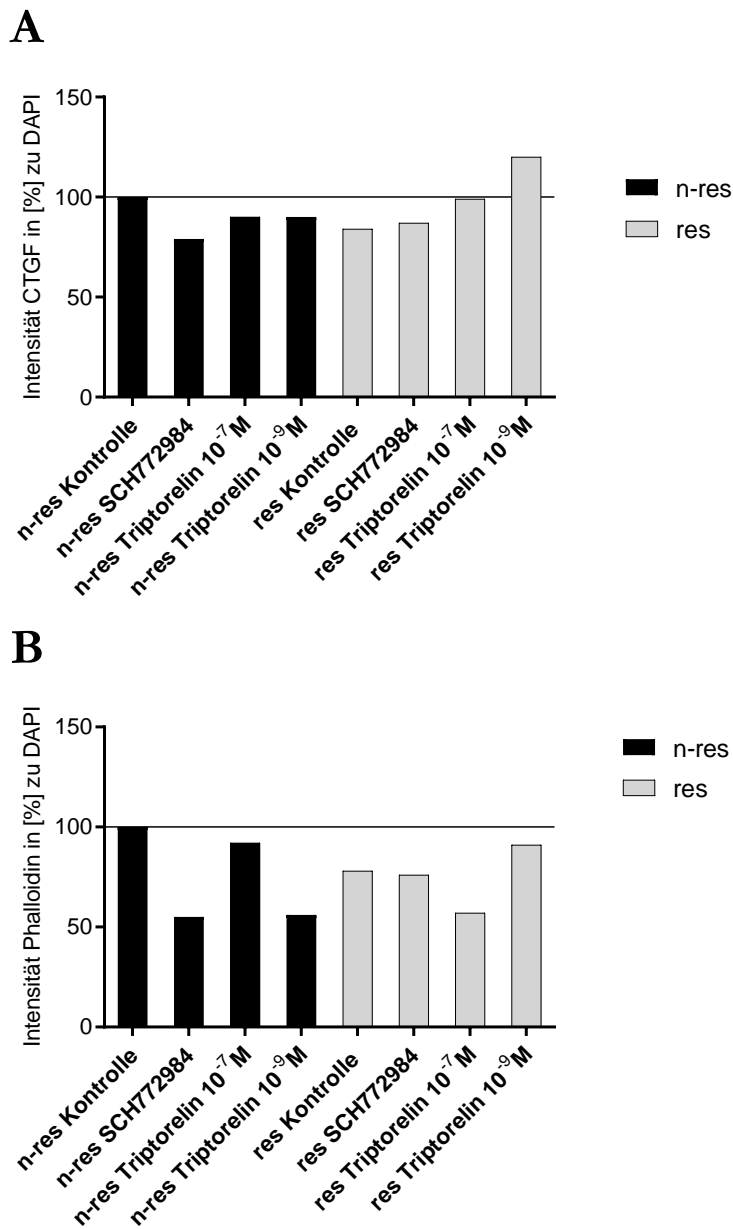


Abbildung 20: Intensität von CTGF und Phalloidin in nicht resistenten und resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806.

A: Dargestellt ist die Intensität von CTGF in [%] in den resistenten (res) Zellen und nicht resistenten (n-res) Zellen der Zelllinie HCC1806 im Vergleich zur unbehandelten n-res Kontrolle aus einem Versuch. Zum quantitativen Abgleich wurden die Werte auf die Intensität von DAPI normiert.

B: Dargestellt ist die Intensität von Phalloidin in [%] in den resistenten (res) Zellen und nicht resistenten (n-res) Zellen der Zelllinie HCC1806 im Vergleich zur unbehandelten n-res Kontrolle aus einem Versuch. Zum quantitativen Abgleich wurden die Werte auf die Intensität von DAPI normiert.

4 Diskussion

Der *mitogen-activated protein kinase*- (MAPK-)Weg ist sehr bedeutend für die Tumorthherapie, da er der am meisten mutierte Signalweg in humanen Tumoren ist. Der Signalweg reguliert Zellwachstum, Differenzierung und Hemmung der Apoptose (Liu et al. 2018). In Tumoren wird durch eine durchgehende Aktivierung dieses RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweges das Wachstum der Tumorzellen gefördert. Zudem sind beim TNBC durch die fehlende Expression des Östrogen- und Progesteronrezeptors sowie keiner Überexpression von HER2 die Therapieoptionen stark eingeschränkt. 10 – 15 % aller Brustkrebsarten sind TNBC, was die große Bedeutung der MAPK-Kaskade und von möglichen Therapieansätzen in dieser verdeutlicht (Kim et al. 2006; Bauer et al. 2007).

Bis dato bezogen sich mögliche Therapien in dieser Signalkaskade hauptsächlich auf die Inhibition von RAF und MEK. Die bisherige Annahme war, dass eine Inhibition von ERK1/2 als nachgeschaltete Kinase keinen zusätzlichen Nutzen bringe. Allerdings treten immer mehr Resistenzen der Proteinkinasen RAF und MEK auf, sodass immer mehr ERK1/2 auch in den Fokus als mögliche Therapieoption rückt (Samatar und Poulikakos 2014). Allerdings sind die Folgen einer möglichen ERK1/2-Resistenz in TNBC-Zellen bisweilen nicht bekannt und es fehlen mögliche Therapieansätze, die bei einer gebildeten Resistenz zum Einsatz kommen könnten.

Daher wurde in dieser Arbeit die Auswirkung zweier ERK1/2-Inhibitoren auf das Zellwachstum und die 3D-Sphäroid-Invasion in TNBC-Zelllinien untersucht. Für die Versuche mit TNBC-Zellen wurden hierzu die Zelllinien HCC1806 und HCC70 herangezogen. Lehmann et al. (2011) und Liu et al. (2019) konnten aufzeigen, dass diese beiden Zelllinien dem TNBC Subtyp ähneln und sich als gutes Modell für Versuche eignen. Des Weiteren wurde eine ERK1/2-resistente Zelllinie generiert und als mögliche Therapieoption die Behandlung dieser resistenten Zellen mit einem GnRH-Analogon analysiert. Zuletzt wurde die Korrelation der CTGF-Expression bei ERK1/2-resistenten Zellen im Vergleich zu nicht resistenten Zellen dargestellt.

4.1 Inhibition von ERK1/2

Zu Beginn wurde der Effekt der ERK1/2-Inhibitoren auf die Proteinexpression von TNBC-Zellen mittels Western Blot analysiert (siehe 2.2.2.5). Dazu wurden die Zelllinien HCC1806 und HCC70 mit der LD₅₀ von den ERK1/2-Inhibitoren SCH772984 und Ulixertinib behandelt, welche durch einen LD₅₀-Viabilitätstest ermittelt wurde (siehe 2.2.1.5).

4.1.1 SCH772984 reduziert die pERK1/2-Expression

Es konnte wie erwartet eine signifikante Abnahme der pERK1/2-Expression sowie dem Verhältnis von pERK1/2 zu ERK1/2 in beiden Zelllinien durch die Behandlung mit SCH772984 aufgezeigt werden, während auf die ERK1/2-Expression kein Einfluss nachgewiesen wurde. SCH772984 hemmt die Phosphorylierung von ERK1/2 und von ihrem Substrat der p90-ribosomalen-S6-Kinase (RSK). Auch hemmt SCH772984 die Phosphorylierung von Bestandteilen in der eigenen Aktivierungsschleife. Dadurch inhibiert der ERK1/2-Inhibitor die weitere MAPK-Signalübertragung und folglich die Zellproliferation in Tumorzellen (Morris et al. 2013). Zudem gehen Morris et al. (2013) davon aus, dass der ERK1/2-Inhibitor SCH772984 ERK1/2 in einer stabilen Konformation hält, so dass keine Phosphorylierung durch MEK oder RAF möglich ist. SCH772984 nimmt wie beschrieben keinen direkten Einfluss auf die Expression von ERK1/2, was die Ergebnisse im Versuch bestätigen.

4.1.2 Ulixertinib reduziert die pERK1/2-Expression nicht

Durch die Behandlung mit Ulixertinib konnte eine signifikante Erhöhung der pERK-Expression in der Zelllinie HCC1806 analysiert werden, allerdings kein signifikanter Effekt auf die ERK1/2-Expression. In der Zelllinie HCC70 konnte kein signifikanter Effekt auf pERK aufgezeigt werden, hingegen aber eine signifikante Abnahme der ERK1/2-Expression. Das Expressionsverhältnis von pERK1/2 zu ERK1/2 zeigte nach Ulixertinib-Behandlung in beiden Zelllinien keine signifikanten Unterschiede. Ulixertinib hemmt ebenso wie SCH772984 die Phosphorylierung von ERK1/2 und die Phosphorylierung der RSK (Ward et al. 2015). Der ERK1/2-Inhibitor wird in mehreren Studien in Phase 1/2 untersucht, wie z. B. in der klinischen Studie NCT01781429 bei Patienten mit fortgeschrittenen Malignomen (Sullivan et al. 2018). Da in beiden Zelllinien der ERK1/2-Inhibitor Ulixertinib nicht die erwartete Verminderung von pERK1/2 bewirkt, lässt dieses vermuten, dass es möglicherweise über eine Aktivierung alternativer Wege und Signalkaskaden zu einer Phosphorylierung von ERK1/2 und dadurch zu einer nicht verminderten oder gar erhöhten pERK1/2-Expression kommt. Zu den selben Ergebnissen, dass Ulixertinib zu einer erhöhten Expression von pERK1/2 führt, kamen Germann et al. 2017: Sie konnten zeigen, dass Ulixertinib trotz erhöhter Phosphorylierung von ERK1/2 die Phosphorylierung von Zielsubstraten hemmt und somit vielversprechend für die Therapie von MAPK-mutierten Krebserkrankungen ist. Unabhängig von ihrem Grad der ERK1/2-Phosphorylierung wird ihr Substrat RSK durch die Inhibitoren Ulixertinib und auch

SCH772984 gehemmt. Dass eine signifikante Abnahme der ERK1/2-Expression in der Zelllinie HCC70 durch Ulixertinib beobachtet werden konnte, lässt die Vermutung aufkommen, dass es doch zu einer Beeinflussung von ERK1/2 kommen könnte – entweder direkt oder beispielsweise über Rückkopplungsmechanismen. Die unterschiedlichen Ergebnisse verdeutlichen zudem, dass auch das zelllinienspezifische Verhalten von HCC70 und HCC1806 als zwei Vertreter der eher heterogenen TNBC gegenüber den Inhibitoren vermutlich eine Rolle spielt.

4.1.3 ERK1/2-Inhibitoren reduzieren die 3D-Sphäroid-Invasion in TNBC-Zellen

Im Weiteren wurde der Effekt der ERK1/2-Inhibitoren auf die 3D-Sphäroid-Invasion untersucht. Dazu wurden 3D-Sphäroid-Invasionsassays nach Vinci durchgeführt (siehe 2.2.1.4, Vinci et al. 2015).

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit dargelegt werden, dass die Behandlung mit den ERK1/2-Inhibitoren SCH772984 sowie Ulixertinib in den 3D-Sphäroiden beider TNBC-Zelllinien zu einem signifikant verminderten Flächenwachstum führt. Solch ein hemmender Einfluss auf das Tumorstadium durch einen ERK1/2-Inhibitor wurde bereits von Ahronian et al. (2015) in menschlichen Xenotransplantations-Modellen in BRAF- und RAS-mutierten kolorektalen Krebszellen aufgezeigt (Sullivan et al. 2018). Dies konnte somit in den Versuchen zu dieser Arbeit mit TNBC 3D-Sphäroiden bestätigt werden. Die 3D-Sphäroid-Invasionsassays eignen sich gut für Versuche zur Invasion von Tumorzellen, da durch die 3D-Struktur eine Tumormikroregion bzw. eine Tumormetastase mit viel getreuerer Morphologie nachgeahmt werden kann – im Gegensatz zu der flachen Morphologie auf einer festen Membran in 2D-Modellen. Vorteilhaft ist ebenfalls, dass der Invasionsassay direkt in derselben Platte durchgeführt werden kann (Vinci et al. 2015).

4.2 Resistente TNBC-Zelllinie

Um den Effekt von einer ERK1/2-Resistenz auf das Zellwachstum und die Invasivität von TNBC-Zellen im Rahmen dieser Arbeit analysieren zu können, musste mindestens eine ERK1/2-resistente Zelllinie generiert werden. Diese wurde durch einen LD₅₀-Vibilitätstest mittels AlamarBlue (siehe 2.2.1.5) nachgewiesen.

Für die Zelllinie HCC1806 gelang es weniger empfindliche Zellen gegenüber dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984 innerhalb von vier Monaten zu generieren (siehe 3.3, Abbildung 9). Erfolgreiche Resistenzversuche mit diesem ERK1/2-Inhibitor konnten von Jha et al. (2016)

bereits in kolorektalen Karzinomzellen beschrieben werden. Daher ist davon auszugehen, dass bei einem längeren Zeitraum der Resistenzversuche nicht nur weniger sensible Zellen, sondern resistente Zellen der Zelllinie HCC1806 gegenüber dem ERK1/2-Inhibitor generierbar wären. Im Weiteren werden die generierten, weniger sensiblen Zellen gegenüber SCH772984 zur Vereinfachung als resistente Zellen benannt. Diese resistenten Zellen wurden im Vergleich zu nicht resistenten Zellen dieser Zelllinie für die weiteren Versuche in der Arbeit genutzt. Jha et al. (2016) konnten in ihren Resistenzversuchen gegenüber SCH772984 aufzeigen, dass die Resistenz auf einer Mutation von Glycin zu Asparaginsäure im Asparaginsäure-Phenylalanin-Glycin-Motiv (auch DFG-Motiv) von ERK1/2 beruht. Die spezifische Bindung von SCH772984 an ERK1/2 wird so verhindert. Weiter konnte dargelegt werden, dass die Mutation die von SCH772984 gehaltene stabile Konformation von ERK1/2 beeinflusst und die Interaktion zwischen MEK und ERK1/2 wieder ermöglicht. Dadurch kann ERK1/2 durch MEK phosphoryliert werden und es kommt zu einer Reaktivierung der ERK-MAPK-Signalkaskade (Jha et al. 2016). Durch Jaiswal et al. (2018) konnten in ERK1/2-Inhibitor-resistenten Zellen verschiedener Zelllinien, u. a. Zelllinien vom kolorektalen Karzinom und Pankreaskarzinom, weitere spezifische ERK1/2-Mutationen identifiziert werden, die zu einer ERK1/2-Resistenz führen.

In der Zelllinie HCC70 konnten keine weiteren Versuche zur Generierung einer Resistenz gegenüber SCH772984 erfolgen, da sich die Zellen bei weiteren Dosisgaben letal zeigten. Grund dafür könnte eine erhöhte Anfälligkeit der Zelllinie HCC70 im Vergleich zur Zelllinie HCC1806 für Stress durch die weiteren Dosisgaben in der Zellkulturflasche sein. Dafür spräche auch, dass in dieser Zelllinie gegenüber dem ERK1/2-Inhibitor Ulixertinib ebenfalls keine Resistenz generiert werden konnte. Allerdings zeigten sich die Zellen bei den Versuchen weiterhin lebensfähig. Gegenüber dem ERK1/2-Inhibitor Ulixertinib konnten hingegen auch in der Zelllinie HCC1806 keine resistenten Zellen innerhalb von vier Monaten generiert werden. Die Ergebnisse zeigen somit vielmehr die nicht generierbare Resistenz gegenüber Ulixertinib in beiden Zelllinien im Vergleich zur möglichen Generierung der Resistenz gegenüber SCH772984 auf. Auch Germann et al. (2017) konnten in Resistenzversuchen gegenüber Ulixertinib nur schwer resistente Zellen generieren. Sie wiesen nach, dass sich die Resistenzentstehung gegen diesen ERK1/2-Inhibitor im Vergleich zur Resistenzentstehung gegenüber RAF- oder MEK-Inhibitoren verzögert zeigte. Diese Erkenntnisse sprechen für den potenziellen Nutzen dieses ERK1/2-Inhibitors im klinischen Alltag, da es scheint, dass Resistenzen gegen Ulixertinib schwerer entstehen.

4.3 Auswirkungen einer ERK1/2-Resistenz und GnRH-Behandlung

GnRH-Agonisten sind für die Behandlung von prämenopausalen Frauen mit ER-positivem Brustkrebs zur Therapie zugelassen (siehe 1.1.3, Emons et al. 2003). Wie bereits aufgezeigt exprimieren aber auch über 70 % der TNBC GnRH-Rezeptoren (Buchholz et al. 2009; Föst et al. 2011). GnRH hat in Mammakarzinomen einen entscheidenden Einfluss auf das Zellwachstum und die Metastasierung. Somit kann die Behandlung mit GnRH-Analoga auch bei TNBC einen wichtigen therapeutischen Ansatz bieten (Gründker und Emons 2017).

Es konnte bereits aufgezeigt werden, dass der GnRH-Rezeptor an ein G-Protein bindet und so die Phosphotyrosin Phosphatase (PTP) aktiviert, welche den Wachstumsfaktor-Rezeptor dephosphoryliert (Gründker et al. 2001). Eine durch den Wachstumsfaktor-Rezeptor ausgelöste Signalkaskade, wie z. B. der ERK-MAPK-Transduktionsweg, kann so herunterreguliert werden (Dondi et al. 1994). Als mögliche Therapieoption bei einer ERK1/2-Resistenz wurde daher in dieser Arbeit der Effekt einer GnRH-Behandlung auf die Expression von ERK1/2 und pERK1/2 in resistenten Zellen im Vergleich zu nicht resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 untersucht. Dazu wurden die Zellen mit der LD₅₀ von SCH772984 und Triptorelin behandelt und die Proteinexpression mittels Western Blot nachgewiesen (siehe 2.2.2.5).

4.3.1 ERK1/2-resistente Zellen exprimieren weniger pERK1/2

Im Rahmen dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass bei einer ERK1/2-Resistenz tendenziell weniger pERK1/2 in den HCC1806-Zellen exprimiert wird als in den nicht resistenten Zellen. Wie in Kapitel 4.2 beschrieben wiesen Jha et al. (2016) nach, dass es durch eine ERK1/2-Resistenz zu einer Wiederherstellung der Interaktion zwischen MEK und ERK1/2 kommt. Daraus folgt eine erneute Phosphorylierung von ERK1/2, wie analysiert werden konnte allerdings in einem niedrigeren Gesamtniveau im Vergleich zu nicht resistenten Zellen. Das Resultat der Versuche über den tendenziellen Unterschied der pERK1/2-Expression zwischen den resistenten und den nicht resistenten Zellen in dieser Arbeit entspricht somit den bereits 2016 beschriebenen Beobachtungen.

4.3.2 SCH772984 reduziert die pERK1/2-Expression in ERK1/2-resistenten Zellen

Es zeigte sich, dass der ERK1/2-Inhibitor SCH772984 die pERK1/2-Expression signifikant in den nicht resistenten Zellen und etwas geringer auch in den resistenten Zellen vermindert. Zu den selben Ergebnissen, dass SCH772984 auch in den auf SCH772984 resistenten Zellen

eine Downregulation von pERK1/2 induziert, kamen Iezzi et al. (2018). Sie generierten erfolgreich resistente nicht-kleinzellige Bronchialkarzinomzellen gegenüber SCH772984. In ihren Versuchen konnten sie aufzeigen, dass die maximale Aktivität der Downregulation nach sechs Stunden zu beobachten ist und es nach 24 Stunden zu einem Wiederauftreten von pERK1/2 kommt. Dies sei beweisend, dass der ERK1/2-Inhibitor das Ziel in seinen Zellen effizient erreicht. In dieser Arbeit erfolgte in den Versuchen die Proteinisolierung 24 Stunden nach Behandlung. Somit könnte ein Grund für die signifikant verminderte pERK1/2-Expression durch SCH772984 in den ERK1/2-resistenten Zellen ein zeitabhängiges Wiederauftreten von pERK1/2 sein, welches dann erneut durch den ERK1/2-Inhibitor beeinflusst und gehemmt wird.

Iezzi et al. (2018) konnten zudem darlegen, dass es in nicht resistenten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen zu einer verminderten Phosphorylierung der nachgeschalteten RSK kommt. Folglich führt dies zu einer ebenfalls verminderten durch die RSK vermittelte Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 (rpS6). Die auf SCH772984 resistenten Zellen zeigten in ihren Versuchen hingegen keine Downregulation der RSK. Dies spräche dafür, dass diese nachgeschaltete Kinase keine Beteiligung an der Entstehung von Resistenzmechanismen hat. In Versuchen von Gao et al. (2019) mit auf MEK-Inhibitor generierten resistenten Melanomzellen hingegen konnte eine Beteiligung von RSK am Resistenzmechanismus aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass unterschiedlicher zellulärer Kontext auch verschiedene molekulare Veränderungen bezwecken kann (Iezzi et al. 2018).

Interessanterweise konnte aber auch eine Kreuzresistenz der beiden ERK1/2- und MEK-resistenten Zelllinien der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen untereinander gegen den jeweils anderen Inhibitor beobachtet werden. Dieses Ergebnis lasse sich laut Iezzi et al. (2018) durch die ähnliche Modulation der nachgeschalteten RSK sowie der rpS6 erklären. Daher sollte in weiteren Studien untersucht werden, inwieweit die nachgeschalteten Substrate an der Resistenzentstehung beteiligt sind.

4.3.3 Triptorelin hat keinen signifikanten Einfluss auf die pERK1/2-Expression in ERK1/2-resistenten Zellen

In den nicht resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 führte die Behandlung mit Triptorelin 10^{-7}M zu einer signifikanten Minderung der pERK1/2-Expression. Wie vorher beschrieben, inhibiert das GnRH-Analogon Triptorelin die Aktivierung der ERK-MAPK-Signalkaskade. Dadurch fehlt die Signalüberleitung entlang der Kaskade, sodass ERK1/2 nicht

phosphoryliert wird. Die Behandlung der nicht resistenten Zellen mit Triptorelin 10^{-9}M zeigte keine signifikante Veränderung. Eine mögliche Erklärung könnte die geringere Konzentration von Triptorelin sein. Die Abhängigkeit der Effekte von der Triptorelinkonzentration sollte in weiteren Versuchen abgeklärt werden.

In den resistenten Zellen konnte kein signifikanter Einfluss auf pERK1/2 durch eine Behandlung mit Triptorelin 10^{-7}M oder Triptorelin 10^{-9}M beobachtet werden. Die Behandlung mit Triptorelin 10^{-9}M zeigte tendenziell aber eher eine erhöhte pERK1/2-Expression auf. Durch die Resistenzentwicklung kommt es zu einer wieder möglichen Phosphorylierung von ERK1/2 durch MEK. Da Triptorelin die EGF-induzierte Aktivierung der ERK-MAPK-Kaskade hemmt, scheint es bei einer ERK1/2-Resistenz zu einer anderen Signalgebung durch Parallelkaskaden zu kommen, die die Phosphorylierung von ERK1/2 aktivieren. Die parallele Signalkaskade Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (AKT)/*mechanistic target of Rapamycin* (mTOR) ist ebenso wie der ERK-MAPK-Signalweg an Zellproliferation, Invasion, Migration und Apoptose beteiligt. Beide Signalwege können durch das G-Protein RAS aktiviert werden (zitiert nach Miricescu et al. 2020). Auch haben beide Wege die RSK als Zielsubstrat (Ruvinsky und Meyuhas 2006). Das G-Protein RAS, die RSK und das durch sie phosphorylierte rpS6 stellen somit überschneidende Strukturen der beiden Signalwege dar (Gao et al. 2019). Es konnte bereits aufgezeigt werden, dass die hauptsächlich durch die ERK-MAPK-Kaskade vermittelte rpS6-Phosphorylierung in RAF- und MEK-resistenten Melanomzellen durch die p70 ribosomale S6-Kinase (p70S6K) des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs übernommen wird (Gao et al. 2019). Die rpS6 nimmt Einfluss auf die Regulierung der Zellgröße und der Zellproliferation (Ruvinsky und Meyuhas 2006). Daher scheint es potenziell möglich zu sein, dass ERK1/2 bzw. dessen Aktivierung durch MEK in ERK1/2-resistenten Zellen über die p70S6K vermittelte rpS6-Aktivierung durch Rückkopplungsschleifen beeinflusst wird.

Allgemein konnte auch ein umfangreicher *crossstalk* zwischen den Netzwerken der beiden Signalwege registriert werden (Fruman und Rommel 2014). Vor allem auf dem Level von RAF in der ERK-MAPK-Kaskade und AKT im PI3K/AKT/mTOR-Signalweg konnte dies beobachtet werden (Zimmermann und Moelling 1999). Daher scheint es auch möglich zu sein, dass Signalweg übergreifender *crossstalk* die ERK1/2-Resistenzmechanismen mit beeinflusst und für eine erneute Aktivierung von ERK1/2 sorgt. So könnte es durch *crossstalk* auf der RAF-Ebene zu einer Aktivierung der ERK-MAPK-Kaskade ab dem Level von RAF kommen und folglich zu einer von Triptorelin unbeeinflussten Aktivierung der nachgeschalteten Kinasen.

In den nicht resistenten sowie den resistenten Zellen, die mit SCH772984 oder Triptorelin behandelt wurden, wiesen die ERK1/2-Expression und das Expressionsverhältnis von pERK1/2 zu ERK1/2 keine signifikanten Unterschiede auf. Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, hemmt SCH772984 die Phosphorylierung von ERK1/2 und nimmt keinen direkten Einfluss auf die ERK1/2-Expression. In der graphischen Darstellung zeigte sich bei den resistenten Zellen, im Vergleich zu den nicht resistenten Zellen, ein Trend zur Erhöhung der ERK1/2-Expression nach Behandlung mit Triptorelin 10^{-7} M bzw. 10^{-9} M. Da Triptorelin nicht den erwarteten senkenden Effekt auf die ERK1/2- sowie die pERK1/2-Expression zeigt, würde dies für die vorherige These sprechen, dass die Aktivierung von ERK1/2 bei einer ERK1/2-Resistenz über Rückkopplungsschleifen durch die p70S6K-vermittelte rpS6-Aktivierung oder über *crossstalk* der Signalwege beeinflusst wird.

4.3.4 ERK1/2-Resistenz führt zur gesteigerten 3D-Sphäroid-Invasion

Der Effekt einer GnRH-Behandlung mit Triptorelin wurde ebenfalls in 3D-Sphäroid-Modellen analysiert. Dazu wurden die resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 (siehe 3.3, Abbildung 9) und im Vergleich dazu nicht resistente Zellen der Zelllinie HCC1806 genutzt. Die Durchführung der 3D-Sphäroid-Invasionsassays erfolgte nach Vinci et al. (2015, siehe 2.2.1.4).

Es konnte bei den unbehandelten resistenten 3D-Sphäroiden ein signifikant erhöhtes Flächenwachstum im Vergleich zu den nicht resistenten 3D-Sphäroiden der Zelllinie HCC1806 analysiert werden. Diese Ergebnisse bestätigen die aufgestellte Hypothese, dass eine ERK1/2-Resistenz zu einer gesteigerten 3D-Sphäroid-Invasion führt.

4.3.5 SCH772984 reduziert die 3D-Sphäroid-Invasion von ERK1/2-resistenten Zellen

Der ERK1/2-Inhibitor SCH772984 zeigte in den nicht resistenten, aber auch in den resistenten 3D-Sphäroiden einen vermindernden Einfluss auf das Flächenwachstum. Dass SCH772984 das Flächenwachstum der nicht resistenten Sphäroide vermindert, zeigt die funktionierende wachstumshemmende Wirkung dieses Inhibitors auf. Erwartet war allerdings, dass der Inhibitor keinen oder kaum Einfluss auf die resistenten Zellen hat. Dies könnte einerseits aufzeigen, dass die genutzten resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 noch nicht vollständig resistent gegenüber dem ERK1/2-Inhibitor sind, sondern eben nur weniger empfindlicher reagieren. Andererseits könnte es daran liegen, wie bereits durch Iezzi et al. (2018) beschrieben, dass es nach 24 Stunden zu einem Wiederauftreten von pERK1/2

und somit zu einer erneuten Aktivierung der Zielsubstrate von ERK1/2 kommt. Die Messung des Sphäroidwachstums erfolgte nach 48 Stunden im Vergleich zum Zeitpunkt Null vor Zugabe des Inhibitors. Durch das zeitabhängige Wiederauftreten von pERK1/2 könnte SCH772984 die Phosphorylierung von ERK1/2 erneut beeinflusst und folglich zum verminderten Flächenwachstum der resistenten Zellen geführt haben.

4.3.6 Triptorelin hat keinen signifikanten Einfluss auf die 3D-Sphäroid-Invasion von ERK1/2-resistenten Zellen

Durch die Behandlung mit Triptorelin konnte in den resistenten 3D-Sphäroiden der Zelllinie HCC1806 kein signifikanter Einfluss auf das Flächenwachstum und die Invasivität ermittelt werden. Diese Erkenntnis spricht wiederum für die in Abschnitt 4.3.3 erläuterte mögliche Erklärung, dass die ERK1/2-Phosphorylierung in ERK1/2-resistenten Zellen durch Rückkopplungsschleifen gemeinsamer Zielsubstrate mit parallelen Signalwegen beeinflusst werden kann. Oder auch, wie bereits beschrieben, über weitere Verbindungen der Netzwerke der beiden Signalwege über *crossstalk* (Fruman und Rommel 2014). Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ist ebenso an der Regulierung der Zellinvasion beteiligt (zitiert nach Miricescu et al. 2020). Daher könnte auch eine mögliche Erklärung sein, dass umfangreicher *crossstalk* zwischen der ERK-MAPK-Kaskade und dem PI3K/AKT/mTOR-Signalweg die erneute Aktivierung von ERK1/2 und somit die Invasivität in ERK1/2-resistenten Zellen beeinflusst. Auch könnte der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg die Invasivität durch eigene Signale direkt beeinflussen. Bei der Resistenzentstehung gegenüber MEK-Inhibitoren konnte durch Won et al. (2012) bereits beobachtet werden, dass es über Signalisierung in Feedbackschleifen zur Aktivierung von parallelen Signalwegen, wie dem PI3K/AKT/mTOR-Signalweg kommt.

Einzig in den nicht resistenten Sphäroiden führte eine Behandlung mit Triptorelin 10^{-9} M zu einem erhöhten Flächenwachstum im Vergleich zu den unbehandelten nicht resistenten Sphäroiden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Invasion in Mammakarzinomzellen durch GnRH-Analoga *in vitro* (von Alten et al. 2006) und *in vivo* (Schubert et al. 2011) reduziert werden kann. Daher stellt sich die Frage, warum in den nicht resistenten Sphäroiden kein signifikanter vermindernder Effekt auf das Flächenwachstum analysiert werden konnte, sondern sogar ein erhöhtes Flächenwachstum. Eine mögliche Erklärung wäre, dass es durch Hemmung der ERK-MAPK-Kaskade durch Triptorelin zur vermehrten Aktivierung von parallelen Wegen, wie des bereits erläuterten PI3K/AKT/mTOR-Signalweges, kommt. Möglich wäre dies beispielsweise durch das gemeinsame Zielsubstrat

RSK (Ruvinsky und Meyuhas 2006). Bei Verminderung der RSK durch Hemmung der ERK-MAPK-Kaskade könnte die Signalgebung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs über Rückkopplungsschleifen verstärkt und so die Zellinvasion erhöht werden.

Eine weitere Möglichkeit wäre auch, dass die Auswertung der 3D-Sphäroide nicht ganz ideal ist. Wie schon in Kapitel 4.1.3 beschrieben, können die 3D-Sphäroide die Morphologie einer Tumormikroregion getreuer nachahmen, im Vergleich zu Versuchen auf flachen Membranen (Vinci et al. 2015). Die Bildanalyse der Sphäroide erfolgte manuell mit einem inversen Lichtmikroskop und einer Bildbearbeitungssoftware. Da die Sphäroide jedoch selten gleichmäßig in alle drei Dimensionen wachsen, fehlt die Betrachtung der dritten Dimension in der eher zweidimensionalen Auswertung des Flächenwachstums. Des Weiteren konnte in der Auswertung nicht zwischen letalen und vitalen Zellen unterschieden werden. Mögliche letale Zellen durch die Behandlung wurden somit in die Ausmessung der Fläche der Sphäroide mit einberechnet.

Maritan et al. (2017) konnten in ihrem Protokoll zu 3D-Sphäroid-Versuchen beobachten, dass die Sphäroidbildung und die Zell-Zell-Adhäsion stark von der von ihnen genutzten Methylcellulose-Konzentration abhängig sind. Auch zeigten sich zelllinienspezifische Unterschiede. Daher kann die Methode der 3D-Sphäroid-Invasionsassays anfällig für methodische Fehler, wie gering unterschiedliche Mengen Matrigel® oder Medium, sein.

Die Invasion der Sphäroide in das umgebende Matrigel® stellt sich durch Zellaussprossungen, die in das Matrigel® hereinragen, und lose Zellaggregate dar. Die verbundenen Zellen wurden mit in die Flächenberechnung der Sphäroide eingeschlossen. Die einzelnen losen Aggregate hingegen nicht. Invasieren die verschiedenen behandelten Sphäroide unterschiedlich schnell, so könnte es vorkommen, dass durch eine schnellere Invasion entstandene einzelne Aggregate nicht mit in die Auswertung einfließen. Die Auswertung von 3D-Sphäroid-Invasionsassays ist somit vom Anwender abhängig. Alle Sphäroide wurden in den Versuchen zu dieser Arbeit einheitlich mit der gleichen Methodik ausgewertet, daher ist eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse des unterschiedlichen Flächenwachstums der nicht resistenten und der resistenten Sphäroide anzunehmen.

4.3.7 ERK1/2-Resistenz hat keinen Einfluss auf das Zellwachstum

Im Weiteren wurde die Viabilität der 3D-Sphäroide der resistenten und der nicht resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 sowie der Einfluss einer GnRH-Behandlung mit Triptorelin untersucht. Dazu wurden Versuche mit AlamarBlue durchgeführt (siehe 2.2.1.5). Bestimmt

wurde die prozentuale Differenz der AlamarBlue-Reduktion der resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 vergleichend zu den nicht resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806.

Es konnte kein signifikanter Unterschied der Zellproliferation als Ausdruck der Viabilität zwischen resistenten und nicht resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 beobachtet werden. Erwartet wurde, dass die resistenten Zellen neben der erhöhten Invasivität eine erhöhte Zellviabilität durch erhöhtes Zellwachstum aufweisen. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass keine gravierenden Unterschiede der Proliferation und somit der Lebensfähigkeit zwischen den nicht resistenten Zellen und den resistenten Zellen vorzufinden sind. Hellinger et al. (2019) konnten aufzeigen, dass es vermittelt durch eine Verminderung der CTGF- oder CYR61-Expression in nicht resistenten Zellen der TNBC-Zelllinie HCC1806 über eine Dephosphorylierung von ERK1/2 zu einer verminderten 3D-Sphäroid-Invasion kommt – und das unabhängig von einer veränderten Proliferation. Die Ergebnisse der Versuche dieser Arbeit deuten darauf hin, dass auch die gesteigerte 3D-Sphäroid-Invasion bei einer ERK1/2-Resistenz nicht auf eine veränderte Proliferationsrate zurückzuführen ist.

4.3.8 SCH772984 reduziert das Zellwachstum in ERK1/2-resistenten Zellen

Durch die Behandlung der resistenten Sphäroide mit dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984 wurden signifikant weniger viable Zellen nachgewiesen, während bei den nicht resistenten Sphäroiden kein signifikanter Einfluss beobachtet wurde. Morris et al. (2013) konnten bereits aufzeigen, dass SCH772984 sogar in BRAF- und MEK-Inhibitor-resistenten Kolorektalkarzinom- und Melanomzellen die Zellproliferation inhibiert – und das auch in Anwesenheit dieser Inhibitoren. Daher scheint SCH772984 trotz Resistenzentstehung in der ERK-MAPK-Kaskade antiproliferativen Einfluss auf Krebszellen zu haben.

Allerdings ist es schwierig nachzuvollziehen, warum in den nicht resistenten Zellen nicht der erwartete Effekt erzielt wurde. Die Nutzung von AlamarBlue als Test für das Zellwachstum wurde erstmals von Fields und Lancaster 1993 beschrieben. Es konnte von ihnen aufgezeigt werden, dass AlamarBlue nicht toxisch auf die Zellen wirkt, unabhängig von der Inkubationszeit. Jede Zelllinie hat zudem auch eigene Stoffwechseleigenschaften, die als individueller Parameter die Reduktionsrate von AlamarBlue beeinflussen könnten (Nakayama et al. 1997). Laut Bio-Rad kann auch eine erhöhte Zelldichte im *well* zu einer abnehmenden Zellproliferation führen, wodurch AlamarBlue weniger reduziert und detektiert wird. Der fehlende signifikante Effekt durch SCH772984 in den nicht resistenten Zellen könnte durch eine nicht optimale Zelldichte der Sphäroide möglicherweise erklärt werden. Des Weiteren kann nicht kontrolliert werden, inwieweit AlamarBlue ins Innere der

3D-Sphäroide eindringt und ob es gleichmäßig von allen Zellen absorbiert wird oder nur von den außen am Sphäroid liegenden Zellen. Dies sollte in weiteren Versuchen untersucht werden.

4.3.9 Triptorelin hat keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum von ERK1/2-resistenten Zellen

Erwartungsgemäß führte die Behandlung mit Triptorelin 10^{-9} M in den nicht resistenten Sphäroiden zu einer signifikant verminderten Zellviabilität. Durch Triptorelin 10^{-7} M wurde jedoch kein Einfluss auf die nicht resistenten Sphäroide nachgewiesen. Auch in den resistenten Sphäroiden konnte durch Triptorelin 10^{-7} M sowie Triptorelin 10^{-9} M kein Einfluss auf die Zellviabilität beobachtet werden. Dies spricht wiederum dafür, dass es in den resistenten Zellen zu einer alternativen Aktivierung von pERK1/2 kommt. So hätte Triptorelin keinen Einfluss auf die resistenten Kinasen, die Signalgebung der ERK-MAPK-Kaskade sowie die durch sie signalisierte Proliferation. Wie vorher genauer erläutert, könnten bei einer ERK1/2-Resistenz auch Signale über andere Kaskaden, wie beispielsweise des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges für ein durch Triptorelin unbeeinflusstes Zellwachstum sorgen. Beispielsweise kann dies durch den umfangreichen Netzwerk-*crosstalk* der beiden Signalwege geschehen (Fruman und Rommel 2014).

Übereinstimmend mit den Resultaten der vorherigen Western Blot Analyse und der 3D-Sphäroid-Invasionsassays spricht auch dieses Ergebnis dafür, dass Triptorelin zur Therapie bei einer ERK1/2 Resistenz eher nicht geeignet scheint.

4.4 CTGF- und Phalloidin-Expression

In dieser Arbeit wurden die Unterschiede in der Expression von CTGF und Phalloidin in Zellen der auf den ERK1/2-Inhibitor SCH772984 resistenten Zelllinie im Vergleich zu nicht resistenten Zellen mittels Immunfluoreszenz veranschaulicht (siehe 2.2.3). Dazu wurde zur quantitativen Auswertung der Immunfluoreszenz-Bilder die Summe der Pixelwerte aus einem Versuch ausgemessen und die Werte der CTGF-Intensität auf die DAPI-Intensität normiert und graphisch dargestellt. Zur Analyse der CTGF-Expression sind Western Blots vorgesehen gewesen. Jedoch waren die Antikörper auf den Blots unzureichend detektierbar. Um den Aspekt der CTGF-Expression in dieser Arbeit darstellen zu können, wurde daher die Durchführung eines Immunfluoreszenz-Experimentes vorgenommen. Für signifikante Resultate müssen weitere Experimente vorgenommen werden.

CTGF führt über ERK1/2 in der ERK-MAPK-Signalkaskade zu einer gesteigerten S100A4-Expression und folgend zu einer gesteigerten Zellinvasion (Chen et al. 2007). Eine verminderte CTGF- oder CYR61-Expression, so Hellinger et al. (2019), führt über eine Dephosphorylierung von ERK1/2 zu einer niedrigeren S100A4-Expression und zu einer verminderten 3D-Sphäroid-Invasion. Es stellte sich die Frage, ob durch die Inhibition von ERK1/2 auch die Expression von CTGF beeinflusst werden kann. Des Weiteren wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine ERK1/2-Resistenz in TNBC-Zellen über die Reaktivierung der ERK-MAPK-Signalisierung zu einer gesteigerten CTGF-Expression führt.

Die Behandlung der nicht resistenten Zellen mit dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984 in den Versuchen dieser Arbeit führte zu einer verminderten CTGF-Detektion. Dieses Ergebnis stützt die Beobachtung von Chen et al. (2007), dass CTGF abhängig von ERK1/2-Signalen agiert. Auch konnte in den vorherigen Versuchen dieser Arbeit durch die Behandlung der nicht resistenten Zellen mit SCH772984 eine verminderte 3D-Sphäroid-Invasion nachgewiesen werden (siehe 4.3.5). Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass auch durch eine Inhibition von ERK1/2 die CTGF-Expression gesenkt und dadurch die Invasivität vermindert werden kann. Die resistenten Zellen zeigten hingegen keinen Unterschied in der CTGF-Intensität nach Behandlung mit SCH772984 im Vergleich zu den resistenten Kontrollzellen. Somit scheint der ERK1/2-Inhibitor keinen Einfluss auf die CTGF-Expression und folglich der Zellmorphologie in ERK1/2-resistenten Zellen zu haben.

In den resistenten unbehandelten Zellen ist vergleichend zu den nicht resistenten unbehandelten Zellen weniger CTGF detektiert worden. Dies würde die Hypothese, dass eine ERK1/2-Resistenz zu einer erhöhten CTGF-Expression und somit zu einer erhöhten Invasivität führt, nicht bestätigen. In den vorherigen Versuchen dieser Arbeit konnte allerdings aufgezeigt werden, dass eine ERK1/2-Resistenz zu einer gesteigerten 3D-Sphäroid-Invasion führt (siehe 4.3.4). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die erhöhte Invasivität bei einer ERK1/2-Resistenz einen reduzierten Bedarf an Wachstumsfaktoren wie CTGF benötigt oder auch CTGF-unabhängig vermittelt werden könnte. Es müssen jedoch weitere Untersuchungen erfolgen, um eine signifikante Aussage treffen zu können.

Die Invasion von Zellen kann durch eine Behandlung mit dem GnRH-Analogen Triptorelin, vermittelt über die Verminderung von S100A4 und CYR61, reduziert werden (Gründker et al. 2016). In Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe wurde außerdem aufgezeigt, dass eine Behandlung mit Triptorelin ebenso zu einer Herunterregulierung von CTGF und folgend zu einer verringerten Invasion führt (Hellinger et al. 2020). In den

Immunfluoreszenz-Bildern konnte bestätigend veranschaulicht werden, dass eine Behandlung nicht resistenter Zellen mit Triptorelin zu einer verminderten Anfärbung von CTGF führt.

Innerhalb der resistenten Zelllinie ist bei den mit Triptorelin behandelten Zellen etwas mehr CTGF im Vergleich zu den resistenten unbehandelten Kontrollzellen detektiert worden. Dieses Resultat passt zu den Ergebnissen der vorherigen Versuche, dass Triptorelin keinen vermindernenden Einfluss auf die 3D-Sphäroid-Invasion in resistenten Zellen hat (siehe 4.3.6). Bei ERK1/2-resistenten Zellen scheint CTGF und die von ihr abhängige Invasivität durch das GnRH-Analogon Triptorelin nicht reduzierbar zu sein. Dass aber im Vergleich zu den resistenten unbehandelten Zellen mehr CTGF detektiert wurde, könnte vermuten lassen, dass es durch Triptorelin trotzdem zu einer Beeinflussung der Signalgebung kommt. Wie in Kapitel 4.3.3 bereits beschrieben, kommt es bei einer ERK1/2-Resistenz möglicherweise über die vom parallelen PI3K/AKT/mTOR-Signalweg aktivierten gemeinsamen Zielsubstrate oder auch über *crossstalk* zur Aktivierung von ERK1/2. Beispielsweise könnte es, durch Triptorelin beeinflusst, zu einer verstärkten alternativen Aktivierung von ERK1/2 und somit zu einer Erhöhung der ERK1/2-abhängigen CTGF Expression kommen. Diese Annahme kann durch die registrierte Tendenz zur Erhöhung der pERK1/2-Expression in den resistenten Zellen nach Behandlung mit Triptorelin 10^{-9} M bestärkt werden (siehe 4.3.3). Allerdings kann die CTGF-Expression auch durch viele weitere Signale, wie verschiedene Wachstumsfaktoren oder Hormone, beeinflusst werden (zitiert nach Chaqour und Goppelt-Struebe 2006). Daher müssen weitere Versuche erfolgen, um eine signifikante Aussage über die CTGF-Beeinflussung in ERK1/2-resistenten Zellen durch Triptorelin treffen zu können.

Durch unsere Arbeitsgruppe konnte in vorherigen Experimenten in mesenchymal-transformierten Brustkrebszellen nachgewiesen werden, dass die Invasion von Brustkrebszellen über CTGF zudem abhängig vom RAS-homologen-Familienmitglied A (RhoA) reguliert wird. Eine Verminderung der RhoA-Expression führte in den Experimenten zu einer erhöhten CTGF-Expression (Hellinger et al. 2020).

Eine Behandlung mit Triptorelin reduziert die CTGF-Expression (Hellinger et al. 2020). Dies konnte auch in den Immunfluoreszenzversuchen in dieser Arbeit veranschaulicht werden. Weiter konnte durch Hellinger et al. (2020) nachgewiesen werden, dass es durch Triptorelin auch zu einer Aktivierung von RhoA kommt, während sich die Invasivität reduziert zeigt. Wie durch Chen et al. (2007) gezeigt, führt CTGF über ERK1/2 zu einer gesteigerten S100A4-Expression und folgend zu einer gesteigerten Zellinvasion. Auch eine Korrelation zwischen RhoA und ERK1/2 konnte bereits durch Tong et al. (2016)

nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die RhoA-Phosphorylierung höchstwahrscheinlich durch ERK1/2 vermittelt wird. Ob durch Inhibition von ERK1/2 die RhoA-Phosphorylierung gehemmt werden kann, muss in weiteren Versuchen untersucht werden.

Des Weiteren wurden die Intensitätsunterschiede von Phalloidin in den nicht resistenten und resistenten Zellen der Zelllinie HCC1806 veranschaulicht. Dafür wurden wie bei CTGF die Summe der Pixelwerte der Immunfluoreszenz-Bilder aus einem Versuch ausgemessen und die Werte der Phalloidin-Intensität auf die DAPI-Intensität normiert und graphisch dargestellt.

Der genutzte Phalloidin Fluoreszenzfarbstoff färbt die Aktinfilamente an. Diese sind als Untereinheiten der Mikrofilamente und als Filamente des kontraktiven Apparats in Muskelzellen an zellulären Prozessen, wie z. B. der Zellmotilität und Zellstabilisierung, beteiligt (Dominguez und Holmes 2011).

Bei den nicht resistenten Zellen wurde nach Behandlung mit SCH772984 und nach Behandlung mit Triptorelin 10^{-7}M bzw. 10^{-9}M jeweils weniger Phalloidin detektiert. Das könnte dafür sprechen, dass weniger zellstabilisierende Aktinfilamente vorhanden sind. Durch die Verhinderung der Signalgebung der ERK-MAPK-Kaskade durch Hemmung der Aktivierung dieser Kaskade oder Hemmung der Phosphorylierung von ERK1/2 könnte die Zelle destabilisiert worden sein. Dies könnte die verminderte Detektion von den zellstabilisierenden Aktinfilamenten erklären. Chen et al. (2007) konnten bereits aufzeigen, dass sich durch eine vermehrte CTGF-Expression die Zellmorphologie verändert und die Zelle eine erhöhte Migrationsfähigkeit aufweist. In den Versuchen konnte in den nicht resistenten Zellen nach der Behandlung von SCH772984 und Triptorelin eine verminderte CTGF-Expression detektiert werden. Im Hinblick auf den Beobachtungen von Chen et al. (2007) könnte eine mögliche Erklärung für die verminderte Detektion von Phalloidin die veränderte Zellmorphologie durch vermindertes CTGF sein.

Die Regulierung von Aktin-Stressfasern ist eine bekannte Funktion von RhoA (Ridley und Hall 1992). Durch Tong et al. (2016) wurde nachgewiesen, dass die Bildung dieser Stressfasern durch Phosphorylierung von RhoA, vermittelt über ERK1/2, verstärkt wird. Daher könnte der Einsatz von ERK1/2-Inhibitoren durch Verminderung der RhoA-Phosphorylierung auch die Bildung von Aktin-Stressfasern reduziert und so zu der

verminderten Detektion von Phalloidin in diesen Versuchen geführt haben. Dies würde dafürsprechen, dass ERK1/2-Inhibitoren Einfluss auf die RhoA-Phosphorylierung haben.

Vergleichend zu den nicht resistenten Zellen war bei den resistenten Zellen die Phalloidin-Intensität weniger intensiv. Erwartet war eine vermehrte Detektion von Phalloidin durch vermehrte Migrationsfähigkeit der resistenten Zellen. Allerdings werden durch Phalloidin die Aktinfilamente unabhängig von ihrer Funktion in Fortbewegung, Stabilisierung oder Adhäsion angefärbt. Daher könnte auch die veränderte Zellmorphologie bei einer ERK1/2-Resistenz durch beispielsweise weniger adhäsive Zellverbindungen der Grund für eine verminderte Detektion sein.

Die Behandlung der resistenten Zellen mit SCH772984 zeigte keinen gravierenden Unterschied in der Phalloidin-Intensität im Vergleich zu den unbehandelten resistenten Zellen. Dies spricht dafür, dass SCH772984 in den auf ihn resistenten Zellen keinen Einfluss auf die Zellmorphologie im Hinblick auf ihre Stabilität oder Motilität hat. Dies passt auch zu den Erkenntnissen der unveränderten CTGF-Intensität nach SCH772984-Behandlung in resistenten Zellen.

Innerhalb der resistenten Zelllinie wurde ebenfalls nach Behandlung mit Triptorelin 10^{-7} M weniger Phalloidin detektiert. Nimmt man wie vorher erläutert an, dass Triptorelin in ERK1/2-resistenten bestärkenden Einfluss auf die alternative ERK1/2-Aktivierung und die CTGF-Expression hat, so passt dieses Ergebnis eher nicht dazu. Durch ungleichmäßige Färbung der Zellen, ungleichmäßiges Waschen der Objektträger mit Fluoreszenzfärbelösung oder auch ungleichmäßiges Auftragen des Eindeckmediums kann es zu ungenauen Ergebnissen oder Fehlern gekommen sein. Zudem können Fluoreszenzsignale durch übermäßige Lichtexposition beeinflusst werden (Mori und Cardiff 2016). In weiteren Immunfluoreszenz-Versuchen könnte zudem der Fokus mehr auf die qualitative Analyse der CTGF- und Phalloidin-Expression in den einzelnen Zellen sowie auch direkt in den 3D-Sphäroiden gelegt werden. Beispielsweise könnte dies durch die Auswertung mit entsprechenden Fluoreszenzmikroskopen erfolgen, die einzelne Schichten der Zellen oder der Sphäroide scannen können.

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine ERK1/2-Resistenz in TNBC-Zellen die 3D-Sphäroid-Invasion signifikant steigert. Eine ERK1/2-Resistenz zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum resistenter Zellen. Diese Erkenntnis spricht

dafür, dass es in ERK1/2-resistenten Zellen zu einer proliferationsunabhängigen Steigerung der Invasivität kommt.

Eine ERK1/2-Resistenz konnte in den Versuchen dieser Arbeit auf den ERK1/2-Inhibitor SCH772984 generiert werden. Auf den ERK1/2-Inhibitor Ulixertinib konnte innerhalb des Versuchszeitraum von vier Monaten keine Resistenz generiert werden. Diese Erkenntnis könnte für den klinischen Nutzen dieses Inhibitors sprechen. Auch in einer bereits stattgefundenen Studie (ClinicalTrials.gov Nr.: NCT01781429) bei Patienten mit fortgeschrittenen Malignomen konnte die therapeutische Wirkung des ERK1/2-Inhibitor Ulixertinib bereits aufgezeigt werden. Es traten häufig unerwünschte dermatologische Nebenwirkungen auf, die allerdings mit einer Stabilität der Erkrankung oder einem partiellen Ansprechen der Therapie assoziiert waren und somit als Marker für das Ansprechen der Therapie dienen können (Wu et al. 2021).

Das GnRH-Analogon Triptorelin zeigte in den Versuchen keinen signifikanten Einfluss auf die pERK1/2-Expression sowie auf das Zellwachstum und die Invasivität von ERK1/2-resistenten TNBC-Zellen.

Da Triptorelin nicht geeignet scheint als Therapie einer ERK1/2-Resistenz, stellt sich die Frage, welche anderen therapeutischen Optionen möglich sind. Jaiswal et al. (2018) konnten aufzeigen, dass verschiedene ERK1/2-resistente Zelllinien (u. a. Zelllinien vom kolorektalen Karzinom und Pankreaskarzinom) weiterhin von MEK abhängig sind und sich MEK-Inhibitoren als therapeutische Option zur Überwindung einer ERK1/2-Resistenz anbieten. Wie vorher beschrieben, konnte durch Iezzi et al. (2018) allerdings eine Kreuzresistenz bei ERK1/2- und MEK-resistenten Zellen untereinander gegen den jeweils anderen Inhibitor beobachtet werden. Der therapeutische Nutzen von weiteren ERK1/2 vorgeschalteten Kinasen scheint bei einer ERK1/2-Resistenz demnach unklar und muss in weiteren Versuchen untersucht werden.

Daher lohnt sich hier auch der Blick auf die Zielsubstrate der ERK-MAPK-Signalkaskade. Die RSK ist nämlich nicht nur ein Zielsubstrat der ERK-MAPK-Kaskade, sondern wie bereits beschrieben ebenso ein nachgeschaltetes Zielsubstrat des mTOR (Ruvinsky und Meyuhas 2006). Das Protein mTOR ist Bestandteil des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs. Dieser Signalweg ist genauso wie die ERK-MAPK-Kaskade an Zellproliferation, Invasion, Migration und Apoptose beteiligt (zitiert nach Miricescu et al. 2020). In dem PI3K/AKT/mTOR-Signalweg konnten ebenfalls häufig Mutationen beim Brustkrebs und auch bei TNBC beobachtet werden (Costa et al. 2018). Die RSK und das durch sie

phosphorylierte rpS6 stellen somit überschneidende Strukturen der beiden Signalwege dar (Gao et al. 2019).

Des Weiteren konnte von Fruman und Rommel (2014) ein umfangreicher *crossstalk* zwischen den Netzwerken dieser beiden Signalkaskaden registriert werden. Es konnte bereits beobachtet werden, dass es bei einer Resistenzentstehung gegenüber MEK-Inhibitoren über Signale in Feedbackschleifen zur Aktivierung von parallelen Signalkaskaden, wie dem PI3K/AKT/mTOR-Signalweg kommt (Won et al. 2012). Daher scheint es wahrscheinlich zu sein, dass es auch bei einer Resistenzentstehung gegenüber ERK1/2-Inhibitoren zu Signalen und Aktivierungen über den *crossstalk* dieser Signalwege kommt.

Zudem konnten Iezzi et al. (2018) in ERK1/2- und MEK-resistenten nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen keine Kreuzresistenz mit Inhibitoren nachweisen, die auf den parallelen PI3K/AKT/mTOR-Signalweg wirken. Dass ein PI3K/AKT/mTOR-Inhibitor die Signalgebung dieser Kaskade in ERK1/2-resistenten Zellen blockieren und so die Lebensfähigkeit der resistenten Zellen vermindern kann, wiesen Jaiswal et al. (2018) bereits in ihren Experimenten nach.

Daher könnte der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg für die Zukunft einen vielversprechenden möglichen Ansatzpunkt zur Überwindung einer ERK1/2-Resistenz darstellen, der in Versuchen weiter untersucht werden sollte.

5 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. 10 – 20 % macht der Subtyp des *triple-negative breast cancer* (TNBC) aus. Durch fehlende Expressierung der Hormonrezeptoren sowie keiner Überexpressierung des *human epidermal growth factor receptor 2* sind die therapeutischen Optionen eingeschränkt.

Der *mitogen-activated protein kinase*-(MAPK-)Kaskadeweg ist der am häufigsten mutierte Signalweg in menschlichen Krebszellen. Er reguliert Zellwachstum, Migration und Differenzierung. Im Rahmen von Brustkrebserkrankungen wurden vor allen Dingen in der MAPK-Signalkaskade um die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK1/2) viele genetische Mutationen beobachtet. Aufgrund von Resistenzenstehungen bei therapeutischer Inhibition von ihr vorgeschalteten Kinasen in diesem Signalweg, richtet sich das Interesse der Forschung nunmehr auf die ERK1/2-Kinase selbst. Die Auswirkungen einer ERK1/2-Resistenz waren bisweilen allerdings nicht bekannt. Angenommen wurde, dass eine ERK1/2-Resistenz in TNBC-Zellen zu einer gesteigerten 3D-Sphäroid-Invasion führt.

Die Expression von pERK1/2 in TNBC-Zellen der Zelllinie HCC1806 und HCC70 wurde durch den ERK1/2-Inhibitor SCH772984 gesenkt. Durch den ERK1/2-Inhibitor Ulixertinib wurde die pERK1/2-Expression nicht vermindert. Trotz fehlender pERK1/2-Verminderung hemmt Ulixertinib jedoch die Phosphorylierung von Zielsubstraten, wie in der Literatur bereits beschrieben. Der Expressionsnachweis erfolgte mittels Western Blot.

In 3D-Sphäroid-Invasionsassays konnte aufgezeigt werden, dass beide Inhibitoren die 3D-Sphäroid-Invasion in TNBC-Zellen reduzieren.

Eine ERK1/2-Resistenz gegenüber SCH772984 in der Zelllinie HCC1806 konnte generiert werden. Die Resistenz wurde durch einen LD₅₀-Vibilitätstest mittels AlamarBlue nachgewiesen.

Mittels Western Blot wurde gezeigt, dass ERK1/2-resistente Zellen pERK1/2 in einem geringeren Gesamtniveau als nicht resistente Zellen exprimieren.

Es konnte mithilfe von 3D-Sphäroid-Invasionsassays aufgezeigt werden, dass eine ERK1/2-Resistenz zu einer erhöhten Invasivität führt. Allerdings konnte kein Einfluss einer ERK1/2-Resistenz auf das Zellwachstum anhand des Proliferationsassays mit AlamarBlue beobachtet werden. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die gesteigerte 3D-Sphäroid-Invasion bei einer ERK1/2-Resistenz nicht auf einer veränderten Proliferationsrate beruht.

Es wurde bereits gezeigt, dass der *connective tissue growth factor* (CTGF), abhängig von der ERK1/2-Phosphorylierung, einen wichtigen Treiber der Zellinvasion darstellt. Daher wurde eine mögliche Korrelation der ERK1/2-Resistenz mit der Annahme einer erhöhten CTGF-Expression untersucht. Anhand der Immunfluoreszenz konnte kein erhöhender Einfluss einer ERK1/2-Resistenz auf die CTGF-Expression beobachtet werden. Da die Ergebnisse der Immunfluoreszenz aus einem Versuch stammen, müssen für signifikante Ergebnisse weitere Versuche erfolgen.

Studien zur Behandlung von Mammakarzinomen mit GnRH-Analoga liefern vielversprechende Ergebnisse. Sie hemmen die wachstumsfaktorinduzierte Aktivierung der ERK1/2-MAPK-Kaskade. Daher wurde Triptorelin als mögliche Behandlungsoption bei einer ERK1/2-Resistenz untersucht. In den Western Blot Analysen, den 3D-Sphäroid-Invasionsassays sowie der Proliferationsanalyse mittels AlamarBlue konnte kein signifikanter Effekt von Triptorelin auf die ERK1/2-resistenten Zellen beobachtet werden. Bei ERK1/2-resistenten Zellen ist anzunehmen, dass es durch *cross-talk* mit parallelen Signalwegen sowie Feedbackschleifen gemeinsamer nachgeschalteter Substrate zur Aktivierung von ERK1/2 kommt – und das unabhängig von der Inhibierung der Aktivierung der Kaskade.

Aufgrund vorliegender Ergebnisse scheint das GnRH-Analogen Triptorelin als potenzielles Medikament zur Überwindung einer ERK1/2-Resistenz in TNBC-Zellen eher ungeeignet. Andere therapeutische Möglichkeiten zur Überwindung einer ERK1/2-Resistenz, wie beispielsweise Ansätze in parallelen Signalkaskaden, sollten in weiteren Versuchen untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

- Ahronian LG, Sennott EM, Van Allen EM, Wagle N, Kwak EL, Faris JE, Godfrey JT, Nishimura K, Lynch KD, Mermel CH, et al. (2015): Clinical Acquired Resistance to RAF Inhibitor Combinations in BRAF-Mutant Colorectal Cancer through MAPK Pathway Alterations. *Cancer Discov* 5, 358–367
- Antoniou AC, Easton DF (2006): Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* 25, 5898–5905
- Babic AM, Chen CC, Lau LF (1999): Fisp12/Mouse Connective Tissue Growth Factor Mediates Endothelial Cell Adhesion and Migration through Integrin $\alpha\beta_3$, Promotes Endothelial Cell Survival, and Induces Angiogenesis In Vivo. *Mol Cell Biol* 19, 2958–2966
- Baines AT, Xu D, Der CJ (2011): Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Med Chem* 3, 1787–1808
- Bareche Y, Venet D, Ignatiadis M, Aftimos P, Piccart M, Rothe F, Sotiriou C (2018): Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Ann Oncol* 29, 895–902
- Baudino TA (2015): Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr Drug Discov Technol* 12, 3–20
- Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V (2007): Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype. *Cancer* 109, 1721–1728
- Bio-Rad: <https://www.bio-rad-antibodies.com/alarblue-faqs-troubleshooting.html>; abgerufen am 29.05.2022
- Bork P (1993): The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett* 327, 125–130
- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (1991): ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65, 663–675
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394–424
- Buchholz S, Seitz S, Schally AV, Engel JB, Rick FG, Szalontay L, Hohla F, Krishan A, Papadia A, Gaiser T, et al. (2009): Triple-negative breast cancers express receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and respond to LHRH antagonist cetorelix with growth inhibition. *Int J Oncol* 35, 789–796
- Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SAW, Savage MI, Osborne CK, Hilsenbeck SG, Chang JC, et al. (2015): Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 21, 1688–1698

- Cardoso F, Senkus E, Costa A, Papadopoulos E, Aapro M, André F, Harbeck N, Aguilar Lopez B, Barrios CH, Bergh J, et al. (2018): 4th ESO–ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4). *Ann Oncol* 29, 1634–1657
- Caunt CJ, Sale MJ, Smith PD, Cook SJ (2015): MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road. *Nat Rev Cancer* 15, 577–592
- Chaquour B, Goppelt-Struebe M (2006): Mechanical regulation of the Cyr61/CCN1 and CTGF/CCN2 proteins. *FEBS J* 273, 3639–3649
- Chen DS, Mellman I (2013): Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* 39, 1–10
- Chen P, Wang M, Wu S, Su J, Hong C, Chuang S, Chen M, Hua K, Wu Y, Cha S, et al. (2007): CTGF enhances the motility of breast cancer cells via an integrin- α 5 β 3-ERK1/2-dependent S100A4-upregulated pathway. *J Cell Sci* 120, 2053–2065
- Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnani M, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ (2015): Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* 26, 1533–1546
- Corning: Matrigel Matrix: <https://www.corning.com/emea/de/products/life-sciences/products/surfaces/matrigel-matrix.html>; abgerufen am 25.03.2021
- Costa RLB, Han HS, Gradishar WJ (2018): Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review. *Breast Cancer Res Treat* 169, 397–406
- Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T (2018): The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch* 472, 697–703
- Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, Budczies J, Darb-Esfahani S, Kronenwett R, Hanusch C, et al. (2010): Tumor-Associated Lymphocytes As an Independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 28, 105–113
- Denkert C, Minckwitz G von, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, Budczies J, Huober J, Klauschen F, Furlanetto J, et al. (2018): Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol* 19, 40–50
- Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA (2007): Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin Cancer Res* 13, 4429–4434
- Dominguez R, Holmes KC (2011): Actin Structure and Function. *Annu Rev Biophys* 40, 169–186
- Dondi D, Limonta P, Moretti RM, Marelli MM, Garattini E, Motta M (1994): Antiproliferative Effects of Luteinizing Hormone-releasing Hormone (LHRH) Agonists on Human Androgen-independent Prostate Cancer Cell Line DU 145: Evidence for an Autocrine-inhibitory LHRH Loop. *Cancer Res* 54, 4091–4095
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, et al. (2011): Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 378, 771–784

- Eicke N, Günthert AR, Emons G, Gründker C (2006): GnRH-II agonist [D-Lys6]GnRH-II inhibits the EGF-induced mitogenic signal transduction in human endometrial and ovarian cancer cells. *Int J Oncol* 29, 1223–1229
- Elston CW, Ellis IO (1991): Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19, 403–410
- Emons G, Schally AV (1994): The use of luteinizing hormone releasing hormone agonists and antagonists in gynaecological cancers. *Hum Reprod* 9, 1364–1379
- Emons G, Ortmann O, Becker M, Irmer G, Springer B, Laun R, Hölzel F, Schulz KD, Schally AV (1993): High affinity binding and direct antiproliferative effects of LHRH analogues in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 53, 5439–5446
- Emons G, Ortmann O, Schulz KD, Schally AV (1997): Growth-Inhibitory Actions of Analogues of Luteinizing Hormone Releasing Hormone on Tumor Cells. *Trends Endocrinol Metab* 8, 355–362
- Emons G, Gründker C, Günthert AR, Westphalen S, Kavanagh J, Verschraegen C (2003): GnRH antagonists in the treatment of gynecological and breast cancers. *Endocr Relat Cancer* 10, 291–299
- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, et al. (2005): Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, 917–921
- Felding-Habermann B, O'Toole TE, Smith JW, Fransvea E, Ruggeri ZM, Ginsberg MH, Hughes PE, Pampori N, Shattil SJ, Saven A, Mueller BM (2001): Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1853–1858
- Fields RD, Lancaster MV (1993): Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity. *Am Biotechnol Lab* 11, 48–50
- Föst C, Duwe F, Hellriegel M, Schweyer S, Emons G, Gründker C (2011): Targeted chemotherapy for triple-negative breast cancers via LHRH receptor. *Oncol Rep* 25, 1481–1487
- Frödin M, Gammeltoft S (1999): Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 151, 65–77
- Fruman DA, Rommel C (2014): PI3K and Cancer: Lessons, Challenges and Opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 13, 140–156
- Gao M, Wang H, Chen X, Cao W, Fu L, Li Y, Quan H, Xie C, Lou L (2019): Aberrant modulation of ribosomal protein S6 phosphorylation confers acquired resistance to MAPK pathway inhibitors in BRAF-mutant melanoma. *Acta Pharmacol Sin* 40, 268–278
- Gazdar AF, Kurvari V, Virmani A, Gollahon L, Sakaguchi M, Westerfield M, Kodagoda D, Stasny V, Cunningham HT, Wistuba II, et al. (1998): Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 78, 766–774
- Germann UA, Furey BF, Markland W, Hoover RR, Aronov AM, Roix JJ, Hale M, Boucher DM, Sorrell DA, Martinez-Botella G, et al. (2017): Targeting the MAPK Signaling Pathway in Cancer: Promising Preclinical Activity with the Novel Selective ERK1/2 Inhibitor BVD-523 (Ulixertinib). *Mol Cancer Ther* 16, 2351–2363

- Gründker C, Emons G (2017): The Role of Gonadotropin-Releasing Hormone in Cancer Cell Proliferation and Metastasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* **8**, 187
- Gründker C, Völker P, Schulz KD, Emons G (2000): Luteinizing hormone-releasing hormone agonist triptorelin and antagonist cetrorelix inhibit EGF-induced c-fos expression in human gynecological cancers. *Gynecol Oncol* **78**, 194–202
- Gründker C, Völker P, Emons G (2001): Antiproliferative Signaling of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone in Human Endometrial and Ovarian Cancer Cells through G Protein α I-Mediated Activation of Phosphotyrosine Phosphatase. *Endocrinology* **142**, 2369–2380
- Gründker C, Günthert AR, Westphalen S, Emons G (2002): Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers. *Eur J Endocrinol* **146**, 1–14
- Gründker C, Bauerschmitz G, Schubert A, Emons G (2016): Invasion and increased expression of S100A4 and CYR61 in mesenchymal transformed breast cancer cells is downregulated by GnRH. *Int J Oncol* **48**, 2713–2721
- Hackshaw A, Baum M, Fornander T, Nordenskjöld B, Nicolucci A, Monson K, Forsyth S, Reczko K, Johansson U, Fohlin H, et al. (2009): Long-term Effectiveness of Adjuvant Goserelin in Premenopausal Women With Early Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* **101**, 341–349
- Hahnen E, Lederer B, Hauke J, Loibl S, Kröber S, Schneeweiss A, Denkert C, Fasching PA, Blohmer JU, Jackisch C, et al. (2017): Germline Mutation Status, Pathological Complete Response, and Disease-Free Survival in Triple-Negative Breast Cancer: Secondary Analysis of the GeparSixto Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* **3**, 1378–1385
- Halaban R, Zhang W, Bacchiocchi A, Cheng E, Parisi F, Ariyan S, Krauthammer M, McCusker JP, Kluger Y, Sznol M (2010): PLX4032, a selective BRAF(V600E) kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAFWT melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**, 190–200
- Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, Ruddy K, Tsang J, Cardoso F (2019): Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* **5**, 1–31
- Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Andre F, Collyar DE, Gonzalez-Angulo AM, Hammond EH, Kuderer NM, Liu MC, Mennel RG, et al. (2016): Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* **34**, 1134–1150
- Hatzivassiliou G, Haling JR, Chen H, Song K, Price S, Heald R, Hewitt JFM, Zak M, Peck A, Orr C, et al. (2013): Mechanism of MEK inhibition determines efficacy in mutant KRAS-versus BRAF-driven cancers. *Nature* **501**, 232–236
- Haura EB, Ricart AD, Larson TG, Stella PJ, Bazhenova L, Miller VA, Cohen RB, Eisenberg PD, Selaru P, Wilner KD, Gadgeel SM (2010): A Phase II Study of PD-0325901, an Oral MEK Inhibitor, in Previously Treated Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* **16**, 2450–2457
- Hellinger JW, Hüchel S, Goetz L, Bauerschmitz G, Emons G, Gründker C (2019): Inhibition of CYR61-S100A4 Axis Limits Breast Cancer Invasion. *Front Oncol* **9**, 1074
- Hellinger JW, Schömel F, Buse JV, Lenz C, Bauerschmitz G, Emons G, Gründker C (2020): Identification of drivers of breast cancer invasion by secretome analysis: insight into CTGF signaling. *Sci Rep* **10**, 17889

- Huang L, Fu L (2015): Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharm Sin B* 5, 390–401
- Iezzi A, Caiola E, Scagliotti A, Brogгинi M (2018): Generation and characterization of MEK and ERK inhibitors- resistant non-small-cells-lung-cancer (NSCLC) cells. *BMC Cancer* 18, 1028
- Irmer G, Bürger C, Ortmann O, Schulz KD, Emons G (1994): Expression of luteinizing hormone releasing hormone and its mRNA in human endometrial cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 79, 916–919
- Jaiswal BS, Durinck S, Stawiski EW, Yin J, Wang W, Lin E, Moffat J, Martin SE, Modrusan Z, Seshagiri S (2018): ERK Mutations and Amplification Confer Resistance to ERK-Inhibitor Therapy. *Clin Cancer Res* 24, 4044–4055
- Jha S, Morris EJ, Hruza A, Mansueto MS, Schroeder GK, Arbanas J, McMasters D, Restaino CR, Dayananth P, Black S, et al. (2016): Dissecting Therapeutic Resistance to ERK Inhibition. *Mol Cancer Ther* 15, 548–559
- Johnson GL, Lapadat R (2002): Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911–1912
- Kim KB, Kefford R, Pavlick AC, Infante JR, Ribas A, Sosman JA, Fecher LA, Millward M, McArthur GA, Hwu P, et al. (2013): Phase II Study of the MEK1/MEK2 Inhibitor Trametinib in Patients With Metastatic BRAF-Mutant Cutaneous Melanoma Previously Treated With or Without a BRAF Inhibitor. *J Clin Oncol* 31, 482–489
- Kim M, Ro J, Ahn S, Kim H, Kim S, Gong G (2006): Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. *Hum Pathol* 37, 1217–1226
- Kolch W (2000): Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351, 289–305
- Laemmli UK (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685
- Lau LF, Lam SCT (1999): The CCN Family of Angiogenic Regulators: The Integrin Connection. *Exp Cell Res* 248, 44–57
- Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA (2011): Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 121, 2750–2767
- Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, Moses HL, Sanders ME, Pietenpol JA (2016): Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One* 11, e0157368
- Leitlinienprogramm Onkologie: Mammakarzinom. S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms; Version 4.4: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>; abgerufen am 24.08.2021
- Liapis H, Flath A, Kitazawa S (1996): Integrin $\alpha\beta 3$ Expression by Bone-residing Breast Cancer Metastases. *Diagn Mol Pathol* 5, 127–135

- Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, Theriault RL, Edge SB, Wong YN, Blayney DW, Niland JC, Winer EP, Weeks JC (2012): Clinicopathological Features, Patterns of Recurrence, and Survival Among Women With Triple-Negative Breast Cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer* 118, 5463–5472
- Litton JK, Rugo HS, Ettl J, Hurvitz SA, Gonçalves A, Lee KH, Fehrenbacher L, Yerushalmi R, Mina LA, Martin M, et al. (2018): Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med* 379, 753–763
- Liu F, Yang X, Geng M, Huang M (2018): Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 8, 552–562
- Liu K, Newbury PA, Glicksberg BS, Zeng WZD, Paithankar S, Andrechek ER, Chen B (2019): Evaluating cell lines as models for metastatic breast cancer through integrative analysis of genomic data. *Nat Commun* 10, 1–12
- Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F, Rouas G, Francis P, Crown JPA, Hitre E, et al. (2013): Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trial in Node-Positive Breast Cancer Comparing the Addition of Docetaxel to Doxorubicin With Doxorubicin-Based Chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol* 31, 860–867
- Lyons TG (2019): Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol* 20, 82
- Maritan SM, Lian EY, Mulligan LM (2017): An Efficient and Flexible Cell Aggregation Method for 3D Spheroid Production. *J Vis Exp* e55544
- Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu II, Badoiu SC, Stefani C, Greabu M (2020): PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. *Int J Mol Sci* 22, 173
- Mitin N, Rossman KL, Der CJ (2005): Signaling Interplay in Ras Superfamily Function. *Curr Biol* 15, R563–R574
- Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, Su X, Wang Y, Gonzalez-Angulo AM, Akcakanat A, et al. (2014): PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res* 2, 361–370
- Mori H, Cardiff RD (2016): Methods of Immunohistochemistry and Immunofluorescence: Converting Invisible to Visible. *Methods Mol Biol* 1458, 1–12
- Morris EJ, Jha S, Restaino CR, Dayananth P, Zhu H, Cooper A, Carr D, Deng Y, Jin W, Black S, et al. (2013): Discovery of a Novel ERK Inhibitor with Activity in Models of Acquired Resistance to BRAF and MEK Inhibitors. *Cancer Discov* 3, 742–750
- Morris GJ, Naidu S, Topham AK, Guiles F, Xu Y, McCue P, Schwartz GF, Park PK, Rosenberg AL, Brill K, Mitchell EP (2007): Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African–American and Caucasian patients. *Cancer* 110, 876–884
- Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z (1997): Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods* 204, 205–208
- Nitz U, Gluz O, Clemens M, Malter W, Reimer T, Nuding B, Aktas B, Stefek A, Pollmanns A, Lorenz-Salehi F, et al. (2019): West German Study PlanB Trial: Adjuvant Four Cycles of Epirubicin and Cyclophosphamide Plus Docetaxel Versus Six Cycles of Docetaxel and Cyclophosphamide in HER2-Negative Early Breast Cancer. *J Clin Oncol* 37, 799–808

- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F (2000): Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267, 5421–5426
- Perbal B (2004): CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* 363, 62–64
- Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, Shi H, Atefi M, Titz B, Gabay MT, et al. (2011): RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 480, 387–390
- Ridley AJ, Hall A (1992): The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389–399
- Rinehart J, Adjei AA, LoRusso PM, Waterhouse D, Hecht JR, Natale RB, Hamid O, Varterasian M, Asbury P, Kaldjian EP, et al. (2004): Multicenter Phase II Study of the Oral MEK Inhibitor, CI-1040, in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung, Breast, Colon, and Pancreatic Cancer. *J Clin Oncol* 22, 4456–4462
- Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2019): Krebs in Deutschland 2015/2016. 78–81
- Robert Koch-Institut: Zentrum für Krebsregisterdaten 2018:
<https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs.html>
; abgerufen am 29.05.2022
- Roberts PJ, Der CJ (2007): Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26, 3291–3310
- Robson M, Im S, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, Delaloge S, Li W, Tung N, Armstrong A, et al. (2017): Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med* 377, 523–533
- Ruvinsky I, Meyuhav O (2006): Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci* 31, 342–348
- Samatar A, Poulikakos P (2014): Targeting RAS-ERK signalling in cancer: Promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 13, 928–42
- Schaeffer HJ, Weber MJ (1999): Mitogen-Activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers. *Mol Cell Biol* 19, 2435–2444
- Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, Nair RM, Debeljuk L, White WF (1971): Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science* 173, 1036–1038
- Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, Diéras V, Hegg R, Im SA, Shaw Wright G, et al. (2018): Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 379, 2108–2121
- Schubert A, Hawighorst T, Emons G, Gründker C (2011): Agonists and antagonists of GnRH-I and -II reduce metastasis formation by triple-negative human breast cancer cells in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 130, 783–790
- Sinn HP, Kreipe H (2013): A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel)* 8, 149–154

- Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ (1994): Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors: Structure and Signal Transduction Pathways. *Endocr Rev* 15, 462–499
- Sullivan RJ, Infante JR, Janku F, Wong DJL, Sosman JA, Keedy V, Patel MR, Shapiro GI, Mier JW, Tolcher AW, et al. (2018): First-in-Class ERK1/2 Inhibitor Ulixertinib (BVD-523) in Patients with MAPK Mutant Advanced Solid Tumors: Results of a Phase I Dose-Escalation and Expansion Study. *Cancer Discov* 8, 184–195
- Tong J, Li L, Ballermann B, Wang Z (2016): Phosphorylation and Activation of RhoA by ERK in Response to Epidermal Growth Factor Stimulation. *PLoS One* 11, e0147103
- Vinci M, Box C, Eccles SA (2015): Three-dimensional (3D) tumor spheroid invasion assay. *J Vis Exp* e52686
- Völker P, Gründker C, Schmidt O, Schulz KD, Emons G (2002): Expression of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in human ovarian and endometrial cancers: Frequency, autoregulation, and correlation with direct antiproliferative activity of luteinizing hormone-releasing hormone analogues. *Am J Obstet Gynecol* 186, 171–179
- von Alten J, Fister S, Schulz H, Viereck V, Frosch KH, Emons G, Gründker C (2006): GnRH analogs reduce invasiveness of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 100, 13–21
- Ward RA, Colclough N, Challinor M, Debreczeni JE, Eckersley K, Fairley G, Feron L, Flemington V, Graham MA, Greenwood R, et al. (2015): Structure-Guided Design of Highly Selective and Potent Covalent Inhibitors of ERK1/2. *J Med Chem* 58, 4790–4801
- Weber CK, Slupsky JR, Kalmes HA, Rapp UR (2001): Active Ras Induces Heterodimerization of cRaf and BRaf. *Cancer Res* 61, 3595–3598
- White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD (1998): Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 305–309
- Williams C, Lin CY (2013): Oestrogen receptors in breast cancer: basic mechanisms and clinical implications. *Ecancermedalscience* 7, 370
- Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JMS, Bilous M, Fitzgibbons P, et al. (2013): Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* 31, 3997–4013
- Won JK, Yang HW, Shin SY, Lee JH, Heo WD, Cho KH (2012): The crossregulation between ERK and PI3K signaling pathways determines the tumoricidal efficacy of MEK inhibitor. *J Mol Cell Biol* 4, 153–163
- Wu J, Liu D, Offin M, Lezcano C, Torrisi JM, Brownstein S, Hyman DM, Gounder MM, Abida W, Drilon A, et al. (2021): Characterization and management of ERK inhibitor associated dermatologic adverse events: analysis from a nonrandomized trial of ulixertinib for advanced cancers. *Invest New Drugs* 39, 785–795
- Xie D, Nakachi K, Wang H, Elashoff R, Koeffler HP (2001): Elevated Levels of Connective Tissue Growth Factor, WISP-1, and CYR61 in Primary Breast Cancers Associated with More Advanced Features. *Cancer Res* 61, 8917–8923
- Ziegler E, Hansen MT, Haase M, Emons G, Gründker C (2014): Generation of MCF-7 cells with aggressive metastatic potential in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 148, 269–277

Zimmermann S, Moelling K (1999): Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* 286, 1741–1744

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Carsten Gründker für die Möglichkeit der Durchführung einer interessanten und anspruchsvollen Promotion. Ich danke ihm für seine hervorragende Betreuung.

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Julia Gallwas und Herrn Prof. Dr. med. Günter Emons, dass ich diese Promotion im Labor für Molekulare Gynäkologie der Universitätsklinik Göttingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Carsten Gründker durchführen konnte.

Für die gute Betreuung und ihre Unterstützung in der Durchführung meiner experimentellen Versuche bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Johanna Hellinger.

Weiterer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Heidi Hahn für die Bereitschaft meiner Mitbetreuung.

Ich danke allen Mitarbeitern des Labors für molekulare Gynäkologie. Besonderer Dank gilt Sonja Blume, die mir im Labor stets für Fragen zur Seite stand.