



**Bedeutung des MEK5/ERK5-Signalwegs in der zielgerichteten
Melanomtherapie**

**Function of the MEK5/ERK5-Pathway in the targeted Therapy of
Melanoma**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades

der Graduate School of Life Sciences,

Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Klasse Klinische Wissenschaften

Vorgelegt von

Neele Weiß

aus

Bremen

Würzburg, **Juli 2020**



Rückseite

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Thomas Haaf

1. Betreuer: Prof. Marc Schmidt

2. Betreuer: PD Roland Houben

3. Betreuerin: Prof. Svenja Meierjohann

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das maligne Melanom	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2 Pathogenese	3
1.1.3 Therapie	4
1.1.4 Resistenzmechanismen auf BRAFi/ MEKi- Therapie	6
1.2 Der MEK5/ERK5- Signalweg	7
1.2.1 Rolle von ERK5 in der Tumorgenese.....	10
1.3 Rolle des MEK5/ERK5 Signalwegs im malignen Melanom.....	12
1.4 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Material	15
2.1 Verbrauchsmaterialien	15
2.2 Chemikalien und Reagenzien	15
2.3 Inhibitoren.....	17
2.4 Zellen	17
2.4.1 Zusammensetzung der Nährmedien	18
2.5 Puffer und Lösungen.....	19
2.5.1 Puffer und Lösungen für Western Blot.....	19
2.5.2 Puffer für Zelllysate.....	20
2.5.3 Puffer und Lösungen für BrdU-Markierung und PI-Färbung	21
2.5.4 Lösung für Zellfärbung.....	21

2.6	Antikörper für Western Blot	21
2.7	Primer.....	22
2.8	Reagenziensätze („Kits“).....	22
2.9	Geräte.....	23
2.10	Software.....	24
3	Methoden.....	26
3.1	Zellkultur	26
3.1.1	Auftauen und Kultivieren der Melanomzellen	26
3.1.2	Passagieren von Melanomzellen	26
3.1.3	Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer	26
3.1.4	Kryokonservierung.....	27
3.1.5	Stimulation der Zellen mit Inhibitoren des MAPK – Signalwegs.....	27
3.1.6	Zellfärbung mit Kristallviolett.....	27
3.2	Durchflusszytometrie.....	28
3.2.1	Zellzyklusanalyse mit BrdU-Markierung und PI-Färbung.....	29
3.2.1.1	BrdU- Markierung.....	29
3.2.1.2	BrdU- Detektion und PI-Färbung.....	30
3.2.2	CFSE-Lebendfärbung.....	30
3.3	Genexpressionsanalysen	31
3.3.1	Western Blot.....	31
3.3.1.1	Herstellung der Proteinlysate	31
3.3.1.2	Proteinquantifizierung.....	32
3.3.1.3	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS- PAGE)	32
3.3.1.4	Proteintransfer	33
3.3.1.5	Proteindetektion	34

3.3.1.6	Immundetektion	34
3.3.1.7	Entfernung von Antikörpern (<i>Stripping</i>).....	34
3.3.2	Quantitative Echtzeit- PCR	35
3.3.2.1	Herstellung der RNA-Lysate.....	35
3.3.2.2	RNA-Isolation	35
3.3.2.3	Reverse Transkription	36
3.3.2.4	Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR	37
3.3.2.5	Quantifizierung.....	38
3.4	Migrationsanalyse mittels <i>Cell-Tracking</i>	38
3.5	Statistik	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Aktivierungszustand von ERK5 bei Hemmung des MAPK-Signalwegs.....	40
4.1.1	Induktion von ERK5- Phosphorylierung durch MEKi- Behandlung NRAS- mutierter Melanomlinien	40
4.1.2	Auswirkung pharmakologischer ERK5- Hemmung auf Zellzyklusprogression und Apoptose in NRAS-mutierter Melanomlinie	44
4.1.3	Die Rolle von ERK5 in BRAF-mutierten Melanomlinien	46
4.1.4	Zusammenhang zwischen ERK1/2- Aktivität und ERK5- Phosphorylierung 51	
4.1.5	Auswirkung einer ERK5- Hemmung auf die Zellproliferation im Langzeitverlauf in NRAS- mutierter Melanomlinie.....	52
4.2	Zellmorphologie und Zellmigration unter ERK5- Inhibition	54
5	Diskussion	57
5.1	ERK5- Aktivierung in Melanomzellen durch Inhibition des MAPK- Signalwegs 57	
5.2	Rolle von ERK5 in der Tumorgenese des malignen Melanoms.....	61

5.3	MEKi/ERK5i- Synergismus als Angriffspunkt in der zielgerichteten Melanomchemotherapie.....	64
5.4	Ausblick: Eventuelle Problematik in der therapeutischen Anwendung - Offene Fragen und Ansätze	67
6	Zusammenfassung.....	72
7	Abstract	74
8	Literaturverzeichnis.....	76
	Publikation.....	85
	Danksagung	86
	Curriculum vitae	88
	Eidesstattliche Erklärung	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle nach Geschlecht in Deutschland 1999 – 2016/2017 und Prognose der Inzidenz bis 2020.....	2
Abbildung 2: Signalwege in der Tumorgenese des malignen Melanoms	4
Abbildung 3: MAPK- Signalwege in Säugetierzellen.....	8
Abbildung 4: Struktur und Aktivierungsmechanismus von ERK5	9
Abbildung 5: ERK5 und seine Eigenschaften in der Tumorgenese	12
Abbildung 6: Basale ERK5- Aktivität in NRAS- mutierten Melanomlinien.....	13
Abbildung 7: Aufbau Western Blot.....	33
Abbildung 8. Schematische Darstellung der Schritte der reversen Transkription	37
Abbildung 9: ERK5-Aktivierung durch Mek1/2-Inhibition in BLM.....	42
Abbildung 10: Kombinationsbehandlung mit ERK5-Inhibition verstärkt zelltoxischen Effekt einer Mek1/2-Inhibition in BLM und unterdrückt die Expression des ERK5-Effektorproteins KLF2	44
Abbildung 11: Zellzyklusanalyse unter ERK5- und MEK1/2- Inhibition in FM79	46
Abbildung 12: Basale ERK5-Aktivität in BRAF-mutierten Melanomlinien	47
Abbildung 13: ERK5-Aktivierung durch Mek1/2 Inhibition in BRAF-mutierten Melanomlinien.....	47
Abbildung 14: Keine ERK5-Aktivierung unter BRAF-Monoinhibition.....	48
Abbildung 15: Kein synergistischer antiproliferativer Effekt eine Kombination aus BRAF- und ERK5- Inhibition in A375	49
Abbildung 16: Keine ERK5-Aktivierung unter BRAF-Einzelbehandlung im Zeitverlauf	49
Abbildung 17: ERK5-Aktivierung unter BRAF/MEK1/2-Inhibitor Doppelbehandlung50	
Abbildung 18: ERK5-Aktivierung bei Erk1/2-Inhibition in Melanomlinien.....	51
Abbildung 19: Doppelbehandlung aus ERK1/2- und ERK5- Inhibition hat synergistischen antiproliferativen Effekt in BLM.....	52
Abbildung 20: Proliferation unter ERK5/Mek1/2-Doppelbehnadlung im Langzeitverlauf	54
Abbildung 21: ERK5-Inhibition steigert Zellmigration und verändert Zellmorphologie	56

Abbildung 22: Wachstumskurven von Melanomen mit NRAS- Mutation im Mausmodell unter MEK1/2- +/- ERK5- Inhibition.....	66
Abbildung 23: Chemische Struktur von XMD 08-92 und BIX02188	68
Abbildung 24: Überblick über die Rolle des MEK5/ERK5- Signalwegs in der Tumorgenese des malignen Melanoms	72
Figure 25: Overview concerning the MEK5/ERK5 pathway and its role in tumorigenesis	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Klassifikationen des malignen Melanoms [3-5].	1
Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Hersteller	15
Tabelle 2: Eingesetzte Chemikalien mit Hersteller	15
Tabelle 4: Verwendete adhärenz Zelllinien mit zugrundeliegenden, aktivierenden Mutationen.....	18
Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen für Western Blot mit Zusammensetzung	19
Tabelle 6: Zusammensetzung der Laufgele und des Sammelgels.....	20
Tabelle 8: Verwendete Puffer für Zelllysate mit Zusammensetzung	20
Tabelle 9: Verwendete Puffer und Lösungen für BrdU-Zellmarkierung und PI-Zellfärbung mit Zusammensetzung	21
Tabelle 10: Verwendete Lösungen für Zellfärbung mit Zusammensetzung	21
Tabelle 11: Verwendete Primärantikörper mit Hersteller	21
Tabelle 12: Verwendete Sekundärantikörper mit Hersteller	22
Tabelle 13: Verwendete Primer mit Sequenz und Hersteller	22
Tabelle 14: Verwendete Reagenziensätze mit Hersteller	22
Tabelle 15: Verwendete Geräte mit Hersteller	23
Tabelle 16: Verwendete Software mit Hersteller	24

Abkürzungsverzeichnis

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
AMP	Adenosin-Monophosphat
ANT	Adenin-Nukleotid-Translokase
ATP	Adenosintriphosphat
BMK1	<i>Big mitogen activated kinase 1</i>
bp	Basenpaare
BRD	Bromodomäne
BSA	Bovines Serumalbumin
Cdc37	<i>Cell division control protein 37</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	mittels Reverse Transkriptase synthetisierte DNA
Ctrl	<i>Control</i> (Kontrolle)
ddH ₂ O	demineralisiertes Wasser (vollentsalzt)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DUSP4	<i>Dual specificity protein phosphatase 4</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELB	<i>EIA lysis buffer</i>
EMT	epitheliale-zu-mesenchymale Transition
ERK5	<i>Extracellular-signal-regulated kinase 5</i>
EtOH	Ethanol
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (dt. Fetales Kälberserum)
FDPS/ FPPS	Farnesyldiphosphatsynthetase/ Farnesylpyrophosphatsynthetase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)

Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
IGF-1	<i>Insulin-like-growth-factor-1</i>
IGFR-1	<i>Insulin-like-growth-factor-receptor-1</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KG	Körpergewicht
KLF 2/4	<i>Krüppel-like-factor 2/4</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEK5 (MAPKK)	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 5</i>
MET	mesenchymale-zu-epitheliale Transition
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MW	Molekulargewicht (<i>Molecular weight</i>)
ng	Nanogramm
NLS	<i>Nuclear localisation signal</i>
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
PDGFR β	<i>Platelet-derived growth factor receptor beta</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death protein 1 ligand</i>
pg	Pikogramm
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PML	<i>Promyelocytic leukemia protein</i>
pRB	Retinoblastom-Protein
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTase	Reverse Transkriptase

RTK	Rezeptortyrosinkinase
s.	siehe
s.	siehe
s.o	siehe oben
s.u	siehe unten
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (Tris-HCL)
TBST	TBS mit Zusatz von Tween
TEMED	N,N,N,N-Tetraethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
u.a	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UACC-257	University of Arizona Cell Culture-257
UACC-62	University of Arizona Cell Culture-62
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

1 Einleitung

1.1 Das maligne Melanom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das maligne Melanom gehört mit den keratinozytären Tumoren und den Merkelzellkarzinomen zu den epidermalen Hautkrebsarten. Neben kutanen Basalzellkarzinomen (~80%) und Plattenepithelkarzinomen (~16%) macht das Melanom mit ~4% einen vergleichsweise geringen Prozentsatz aus [1]. Obwohl die Tumore keratinozytären Ursprungs für den größten Anteil neudiagnostizierter Erkrankungen verantwortlich sind, ist das maligne Melanom die am häufigsten tödlich verlaufende Hauterkrankung (~75%) [2]. Es ist damit als der aggressivste und fatalste Tumor der Haut anzusehen. Melanozyten, aus denen sich das Melanom entwickelt, sind pigmentproduzierende Zellen des Neuroektoderms, die in der Haut, der Iris und des Anus zu finden sind. Die kutane Form des malignen Melanoms tritt am häufigsten auf. In Tabelle 1 ist ein kurzer Überblick der kutanen Melanomformen zusammengestellt.

Tabelle 1: Klinische Klassifikationen des malignen Melanoms [3-5].

	Häufigkeit	Besonderheiten
Superfiziell spreitendes Melanom	~70%	Relativ langsames Wachstum
Noduläres Melanom	~5%	Schnelles vertikales Wachstum, höhere Metastasierungsrate, oft ulzeriert
Lentigo-maligna Melanom	4-15%	Sehr langsames Wachstum, Melanom des Alters
Akral lentiginöses Melanom	5%	Melanom des alten, weiblichen Patienten, betrifft das Nagelbett
Desmoplastisches Melanom	2%	In 2/3 der Fälle amelanotisch, schwer zu detektieren, höchst invasiv, neigt zu perineuraler Infiltration

In Deutschland gehört das maligne Melanom aktuell zu den fünf führenden Tumorarten aller Krebsneuerkrankungen und rangiert bei Männern an fünfter und bei Frauen an vierter Stelle [6]. Die Inzidenz fällt weltweit unterschiedlich aus, jedoch fand über das

Einleitung

letzte Jahrzehnt ein ubiquitärer, stetiger Anstieg statt, der die Anzahl neuauftretener Tumore anderer Entitäten übersteigt [7, 8]. Studien prognostizieren außerdem, dass die Zahl der Patienten mit neudiagnostiziertem Melanom über die nächsten Jahrzehnte weiter steigen wird (s. Abbildung 1) [9].

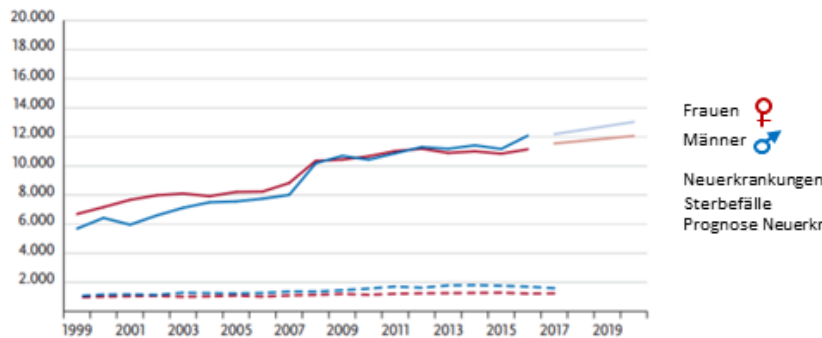


Abbildung 1: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle nach Geschlecht in Deutschland 1999 – 2016/2017 und Prognose der Inzidenz bis 2020

Dieses Diagramm, veröffentlicht durch das Robert-Koch-Institut, zeigt die Anzahl der Neuerkrankungen und Sterbefälle des malignen Melanoms je nach Geschlecht von 1999-2016/2017. Außerdem gibt es einen prognostischen Ausblick. (modifiziert aus dem Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016 des Robert Koch-Instituts [6])

Momentan liegt die Anzahl globaler Neuerkrankungen bei 15-25 pro 100.000 Einwohner pro Jahr, wobei die Inzidenz in Australien mit 50 pro 100.000 Einwohner deutlich von diesem absoluten Wert abweicht [10]. Im Gegensatz zu anderen Krebserkrankungen liegt das mediane Alter bei Diagnosestellung bei 57 und damit deutlich vor dem Erkrankungsgipfel von Brust-, Lungen- oder Darmkrebs [11]. Der kumulative Lebenszeitverlust ist verglichen mit sonstigen Tumorentitäten um ein Vielfaches höher [12].

Das maligne Melanom ist eine multifaktorielle Erkrankung bei dessen Entstehung genetische Instabilität und Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Der Hauptrisikofaktor für die Tumorentstehung ist die UV- Exposition [13, 14]. Dabei erhöht nicht nur die regelmäßige, z.B. berufliche Sonnenbelastung, sondern auch eine intermittierende Exposition durch Sommerurlaub oder Sonnenbank das Risiko erheblich. Nicht zwingend muss es dazu zu einer Verbrennung der Haut im Sinne eines Sonnenbrands gekommen sein [15, 16]. Besonders gefährdet sind Menschen, die in ihrer Kindheit vermehrter Sonneneinstrahlung ausgesetzt waren. Ebenfalls mit einem erhöhten Risiko assoziiert ist eine weiße, helle Hautfarbe (Hauttyp I/II), das männliche Geschlecht und melanozytäre Naevi, die durch Sonnenexposition oder genetische Mechanismen angeboren oder

erworben sind [3]. Zudem gehen eine Anzahl von >100 Naevi oder eine Zunahme in Größe oder Asymmetrie mit einer signifikanten Erhöhung des Tumorrisikos einher [11].

1.1.2 Pathogenese

Die Pathogenese des malignen Melanoms unterliegt einem Prozess aus exogenen und endogenen Faktoren. UV-Strahlung führt entweder über eine direkte DNA-Schädigung oder als sekundäres Mutagen [11] zu einem Verlust einer physiologischen Zellregulation. 90% der kutanen Melanome sind sporadischen Ursprungs mit Mutationen im RAS/RAF/MEK/ERK MAPK (mitogen-activated protein kinase)-Signalweg, die dort vor allem die Onkogene *NRAS* (~20%) und *BRAF* (~50-60%) betreffen und in den meisten Fällen zu den aktivierenden Mutationen *BRAF* V600E oder *NRAS* Q61K/L führen. Durch diese Genveränderungen kommt es zu einer konstitutiven Aktivierung dieses RAS/RAF/MEK/ERK-MAPK-Signalwegs, der sich auf die Regulation von Zellzyklusprogression und Apoptose entscheidend auswirkt [1]. Daraus resultiert, dass im Melanom die RAS/RAF/MEK/ERK MAPK-Kaskade als der Signalweg mit der größten therapeutischen Relevanz betrachtet werden kann. Einen anderen Regulationsweg stellt der PI3K-AKT-PTEN-Signalweg dar, der durch Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) aktiviert und durch die Phosphatase PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog) antagonisiert wird. Ein Verlust oder eine Überexpression von steuernden Bestandteilen dieses Signalwegs führt ebenfalls zu einer Fehlregulation von zellulären Prozessen und wirkt prokanzerogen [17]. Des Weiteren ist das maligne Melanom imstande, direkt die Immunantwort des Menschen zu beeinflussen, indem Melanomzellen den Liganden PD-L1 (*programmed cell death protein 1 ligand 1*; offizieller Genname *CD274*) exprimieren. Der korrespondierende Rezeptor PD-1 (*programmed cell death 1*; offizieller Genname *PDCD1*) befindet sich auf T-Zellen, B-Zellen und Natürlichen Killerzellen. Durch Bindung von PD-L1 an PD-1 wird die Immunantwort gehemmt. Die T-Zell-Antwort wird durch den Tumor ausgebremst und dadurch eine adäquate Reaktion des Körpers unterdrückt [18].

Neben den sporadisch auftretenden Melanomerkrankungen findet ein kleinerer Anteil der Tumorentstehung seinen Ursprung in Keimbahnmutationen (~8%) [11], die in Familien mit positiver Melanomanamnese in vielen Fällen zu finden sind und das individuelle Risiko erhöhen [3, 19]. Die größte genetische Prädisposition für die Entstehung eines malignen Melanoms geht dabei von einer hereditären Mutation im *CDKN2A*- (cyclin-

Einleitung

dependent kinase inhibitor 2A) Gen aus und ist bei ~40% der Patienten mit positiver Familienanamnese zu finden. Diese Mutation führt zu einem Funktionsverlust der vom *CDKN2A* Genlocus codierten Proteine p16 und p14 und somit zu der Inaktivierung der Tumorsuppressorproteine pRB (Retinoblastom-Protein) und p53. Es kommt zum Verlust zweier wichtiger Regulationsproteine der G1-S Zellzyklusprogression und zu einer unkontrollierten Zellproliferation [11, 17, 20] (Abbildung 2).

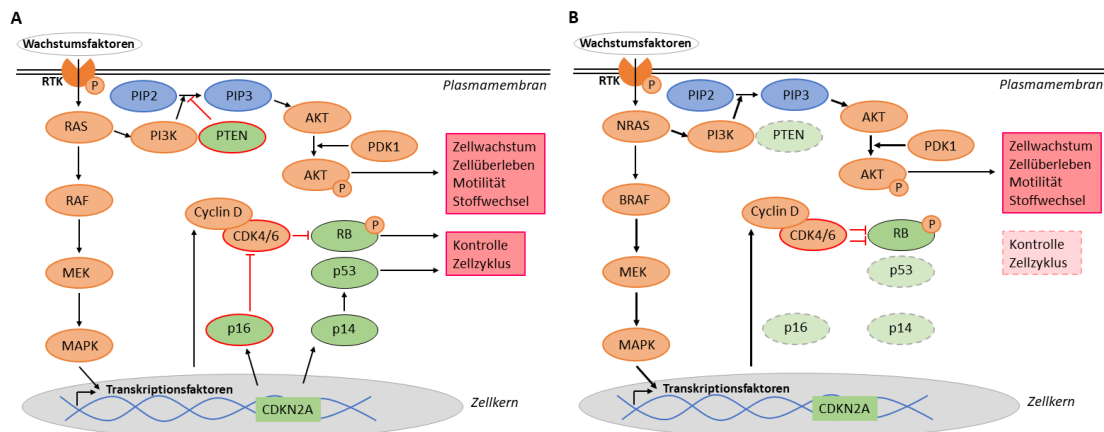


Abbildung 2: Signalwege in der Tumorgenese des malignen Melanoms

A zeigt die Abläufe der MAPK- und der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) / AKT- vermittelten Signalwege, wie sie unter normalen Umständen auf zellulärer Ebene ablaufen, und so zelluläre Prozesse wie Proliferation und Zellzyklusprogression kontrollieren. Bei genetischen Mutationen kommt es zu einer konstitutiven Signalwegaktivierung und einem Verlust von Supressorgenen (B)

Abkürzungen: CDK: Cyclin-dependent kinase; MEK: MAP/ERK kinase; P (rot eingekreist): Phosphat; PDK1: 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; PIP2: phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate; CDKN2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; PIP3: phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate; PTEN: Phosphatase und Tensin Homolog; RB: retinoblastoma-associated protein; RAF: serine/threonine-protein kinase RAF; RAS: GTPase RAS; RTK: receptor tyrosine kinase (angelehnt an Schadendorf et al. 2015 [11]).

1.1.3 Therapie

Der kurative Ansatz in der Melanomtherapie ist die chirurgische R0-Resektion (Resektionsrand ohne histopathologischen Tumornachweis) des Tumors. Bei fortgeschrittenen, metastasierten Stadien reicht diese Strategie jedoch nicht aus und es gab in diesem Fall lange keine erfolgversprechenden Therapieoptionen.

Die konstitutive und somit wachstumsfaktorunabhängige Aktivierung des RAF/MEK/ERK MAPK- Signalwegs ist wegen seiner großen Bedeutung in der Tumorgenese des malignen Melanoms ein Hauptangriffspunkt zielgerichteter Therapieansätze (*targeted therapy*) und Basis der klinischen Forschung und Entwicklung in den letzten Jahren. Während Patienten vor einem Jahrzehnt im metastasierten Stadium mit einer mittleren Überlebensaussicht von ~9 Monaten konfrontiert waren [21], gelang

Einleitung

es durch die Entwicklung von Inhibitoren, die gezielt diesen MAPK- Signalweg hemmen, das Langzeitüberleben zu verbessern. Zu diesen zielgerichteten Therapien (eng. *targeted therapy*) gehören u.a. die zugelassenen BRAF- Inhibitoren (BRAFi) Vemurafenib, Dabrafenib oder Encorafenib und die MEK1/2- Inhibitoren (MEKi) Trametinib, Cobimetinib und Binimetinib [22]. Zur gleichen Zeit wurde der gegen das Protein CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) gerichtete Antikörper Ipilimumab zugelassen. CTLA-4 wird exklusiv auf T-Zellen exprimiert und vermittelt ein hemmendes Signal, um eine Überreaktion des Immunsystems zu vermeiden. Zusammen mit den gegen PD-1 gerichteten Antikörpern Nivolumab und Pembrolizumab verkörpert der CTLA-4- Antikörper die Grundzüge der Immuntherapie des Melanoms. Durch die Antikörpertherapien wird das Immunsystem sensibilisiert und eine Immunantwort zur Bekämpfung des Tumors provoziert. Unter der Immuntherapie konnten in klinischen Studien längere, progressionsfreie Intervalle als in unbehandelten Tumoren erreicht werden [23]. Das Therapieansprechen liegt in mehreren Studien jedoch zusammengefasst bei lediglich 20- 45% für PD1- Antikörper und fällt für Ipilimumab noch geringer aus (11- 20%) [21, 23, 24]. In Kombination spricht die aktuelle Studienlage von einer Ansprechrates von immerhin ~ 58% [24]. Neben immuntherapeutischen Therapien sind auch die RAF/MEK/ERK- zentrierten Therapieansätze von immenser Bedeutung. Mit einer schnellen, hohen Ansprechrates (~70%) und milden Nebenwirkungsprofilen [21] profitieren vor allem fortgeschrittene BRAF- mutierte Melanome signifikant von einer dualen BRAFi/MEKi- Therapie. Eine Kombinationstherapie von BRAF- Inhibition und MEK1/2- Hemmung wurde bei fortgeschrittenen Melanomen mit BRAF- Mutation daher schnell zu der klinischen Standardtherapie und kann die Tumorprogression verlangsamen und einen Langzeitüberlebensvorteil sichern [25, 26].

Ein Drittel der Patienten leidet zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits unter einem schnell voranschreitenden, multifokalen Tumor [21]. Dabei begünstigen BRAF oder NRAS Mutationen den Metastasierungsprozess [27]. Ein multimodales Therapiekonzept aus Chirurgie, Radiatio und Chemotherapie ist nötig. Von Bedeutung ist die Etablierung von synergistischen Therapieoptionen ohne synergistische Toxizität [21]. Das Ziel sollte die Sicherung des Langzeitüberlebens mit menschenwürdiger Lebensqualität sein. Um dieses Vorhaben zu erreichen, ist es wichtig, die Wirkungsweise der bereits verwendeten, gezielten Melanomtherapien besser zu verstehen, um eventuelle Mängel zu beseitigen

und neue Ansätze zu schaffen. Dabei besteht bei den angesprochenen BRAF/MEK zentrierten Therapieansätzen die größte therapeutische Herausforderung in der Vermeidung erworbener Therapieresistenz.

1.1.4 Resistenzmechanismen auf BRAFi/ MEKi- Therapie

Die Entwicklung von Tumorresistenzen ist das Hauptproblem in der Therapie des malignen Melanoms. Dies gilt insbesondere für die *targeted therapies*, bei denen bei Langzeitanwendung fast unweigerlich eine Behandlungsresistenz eintritt. Dabei herrscht eine große Heterogenität innerhalb der Resistenzbildung, was eine langfristige, erfolgreiche Therapie erschwert. Das maligne Melanom hat zudem den höchsten Grad an Mutationen innerhalb des Zellgenoms unter allen Tumoren [11, 28], was ein Therapieversagen weiter begünstigt.

Es sind bereits einige Resistenzmechanismen bekannt, die primär bestehen oder sekundär entstanden sein können. Eine Therapieresistenz für BRAFi wird häufig durch Reaktivierung der MAPK- Kaskade über verschiedene Wege erreicht [29-31]. Sekundäre Überexpression von Tyrosinkinaserzeptoren [z.B PDGFR β (*Platelet-derived growth factor receptor beta*) oder EGFR (*Epidermal growth factor receptor*)] und sekundär erworbene Mutationen von RAS, CRAF oder MEK wurden unter BRAF- Mono- und MEK- Kombinationstherapie in BRAF- mutierten Melanomzellen beobachtet. Oft werden in fortgeschrittenen Stadien in den Metastasen molekulargenetisch andere Mutationen als im Primärtumor nachgewiesen, was die Komplexität der Tumorbiologie ausdrückt [27]. Außerdem fand man molekulargenetisch in Patienten, die nach erstem Therapieansprechen rückfällig wurden, *Splice*- Varianten von BRAF V600E [32]. Interessanterweise wurde außerdem eine paradoxe BRAF-Aktivierung unter BRAFi gezeigt [33, 34]. Als Konsequenz dieser aufgezeigten Mechanismen kommt es nach initialem Ansprechen in den meisten Fällen zu einer Tumorprogression unter BRAF/MEK- Inhibitor- Therapie [28].

In <10% sind intrinsische Resistenzen für ein schlechtes Therapieansprechen ursächlich. Dabei spielen vor allem der Verlust oder die Fehlregulation von pRB oder PTEN eine Rolle [30]. Ein gleichzeitiges Auftreten einer BRAF- Mutation und eines Funktionsverlustes von PTEN geht mit einem schlechten Therapieansprechen und einem kürzeren, rezidivfreien Intervall einher [35].

NRAS Mutationen sind generell mit einer schlechteren Prognose assoziiert als andere genetische Aberrationen. Patienten mit NRAS- mutierten Melanomen profitieren auffallend weniger von der Kombination aus BRAF- und MEK1/2- Inhibition. Ursache dafür ist zum einen, dass die klinisch eingesetzten Inhibitoren spezifisch für das aktivierte BRAF V600 sind und nicht auf das endogene BRAF wirken. BRAF- und NRAS- Mutationen schließen sich aber in der Regel aus, so dass praktisch alle NRAS- Tumoren BRAF- Wildtyp (WT) sind und somit die BRAF- Inhibitoren keine Wirkung zeigen [11, 27]. Außerdem kann die Aktivierung des MAPK- Signalwegs in NRAS- mutierten Melanomzellen alternativ über CRAF vermittelt werden, was ebenfalls ein mangelndes BRAFi- Ansprechen erklärt [30]. Zum anderen zeigen NRAS-mutierte Melanomzellen eine höhere Rate an intrinsischer oder erworbener MEK-Inhibitor-Resistenz [36] und sind dazu fähig, Thyrosinkinaserzeptoren wie PDGFR β und EGFR schneller an der Zelloberfläche herauf zu regulieren [28]. Der PI3K/AKT-Signalweg ist neben der MAPK- Kaskade ebenfalls für die Zellproliferation und das Zellüberleben verantwortlich und kann daher im Sinne eines Umgehungskreislaufes als Vermittler einer Tumorresistenz dienen [37]. Er wird entweder über sekundäre Mechanismen unter MAPK-Inhibition oder direkt durch NRAS aktiviert [28]. Für Patienten mit NRAS- Mutation steht daher einzig und allein die Immuntherapie als vergleichsweise einzig effektive und langfristig wirksamere Behandlungsoption zur Verfügung. Dies gilt ebenso für Patienten mit primärer oder sekundärer BRAF/MEK-Inhibitor-Resistenz bei BRAF- Mutation.

Stellt sich jedoch ein Versagen der Immuntherapie ein, oder kann sie bei Patienten mit chronischen Erkrankungen oder Autoimmunbeschwerden aufgrund von erheblichen Nebenwirkungen nicht angewandt werden [23], fehlt es momentan an Behandlungsoptionen. Deshalb sind insbesondere neue zielgerichtete Therapieansätze, die Resistenzmechanismen aufgreifen von großer Bedeutung.

1.2 Der MEK5/ERK5- Signalweg

JNK (c-Jun N-terminale Kinase), p38, ERK1/2 und ERK5 sind die vier bekannten Vertreter der MAPK-Familie [38]. Während eine Dysregulation verschiedener MAP- Kinasen schon lange als Induktor der Tumorgenese bekannt ist, wurde dem MEK5/ERK5- Signalweg (*mitogen-activated protein kinase kinase 5/extracellular signal-regulated kinase 5*) erst in den letzten Jahren eine Bedeutung in der Entstehung

Einleitung

von Tumoren zugewiesen. Stress und Wachstumsfaktoren wie EGF, IGF-1 (*Insulin-like-growth-factor-1*) oder PDGF β können diesen Enzympfad aktivieren (Abbildung 3). Durch die extrazellulären Stimuli kommt es über Zwischenschritte zu einer Phosphorylierung von MEK5 an den Aminosäuren Serin311 und Threonin315. MEK5 ähnelt der MEK1/2-Kinase, ist aber die einzige MAP-Kinase, die ERK5 direkt aktivieren kann, bedingt durch ein spezifisches Interaktionsmotiv [39]. ERK5 ist wiederum eng mit ERK2 verwandt und stimmt zu 66% mit der Aminosäuresequenz dieser Kinase überein [40].

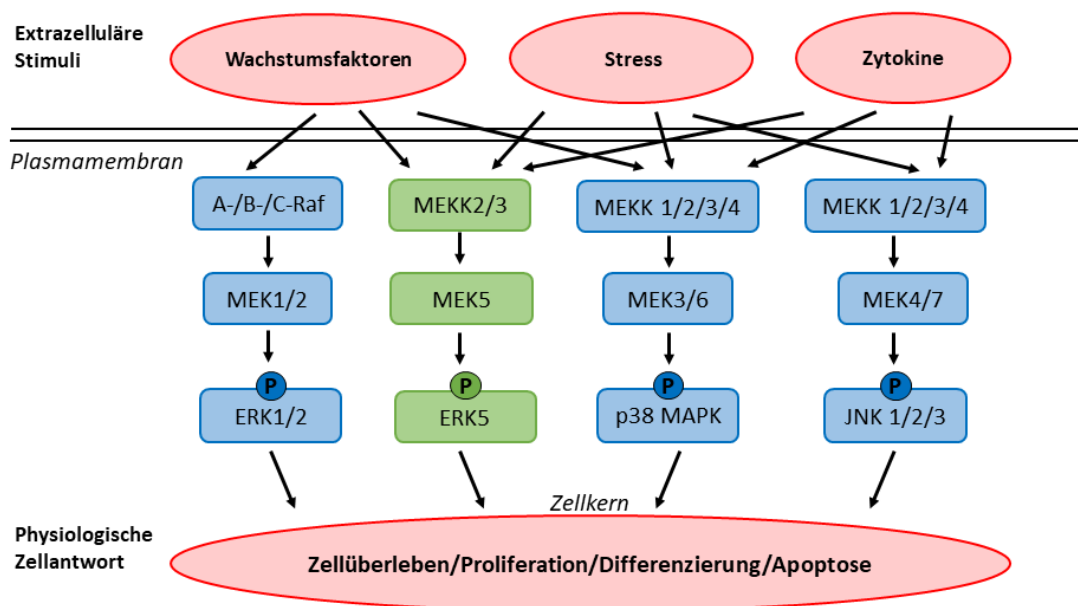


Abbildung 3: MAPK- Signalwege in Säugetierzellen

Dieses Schaubild bietet einen Überblick über die verschiedenen MAPK-Signalwege. Es stellt die unterschiedlichen extrazellulären Stimuli und Zwischenschritte einer Aktivierung dar und beschreibt die Aspekte der Zellantwort.

Darüber hinaus grenzt sich ERK5 jedoch durch eine einzigartige Struktur von anderen MAP-Kinasen ab. Nicht ohne Grund war ERK5 lange als BMK1 (*big mitogen activated kinase 1*) bekannt. Eine deutliche C-terminale Verlängerung verleiht der Kinase ungefähr das doppelte, molekulare Gewicht, verglichen mit anderen MAPKs. Innerhalb dieser C-terminalen Domäne befindet sich eine außergewöhnliche Transkriptionsaktivierungsdomäne. MEK5 phosphoryliert ERK5 an der dafür vorgesehenen Kinasedomäne und führt zu einer Autophosphorylierung der Kinase am C-Terminus. Dadurch kommt es zu einer Entfaltung des Proteins, wodurch eine Signalsequenz freigelegt wird, die die Zellkernlokalisierung vermittelt. Nach der Aktivierung kommt es zu einer Translokation in den Nukleus, wo ERK5 direkt Einfluss

Einleitung

auf transkriptionelle Prozesse nimmt, indem Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung oder durch Interaktion mit dem C-Terminus aktiviert werden [40-42]. Obwohl die MEK5-abhängige Phosphorylierung als Hauptaktivierungsmechanismus betrachtet wird, wurde mittlerweile auch eine MEK5-unabhängige Aktivierung über Cyclin-abhängige Kinasen beschrieben [43]. Des Weiteren sollen andere Prozesse, die unabhängig von einer C-terminalen Phosphorylierung sind, über das Onkogen Cdc37 (*cell division-cycle 37*) für eine nukleäre Translokation von ERK5 verantwortlich sein [44]. Zusammen mit dem Chaperon Hsp90 (*heat shock protein 90*) und ERK5 bildet Cdc37 normalerweise einen Komplex, in dem inaktives ERK5 im Zytoplasma stabilisiert wird und in einer Formation verharrt, in der das Protein von MEK5 erkannt werden kann (Abbildung 4).

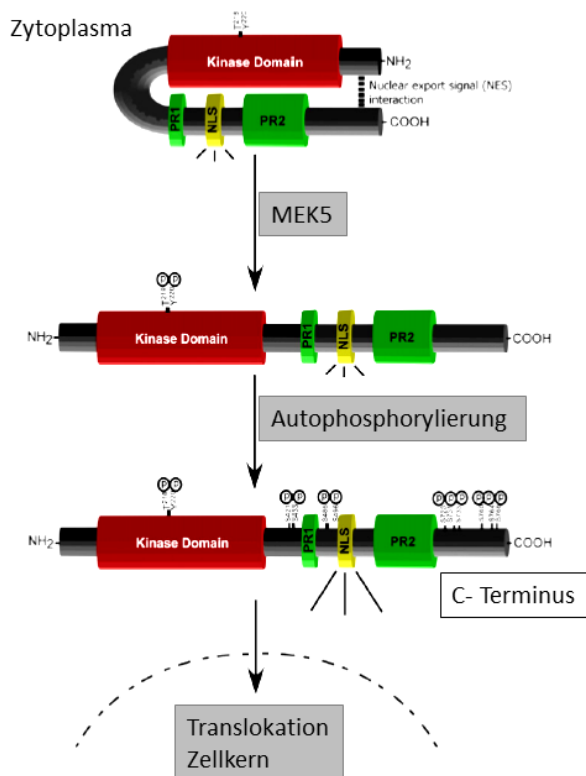


Abbildung 4: Struktur und Aktivierungsmechanismus von ERK5

In diesem Schaubild ist die zytosolische Konstellation von ERK5 dargestellt. Das Flussdiagramm zeigt die Entfaltung der Kinase bei Phosphorylierung (P) durch MEK5 und die anschließende Autophosphorylierung am C-Terminus. Es erfolgt die Freilegung einer Signalfrequenz (NLS: *nuclear localisation signal*), die den Transport in den Zellkern induziert (modifiziert nach Nithianandarajah-Jones et al. 2012 [40]).

1.2.1 Rolle von ERK5 in der Tumorgenese

Der MEK5/ERK5-Signalweg reguliert diverse zelluläre Prozesse wie Proliferation, Zellüberleben, Differenzierung und Apoptose [39]. Physiologisch hat ERK5 Einfluss auf die neuronale Differenzierung und eine normale Gehirnentwicklung, sowie die Angiogenese und Funktion der Endothelzellen während der Embryogenese. So waren Embryos von ERK5-knock-out Mäusen nicht lebensfähig und starben innerhalb weniger Tage. Postletal zeigten sie eine cerebrale Wachstumsretardierung, abnormale Blutgefäße und multiple Hämorrhagien [45]. Auch in adulten Mäusen konnte diese Störung der vaskulären Integrität aufgrund von endothelialer Apoptose bei ERK5- Deletion nachgewiesen werden [46].

Sowohl in neuronalen und endothelialen Zellen als auch in Tumorzellen besitzt ERK5 zytoprotektive Eigenschaften [39, 40, 42]. Die Funktion in der Tumorgenese erlangt ERK5 über eine Überexpression, während direkte Mutationen der Kinase selten sind [42]. Im Zellkern steuert ERK5 die Transkription verschiedener Zielgene, die den Zellzyklus, das Zellüberleben und die Proliferation regulieren. Diesbezüglich wurden verschiedene Mechanismen diskutiert und publiziert [44]. Durch die transkriptionelle Aktivierung von MEF2C über ERK5 wird die Transkription des Proteins c-Jun induziert [47]. C-Jun ist ein wichtiger Faktor für die Zellproliferation und ein Protoonkogen. Der Transkriptionsfaktor PML (*promyelocytic leukemia protein*) dient als Tumorsuppressor. ERK5 interagiert im Nukleus von Tumorzellen mit PML und inhibiert seine antiproliferativen Eigenschaften [48]. So ist es den Zellen möglich, von der G1- Phase in die S-Phase überzugehen und somit ungehindert zu proliferieren. Diese Funktion wird zudem durch eine Induktion von Cyclin-D1 erreicht [49]. ERK5- Überexpression führt ferner zu einem erhöhten Mitoseindex, indem durch eine transkriptionelle Interaktion mit NF- κ B ein G2/M-Übergang geschaffen wird [50]. Außerdem sichert ERK5 das Zellüberleben während der Mitose durch Inaktivierung des proapoptotischen Proteins Bim [51].

Neben der Induktion von adaptiven Resistenzmechanismen wie Zellüberleben, Proliferation und Umgehung von Apoptose wird für MEK5/ERK5 außerdem eine direkte Rolle im Metastasierungsvorgang postuliert. Metastasierung ist ein komplexer Prozess, bestehend aus Invasion, Migration, Zirkulation und Kolonisation an einer dem Primärtumor fernen Lokalisation. Die epitheliale-zu-mesenchymale Transition (EMT) ist

Einleitung

ein wichtiger Bestandteil der Tumorverschleppung und soll direkt durch ERK5 reguliert werden, indem die Kinase die Transkription von epithelialen und mesenchymalen Faktoren beeinflusst [52]. Ob ERK5 eine induzierende oder eine inhibitorische Wirkung auf den Vorgang der EMT hat, hängt anscheinend von der Tumorentität ab [53-55]. Dabei ist zu erwähnen, dass die EMT während des Metastasierungsprozesses fließend in seinen Gegenspieler MET (mesenchymale-zu-epitheliale Transition) übergeht und beide Komponenten essenziell für die Ausbreitung eines Tumors sind [56, 57]. Inwiefern MEK5/ERK5 diese Plastizität in Tumorzellen beeinflusst, wird aktuell kontrovers diskutiert. Belegt ist ein erhöhtes Metastasierungsrisiko in Prostata-, Brust-, Kolon-, Nieren- und Knochenkrebs in Anwesenheit von aktivem ERK5 [39]. Des Weiteren ist eine Überexpression und Aktivität von ERK5 mit einer schlechteren Prognose, einem kürzeren rezidivfreien Intervall, sowie einer dargelegten Chemoresistenz in diversen Tumorentitäten assoziiert. Im Prostatakarzinom korreliert ein erhöhter ERK5-Spiegel mit dem Auftreten von Knochenmetastasen und einem ungünstigerem Gesamtüberleben [42, 58]. In chemotherapeutisch vorbehandelten Brustkrebszellen wurde ein erhöhter ERK5-Spiegel gefunden, was mit einer Therapieresistenz verbunden war und zu einer sekundären Tumorprogression führte [59, 60]. Auf der anderen Seite gab es Hinweise, dass Her2-positive Mammakarzinome besser auf eine Kombinationstherapie aus Trastuzumab (Her2-Antikörper) und ERK5-Inhibition ansprechen als auf eine Antikörpermonotherapie [61]. In Dickdarmkrebszellen führte eine konstitutive Aktivierung von MEK5 zu einer Resistenz gegenüber dem Standardtherapeutikum 5-Fluoruracil (5-FU) [62] und zu einer Beschleunigung der Zellzyklusprogression und der Proliferation [63]. Auch in Pankreas-, Cervix- und Lungenkarzinomen resultierte eine verstärkte MEK5/ERK5- Aktivität in einem zunehmenden Tumorwachstum *in vivo*, während eine ERK5-Inhibition die Zellproliferation ausbremste [39, 64]. Die physiologische Rolle von MEK5/ERK5 in der Angiogenese impliziert überdies eine Auswirkung von ERK5 auf eine tumorassoziierte Neovaskularisation [65]. Ein weiterer wichtiger Punkt ist eine ERK5-vermittelte immunmodulatorische Wirkung, die die Immunantwort und die T- Zell- Differenzierung beeinflusst [66, 67].

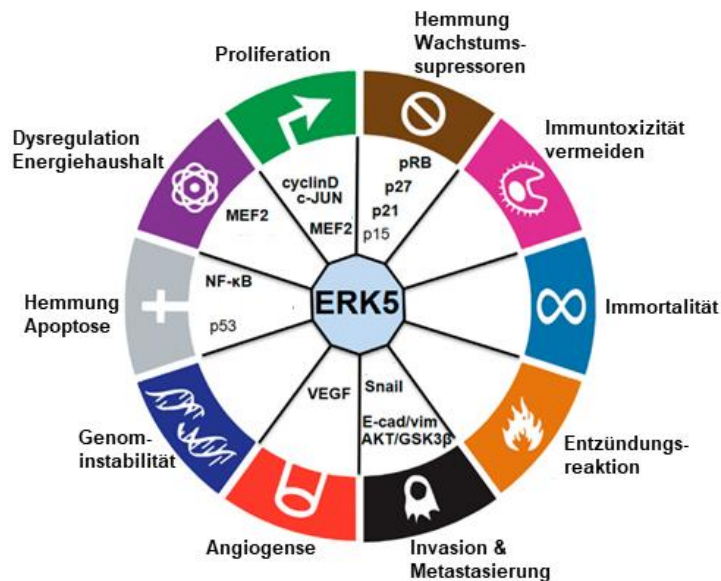


Abbildung 5: ERK5 und seine Eigenschaften in der Tumorgenese

Diese Abbildung gibt einen Überblick über die Rolle von ERK5 in der Tumorgenese und Faktoren, die in diesem Zusammenhang von ERK5 reguliert werden und dadurch zur Entstehung und Progression eines Karzinoms beitragen (adaptiert nach Stecca et al. 2019 [67])

Abkürzungen: NF-κB: *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*; E-cad: E-Cadherin; AKT=PKB: Proteinkinase B; GSK3β: *Glycogen synthase kinase 3 beta*

1.3 Rolle des MEK5/ERK5 Signalwegs im malignen Melanom

Interessanterweise brachten zuletzt publizierte Forschungsarbeiten neue Erkenntnisse über Therapieresistenzmechanismen in verschiedenen Tumoren mit RAS-Mutation. De Jong et al. konnten 2016 zeigen, dass in KRAS-mutierten Kolonkarzinomzellen eine MEK1/2-Inhibition durch eine Aktivierung von ERK5 kompensiert werden kann, und sich so eine Resistenz gegenüber MEKi entwickelte. Es kam zu einer Proliferation und Differenzierung von Kolonkarzinomzellen unter der Therapie [68]. Ein ähnliches Phänomen wurde in KRAS-mutierten Pankreaskarzinomzellen beschrieben [69]. Analog zu der Tumorgenese dieser Tumorentitäten findet das maligne Melanom seinen Ursprung zu einem großen Prozentsatz in einer Mutation der RAS-Familie wobei zu ~20% das NRAS-Gen betroffen ist [1, 11]. Ob eine ERK5-Aktivierung mit einer MEK1/2-Inhibitorresistenz in der Hautkrebsbehandlung einhergeht, ist aktuell unklar. Vor allem hinsichtlich melanotischer Tumore mit NRAS-Mutation liegen zugrundeliegende Mechanismen weitestgehend im Dunkeln. Dass ERK5 eine Rolle in NRAS-mutierten Melanomlinien eine Rolle spielt, konnte bereits durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe dargestellt werden (Abbildung 6). Bei ungefähr einem Drittel der untersuchten NRAS-mutierten Melanomlinien zeigte sich basal eine ERK5-Phosphorylierung. ERK5 könnte

Einleitung

somit in diesen Krebszellen für zelluläre Prozesse, die das Zellüberleben beeinflussen oder sogar in diesem Zusammenhang notwendig sind, verantwortlich sein.

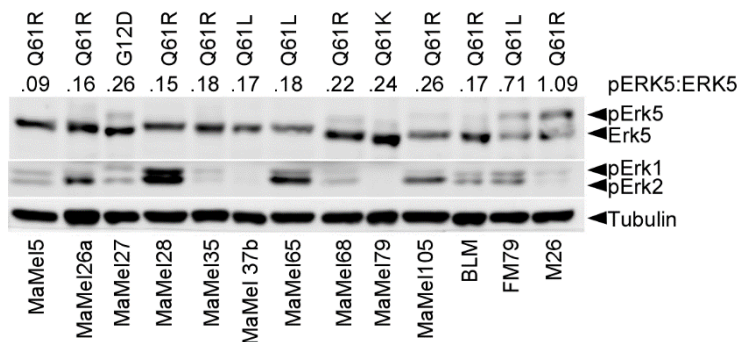


Abbildung 6: Basale ERK5- Aktivität in NRAS- mutierten Melanomlinien

Der Western Blot zeigt 13 unbehandelte Melanomlinien, die eine NRAS-Mutation aufweisen. Bei mehreren Linien konnte die Arbeitsgruppe bereits eine basale ERK5- Aktivität anhand eines Phosphorylierungsshifts im Western Blot beobachten. Die Relation von pERK5 zu ERK5 ist ebenso aufgeführt, wie die jeweilige genauer definierte NRAS- Mutation der einzelnen Zellreihen.

Bei weiteren 50-60% Patienten resultiert das maligne Melanom aus einer BRAF-Mutation [1]. Eine Standardtherapie aus BRAF/MEK-Inhibition hat sich für Patienten mit dieser Tumormutation über die letzten Jahre etabliert. Wie angesprochen stellt sich bei dieser Behandlungsstrategie nach initialem Erfolg jedoch häufig ein Therapieversagen ein [21, 30]. In BRAF-mutierten Melanomzellen, die resistent gegenüber einer Kombination aus BRAF/MEK- Inhibition waren, konnte eine kompensatorisch erhöhte MEK5/ERK5-Aktivität nachgewiesen werden [70]. Auch unter ERK1/2- Inhibition kam es in Melanomzellen mit BRAF- Mutation zu einer Aktivierung des MEK5/ERK5-Signalwegs über IGFR-1 (*Insulin-like-growth-factor-receptor-1*). Daraufhin stellte sich eine Resistenz gegenüber dem Pharmakon ein [71].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund einer heterogenen Resistenzbildung und einer komplexen Tumorbiologie ist die Therapie des malignen Melanoms an große Herausforderungen geknüpft. Individualisierte, auf den Patienten zugeschnittene Kombinationstherapien aus BRAF/MEK-Inhibition bei BRAFV600E- Mutation haben das Überleben vieler Patienten in fortgeschrittenen Stadien verbessert. Doch eine fortwährende Resistenzbildung erschwert eine langfristig erfolgreiche Behandlung. Insbesondere für Patienten mit einem NRAS- mutierten Melanom ist die Immuntherapie häufig die einzige Therapieoption. Allerdings kann diese zu erheblichen Nebenwirkungen und Einschränkung der Lebensqualität führen und ist mit einer bis dato ungeklärten Resistenzbildung assoziiert.

Während andere MAP-Kinasen wie ERK1/2 bereits weitestgehend studiert wurden, ist die Auswirkung von ERK5 auf zelluläre Prozesse in der Tumorgenese aktuell unzureichend verstanden. Ziel dieser Dissertation war es, die Rolle des MEK5/ERK5-Signalwegs als möglicher *Bypass* und Vermittler einer Therapieresistenz zu prüfen und seine Funktion als solcher besser zu verstehen. Dabei sollte untersucht werden, ob ERK5 unter Inhibition verschiedener MAPK-Komponenten einen adaptiven Resistenzmechanismus vermittelt und das Zellüberleben und die Proliferation fördert. Außerdem sollten mögliche Effekte auf die Regulation des Zellzyklus genauer betrachtet werden. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit Zelleigenschaften wie Migration und Morphologie unter ERK5-Inhibition untersucht, um die Frage zu beantworten, inwiefern diese Funktionen über ERK5 und deren Zielgene reguliert werden. Zu diesem Zweck wurden Melanomzelllinien mit NRAS- oder BRAF-Mutation eingesetzt.

Die MEK1/2- und MEK5- Signalwege teilen sich gemeinsame Effektorproteine. In einer Kombinationstherapie liegt daher ein mögliches, synergistisches Potential [39]. Um dem nachzugehen, wurden in dieser Arbeit Melanomzelllinien unter BRAF-, MEK1/2- oder ERK1/2- Hemmung zusätzlich mit einem ERK5- Inhibitor behandelt. Im Kurz- und Langzeitverlauf sollten nachfolgend Einflüsse auf die Zelltoxizität analysiert werden.

Ziel war es, durch die Adressierung des MEK5/ERK5-Signalwegs präklinisch zu prüfen, ob dieser sich als zukünftiger, alternativen Angriffspunkt in der Behandlung des malignen Melanoms eignen könnte, um das Therapieansprechen und die Prognose von Patienten zu verbessern.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
Filterspitzen	Sarstedt
Filterspitzen, DNA-, DNase-, RNase frei	Biosphere
PCR-Folie	Applied Biosystems
PCR-Platte, 96 Loch	Applied Biosystems
Pipettenspitzen	Starlab
Serologische Pipetten	Cellstar Greiner Bio-One
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml), DNA-, DNase-, RNase frei	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Cellstar Greiner Bio-One
Zellschaber	Sarstedt
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²)	Cellstar Greiner Bio-One
Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm)	BD Falcon
6-Loch-Zellkulturplatte	Cellstar Greiner Bio-One
Gekammertes Deckgläschen mit 4 Kammern (μ -Slide 4 Well)	ibidi GmbH
Nitrocellulose Membran 0,45 μ m	Millipore Immobilon
PVDF Membran 0,45 μ m	Thermo Fisher
Spritze 50 ml	BD Falcon
Zählkammer	Neubauer Zählkammer HB6

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Eingesetzte Chemikalien mit Hersteller

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid	Appllichem
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich
Bovine serum albumin fraction V (BSA)	Appllichem

Material

Bradford Farbreagenz	BioRad
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva und Merck
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	Gibco
EDTA	Serva und Sigma Aldrich
Ethanol, absolut	Sigma Aldrich
Ethanol, vergällt, 70 %	Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
Glycerol-2-phosphat	Sigma Aldrich
Magermilchpulver	Applichem
Methanol	Applichem
Natriumorthovanadat	Sigma
Ponceau S	Serva und Fluka
Complete© Proteaseinhibitor	Roche
Salzsäure (HCl)	Sigma Aldrich
SDS	Applichem
TEMED	Applichem
Tris	Applichem
Trypanblau	Sigma Aldrich
Tween-20	Sigma Aldrich
Wasser, vollentsalzt	Fresenius Kabi
Wasserstoffperoxid, 30 %	Applichem
Luminol	Fluka
Cumarinsäure	Sigma Aldrich
Pepsin	Merck
Di-Natriumtetraborat	Applichem
Borsäure	Applichem
Anti-BrdU-FITC-Antikörper	BD Biosciences
RPMI 1640 Medium	Gibco

Material

DNase/RNase-freies Wasser	Gibco
PI	Gibco
Kristallviolett	BD Biosciences
1x Trypsin/EDTA 0,05/0,02 %	Gibco

2.3 Inhibitoren

Die in den Versuchen verwendeten Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und in verschiedenen Konzentrationen verwendet.

Tabelle 3: Verwendete Inhibitoren mit Funktion und Hersteller

Freiname	Funktion	Stockkonzentration	Hersteller
Trametinib	MEK1/2-Inhibitor	10 mM	Hölzel Diagnostika
Cobimetinib	MEK1/2-Inhibitor	10 mM	Selleckchem
Binimetinib	MEK1/2-Inhibitor	10 mM	Selleckchem
Selumetinib	MEK1/2-Inhibitor	10 mM	Selleckchem
Dabrafenib	BRAF-Inhibitor	10 mM	Cayman Chemical
Vemurafenib	BRAF-Inhibitor	10 mM	Cayman Chemical
GDC-0994	ERK1/2-Inhibitor	10 mM	MedChem Express
XMD 08-92	ERK5-Inhibitor	10 mM	Santa Cruz
BIX 02188	ERK5-Inhibitor	10 mM	Selleckchem

2.4 Zellen

Die verwendeten Melanomzelllinien wurden ursprünglich aus menschlichen Tumoren isoliert und dann in Zellkultur gehalten. Sie wurden bereits in diversen Arbeiten eingesetzt und sind in der Melanomforschung etabliert. Die NRAS- Linien wurden zuvor von Arbeitsgruppen bezüglich ihres Mutationsstaus charakterisiert [72, 73]. Alle Linien stammen aus der Stocksammlung der Klinik für Dermatologie, Venerologie und

Material

Allergologie der Universitätsklinik Würzburg und wurden frisch als gefrorenen Stocks in Kultur genommen und nicht mehr als 10-20 Passagen kultiviert.

Tabelle 4: Verwendete adhärenz Zelllinien mit zugrundeliegenden, aktivierenden Mutationen

Zellname	Mutation	Herkunft
BLM	NRAS	Erstmals im Mai 1991 beschrieben [74]. Sublinie der BRO- Zelllinie, die aus einem Primärtumor eines 34-jährigen Mannes mit Melanom in der Schulterregion gewonnen wurde [75]. Die BLM- Linie wurde dann nach Beimpfung einer Maus mit BRO-Zellen aus einer Lungenmetastase gewonnen [74].
A375	BRAF V600E	Erstmals 1973 beschrieben und als Zelllinie kultiviert [76].
UACC-62	BRAF V600E	Erstmals 1991 beschrieben [77].
LOXI-MVI	BRAF V600E	Erstmals 1988 beschrieben. Aus der Lymphknotenmetastase eines 58-jährigen Patienten mit malignem Melanom kultiviert [78].
UACC-257	BRAF V600E	Erstmals 1991 beschrieben [77].
FM79	NRAS	Erstmals 1997 beschrieben und hergestellt [79].

2.4.1 Zusammensetzung der Nährmedien

Die verwendeten Melanomzelllinien wurden ausschließlich im folgenden Nährmedium inkubiert:

500 ml RPMI 1640 Medium versetzt mit 10% FCS

2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 Puffer und Lösungen für Western Blot

Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen für Western Blot mit Zusammensetzung

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Minigel-Puffer A	Acrylamid 4K 30% Lösung (Applichem)
Laufgel-Puffer B	0,75 M Tris-HCl pH 8,8, 0,2% SDS in ddH_2O
Sammelgel-Puffer C	0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 0,2% SDS in ddH_2O
10x Elektrophoresepuffer	0,25 M Tris-HCl, 1,92 M Glycin, 1% SDS
1x Elektrophoresepuffer	10x Elektrophoresepuffer 1:10 in ddH_2O
10x Blottingpuffer	0,25 M Tris-HCl, 1,92 M Glycin in ddH_2O
1x Blottingpuffer	10x Blottingpuffer 1:10 in ddH_2O mit 20% Methanol
10% APS	1 g APS (Sigma Aldrich) in 10 ml ddH_2O
10x Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)	200 mM Tris-HCl, 1,37 M Natriumchlorid in ddH_2O mit HCl auf pH 7,6 eingestellt
1x Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)	10x Tris-gepufferte Kochsalzlösung 1:10 in ddH_2O
1x TBS-Tween (TBS-T)	0.05% Tween in 1x TBS
4x SDS-Probenpuffer (Lämmli)	8% SDS, 40% Glycerol, 250 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0,1% Bromphenolblau, 10% β -Mercaptoethanol in ddH_2O
1x SDS-Probenpuffer (Lämmli)	4x Lämmli in ddH_2O
Verstärkende Chemilumineszenz Lösung (ECL)	Lösung A \rightarrow 250 mM Luminol and 90 mM p-Cumarinsäure in 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5) Lösung B \rightarrow 30% H_2O_2 in 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5)

Material

	A und B à 20 ml werden kurz vor Gebrauch zur Immunoblotentwicklung zusammengefügt.
Blockmilch	5% Milchpulver in 1x TBS-T
BSA Lösung	5% BSA in 1x TBS-T
Strippingpuffer	100 mM β -Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,7) in ddH_2O

Tabelle 6: Zusammensetzung der Laufgele und des Sammelgels

% Acrylamid	6%	8%	Sammelgel
Puffer A	2 ml	2,66 ml	1 ml
Puffer B	5 ml	5 ml	
Puffer C			5ml
ddH_2O	3 ml	2,33 ml	4 ml
10% APS	100 μl		150 μl
TEMED	4 μl		10 μl

2.5.2 Puffer für Zelllysate

Tabelle 8: Verwendete Puffer für Zelllysate mit Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
ELB-Zelllyse Puffer	150 mM Natriumchlorid, 50 mM HEPES (pH 7,5), 5 mM EDTA, 0,1% NP-40
ELB+++	20 mM β -Glycerolphosphat, 100 mM Natrium-Orthovanadat, 200 μl Roche Complete Protease-Inhibitor in 5 ml ELB-Zelllyse Puffer
RLT-Zelllyse Puffer	143 mM β -Mercaptoethanol in Qiagen RLT Lysis Puffer

2.5.3 Puffer und Lösungen für BrdU-Markierung und PI-Färbung

Tabelle 9: Verwendete Puffer und Lösungen für BrdU-Zellmarkierung und PI-Zellfärbung mit Zusammensetzung

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Pepsin Lösung	0,5 mg/ml Pepsin in 0,1 M HCl
PBS/BSA/Tween Lösung	0,1% BSA, 0,5% Tween-20 in PBS
Borat Puffer pH 8,5	100 mM Borsäure in ddH_2O , pH 8,5 pH-Einstellung mit 100 nM di-Natrium-Tetraborat in ddH_2O
Anti-BrdU-FITC-Antikörper	1:50 anti-BrdU-FITC-Antikörper in PBS/BSA/Tween Lösung s.o
PI Puffer	10 $\mu\text{g/ml}$ PI, 250 $\mu\text{g/ml}$ RNase in PBS

2.5.4 Lösung für Zellfärbung

Tabelle 10: Verwendete Lösungen für Zellfärbung mit Zusammensetzung

Lösung	Zusammensetzung
Kristallviolett Stocklösung	0,5% Kristallviolett in H_2O
Kristallviolett Färbelösung	50% Stocklösung, 20% Methanol, 30% H_2O

2.6 Antikörper für Western Blot

Tabelle 11: Verwendete Primärantikörper mit Hersteller

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung/ Stockkonz.	MW	Hersteller/ Bestellnummer
Polyklonaler Anti-ERK5/ Anti-BMK1-AK	Kaninchen	1:1000	~110 kDa	Upstate 07-039
Polyklonaler Anti-ERK5/ Anti-BMK1-AK	Kaninchen	1:8000 Stock: 14,1 mg/ml	~110 kDa	Sigma Aldrich E1523

Material

Phospho-p44/42 MAPK / p-Erk1/2	Kaninchen	1:1000	~42, 44 kDa	Cell Signaling 9101
Monoklonaler Anti- α - Tubulin-AK (B-5-1-2)	Maus	1:10.000 Stock: 23,6 mg/ml	~50 kDa	Sigma Aldrich T5168

Tabelle 12: Verwendete Sekundärantikörper mit Hersteller

Sekundärantikörper		Verdünnung	Hersteller
Polyklonaler Kaninchen-AK	Anti-	1:2000	GE Healthcare NA9340V
Polyklonaler AK	Anti-Maus-	1:2000	Transduction Laboratories NA9310V

2.7 Primer

Tabelle 13: Verwendete Primer mit Sequenz und Hersteller

Gen	Strang	Sequenz (5' → 3')	Hersteller
GAPDH (Haushaltsgen)	Sense	CCACCCATGGCAATTCC	Sigma
	Antisense	GATGGGATTTCCATTGATGACA	Aldrich
DUSP4	Sense	GGCGGCTATGAGAGGTTTTCC	Sigma
	Antisense	TGGTCGTGTAGTGGGGTCC	Aldrich

2.8 Reagenziensätze („Kits“)

Tabelle 14: Verwendete Reagenziensätze mit Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
cDNA-Synthese-Kit <i>Reverse Transcription Kit Quanti Tect</i> (10 pg – 1 µg)	Qiagen
RNA-Isolations-Kit <i>RNeasy Mini-Kit</i>	Qiagen
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Invitrogen

2.9 Geräte

Tabelle 15: Verwendete Geräte mit Hersteller

Bezeichnung	Typbezeichnung	Hersteller
Stickstofftank (Probenlagersystem)	Biosafe® 420 SC Beta	Cryotherm
-80° C Gefrierschrank (Ultratiefkühlschrank)	UF V 700	Binder GmbH
Inversfluoreszenzmikroskop	Axiovert 35	Zeiss
Inversmikroskop	DM-IL	Leica
CO ₂ -Brutschrank / Inkubator	Galaxy 170 S	Eppendorf AG
Sterilbank (1,8 m)	Safe2020 1.8	Thermo Fisher
Waage (max. 1200 g)	Scout II - SCA210	Ohaus
Zentrifuge (Falcon)	Multifuge 1L-R	Heraeus/Kendro
Tischzentrifuge gekühlt (Eppendorfreaktionsgefäße)	5427R	Eppendorf AG
Vortexer	Vortex Genie 2 G560E	Scientific Industries, Inc.
Wasserbad	TW12	Julabo
Absaugpumpe inkl. Flasche für Sterilwerkbank	Vacunsafe	Integra Biosystems (IBS)
Inversfluoreszenzmikroskop	AX10 - Vert.A1	Zeiss
Rollenmischer	RM 10W-30V	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH
Real-Time PCR System	StepOne Plus™	Applied Biosystems
Feinwaage (max. 110 g)	BP110S	Sartorius
Multifunktionsreader	Infinite M200	Tecan
Schüttelplatte	KS125B Basic	IKA Werke
Tischzentrifuge (Eppendorfreaktionsgefäße)	5424	Eppendorf AG
Präzisionsedelmetallwaage bis 3,1 kg	M-Power	Sartorius

Material

PCR-Gradientencycler (Doppelblock, 2x 48-well)	Peqstar 2X Gradient	VWR international (Peqlab über Clemens GmbH)
Heizblock doppelt (2x20 Plätze)	SBH130DC	Stuart
motorisiertes Aufrechtfluoreszenzmikroskop inkl. Kamera	Eclipse Ti-E	Nikon
Inkubationsset Stage-Top	T-Unit+H201-K-Frame Stage Top Inkubator + Objektivheizung	Okolab
CO ₂ Inkubationssystem inkl. Controller	Ibidi Gasmixer Bio 1 für CO ₂ /O ₂	ibidi GmbH
Labormembranpumpe (Betrieb am ibidi Gasmixer)	N86KN.18	KNF Neuberger Laboport
Rollenmischer	SRT9	Stuart
Eismaschine	AF-103	Scotsman
Sterilisator SF110	SF110	Memmert
Spannungsgeber		BioRad Laboratories

2.10 Software

Tabelle 16: Verwendete Software mit Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
FIJI	<i>Open source imaging</i> Paket, basierend auf dem Java image processing program Image J, verfügbar unter: https://fiji.sc/
Graph für Cell Tracking	Image J PlugIn von ibidi GmbH
<i>Flow Jo 7.6.5.</i>	Tree Star Inc.
<i>GraphPad Prism 6, Scientific Software</i>	GraphPad
<i>I-Control 1.10</i>	Tecan Reader Infinite 200M Pro
<i>Magellan 3.00</i>	Tecan

Material

Office Excel 2010	Microsoft
Office Word 2016	Microsoft
<i>StepOne</i>	Thermo Fisher Scientific
Zen Blue 2011	Carl Zeiss

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Die für die Arbeit verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Sämtliche Aspekte der Zellkultur wurden unter der Sterilbank mit Hilfe steriler Nährmedien und Materialien durchgeführt. Die verwendeten Medien wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Bei den für die Versuche verwendeten Zellen handelte es sich ausschließlich um adhärenz Melanomzelllinien. Mittels PCR wurden die eingesetzten Zelllinien regelmäßig auf Mycoplasmen- Kontamination geprüft.

3.1.1 Auftauen und Kultivieren der Melanomzellen

Die Melanomzellen wurden in Kryogefäßen in einem Stickstofftank in Gasphase bei -196°C gelagert. Nach zügigem Transport vom Stickstofftank wurden sie im 37°C warmen Wasserbad durch vorsichtiges Schwenken aufgetaut und mit einer Pipette in eine mit präinkubiertem Nährmedium gefüllte Zellkulturflasche überführt. Dafür standen 75 cm² große Zellkulturflaschen, gefüllt mit 12 ml Nährmedium bzw. 175 cm² große Zellkulturflaschen, versetzt mit 25 ml Nährmedium zur Verfügung. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, um die Zerstörung durch das zum Einfrieren notwendige Gefrierschutzmittel DMSO zu verhindern.

3.1.2 Passagieren von Melanomzellen

Bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit einer adäquaten Menge 1x PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ bei Raumtemperatur zweimal gewaschen. Zum Ablösen der adhärenz Zellen wurden 1-3 ml einer Trypsinlösung verwendet (0,05% Trypsin/0.02% EDTA in PBS). Nach zwei Min Inkubation bei 37°C wurden die Reaktion des Trypsins mit Medium gestoppt. Das Gemisch wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und fünf Minuten bei 1100 rpm bei Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Zellpellet in Nährmedium resuspendiert. Die Zellen konnten dann entweder als Stock in verringerter Zellzahl neu ausgesät oder für Versuche genutzt werden.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer

Zur Quantifizierung der Zellen wurden 10 µl Trypanblau mit 10 µl Zellsuspension (Verdünnung 1:2) vermischt und 10 µl auf einen Objektträger gegeben. Dabei diente der

Methoden

blaue Farbstoff zur Identifizierung der toten Zellen. Die Zellzahl lässt sich nach Auszählung der Zählfelder unter dem Lichtmikroskop durch folgende Schritte berechnen:

$$\begin{aligned} \text{Zellzahl aller Quadrate} / 4 &= \text{Mittelwert der Zellzahl} / \text{Quadrat} \\ \text{Mittelwert der Zellzahl} / \text{Quadrat} \times 10^4 \times 2 &= \text{Zellen} / \text{ml} \\ \text{Zellen} / \text{ml} \times \text{Volumen der Zellsuspension} &= \text{Gesamtzellzahl} \end{aligned}$$

Das Volumen einer Zellkammer beträgt $1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ }\mu\text{l}$. Durch den Multiplikationsfaktor 10^4 errechnet sich die Zellzahl pro 1 ml. Aus der 1:2 Verdünnung mit Trypanblau ergibt sich der Verdünnungsfaktor 2.

3.1.4 Kryokonservierung

Zunächst wurde das Einfriermedium vorbereitet. Dieses bestand aus 80% Kulturmedium, 10% DMSO und 10% FCS und wurde bis zum Gebrauch auf Eis gelagert. Die Zellen wurden wie gewohnt abgelöst und herunterzentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet mit Einfriermedium resuspendiert, je 1 ml der Zellsuspension in Kryogefäße gegeben und in einem Styroporständler bei -80°C gelagert. Später erfolgte der Transfer in den Flüssigstickstoff, um die Zellen in ihren Eigenschaften zu konservieren und einen späteren Gebrauch zu ermöglichen.

3.1.5 Stimulation der Zellen mit Inhibitoren des MAPK – Signalwegs

NRAS- und BRAF V600E- mutierte Melanomzelllinien wurden mit verschiedenen Konzentrationen der in *Tabelle 3* aufgeführten Inhibitoren behandelt. Dazu wurden sie zuvor je nach Versuchsaufbau in 6-Loch-Platten bzw. 6- oder 10-cm-Petrischalen in unterschiedlicher Zahl ausgesät und 24 Stunden bei 37° zur Adhäsion inkubiert. Nachdem das Therapeutika- freie Medium abgesaugt wurde, wurden jeweils 3 ml Medium pro 6-Loch, 3,5 ml pro 6-cm-Petrischale und 7 ml Medium pro 10-cm-Schale mit der betreffenden Konzentration an Inhibitor versehen und auf die Zellen pipettiert. Falls nicht anders angegeben wurden die Zellen daraufhin für Western Blots für 24 h und für Kristallviolett-färbungen für 72 h stimuliert.

3.1.6 Zellfärbung mit Kristallviolett

Mit der Kristallviolett-färbung gelingt es, den optischen Kontrast zur fotografischen Dokumentation von Zelltoxizität zu steigern und genauer zu analysieren. Der

Methoden

Kristallviolettfarbstoff bindet dabei an Proteine und DNA und färbt die vitalen, adhärenen Zellen.

Hierzu wurden 80.000 Zellen pro 6-Loch ausgesät, nach 24 h Stunden je nach Aussaat für 72 h stimuliert und wie folgt gefärbt:

Zunächst wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Jeder Schritt der Färbung und Auswertung wurde jeweils auch an einem Well durchgeführt in dem keine Zellen enthalten waren (*Blank*). Durch das Waschen wurden abgelöste, tote Zellen entfernt. Im Anschluss wurden die übrigen Zellen mit je 1 ml der Kristallviolettlösung (s. Kapitel 2.5.4) benetzt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgenommen. Danach drei Waschschritten mit d_6H_2O wurden die Platten für ein bis zwei Stunden getrocknet. Im weiteren Verlauf wurde die 6-Loch-Platte für die Dokumentation des Zellüberlebens fotografiert und quantifiziert. Dazu wurde die Platte mit 1 ml Methanol pro 6-Loch 20 min bei Raumtemperatur auf der Schüttelplatte inkubiert, um das Kristallviolett abzulösen. Duplikate von je 200 μ l jeder Kondition wurden auf eine 96-Loch-Platte gegen den *Blank* aufgetragen. Zur spektroskopischen Analyse wurde der Kristallviolettfarbstoff durch Absorptionsmessung im *Tecan Reader* mit der *I-control*-Software bei einer Wellenlänge von 570 nM gemessen.

3.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das die Analyse von Zellen nach ihrer Form, Struktur oder Färbung erlaubt. Werden die Zellen nach ihrer Eigenschaft der Fluoreszenz sortiert, spricht man von einer FACS-Messung (*fluorescence-activated cell sorting*). Diese wurde in den folgenden Methoden zur Analyse verwendet.

Durch hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen einzeln durch den Messbereich eines Laserstrahls geführt. Das dabei emittierte Streulicht gibt quantitative Informationen über die Eigenschaften der Zellen. Das Vorwärtsstreulicht (FCS) ist ein Maß für das Volumen und das Seitwärtsstreulicht (SSC) ein Maß für die Granularität der Zellen. Dieses Prinzip ermöglicht die Detektion von Fluoreszenzfarbstoffen. Die Evaluation von Zellen anhand ihrer Fluoreszenz erfolgt über Fluorchrom- gekoppelte Antikörper gegen zelluläre Antigene oder DNA- bindende bzw. -interkalierende Farbstoffe. Die Fluoreszenz der einzelnen Fluorochrome besitzt ein charakteristisches Emissionsspektrum und ihre Intensität verhält sich proportional zu dem zellulären Gehalt des Farbstoffs.

3.2.1 Zellzyklusanalyse mit BrdU-Markierung und PI-Färbung

Bromodesoxyuridin (5'-bromo-2'-desoxyuridin, BrdU) ist ein chemisches Analogon des Nucleosids Thymidin und kann an dessen Stelle während der S-Phase in die DNA der lebenden Zelle eingebaut werden. Durch einen spezifischen BrdU- bindenden Antikörper kann diese DNA- Markierung detektiert werden. Eine Denaturierung der DNA ist von Nöten, um dem Antikörper Zugang zu dem eingebauten BrdU zu gewähren. Für eine FACS-Analyse wurde der BrdU- Antikörper zusätzlich mit dem Fluoresceinderivat FITC (Fluoresceinisothiocyanat) konjugiert.

Da durch die BrdU- Markierung nur die Population der Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, genau quantifiziert werden kann, wurde das Verfahren mit einer PI- Färbung kombiniert, um die einzelnen Phasen zu analysieren. Bei Propidiumiodid (PI) handelt es sich um einen fluoreszierenden Nucleinsäureinterkalator, der nur die Zellmembran toter Zellen überwinden kann und die gesamte DNA anfärbt. Die Intensität der Fluoreszenz wurde per linearer FACS-Messung bestimmt und stand mit dem DNA-Gehalt und somit mit den einzelnen Phasen des Zellzyklus in direkter Verbindung.

3.2.1.1 BrdU- Markierung

Für diesen Versuch wurden je 750.000 FM79-Zellen auf eine 10-cm-Schale ausgesät und wie in 3.1.5 beschrieben stimuliert. Nach 48 h wurde das Nährmedium direkt mit 1 μ M BrdU-Lösung versetzt und die Zellen 10 Min bei 37°C inkubiert. Zu dem Versuchsaufbau gehörten eine ungefärbte und eine gefärbte unstimulierte Kontrolle. Nach der Inkubation wurde das BrdU-Nährmedium jeder Kondition in unterschiedliche Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und dieses dann ebenfalls den Zentrifugenröhrchen zugefügt. Die Zellen wurden wie in 3.1.3 beschrieben abgelöst, wobei die Absättigung des Trypsins mit dem BrdU-PBS-Nährmedium geschah. Im Folgenden wurde die Suspension 5 min bei 1100 rpm und 4°C in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit eiskaltem PBS resuspendiert und abermals bei 4°C und 1100 rpm für 5 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde der Überstand bis auf circa 200 μ l abgesaugt und die Zellen darin gelöst. Unter ständigem Vortexen wurden tropfenweise 3 ml 70% Ethanol zur Fixierung hinzugegeben. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung für die durchflusszytometrische Analyse mindestens 16 h bei 4°C inkubiert.

3.2.1.2 BrdU- Detektion und PI-Färbung

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Zentrifugiert wurde einheitlich 5 min bei 1500 rpm in einer Tischzentrifuge, wonach der Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert wurde.

Die BrdU-markierte und Ethanol-fixierte Zellsuspension (s. 3.2.1.1) wurde mit PBS aufgefüllt und bei 4°C zentrifugiert. Die Proben wurden mit 1,5 ml der Pepsin-Lösung (s. Kapitel 2.5.3) versetzt und 20 min bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer inkubiert. Das Pepsin führt zu einer Verdauung der Proteinmembranen. Um daraufhin unspezifische Bindungen zu vermeiden und die nun freiliegende DNA zu stabilisieren, wurden 3 ml einer PBS/BSA/Tween Lösung hinzugegeben und die Suspension wurde bei Raumtemperatur zentrifugiert. Daraufhin wurden die Röhren mit 1,5 ml HCl 2 N befüllt und 12 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde 3 ml Boratpuffer (s. Kapitel 2.5.3) zugefügt und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dieser Schritt wurde, nach erneuter Zugabe von 3 ml PBS/BSA/Tween Lösung, wiederholt. Zur Detektion des in die DNA eingebauten Bromodesoxyuridins diente der Anti-BrdU-FITC Antikörper, von dem 100 µl für jede Probe verwendet wurden. Unspezifische Antikörperbindungen wurden hier durch das BSA minimiert. Nach einer Inkubation von 1 h auf Eis in Dunkelheit wurden je 3 ml der stabilisierenden PBS/BSA/Tween Lösung beigemischt und die Röhren wurden erneut bei Raumtemperatur zentrifugiert. Als letzter Schritt gab man den PI- Puffer dazu (s. Kapitel 2.5.3). Die RNase sollte RNA-Kontamination entfernen und die alleinige Anfärbung der DNA ermöglichen.

Die nun angefärbten Proben wurden in FACS-Röhren transferiert, per Durchflusszytometrie (FACS) analysiert und mit der *FlowJo* Software ausgewertet. Als Referenz dienten hierbei gleichermaßen aufbereitete, unbehandelte Zellen ohne Antikörperfärbung im Sinne einer Kontrollkondition. Diese Populationseinstellung wurde auf die anderen Konditionen übertragen und darin dann die BrdU- und PI-Analyse graphisch dargestellt.

3.2.2 CFSE-Lebendfärbung

Carboxyfluorescein-(5-, 6-)-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zu Proliferationsanalyse verwendet wird. CFSE ist membranpermeabel. In der Zelle werden die Estergruppen durch intrazelluläre Esterasen abgespalten und der Farbstoff bindet über die Succinimidylgruppe kovalent an Amine.

Methoden

Diese Bindungen sind sehr stabil und ermöglichen eine langfristige Signalretention. Nach jeder Zellteilung wird der Farbstoff hälftig auf die Tochterzellen verteilt. Aufgrund der hohen Fluoreszenzintensität bleibt der Farbstoff über mehrere Generationen proliferierender Zellen sichtbar und kann durchflusszytometrisch detektiert werden.

Für die Färbung wurden je 200.000 BLM-Zellen auf 6-cm-Schalen ausgesät und wie in 3.1.5 beschrieben stimuliert. Nach 72 h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden 20 min bei 37°C mit der CFSE-Lösung (5 µM in PBS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und mit frischem, farbstofffreiem Medium unter Stimulation im Brutschrank weiter gelagert. Eine unstimulierte, gefärbte Kondition wurde als Kontrolle verwendet. Die Zellen wurden wie gewohnt weiter kultiviert und die Zellzahl durch Passagierung für alle Konditionen gleichermaßen konstant gehalten. Die Fluoreszenz wurde fotografisch dokumentiert. Dabei wurde die Belichtungszeit anhand der Kontrolle bestimmt und beibehalten. Nach 14 Tagen wurde die Fluoreszenz durchflusszytometrisch gemessen und mit der *FlowJo*-Software dargestellt. Als Referenz diente dabei die gefärbte Kontrolle zu dem Zeitpunkt der Messung.

3.3 Genexpressionsanalysen

Im Folgenden werden die verwendeten Analysen zur Genexpression auf Protein- und DNA- Ebene beschrieben.

3.3.1 Western Blot

Die Western Blot Methode bezeichnet die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran. Über verschiedene Reaktionen dient sie dem Nachweis spezifischer Proteine aus einem Zelllysat.

3.3.1.1 Herstellung der Proteinlysate

Es wurden 200.000 Zellen pro 6-Loch und 400.000 Zellen pro 6-cm-Schale ausgesät und je nach Versuchsaufbau 24 bis 48 h stimuliert. Die Schritte der Zellyse erfolgten auf Eis, um die Proteine während der Aufbereitung zu stabilisieren. Nach der Stimulation wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 120 µl ELB+++ pro 6-Loch und 200 µl ELB+++ pro 6-cm-Schale mindestens 1 h auf Eis inkubiert und so lysiert. Der Abbau und die Dephosphorylierung der Proteine durch endogene Proteasen und Phosphatasen wurde mittels frisch zugesetzter Protease- und Phosphatase Inhibitoren in dem ELB+++-Puffer

gehemmt. Nach erfolgter Zelllyse wurden die Zellen abgeschabt, in Mikro-Reaktionsgefäße überführt und 10 min mit 10.000 rpm bei 4°C in einer Mikrozentryge zentrifugiert. Der Überstand, der die Proteine enthält, wurde abgenommen und in einem Reaktionsgefäß bei -20°C gelagert.

3.3.1.2 Proteinquantifizierung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration dient dazu, in der später folgenden Gelelektrophorese äquivalente Proteinmengen der Proben auftragen zu können.

Diese erfolgte mittels der Bradford Farbreagenz von BioRad anhand einer BSA-Standardreihe. Dabei wurde das Farbreagenz 1:5 mit dH₂O verdünnt, in Reaktionsgefäße vorgelegt und mit 0, 2, 5, 10 und 20 mg/ml BSA versetzt. Von den einzelnen Proben wurden jeweils 2,5 µl zu einem Endvolumen von 500 µl mit der Bradford Reagenz aufgefüllt. Die Reaktionsgefäße wurden daraufhin 5 min in Dunkelheit gestellt. In dieser Zeit läuft die Farbreaktion ab, auf die das Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford beruht.

Der Farbstoff bildet mit den Proteinseitenketten Komplexe. Dies führt zu einer Verschiebung seines Absorptionsmaximums. Das Maximum der ungebundenen (kationischen), roten Form liegt bei 470 nm. Durch die Komplexbildung wandelt sich der Farbstoff in seine unprotonierte, anionische, blaue Form um, wodurch sich das Absorptionsmaximum zu 595 nm ändert. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm durch die Bildung der Farbstoff-Protein-Komplexe gegenüber dem freien Farbstoff wird photometrisch gemessen und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Proben.

Es wurden Duplikate von 200 µl der Proben und der Konditionen der Standardreihe auf eine 96-Loch-Platte aufgetragen und mit Hilfe der *Magellan* Software des *Tecan Readers* quantifiziert.

3.3.1.3 Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit der SDS-PAGE. Das zugrundeliegende Prinzip besteht darin, dass geladene Teilchen in einem elektrischen Feld abhängig von ihrer molekularen Größe und Ladung unterschiedlich weit durch eine Gelmatrix wandern. Die Eigenladung der Proteine konnte durch Zugabe des 4x Lämmli-Puffers im Verhältnis 1:4 zu der Proteinkonzentration vernachlässigt werden. Der Lämmli-Puffer enthält Natriumdodecylsulfat (SDS). Dieses anionische Tensid bindet an die Proteine, wodurch eine konstant negative Ladungsverteilung erzeugt wird. Die mit Lämmli-Puffer

Methoden

vermischten Proben wurden 7 min bei 95°C erhitzt. Die Proteine wurden in ihrer Tertiär- und Quartärstruktur denaturiert. Neben der thermischen Spaltung der Wasserstoffbrücken wurden Disulfidbrücken durch β -Mercaptoethanol im Lämmli-Puffer reduziert und die Tertiärstruktur weiter aufgebrochen. Die Lauf- und Sammelgele setzten sich wie in 2.5.1 beschrieben zusammen. Vor dem Gießen des Sammelgels, wurden Luftblasen mit Isopropanol verhindert und eine glatte Gelkante erzeugt. Gleiche Proteinmengen der Proben (10 -50 μ g) wurden zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard in die Taschen des Sammelgels gefüllt und gleichermaßen mit 1x Lämmli-Puffer aufgefüllt, um einen geraden Gellauf zu gewährleisten. An die Polyarylamid-Gele wurde in einer Elektrophoresekammer mit Elektrophoresepuffer für ca. 90 min eine konstante Stromstärke von 50 mA für zwei Gele gelegt. Die denaturierten Proteine wanderten in dieser Zeit abhängig von ihrer molekularen Größe unterschiedlich schnell durch die Poren des Polyacrylamids hin zur Anode.

3.3.1.4 Proteintransfer

Die mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch den eigentlichen Western Blot auf eine Nitrocellulose- oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Trägermembran übertragen (engl. *Blotting*). Die PVDF- Membran wurde vor Gebrauch in Methanol gelegt, um die Hydrophobie zu senken und einen Proteintransfer zu ermöglichen. Wie in Abbildung 7 zu sehen wurde das Gele auf der Membran positioniert. An die mit Blottingpuffer gefüllte Kammer wurde eine Spannung von 400 mA gelegt. Der Proteintransfer dauerte bei zwei Gelen 90 min und wurde aufgrund der Hitzentwicklung durch die hohe Spannung bei 4°C durchgeführt.

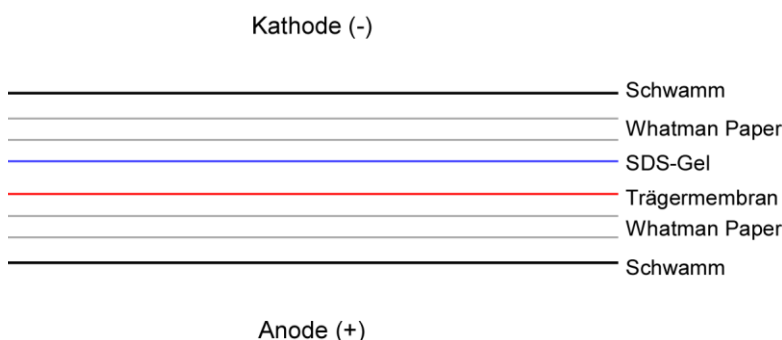


Abbildung 7: Aufbau Western Blot

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der Materialien für den Proteintransfer mittels Western Blot. Schwämme, Whatman Paper, Gel und Trägermembran wurden vor Gebrauch in Blottingpuffer geschwenkt. Diese Blotting-Methode bezeichnet man als Nassblot-Technik.

3.3.1.5 Proteindetektion

Ponceau-S ist ein Azofarbstoff, mit dem die Banden auf der Trägermembran nach dem *Blotting* temporär angefärbt werden können. Die Effizienz des Proteintransfers kann so vor der Immundetektion dargestellt werden. Dazu wird die Membran mit Ponceau-S benetzt und 1 min inkubiert. Der Farbstoff bindet reversibel an die Aminogruppen der Proteine und kann mit Wasser wieder abgewaschen werden.

3.3.1.6 Immundetektion

Zunächst wurde die Trägermembran mit TBS-T gewaschen. Um später unspezifische Antikörper-Proteinbindungen zu vermeiden, wurde die Membran 1 h mit Blockmilch bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer inkubiert. So wurden freie Bindungsstellen abgesättigt. Zur Detektion von phosphorylierten Proteinen wurde zu diesem Zweck BSA verwendet. In der Blockmilch befinden sich Phosphatasen (Casein), die mit dem Antikörper unspezifische Bindungen eingehen können und so den Hintergrund erhöhen. Aufgrund seiner höheren Affinität verwendete man in diesem Zusammenhang außerdem PVDF-Membrane.

Nach der Blockierung erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in Blockmilch bzw. BSA bei 4°C auf dem Rollenmischer über Nacht. Anschließend wurde die Membran viermal mit TBS-T gewaschen, um nicht gebundene Antikörperrückstände zu entfernen. Danach folgte die Inkubation für 1 h mit einem gegen die Herkunftspezies des Erstantikörpers gerichteten, Meerrettichperoxidase- (HRP)-gekoppelten polyklonalen Sekundärantikörper in 1/3 Blockmilch und 2/3 TBS-T auf dem Rollenmischer. Der Sekundärantikörper bindet spezifisch an den Primärantikörper. Die Konzentrationen der Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Es folgten drei Waschschrte mit TBST-T und einer mit TBS für 7 min. Dann wurde die Membran für 1 min in dem ECL-Reagenz geschwenkt. In der durch den HRP-gekoppelten Sekundärantikörper induzierten Chemolumineszenzreaktion wird das darin enthaltene Luminol in seine oxidierte Form überführt, dessen Lumineszenz mittels eines digitalen Kamerasystems detektiert werden kann.

3.3.1.7 Entfernung von Antikörpern (*Stripping*)

Die Methode des *Strippings* ermöglicht es, Antikörper von der Membran zu entfernen und sie für eine erneute Immundetektion zugänglich zu machen.

Die Membran wurde einmal mit TBS-T gewaschen und 25 min bei 50°C im Wasserbad mit Strippingpuffer inkubiert (s. Kapitel 2.5.1). Mit PVDF- Membranen wurde im nassen Milieu vorgegangen, da durch eine Re-Aktivierung mit Methanol sonst die Protein-Antikörperkomplexe auf der Membran fixiert werden und diese sich nicht *strippen* lassen. Die Membran wurde dreimal 5 min mit TBS-T gewaschen und es konnte wie in 3.3.1.6 beschrieben mit anderen Antikörpern vorgegangen werden.

3.3.2 Quantitative Echtzeit- PCR

Die Methode der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion beschreibt das Vervielfältigen von Nukleinsäuren und die anschließende Quantifizierung der gewonnenen DNA durch Fluoreszenzmessung. Im Vorfeld wird die RNA aus den Zellen isoliert, durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der herkömmlichen PCR-Methode amplifiziert.

3.3.2.1 Herstellung der RNA-Lysate

Es wurden 200.000 Zellen pro 6-Loch ausgesät und je nach Versuchsaufbau stimuliert. Das Nährmedium wurde abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Im Gegensatz zu der Herstellung von Proteinlysaten wurden die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Ab dem Zeitpunkt der RNA- Elution wurden Filterspitzen und RNase/DNase-freie Reaktionsgefäße verwendet. Zur Lyse der Zellen wurden pro 6-Loch 250 µl des RLT Puffers von Qiagen mit 2,5 µl β-Mercaptoethanol pro 6-Loch eingesetzt. β-Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken und verhindert den RNA-Abbau während der Aufbereitung indem es endogene Ribonukleasen (RNase) denaturiert. Die Zellen wurden mit sterilen Zellschabern abgeschabt und in Reaktionsgefäße überführt. Die Proben lagerten bei -20°C.

3.3.2.2 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit dem Qiagen RNeasy® Mini Kit. Die vom Hersteller empfohlenen Schritte des DNase-Verdau wurden durchgeführt, um mögliche DNA-Reste zu entfernen. Zum Erzielen einer höheren RNA-Konzentration wurde in Anlehnung an das Herstellerprotokoll ein optionaler Schritt durchgeführt. Das RNA-Eluat wurde am Ende nochmals auf die Membran der RNeasy®-Säule des Kits gegeben und 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Messung von RNA-Konzentration und Reinheit erfolgte photometrisch durch Absorptionmessung bei

Methoden

260/280 nm mit dem *i-Control* Programm des *Tecan Readers*. Als Referenz diente RNase/DNase-freies Wasser. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

Hintergrund für die Analyse ist, dass laut dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Menge der Nukleinsäuren mit der Menge des absorbierten Lichts bei 260 nm korreliert, indem in diesem Bereich die Extinktion der Probe gemessen wird. Diese Extinktion wird als optische Dichte bei 260 nm (OD_{260}) beschrieben und als logarithmisches Verhältnis zwischen der initialen Lichtintensität (I_0) bei einer Wellenlänge von 260 nm und der photometrisch gemessenen Lichtintensität (I) bei gleicher Wellenlänge berechnet.

$$OD_{260} = \text{Log} (I_0/I)$$

Große Mengen an Nukleinsäuren absorbieren viel Licht und gehen mit hohen OD_{260} -Werten einher und umgekehrt.

Danach werden die Messwerte, bei einer standardmäßigen Distanz von 1 cm zwischen Lichtquelle und Photometer, für die Quantifizierung des RNA-Gehalts mit dem Faktor 40 in [$\mu\text{g/ml}$] konvertiert. Weiterhin ist zu beachten, dass in der hier vorliegenden Arbeit kein Standardphotometer eingesetzt wurde, sondern ein Plattenreader (*Tecan-Reader*). Daher musste zusätzlich mit einem Lichtwegkorrekturfaktor von 20 multipliziert werden. Da es in der Aufbereitung der Nukleinsäuren zu Verunreinigungen durch Proteine kommen kann und diese auch bei 260 nm Licht absorbieren, wird die Reinheit der Proben bestimmt. Dafür wird eine zweite photometrische Messung bei 280 nm durchgeführt, da in diesem Bereich nur die Proteine und nicht die Nukleinsäuren Licht aufnehmen. Bei einem OD_{260}/OD_{280} -Quotient von ~ 2 ist die RNA-Isolation als rein anzusehen.

3.3.2.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription der isolierten RNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des QuantiTect® Reverse Transkriptase Kits von Qiagen. Mit diesem Kit können RNA-Mengen zwischen 10 pg und 1 μg revers transkribiert werden. Er enthält einen gDNA *Wipeout Puffer* zur Entfernung der genomischen DNA, die Quantiscript® Reverse Transkriptase mit RNase Inhibitor, sowie einen Reverse Transkriptase-Puffer und einen Random-Primer Mix mittels dem überlappende cDNA Stränge der jeweiligen mRNA hergestellt werden. Die RNA Matrize wurde nach Herstellerangaben in die komplementäre Einzelstrang DNA umgeschrieben. Für die folgende Echtzeit-PCR wurde die DNA 1:10 in RNase/DNase-freiem Wasser verdünnt und lagerte bei -20°C.

Methoden

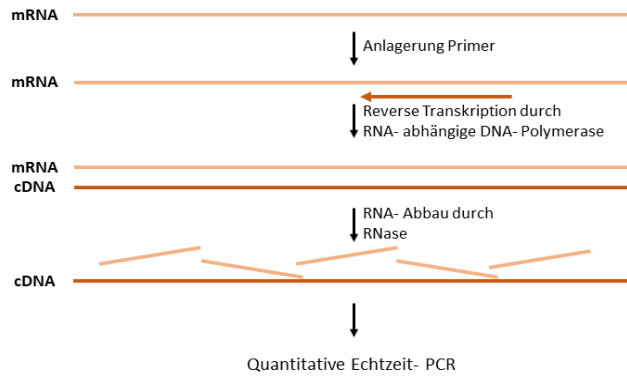


Abbildung 8. Schematische Darstellung der Schritte der reversen Transkription

Aus der RNA-Matrize erfolgt nach Anlagerung der Primer die reverse Transkription durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase und in diesem Sinne die Herstellung komplementärer Einzelstrang-DNA. RNasen bauen die RNA ab (adaptiert nach dem Herstellerprotokoll des QuantiTect® Reverse Transkriptase Kits von Qiagen, April 2005)

3.3.2.4 Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion mit cDNA aus vorheriger reverser Transkription aus RNA wird in dieser Arbeit mit RT-qPCR abgekürzt.

Die PCR ist eine Abfolge aus DNA-Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Diese Schritte werden über mehrere Zyklen wiederholt. Die Denaturierung der doppelsträngigen DNA (sog. Template) erfolgt bei 94-96°C. Die DNA wird in Einzelstränge aufgebrochen. Für die hier durchgeführte *SYBR® Green* Methode (s.u.) wurden mit Hilfe des QuantiTect® Reverse Transkriptase Kits von Qiagen in der Reversen Transkription bereits DNA-Einzelstränge gewonnen, um ein direktes Anlagern und damit ein Farbsignal durch den Farbstoff zu Beginn zu vermeiden. Bei einer Temperatur zwischen 55 und 65°C können sich die ausgewählten Primer anlagern. Der zu amplifizierende Genabschnitt befindet sich zwischen den beiden Oligonukleotiden und wird während der Elongation durch eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase in 5'→3'-Richtung mit freien Nukleotiden aufgefüllt. Die beiden Primer bilden den Anfang und das Ende des neuen Einzelstrangs, der pro Zyklus verdoppelt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die RT-qPCR-Methode angewandt, bei der die PCR-Produkte mit Fluoreszenzfarbstoffen im zeitlichen Verlauf quantifiziert werden können. Als Farbstoff wurde *SYBR® Green* in dem *Brilliant III SYBR® Green QPCR MasterMix* von Agilent Technologies verwendet.

SYBR® Green hat in Anwesenheit einzelsträngiger Nukleinsäuren eine niedrige Eigenfluoreszenz. In Abhängigkeit des Anstiegs, der in der PCR Reaktion gebildeten dsDNA, wird dann ein Fluoreszenzsignal erzeugt. Ab dem Zeitpunkt/Zyklus, an dem

dieses Signal erstmals signifikant den Schwellenwert (sog. *Comparative threshold* (C_t)) der Hintergrundfluoreszenz übersteigt, findet ein proportionaler Anstieg der Fluoreszenz zur DNA-Amplifikation statt, bis eine Sättigung eintritt, die den Verbrauch an Primer und Polymerase anzeigt.

Die Parameter für die Durchführung der RT-qPCR wurden mit Hilfe der *StepOnePlus*-Software von Thermo Fisher festgelegt. Es wurden Triplikate jeder Probe auf eine 96-Loch-Platte pipettiert. Die Zusammensetzung der Proben erfolgte nach Protokollangaben des Herstellers Agilent Technologies aus dem *Brilliant III SYBR® Green QPCR MasterMix*, Nuklease-freiem Wasser, DNA-Template und den Primern. Die Komponenten lagerten während des Gebrauchs auf Eis. Es wurden 5 μ M eines jeden Primers eingesetzt. Als Referenzgen wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse und wird durch äußere Einflüsse in seiner Expression normalerweise nicht verändert und kann daher zur Normalisierung etwaiger Templateunterschiede durch ungenaue RNA Vermessung oder Pipettierfehler bei der Herstellung der cDNA Verdünnung eingesetzt werden. Außerdem wurde eine Kontrolle ohne DNA-Template mitgeführt. Die RT-qPCR wurde mit dem *StepOnePlus*-System von Thermo Fisher durchgeführt.

3.3.2.5 Quantifizierung

Für die Auswertung der Ergebnisse der RT-qPCR wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Der C_t -Wert (*Comparative threshold*) beschreibt den Schwellenwert, ab dem es zu einem exponentiellen Anstieg der Templatmenge kommt. Er definiert den Punkt, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant und daher quantifizierbar ansteigt (s.o). Um die einzelnen Proben miteinander vergleichen zu können, wird zunächst zur Normalisierung eine Differenz aus dem C_t -Wert des Zielgens in den einzelnen Proben und dem des Referenzgens (in unserem Fall GAPDH) gebildet (ΔC_t). Die ΔC_t -Werte der stimulierten Gruppen wurden anschließend von der unstimulierten Kontrollprobe subtrahiert ($\Delta\Delta C_t$). Der erhaltene Wert wurde in die Gleichung $x = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ eingesetzt, um die x-fache Expression des Zielgens in den stimulierten Proben in Relation zur unstimulierten Referenzprobe zu erhalten.

3.4 Migrationsanalyse mittels *Cell-Tracking*

Aussagen über das Migrationverhalten von Zellen konnten mit Hilfe des Prinzips des *Cell-Trackings* getroffen werden. Auf ein gekammertes Deckgläschen mit vier Kammern

Methoden

von ibidi GmbH wurden 50.000 BLM-Zellen pro Kammer ausgesät und am folgenden Tag stimuliert. Die zu diesem Zeitpunkt subkonfluenten Zellpopulationen wurden nach Stimulation für 48 h unter einem motorisierten Aufrechtfluoreszenzmikroskop beobachtet. Dieses war ausgestattet mit einer Weißlicht-LED Beleuchtung und einem Inkubationssystem, das die Bedingungen bei 37°C, 5% CO₂ und 85% Luftfeuchtigkeit hielt. Alle 10 min wurde von einer konstanten Position einer jeden Kammer eine Phasenkontrast-Aufnahme festgehalten. Die entstandenen Bilder wurden mit der *NIS-Elements Advanced Research* Software von Nikon in AVI-Filmsequenzen umgewandelt. Mit Hilfe eines Plugins des auf *Image J* basierenden *Open Source* Software Pakets *FIJI* wurden anhand der Filmaufnahmen 15 Zellen pro Kammer manuell *getrackt*. Die Ergebnisse wurden dazu genutzt, die zurückgelegte Wegstrecke der einzelnen Zellen in dem beobachteten Zeitraum graphisch darzustellen. Diese weitere Auswertung erfolgte mit Hilfe des Chemotaxis Plugins von ibidi GmbH. Außerdem konnten morphologische Veränderungen in dem Zeitintervall durch photographisch festgehaltene Standbilder veranschaulicht werden.

3.5 Statistik

Sämtliche statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Software *GraphPad Prism* und dem *Microsoft*- Programm Excel durchgeführt. Bei einem

Vergleich von normalisierten Daten mit einer auf 1 (100%) gesetzten Kontrolle wurde der *One-Sample TTest* verwendet, bei dem ein Datensatz um einen Mittelwert normalverteilt vorliegt. Durch die Bonferroni- Multiplikationskorrektur erhält man im Anschluss einen korrigierten p- Wert, indem der niedrigste durch den *One-Sample TTest* (Einstichproben-t-Test) erhaltene p- Wert mit n-1 der verglichenen Konditionen (inklusive der normalisierten Kontrolle) multipliziert, der zweitniedrigste mit n-2 usw. wird. Außerdem wurde der *Paired Sample TTest* (Abhängige t-Test) verwendet, um die mittlere normalverteilte Differenz zweier verbundener Stichproben, die um einen Mittelwert herum variieren, miteinander zu vergleichen.

Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% (*p < 0,05) wurde das Signifikanzniveau erreicht. Als signifikanter galten Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 1 % (**p < 0,01) als sehr signifikant Ergebnisse mit unter 0,1 % (**p < 0,001) und als hoch signifikant wurden Ergebnisse mit unter 0.01% (***p < 0,0001) gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Aktivierungszustand von ERK5 bei Hemmung des MAPK-Signalwegs

Ziel der folgenden Versuche war es, die Auswirkung einer Inhibition auf verschiedenen Ebenen des MAPK- Signalwegs auf den Aktivierungszustand von ERK5 mit diversen Methoden zu erheben. Eine Therapieresistenz-vermittelnde Wirkung von ERK5 Aktivierung unter MEK1/2- Inhibition wurde für KRAS- mutierten Kolon- und Pankreaskarzinomzellen bereits publiziert[68, 69]. Da in der Tumorgenese des Melanoms ebenfalls eine RAS- Isoform (NRAS Q16) eine der verbreitetsten, genetischen Veränderungen darstellt, lag es nahe, NRAS- mutierte Melanomzellen zu untersuchen, um den Beitrag einer ERK5- Aktivierung hinsichtlich einer MEKi- Resistenz in dieser Tumorentität zu prüfen. Um herauszufinden, ob initial davon auszugehen ist, dass ERK5 eine vergleichbare Funktion in NRAS- mutierten Melanomzellen ausübt, wurden im Rahmen von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe 13 Melanomlinien auf ihren ERK5- Phosphorylierungsstatus hin untersucht. Etwa ein Drittel zeigte bereits basal eine ERK5- Phosphorylierung (s. Kapitel 1.3). Diese Beobachtung lieferte die Ausgangslage für die folgenden Versuche. Neben RAS- Mutationen spielen Mutationen auf BRAF- Ebene eine ebenso tragende Rolle in der Melanomentstehung. Aus diesem Grund wurden auch mit BRAF- mutierten Melanomzelllinien Hemmversuche durchgeführt bei denen der MAPK- Signalweg auf Ebene verschiedener Signalkomponenten (BRAF, MEK oder ERK) inhibiert wurde, um auch in diesem Kollektiv neue Erkenntnisse über die Funktion von ERK5 zu erlangen.

Ein weiteres, zentrales Element der folgenden Versuche stellte die Untersuchung der Zelltoxizität der verwendeten pharmakologischen Inhibitoren sowie deren Auswirkung auf die einzelnen Phasen des Zellzyklus dar.

4.1.1 Induktion von ERK5- Phosphorylierung durch MEKi- Behandlung NRAS-mutierter Melanomlinien

Um die Auswirkung einer MEK1/2- Inhibition auf den Phosphorylierungsstatus von ERK5 in Melanomlinien zu untersuchen, wurde initial eine NRAS- mutierte Linie ausgewählt, die keine augenfällige bzw. nur eine sehr geringe ERK5 - Basalphosphorylierung aufwies. Die Wahl fiel auf die BLM- Zelllinie, die über eine

Ergebnisse

deutlich vorhandene ERK1/2- Phosphorylierung bei gleichzeitig niedrigem pERK5-Basallevel verfügt. Die BLM Zellen wurden 48 h mit dem MEK1/2- Inhibitor Trametinib in verschiedenen Dosierungen stimuliert. Anschließend wurden parallel Zelllysate gewonnen und zur Bestimmung der antiproliferativen/zytotoxischen Inhibitoraktivität eine Kristallviolett färbung angefertigt. Für einen Kristallviolett assay wurden die Zellen 72 h mit dem jeweiligen Inhibitor stimuliert. Diese Zeitspanne gilt für jede angefertigte Zell färbung dieser Arbeit, sollte es nicht anders beschrieben sein. Eine Phosphorylierung von ERK5 äußert sich durch das Auftreten einer im Immunoblot langsamer migrierenden ERK5-Bande bei ca. 115 kDa. Nach Auftragung der Zelllysate zeigte sich im Western Blot mit aufsteigender Dosis des Inhibitors ab 10 nM Trametinib ein immer prägnanter werdender Phosphorylierungsshift der ERK5- Bande zu pERK5 (Abbildung 9A). Gleichzeitig nahm die Aktivierung von ERK1/2 im Western Blot dosiskorrelierend ab, wodurch die primäre Wirkung des Inhibitors belegt wurde. Als Ladekontrolle fungierte in allen durchgeführten Western Blots Tubulin als Bestandteil des Zytoskeletts. Durch eine Erweiterung des Inhibitor- Spektrums konnte eine Spezifität dieser ERK5- Aktivierung durch MEKi in BLM- Zellen nachgewiesen und ein *off-traget*- Effekt ausgeschlossen werden. Hierzu wurden in anschließenden Versuchen Titrationen mit den alternativen MEKi Cobimetinib (Abbildung 9B), Binimetinib (Abbildung 9C), sowie Selumetinib (Abbildung 9D) durchgeführt. Auch in diesen Versuchen ließ sich mit ansteigender MEKi- Dosierung eine zunehmende ERK5- Phosphorylierung erkennen. Diese trat für Cobimetinib ab einer Konzentration von ca. 1 μM , für Binimetinib ab 2,5 μM und Selumetinib ab 5 μM deutlich auf. Die gleichzeitig durchgeführten Kristallviolett färbungen dienten zur Visualisierung und Analysierung der Zelldichte unter den verschiedenen MEKi- Monobehandlungen. Dabei ließ sich ein dosiskorrelierender Verlust der Zelldichte erkennen, der die toxische/antiproliferative Wirkung der angewandten Inhibitoren auf die BLM Zellen bestätigt. Die Farbeintensitäten wurden in n=3 unabhängig durchgeführten Experimenten durch Farbstoffauswaschung und nachfolgende Absorptionmessung mittels *One-Sample TTest* und Bonferroni- Multiplikationskorrektur statistisch ausgewertet. Wenn nicht anders beschrieben, wurde diese Technik der Auswertung auch in den folgenden Versuchen angewandt.

Ergebnisse

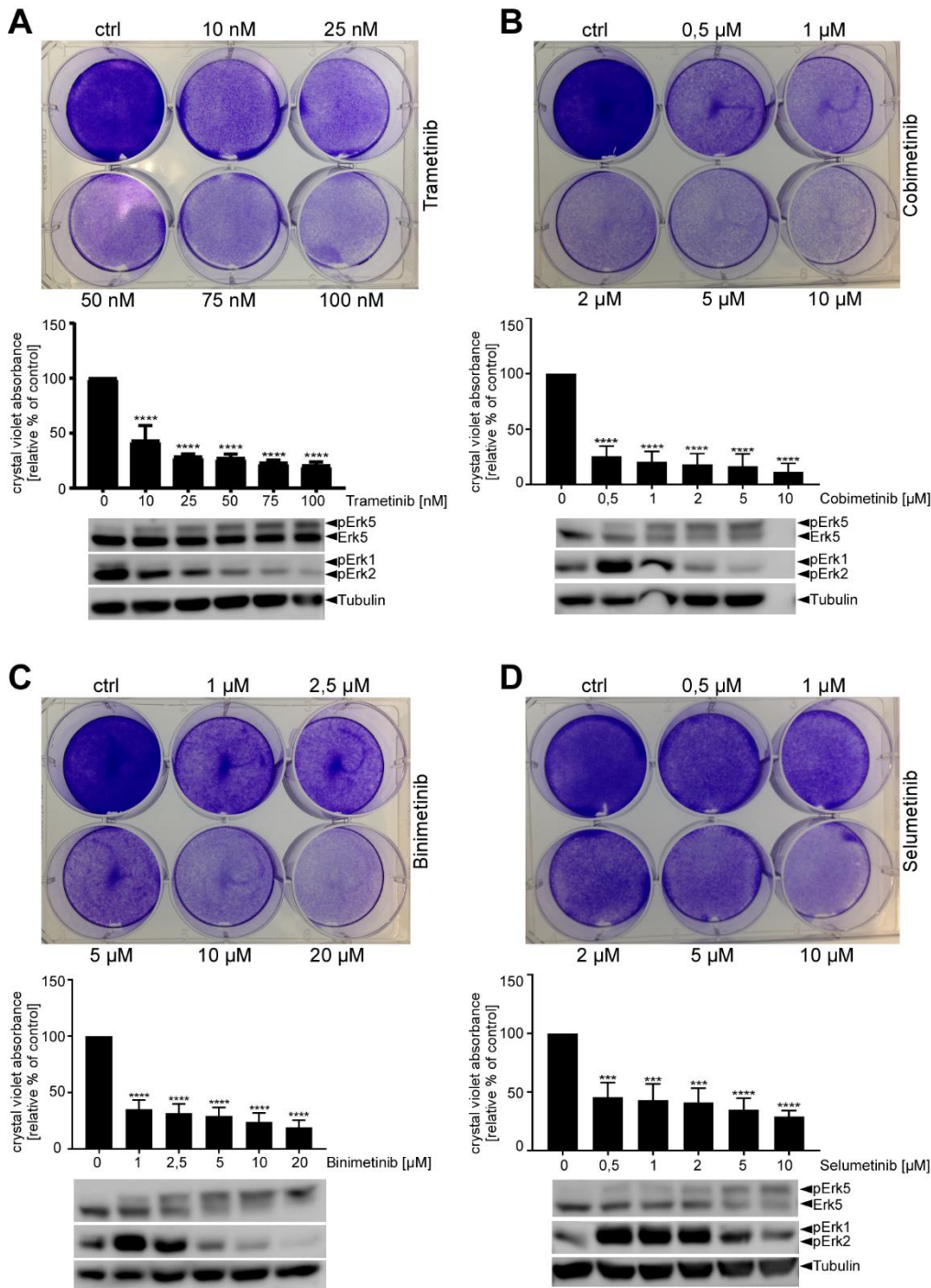


Abbildung 9: ERK5-Aktivierung durch Mek1/2-Inhibition in BLM

Die NRAS-mutierte Melanomlinie BLM wurde mit den Mek1/2-Inhibitoren Trametinib (A), Cobimetinib (B), Binimetinib (C) und Selumetinib (D) für 48h (Western Blots) bzw. 72 h (Kristallviolett-färbung) mit den angegebenen Konzentrationen der jeweiligen MEKi stimuliert. Mit steigenden Konzentrationen zeigt sich für alle Behandlungen eine dosiskorrelierende ERK5-Phosphorylierung im Western Blot. Trametinib führt dabei ab einer Konzentration von 10 nM zu einem deutlichen Phosphorylierungsshift (A), Binimetinib ab 2,5 µM (C) und Selumetinib ab 5 µM. Eine Konzentration von 1 µM Cobimetinib aktiviert ERK5, wobei bereits 10 µM zu einem solch hohen Zellverlust führte, dass ein Auftrag im Western Blot nicht mehr möglich war. Gleichzeitig wird die ERK1/2-Aktivität zunehmend inhibiert. Die Zelldichte wurde anhand von Kristallviolett-färbungen dargestellt und statistisch mit n=3 ausgewertet. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Sample TTest und Bonferroni- Multiplikationskorrektur.

Ergebnisse

Eine MEK1/2- Inhibition durch die verschiedenen Wirkstoffe resultierte in einer ERK5- Phosphorylierung in der getesteten Melanomlinie. Diese Observation wirft die Frage auf, wie die Melanomzellen der BLM- Linie auf eine Hemmung dieser aktivierten Kinase reagieren. Um die angemessene Konzentration des zu diesem Zweck verwendeten ERK5- Inhibitors XMD 08-92 zu eruieren, wurde eine Titration des Inhibitors durchgeführt. Gleichzeitig wurden die Zellen unter eine repräsentative MEK1/2 -Inhibition mit 100 nM Trametinib gesetzt, um die Veränderung der ERK5- Phosphorylierung unter Inhibition anhand des *Shifts* im Western Blot aufzuzeichnen. Die Zellen wurden dazu insgesamt 48 h mit Trametinib und XMD 08-92 in den aufgeführten Konzentrationen kostimuliert.

Nach Auftragung der Zelllysate kam es im Western Blot zu einer sichtbaren Abnahme der MEKi- induzierten ERK5- Phosphorylierung mit 5 μ M XMD 08-92 (Abbildung 10A). In einem nächsten Schritt wurden die ermittelten Konzentrationen kombiniert und der antiproliferative Effekt dieser Kombibehandlung auf BLM- Zellen anhand Kristallviolett-färbung untersucht. Abbildung 10B illustriert, dass unter Trametinib/XMD 08-92 Doppelbehandlung eine synergistische antiproliferative Wirkung eintrat, die deutlich stärker als die jeweilige Monobehandlung war. Diese Daten wurden auch für Cobimetinib als MEKi- Alternative (C) und den MEK5/ERK5- Inhibitor BIX 02188 (D) anstelle von XMD 08-92 reproduziert. Im Western Blot wurde die Wirkung auf Proteinebene simultan kontrolliert. Um den aktivierenden Effekt von Trametinib auf ERK5 zusätzlich funktionell zu kontrollieren, wurde nachfolgend mittels qRT-PCR die Expression des bekannten ERK5 Effektorgens *KLF2* nach Stimulation von BLM mit den verschiedenen Inhibitoren mit der einer unbehandelten Kontrolle verglichen (E). Dabei ergab sich eine eindeutige *KLF2* mRNA Induktion durch Trametinib, die durch eine Kostimulation mit XMD 08-92 unterdrückt wurde. Alleinige ERK5- Inhibitor Behandlung zeigte dabei keine signifikante Repression von *KLF2*. Diese Daten bestätigen die Annahme, dass die durch MEKi Behandlung im Immunoblot induzierte langsam migrierende ERK5 Bande tatsächlich seiner autophosphorylierten, aktivierten Form entspricht.

Ergebnisse

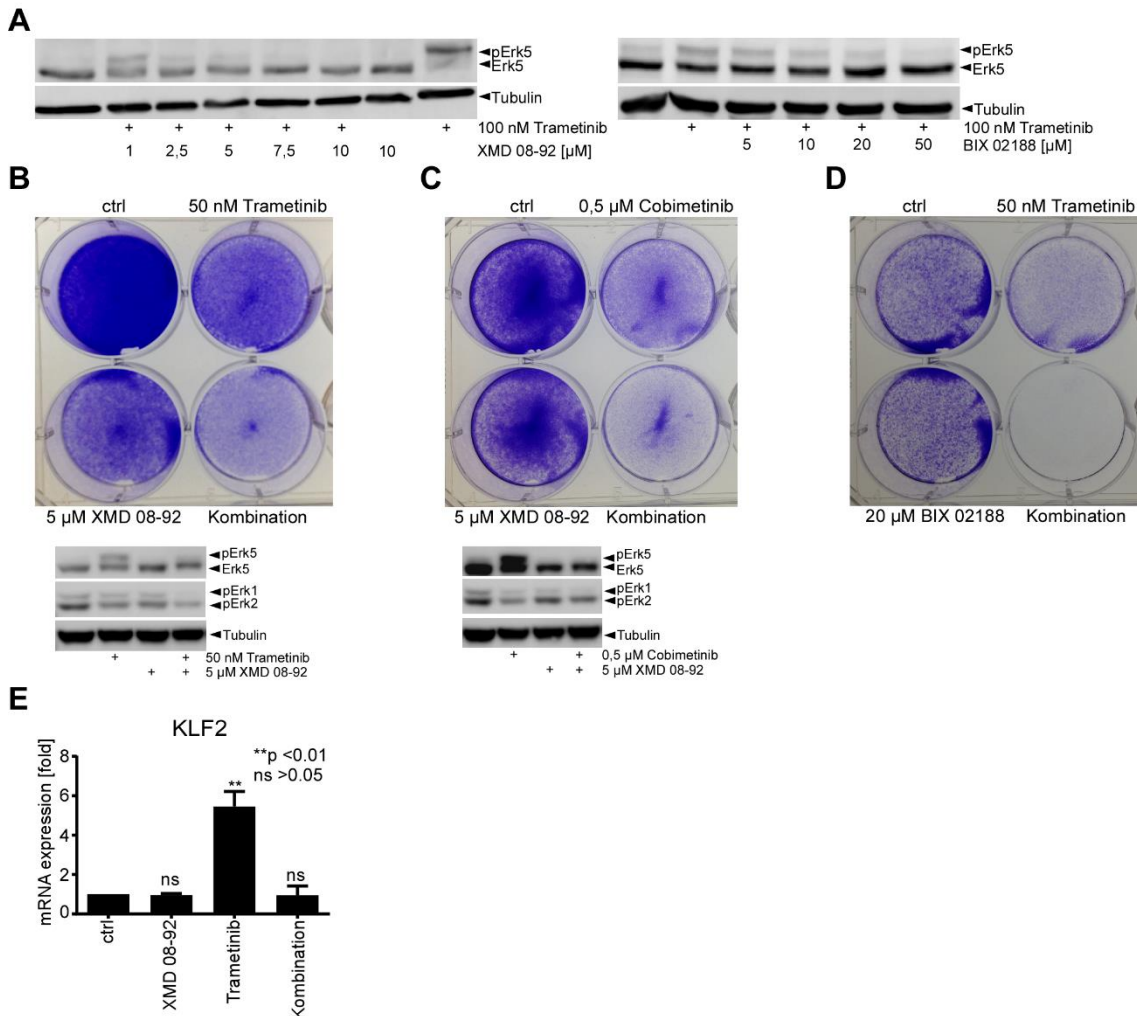


Abbildung 10: Kombinationsbehandlung mit ERK5-Inhibition verstärkt zelltoxischen Effekt einer Mek1/2-Inhibition in BLM und unterdrückt die Expression des ERK5- Effektorproteins KLF2

Um die effiziente Konzentration des ERK5-Inhibitoren XMD 08-92 und BIX 02188 zu ermitteln, wurde die NRAS-mutierte Melanomlinie BLM mit aufsteigenden Konzentrationen der Inhibitoren unter konstanter repräsentativer Mek1/2-Inhibition von 100 nM Trametinib stimuliert (A). Im weiteren Verlauf wurden die BLM- Zellen für 48 h unter MEKi/ERK5i- Kostimulationen gesetzt und diese per Kristallviolettassays protokolliert. Die Doppelbehandlungen fanden in Form von Trametinib +/- XMD 08-92 (B), Cobimetinib +/- XMD 08-92 (C) und Trametinib +/- BIX 02188 (D) statt. Die Zellfärbungen verdeutlichen die synergistische Zytotoxizität bei Kombination eines MEK1/2- mit einem ERK5-Inhibitor. Die korrelierenden RT-qPCR- Analyse zeigt die Expression des ERK5- Zielgens KLF2 in Bezug auf die Kontrolle bei Stimulation durch die aufgeführten Inhibitoren (E). Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Sample TTest und Bonferroni- Multiplikationskorrektur.

4.1.2 Auswirkung pharmakologischer ERK5- Hemmung auf Zellzyklusprogression und Apoptose in NRAS-mutierter Melanomlinie

In den bereits beschriebenen Versuchen wurde bei Melanomzellen ohne auffallende basale ERK5 Aktivität anhand von Kristallfärbungen ein deutlicher Effekt einer Kombibehandlung eines ERK5i im Zusammenspiel mit einer Hemmung des MAPK - Signalwegs auf MEK1/2- Ebene nachgewiesen. Im weiteren Verlauf sollte die spezifische

Ergebnisse

Wirkung einer Einzelbehandlung und Ko-Behandlung mit Trametinib und XMD 08-92 auf die Zellzyklusprogression von Melanomzellen genauer analysiert werden. Dazu wurde eine Melanomzelllinie mit hoher Basalaktivität von ERK5 (indiziert durch deutliches Vorhandensein einer geschifteten pERK5 Bande unter Basalbedingungen) verwendet, um den Einfluss einer ERK5- Monoinhibition besser beurteilen zu können. Die Wahl fiel auf die Linie FM79, die zuvor in Immunoblots eine klare konstitutive ERK5 Phosphorylierung aufwies (s. Abbildung 6). Für die anschließende Zellzyklusanalyse wurden die Zellen 48 h mit dem ERK5- Inhibitor XMD 08-92, dem MEK1/2- Inhibitor Trametinib oder einer Kombination behandelt. Nachfolgend wurde der Einbau des Basenanalogs Bromdesoxyuridin (BrdU) als Maß für die Replikationsaktivität in der S-Phase des Zellzyklus in behandelten und unbehandelten Zellen durch durchflusszytometrische Quantifizierung der BrdU-Positivität mit einem FITC-Fluorochrom-gekoppelte Antikörper gegen BrdU bestimmt. In Abbildung 11A ist zu sehen, dass sich der Anteil BrdU-positiver Zellen unter ERK5 Monoinhibition deutlich von 18% auf 0,1% reduzierte.

Zusätzlich lässt sich die Zellzyklusverteilung und der Anteil apoptotischer Zellen durch Färbung mit dem DNA- Farbstoff PI analysieren. Dabei zeigte sich, dass eine Kombinationsstimulation aus MEKi und ERK5- Inhibition zu einem prägnanten Anstieg des Anteils von Zellen mit subdiploidem DNA-Anteil (Sub G1) führte, was auf eine erhöhte Apoptose hindeutet. Im Gegensatz dazu führte eine ERK5- Monobehandlung lediglich zu einem erhöhtem Anteil von G1-Zellen und einer Abnahme der sich in der S-Phase befindenden Zellen, aber keinem klaren Anstieg der Subdiploidie, was eher auf die Induktion eines Zellzyklearrests in G1-S als auf eine verstärkte Apoptose hindeutet. MEKi allein zeigte im Vergleich zur Kombinationsbehandlung mit XMD 08-92 eine geringere antiproliferative und proapoptische Wirkung (Abbildung 11B). Durch diese Methode konnte, der bereits für BLM-Linie beobachtete, erhöhte zytotoxische Effekt einer MEKi und ERK5 Ko-Inhibition auf Melanomzellen weiter bestätigt werden. Die Ergebnisse dieses Versuchs lassen außerdem den Schluss zu, dass zumindest in manchen Melanomlinien eine erhöhte ERK5-Aktivität zwar nicht das generelle Überleben, jedoch die Proliferation beim Übertritts von G1 in die S-Phase des Zellzyklus fördert, da die Zellen bei Hemmung der ERK5- Kinaseaktivität in der G1-Phase akkumulieren aber keine ausgeprägte Subdiploidie zu erkennen war.

Ergebnisse

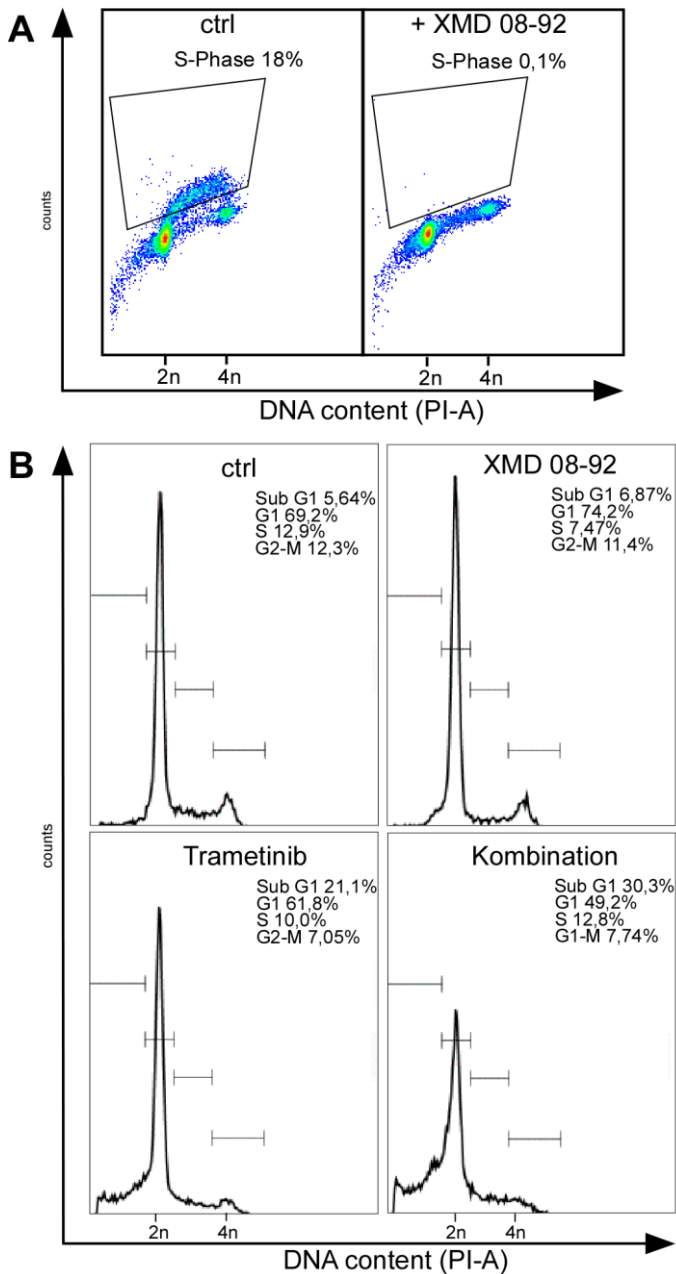


Abbildung 11: Zellzyklusanalyse unter ERK5- und MEK1/2- Inhibition in FM79

Für die Zellzyklusanalyse wurde die NRAS-mutierte Melanomlinie FM79, die eine erhöhte Basalaktivität von ERK5 aufweist, verwendet. Behandelt man diese Zelllinie mit XMD 08-92, gehen die Zellen in einen G1-Arrest über. Dies wird durch die BrdU-Markierung über FITC-Konjugation in der FACS-Messung dargestellt (A). Durch diese Methode wird die DNA während der S-Phase markiert und die Zellen in dieser Phase prozentual bestimmt. Es zeigt sich eine deutliche Verminderung der sich in der S-Phase befindenden Zellen von 18% auf 0,1% unter ERK5-Inhibition. Mittels einer nukleinsäureinterkalierenden PI- Färbung mit anschließender FACS-Messung lässt sich der Zellzyklus weiter analysieren. Es zeigt sich auch in dieser Zelllinie, dass eine Kombination aus ERK5- und Mek1/2-Inhibition zu einer erhöhten Zelltoxizität, mit einer Apoptoserate von 30,3% (Sub G1), führt (B).

4.1.3 Die Rolle von ERK5 in BRAF-mutierten Melanomlinien

Neben der NRAS Mutation nimmt die BRAF Mutation, insbesondere die aktivierende Mutation BRAF V600E, in der Tumorgenese des Melanoms eine tragende Rolle ein.

Ergebnisse

Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, die bisherigen Ergebnisse auf Zelllinien, in denen diese genetische Anomalität zu finden ist, zu übertragen. Als ersten Schritt wurde analog zu den NRAS- mutierten Zellreihen ein Panel aus BRAF- Melanomlinien erstellt und im Western Blot aufgetragen. Hier konnte bei keiner der verwendeten Zelllinien eine basale ERK5- Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abbildung 12).

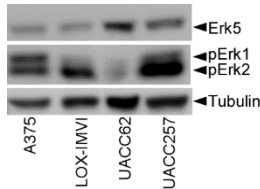


Abbildung 12: Basale ERK5-Aktivität in BRAF-mutierten Melanomlinien

Der Western Blot zeigt vier unbehandelte Melanomlinien mit einer BRAF-Mutation. Keine der aufgeführten Linien zeigt eine basale ERK5-Phosphorylierung.

Als nächstes galt es zu überprüfen, ob eine MEKi in BRAF- mutierten Melanomlinien, ebenfalls eine ERK5- Phosphorylierung induziert. Dazu wurden repräsentativ die drei Melanomlinien LOX-IMV1, UACC-62 und A375 mit steigenden Dosen des MEK1/2- Inhibitor Trametinib behandelt und nach einer Stimulation von 48 h lysiert. Dabei ließ sich eine dosisabhängige Intensivierung der pERK5- Bande im Western Blot darstellen (Abbildung 13A). In den parallel angefertigten Kristallviolettassays ließ sich in den BRAF Linien verglichen mit den Resultaten in den BLM- Zellen eine deutlich stärkere proapoptotische Sensitivität auf MEKi nachweisen (B).

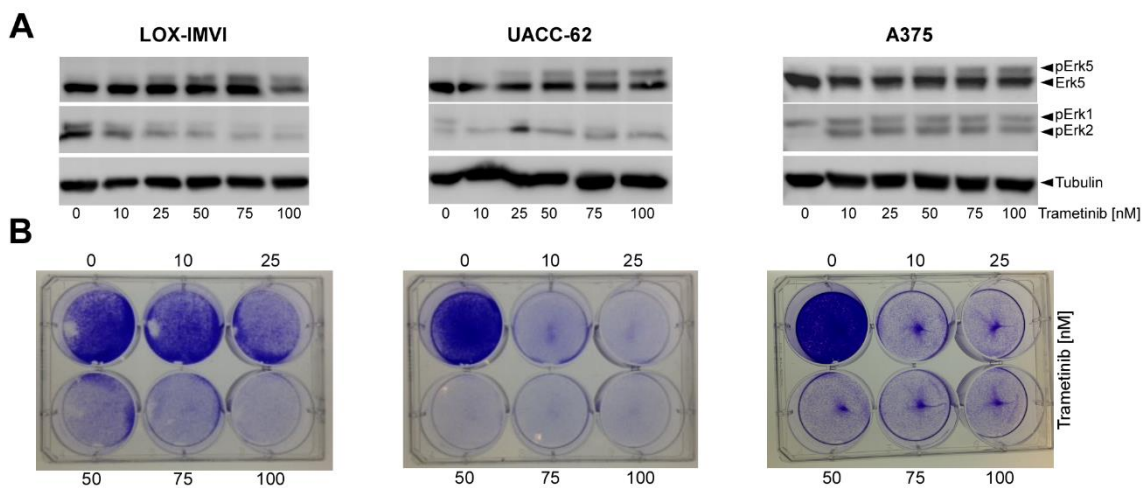


Abbildung 13: ERK5-Aktivierung durch Mek1/2 Inhibition in BRAF-mutierten Melanomlinien

Die BRAF V600E mutierten Zelllinien LOX-IMVI, UACC-62 und A275 wurden für 48 h mit ansteigenden Konzentrationen des MEK1/2-Inhibitor Trametinib stimuliert. Die zugehörigen Western Blots zeigen für alle Zelllinien einen Phosphorylierungsshift von ERK5 bei steigender Dosierung der MEK1/2-Inhibition, während sich eine Abnahme der ERK1/2- Phosphorylierung auf Proteinebene, besonders in der Linie A375, nicht darstellen lässt (A), trotz einer deutlich nachweisbaren verminderten Zelldichte in den korrelierenden Kristallviolett-färbungen (B).

Ergebnisse

Nachdem sich auch in der getesteten Melanomlinie mit BRAF- Mutation eine ERK5-Phosphorylierung unter MEKi analog zu der Beobachtung in NRAS- mutierten Melanomzellen wiederfand, war es nun interessant, den Effekt einer BRAF-Monoinhibition (BRAFi) in BRAF- Linien zu untersuchen. BRAF liegt in der Signalkaskade oberhalb von MEK und eine Inhibition führt somit zu einer *Upstream*-Hemmung des MAPK- Signalwegs. Die Zellreihen LOX-IMV1, UACC-62 und A375 wurden mit dem BRAF- Inhibitor Dabrafenib im Sinne einer Titration stimuliert und nach 48 h lysiert. Zur Bestimmung der Zelltoxizität des Inhibitors erfolgten Kristallviolett-färbungen nach Protokoll, wodurch jeweils eine Wirkung des Inhibitors auf die Zelldichte nachgewiesen werden konnte (Abbildung 14B). Jedoch hatte Dabrafenib auf die Linien LOX-IMVI und A375, verglichen mit der Linie UACC-62, diesbezüglich einen geringeren Effekt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit dem MEKi Trametinib, blieb unter BRAFi im Western Blot eine Phosphorylierung von ERK5 in allen drei Zellreihen aus. Gleichzeitig fiel auf, dass auf Proteinebene keine effektive Hemmung von ERK1/2 Phosphorylierung, bei UACC62 sogar eine erhöhte ERK1/2 Phosphorylierung unter der Stimulation eintrat.

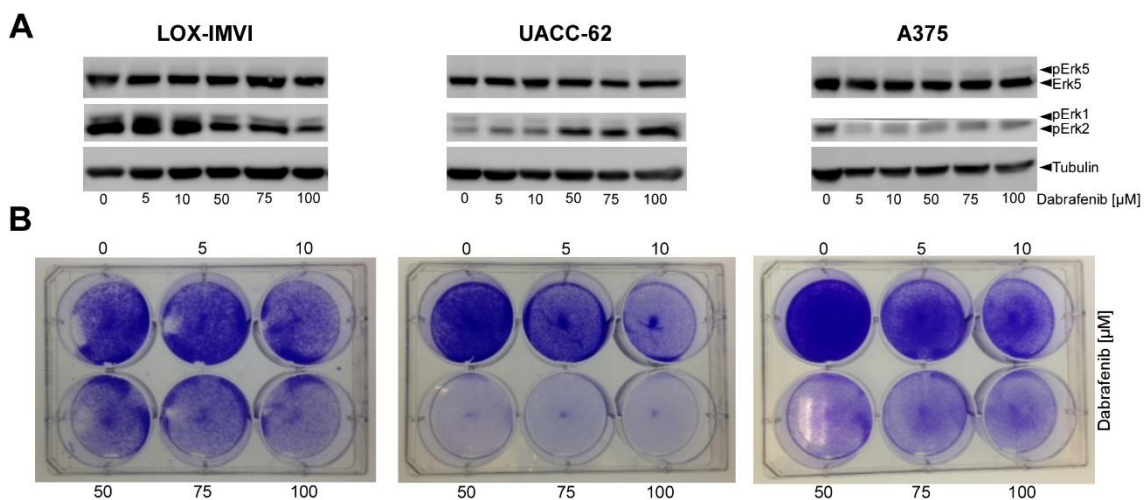


Abbildung 14: Keine ERK5-Aktivierung unter BRAF-Monoinhibition

Eine BRAF-Monoinhibition mit dem BRAF-Inhibitor Dabrafenib führte in den Melanomlinien LOX-IMVI, UACC-62 und A375 zu keiner ERK5-Aktivierung. Im Western Blot zeigt sich nur die unphosphorylierte ERK5-Bande. Des Weiteren bleibt eine deutliche Verminderung der phospho-Erk1/2-Banden im Western Blot unter Inhibition aus (A). Die Wirkung des Inhibitors auf den Zelltod kann dosiskorrelierend mittels der Kristallviolett-färbung nachgewiesen werden (B).

Passend zur fehlenden ERK5 Aktivierung unter BRAFi kam es bei einer zusätzlichen ERK5- Inhibition zu keinem synergistischen Effekt der Zellproliferation. Zellen der Melanomlinie A375 wurden 72 h in An- und Abwesenheit des pharmakologischen ERK5

Ergebnisse

Inhibitors XMD 08-92 mit Dabrafenib stimuliert. Durch den daraus resultierende Kristallviolettassay ließ sich keine verstärkende antiproliferative Wirkung einer Kohemmung mit XMD 08-92 nachweisen.

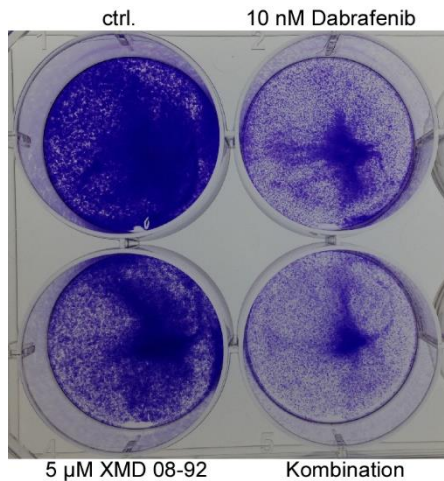


Abbildung 15: Kein synergistischer antiproliferativer Effekt eine Kombination aus BRAF- und ERK5- Inhibition in A375

Es zeigt sich kein Effekt einer ERK5-Inhibition mit XMD 08-92, sowie keine synergistische Wirkung auf die Zellproliferation bei Kombination BRAF-Inhibition in A375. Die Zelldichte wurde durch Kristallviolett-Färbungen dargestellt.

Um eine transiente oder verspätete ERK5- Phosphorylierung als Ursache für die ausbleibende ERK5 Inhibition unter BRAFi auszuschließen, wurden nachfolgend Zeitverlaufsexperimente mit Vemurafenib durchgeführt. Eine Veränderung des ERK5-Aktivierungszustand konnte zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Interessant war jedoch, dass nach Stimulation von A375 mit dem BRAF- Inhibitor Vemurafenib die pERK1/2- Bande im Western Blot nur transient verschwand, aber bereits nach 24 h wieder auftrat und bis zum Zeitpunkt der Probenentnahme der vorherigen Versuche (48 h , s. Abbildung 14) weiter zunahm (Abbildung 16).

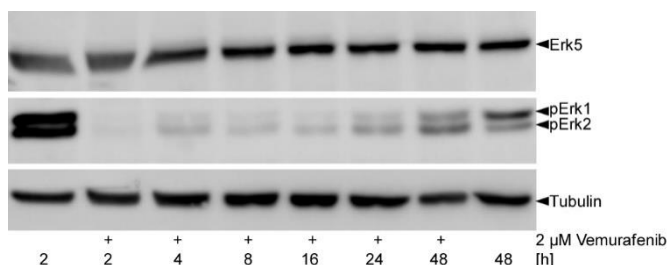


Abbildung 16: Keine ERK5-Aktivierung unter BRAF-Einzelbehandlung im Zeitverlauf

Um eine zeitliche Komponente als Ursache für den ausbleibenden Nachweis einer ERK5-Aktivierung unter BRAF-Einzelbehandlung, auszuschließen, wurde ein *Timecourse*-Experiment mit der BRAF-Linie A375 durchgeführt. Durch den Western Blot kann eine möglicherweise transiente oder verspätete ERK5-

Ergebnisse

Aktivierung unter Vemurafenib-Stimulation ausgeschlossen werden. Tatsächlich konnte nach anfänglicher Inhibition nach circa 24 h eine Re-Aktivierung der ERK1/2 - Phosphorylierung beobachtet werden.

Eine BRAF- Monoinhibition induzierte in Melanomlinien mit BRAF- Mutation keine ERK5- Aktivierung. Die Therapie des metastasierten Melanoms erfolgt in der klinischen Anwendung standardmäßig durch eine Doppelbehandlung aus BRAF- und MEK1/2- Inhibitor. Im folgenden Versuch wurde die Wirkung einer kombinierten BRAF/MEK1/2- Inhibition, die in der Klinik therapeutisch genutzt wird, mit einer Monotherapie der jeweiligen Inhibitoren auf Proteinebene verglichen. Die BRAF- mutierten Melanomlinien LOX-IMVI, UACC62 und A375 wurden jeweils 48 h mit verschiedenen Kombinationen aus BRAFi und MEKi stimuliert und die Zelllysate im Western Blot aufgetragen. Dabei konnte bei jeder Kombinationsbehandlung, ebenso wie unter MEKi allein eine ausgeprägte ERK5 Aktivierung beobachtet werden. Auffällig war, dass diese umso stärker ausgeprägt ist, je stärker die Hemmung auf ERK1/2- Ebene ausfiel (Abbildung 17).

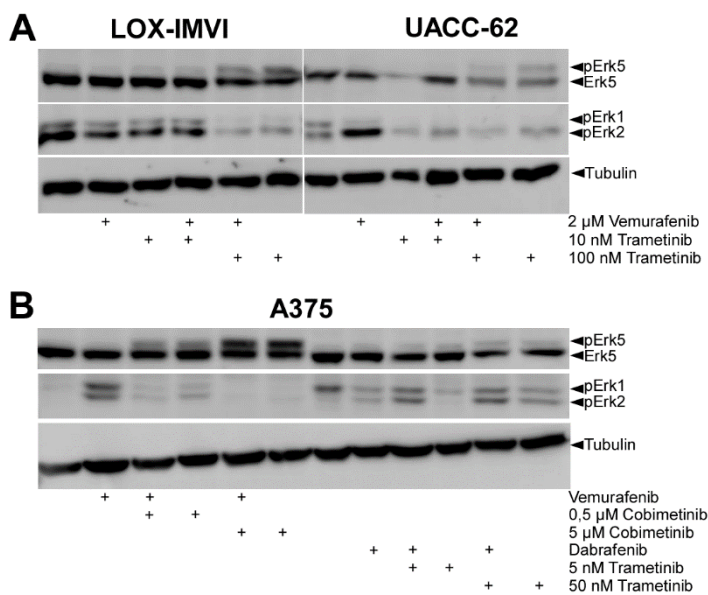


Abbildung 17: ERK5-Aktivierung unter BRAF/MEK1/2-Inhibitor Doppelbehandlung

Im Western Blot zeigt sich eine ERK5-Aktivierung bei verschiedenen Kombinationen aus Vemurafenib und Trametinib (A), Vemurafenib und Cobimetinib, sowie Dabrafenib zusammen mit Trametinib (B) in verschiedenen BRAF-mutierten Melanomzelllinien. Je schwächer die Inhibition auf ERK1/2 Ebene ausfiel, desto schwächer war die Phosphorylierung von ERK5. Die in Abbildung B durchgeführten Kombinationen finden standardmäßig klinische Anwendung in der Melanomtherapie.

4.1.4 Zusammenhang zwischen ERK1/2- Aktivität und ERK5- Phosphorylierung

Die Daten aus Abbildung 17 implizieren, dass ein Zusammenhang zwischen einer ERK5-Phosphorylierung und einer effizienten Hemmung auf der Ebene von ERK1/2 besteht. Daraus evolviert die These, dass die fehlende ERK5- Phosphorylierung in den BRAF Linien möglicherweise das Resultat einer unzureichenden ERK1/2- Hemmung sein könnte. Diese Behauptung wurde in einem anschließenden Versuchsaufbau überprüft. Melanomzellen mit NRAS- bzw. BRAF- Mutation wurden mit dem ERK1/2- Inhibitor GDC-0994 (ERKi) behandelt. Die Stimulationen erfolgten 24 h (Immunoblots) bzw. 72 h (Kristallviolettassays) nach Stimulation der repräsentativen Melanomlinien BLM und A375. Die Auswirkung auf Proteinebene wurde durch Immunoblots dargestellt und die Zelltoxizität/ Proliferation in Form von Kristallviolettassays visualisiert. Mittels RT-qPCR wurde parallel das ERK1/2- Zielgen DUSP4 analysiert und so die Funktionalität des Inhibitors überprüft. Tatsächlich zeigte sich in einer Titration des ERK1/2- Inhibitors eine dosiskorrelierende Aktivierung von ERK5 ab einer GDC-0994- Konzentration von 1 μ M (BLM, Abbildung 18A) bzw. zwischen 10 und 100 μ M (A375, Abbildung 18 B). Die Expression des Effektorproteins DUSP4 nahm mit aufsteigender Stimulanzienmenge ab (Abbildung 18C).

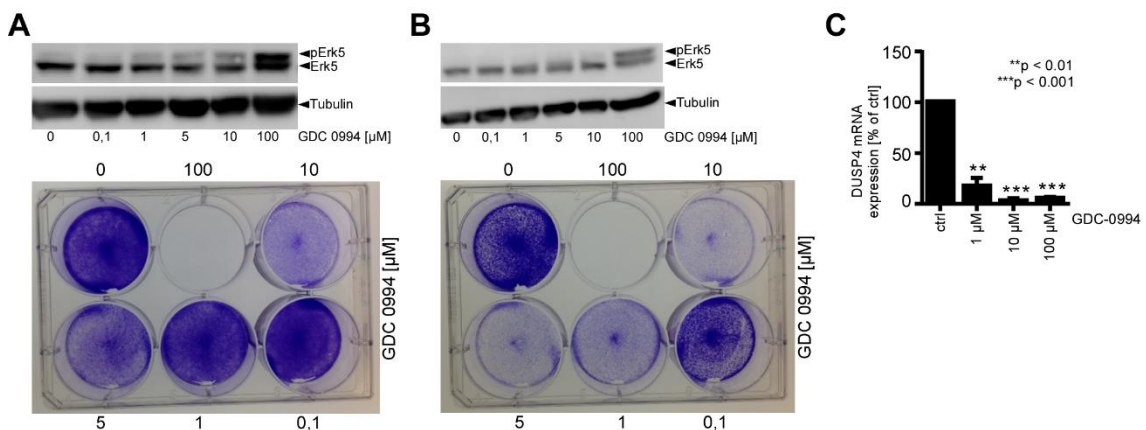


Abbildung 18: ERK5-Aktivierung bei Erk1/2-Inhibition in Melanomlinien

Die NRAS-mutierte Melanomlinie BLM (A) und die BRAF- mutierte Melanomlinie A375 (B) wurden 24 h mit dem ERK1/2 Inhibitor GDC-0994 im Sinne einer Dosiskinetik stimuliert. Es zeigte sich eine dosisabhängige ERK5-Aktivierung ab einer Konzentration von 1 μ M GDC-0994 (BLM) bzw. ab einer Konzentration zwischen 10 und 100 μ M (A375) im Western Blot. Die dosiskorrelierende Zelltoxizität wurde durch eine Kristallviolettärfärbung 72 h nach Inhibitorgabe dargestellt. Durch eine RT-qPCR des ERK1/2-Zielgens DUSP4 wurde in n=3 Experimenten die Funktion des Inhibitors überprüft (C). Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Sample TTest und Bonferroni- Multiplikationskorrektur. Gezeigt ist die mittlere prozentuale Reduktion der DUSP4 mRNA Expression \pm s.d. nach Normalisierung auf Expression des nicht-regulierten Haushaltgens GAPDH.

Ergebnisse

Die Zusammenschau der Ergebnisse lässt darauf schließen, dass die MEKi- induzierte ERK5- Phosphorylierung über ERK1/2 vermittelt wird. Eine effektive Hemmung der ERK1/2 Aktivität scheint eine Voraussetzung für die Umgehung des MAPK- Signalwegs im Sinne einer ERK5- Induktion zu sein. Die fehlende ERK5- Phosphorylierung in den BRAF- Linien unter BRAFi war durch eine mangelnde Blockierung auf ERK- Ebene bedingt. Durch eine erfolgreiche ERK1/2- Inhibition lässt sich auch in der verwendeten BRAF- Linie eine Aktivierung von ERK5 provozieren.

In BLM- Zellen konnte anhand von Kristallviolettassays ein synergistischer zelltoxischer Effekt einer MEK1/2/ERK5- Doppelbehandlung belegt werden (s. Abbildung 10). Dieser Synergismus sollte sich als Folgerung der aufgeführten Ergebnisse durch eine ERK1/2/ERK5- Kombinationsinhibition reproduzieren lassen. Dazu wurden BLM- Zellen mit GDC-0994 und XMD 08-92 in den angegebenen Konditionen stimuliert und wie gewohnt eine Zellfärbung durchgeführt. Parallel wurden Zellyssate für einen Immunoblot genommen, um die Wirkung der Stimulanzen auf Proteinebene zu verfolgen. In der Abbildung 19A lässt sich ein ausgeprägter antiproliferativer Effekt der Doppelbehandlung erkennen.

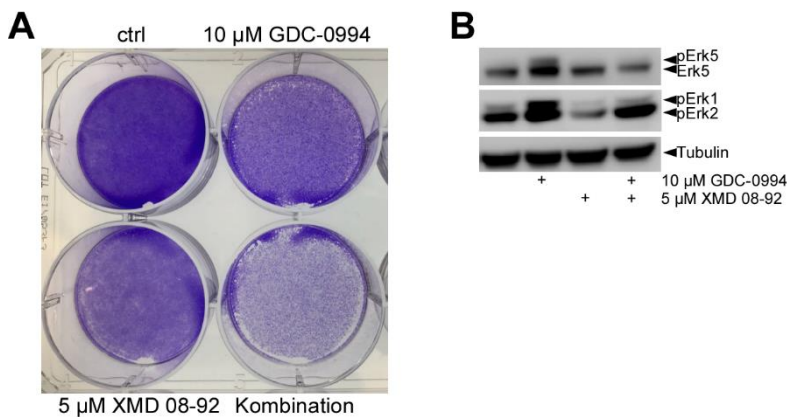


Abbildung 19: Doppelbehandlung aus ERK1/2- und ERK5- Inhibition hat synergistischen antiproliferativen Effekt in BLM

Melanomzellen der Linie BLM wurden mit GDC-0994 und XMD 08-92 allein oder in Kombination stimuliert. Die erstellte Kristallviolett färbung zeigt einen deutlichen verstärkenden Effekt einer Doppelbehandlung auf die Zelldichte (A). Im Immunoblot erkennt man eine ERK5- Phosphorylierung unter ERKi, die durch ERK5- Inhibition unterdrückt wird (B).

4.1.5 Auswirkung einer ERK5- Hemmung auf die Zellproliferation im Langzeitverlauf in NRAS- mutierter Melanomlinie

In der NRAS- mutierten Melanomzelllinie BLM konnte in einer Kurzzeitbehandlung von 72 h mit einer Kombination aus MEKi durch Trametinib und ERK5 Inhibition mittels

Ergebnisse

XMD 08-92 ein synergistischer, zelltoxischer Effekt mittels Kristallviolett-Färbung beobachtet werden (Kapitel 4.1.1). Der Fluoreszenz-Farbstoff CFSE diente in einem weiteren Versuch dazu, die Proliferation von BLM- Zellen unter einer Langzeit-Doppelbehandlung aus MEK1/2/ERK5-Inhibition zu verfolgen. Die Melanomzellen wurden 72 h mit XMD 08-92, Trametinib oder eine Kombination aus beiden Inhibitoren stimuliert und nach dieser Zeitspanne mit CFSE gefärbt. Die Stimulation dauerte anschließend weitere 11 Tage an, um eine gesamte Zeitdauer von 14 Tagen zu erreichen. Bei einer Zellteilung verteilt sich der CFSE Farbstoff gleichmäßig auf beide Tochterzellen. Das heißt, die Fluoreszenz nimmt bei stetiger Proliferation ab und gibt Aufschluss über die Verdopplungsrate. Bei ausbleibender Zellteilung oder Zelluntergang wird ein im Vergleich höherer Gehalt an Farbstoff in den Zellen detektiert. Die verbliebende Menge an Farbstoff, beziehungsweise seine fluoreszierende Wirkung, wurde nach abgeschlossener Stimulationsdauer mittels Durchflusszytometrie ausgewertet und graphisch aufgetragen. Die Grafik veranschaulicht deutlich den Nachweis einer ausgeprägten, anhaltend hemmenden Wirkung einer MEKi/ ERK5i Ko-Behandlung auf die Proliferation von NRAS- mutierten Melanomzellen. Als einzige Kondition mussten die Zellen unter Kombinationsbehandlung über 14 Tagen kein einziges Mal passagiert werden. Stattdessen fand ein dauerhafter Arrest der Zellzahl statt, die sich überdies kontinuierlich verringerte. Unter einer Trametinib-Monobehandlung war die Proliferation verzögert, doch kam es weiterhin zu Zellteilung so dass der Ansatz im Verlauf des Versuchs gesplittet werden musste. Eine Stimulation mit XMD 08-92 hatte kaum Auswirkungen auf die Verdopplungsrate.

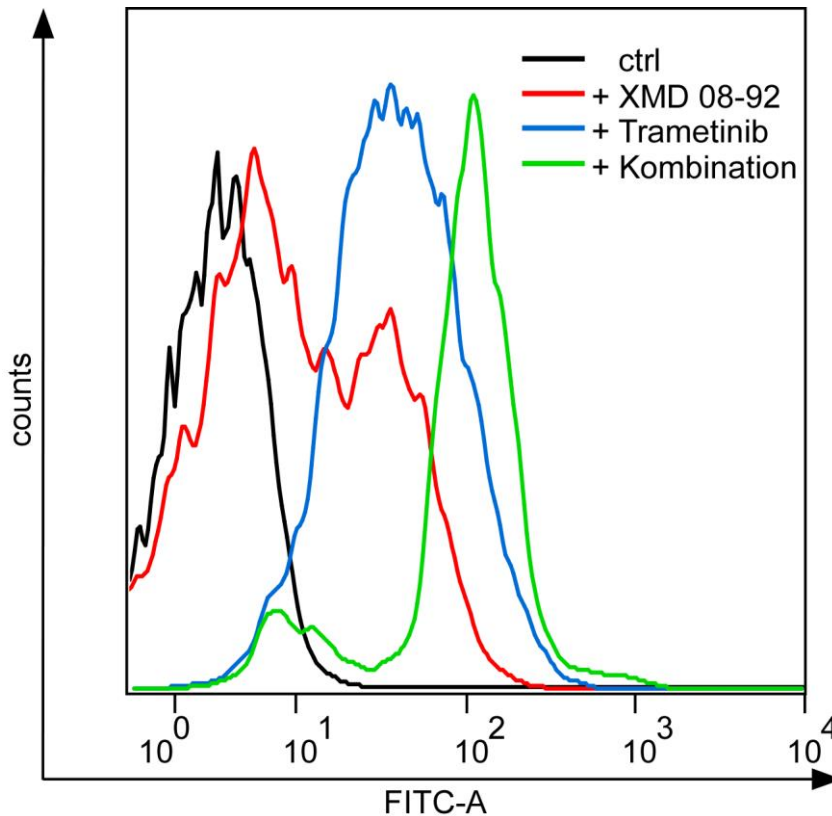


Abbildung 20: Proliferation unter ERK5/Mek1/2-Doppelbehnadlung im Langzeitverlauf

Die NRAS-mutierte Melanomlinie BLM wurde 14 Tage mit 10 μ M XMD 08-92 oder 100 nM Trametinib allein, sowie in Kombination stimuliert. Nach 72 h Behandlung wurden die Zellen mit dem CFSE-Farbstoff gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde nach 14 d durchflusszytometrisch ausgewertet. Als Referenz diente eine gefärbte, unbehandelte Kontrolle (schwarz). Der CFSE-Gehalt der Kondition mit Kombinationsstimulation (grün) ist höher als in den Konditionen mit Trametinib (blau) oder XMD 08-92 (rot) allein. Somit lässt sich der synergistische, antiproliferative Effekt einer Kombination auch im Langzeitverlauf nachweisen.

4.2 Zellmorphologie und Zellmigration unter ERK5- Inhibition

Da ERK5 in anderen Zellen neben Proliferation und Apoptose noch weitere Prozesse reguliert wie z.B. Migration und Morphologie [39, 67, 80], wurde nachfolgend der Effekt einer pharmakologischen ERK5- Hemmung mittels *Time-lapse*-Mikroskopie untersucht. Interessant war darüber hinaus, diese Aspekte unter einer Doppelbehandlung aus MEKi/ERK5i zu analysieren. Um dieses Vorhaben zu realisieren, wurden Zellen der BLM- Zellreihe für 48 h mit dem ERK5- Inhibitor XMD 08-92, dem MEK1/2- Inhibitor Trametinib oder einer Doppelbehandlung inkubiert und verglichen mit einer unbehandelten, lediglich in Kulturmedium gehaltenen Kontrolle unter einem motorisierten Aufrechtfluoreszenzmikroskop studiert. In den entstandenen Filmsequenzen wurde die Wanderung der Zellen untersucht. Mittels *Cell Tracking* wurden einzelne Zellen mit n=15 der XMD 08-92-, der Trametinib-, und der

Ergebnisse

Kombinations- Kohorte, sowie der unbehandelten Kontrolle manuell verfolgt und ihr Migrationsverhalten verglichen. In Abbildung 21A sieht man die Ergebnisse der Migrationsanalyse. Die XY-Diagramme zeigen die jeweiligen Zellbewegungen mit dem Startpunkt 0|0 in x-y-Richtung über den Zeitraum von 30 h bis 48 h nach Beginn der Stimulation. Dabei stellt jeder Punkt, den Endpunkt einer *getrackten* Zelle dar. Es wurden n=2 Einzelversuche durchgeführt. Die unbehandelten Zellen bleiben ortsstabil und bewegen sich nur vereinzelt leicht um den 0|0- Startpunkt. Unter ERK5-Inhibition fällt eine erhöhte Zellmigration auf. Die mit XMD 08-92 behandelten Zellen legen während des gleichen Zeitraumes eine längere Strecke zurück als die Zellen der Kontrollkondition. Eine MEKi hat keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten. Ähnliches lässt sich über die Kondition der Doppelbehandlung sagen. Bis auf wenige Ausreißer, die jedoch auch in der Kontrollgruppe zu finden sind, migrieren die BLM- Zellen unter MEKi/ERK5i in einem limitierten Radius stetig um den 0|0. Aus den Daten der *Tracking*- Analysen wurden anschließend Angaben zu der Zellgeschwindigkeit erhoben. Es wurde dazu die Kontrollkondition mit den XMD 08-92- behandelten Zellen der durchgeführten Versuche verglichen und eine höhere Werte unter Inhibitorstimulation erhoben. Eine ERK5-Hemmung führte außerdem zu einer Änderung der Zellmorphologie (Abbildung 21B). Unter Stimulation mit XMD 08-92, werden die Melanomzellen schmal und entwickelten filopodische Ausläufer. Eine MEKi scheint wenig morphologische Auswirkungen zu haben. Unter einer Doppelstimulation werden die Zellen kleiner, schließen sich zu vereinzelt Zellverbänden zusammen und weisen ein sternförmiges, ungeordnetes Erscheinungsbild auf.

Unter XMD 08-92 ergab sich eine Tendenz zu einer erhöhten Zellmigration und Fortbewegungsgeschwindigkeit, sowie zu einer veränderten Zellmorphologie. Eine statistisch valide Aussage dazu könnte aber erst bei einer Erweiterung von biologischen Replikaten getroffen werden, was im Zeitrahmen der Doktorarbeit nicht mehr möglich war. Es handelt sich bei den in Abbildung 21 zu sehenden Ergebnissen dementsprechend um präliminäre Daten. Aus Zeitgründen konnten weder Kontrollversuche mit Melanomzellen mit eindeutiger, basaler ERK5- Aktivität (z.B FM79), noch Varianten mit niedrigeren Inhibitorkonzentration, durchgeführt werden, um *off-traget* Effekte auszuschließen und die Aussage der Beobachtungen zu überprüfen.

Ergebnisse

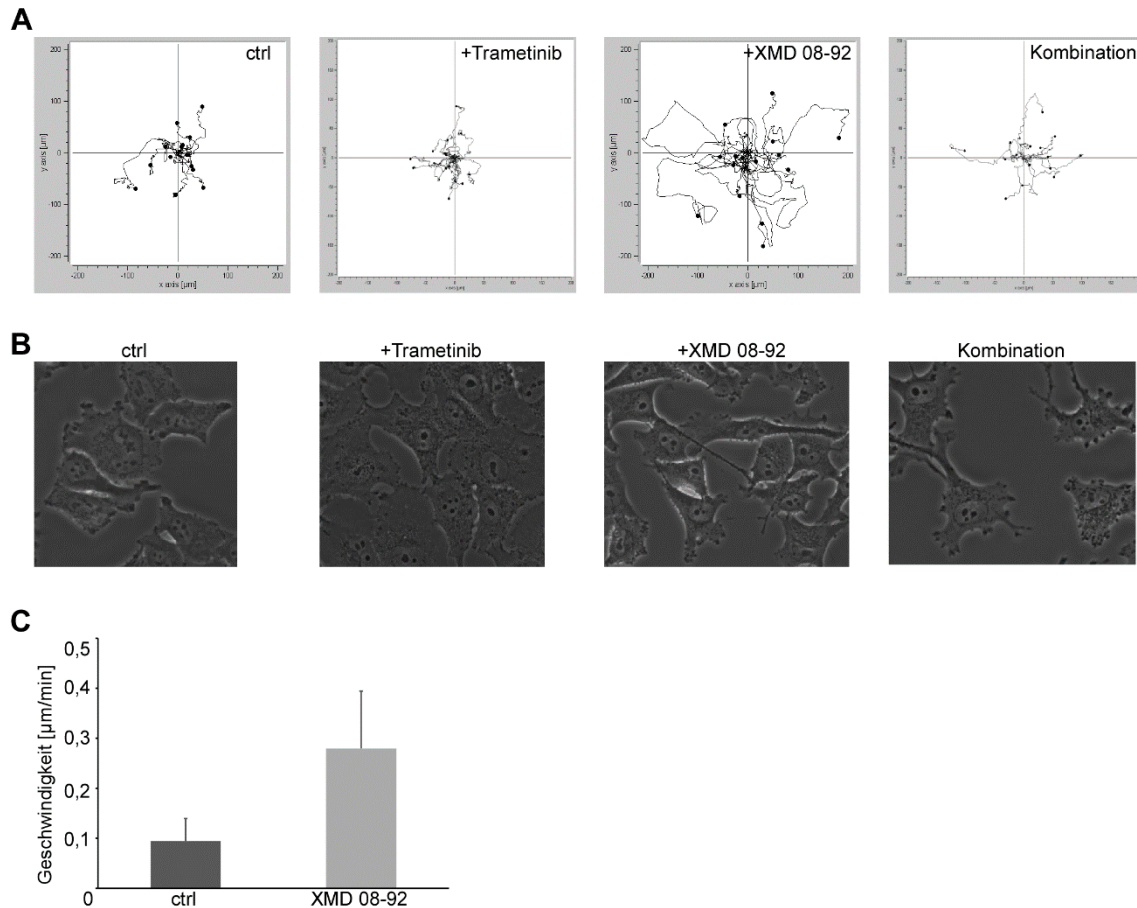


Abbildung 21: ERK5-Inhibition steigert Zellmigration und verändert Zellmorphologie

Die NRAS-mutierte Zelllinie BLM wurde 48 h mit 10 μM XMD 08-92, 100 nM Trametinib oder einer Kombination aus beiden Inhibitoren inkubiert und mit einer unbehandelten Kontrolle unter einem motorisierten Aufrechtfluoreszenzmikroskop beobachtet. Dieser Versuch wurde mit $n=2$ durchgeführt. A zeigt die Ergebnisse der Migrationsanalyse mittels *Cell-Tracking*. Die XY-Diagramme zeigen die Zellbewegung in x-y-Richtung (in μm) mit dem Startpunkt 0|0 über den Zeitraum von 30 h bis 48 h der Stimulation. Jeder Punkt markiert den Endpunkt einer einzelnen *getrackten* Zelle bei $n=15$. B stellt die Gegenüberstellung der Zellmorphologie der Konditionen in Form von Standbildenaufnahmen der Filmsequenzen dar. Die Grafik in C gibt Aufschluss über die mittlere Zellgeschwindigkeit der Zellen unter XMD 08-92 und der unbehandelten Kontrolle der durchgeführten Einzelversuche mit der Standardabweichung als Fehlerindikator.

5 Diskussion

In dieser Dissertation wurde präklinisch analysiert, welche Rolle ERK5 bei der intrinsischen und erworbenen Therapieresistenz für klinische MEK-Inhibitoren zukommt. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise darauf, dass ERK5 als potenzieller, alternativer Angriffspunkt in der Therapie des malignen Melanoms dienen könnte. Zudem wurde versucht Erklärungsansätze zum Mechanismus einer ERK5-Aktivierung durch ein Zusammenspiel der MAPK- Signalwegkomponenten zu finden. Umstände, die Voraussetzung einer ERK5- Phosphorylierung sind und die vermittelten zellulären Prozesse dieser Aktivierung wurden im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und sollen die Basis für eine anknüpfende Forschung darstellen.

5.1 ERK5- Aktivierung in Melanomzellen durch Inhibition des MAPK- Signalwegs

Über den Aktivierungszustand von ERK5 und mögliche Auslöser einer Phosphorylierung in Tumorzellen ist bisher wenig bekannt. Vor allem bezüglich des malignen Melanoms ist die aktuelle Studienlage in diesem Zusammenhang dünn. In KRAS-mutierten Kolon- und Pankreaskarzinomzellen wurde bereits eine ERK5- Aktivierung als Kompensationsmechanismus einer MEK1/2-Inhibition publiziert [68, 69]. Diese Beobachtung auf andere Tumore der RAS-Familie zu übertragen, liegt nahe. Tatsächlich konnte in NRAS-mutierten Melanomzellen der Linie BLM durch eine MEKi eine pERK5-Expression induziert werden (s. Kapitel 4.1.1). Dies gelang im Rahmen einer Spezifitätskontrolle mit den MEK- Inhibitoren Trametinib, Cobimetinib, Binimetinib und Selumetinib. Dadurch konnte die Möglichkeit eines *off-target* Effekts einer MEKi minimiert werden. In KRAS- mutierten Tumorzellen der Bauchspeicheldrüse wurde eine MEKi- Resistenz durch eine ERK5- Aktivierung über eine cMYC- Stabilisation erlangt [69]. Ein RAS- Isoform- oder Tumorzell- gekoppelter Mechanismus/ Zusammenhang einer ERK5- Aktivierung wäre denkbar. In der NRAS- mutierten Melanomlinie BLM war eine Induktion von pERK5 abhängig von der MEK- Zielstruktur ERK1/2. So resultierte eine ERKi durch GDC-0994 ebenso wie einer MEKi in eine Aktivierung des MEK5/ERK5- Signalwegs. Die ERK5- Phosphorylierung wurde demzufolge über die nachfolgend geschaltete MAPK- Ebene vermittelt. Dies deckt sich mit Befunden einer anderen Arbeitsgruppe, die jüngst in BRAF- mutierten Melanomzellen ebenfalls eine ERK5- Phosphorylierung nach ERK1/2- Inhibition durch den Inhibitor SCH772984

berichtete [71]. In unseren Versuchen wurde die Funktionalität des ERK- Inhibitors durch die Analyse der mRNA- Expression des ERK1/2 Zielgenes *DUSP4* (*Dual specificity protein phosphatase 4*) nachgewiesen [81] (s. Abbildung 18C). Die Phosphatase soll als negativer *Feedback*-Mechanismus wirken und zu einer balancierten Dephosphorylierung von ERK1/2 führen. Da ERK1 und ERK2 selbst gehemmt werden, zeigt erst ein Verlust des nachgeschalteten Effektors DUSP4 eine effektive Inhibition an. Interessanterweise wurde DUSP4 unter anderem als potenzieller Biomarker für besonders aggressive Schilddrüsenkarzinome beschrieben, dessen Überexpression in diesen Tumorzellen mit einer BRAF V600E- Mutation gepaart war [82]. Passend dazu wurde eine DUSP4- Mutation in Melanomzellen mit BRAF- Mutation als Grund für eine BRAFi- Resistenz dargelegt [83]. Viele der bekannten DUSPs sind promiskuitiv und können zumindest *in vitro* auch andere MAPKs dephosphorylieren [84]. Daraus resultiert die Frage, ob DUSP4 möglicherweise auch ERK5 dephosphorylieren könnte. In diesem Fall könnte das Fehlen von DUSP4 bei ERKi den Ausfall eines negativen *Feedback-Loops* bedingen, wodurch die Dephosphorylierung einer kontinuierlich erfolgenden ERK5- Neuphosphorylierung unterbliebe und somit ERK5 netto phosphoryliert vorläge. Das würde bedeuten, dass durch eine ineffektive Hemmung von ERK1/2 im Sinne einer Persistenz des ERK- Effektors keine ERK5- Phosphorylierung ausgelöst werden kann. Dagegen spricht aber eine von unserer Arbeitsgruppe beobachtete späte Kinetik bzw. eine verspätete Induktion von pERK5 [85]. In diesen weiterführenden Experimenten kam es in einer Zeitkinetik sowohl unter Trametinib- als auch unter GDC-0994- Stimulation erst nach ~8-16 h zu einer ERK5- Phosphorylierung, während eine reduzierte/ fehlende mRNA/ Proteinexpression von DUSP4 bereits nach 2 h vorlag. Das lässt auf eine indirekte Korrelation von ERK1/2- Inhibition und ERK5- Aktivierung schließen.

Eine MEK1/2- Inhibition führte sowohl in Melanomzellen mit NRAS- Mutation als auch in Linien mit BRAF- Mutation zu einer Induktion des MEK5/ERK5- Signalwegs. Das heißt, diese Beobachtung kann als Onkogen- unabhängig betrachtet werden. In der Literatur konnte dies in BRAF- mutierten Melanomzellen bisher nur als Resultat einer BRAFi/MEKi- Doppelbehandlung gezeigt werden [70]. Eine genauere Definition über den Auslöser innerhalb des MAPK- Signalwegs, welcher bei Inhibition eine Umgehung der Kaskade induziert, war bisher nicht möglich. Auffallend war daher, dass in der hier vorgelegten Arbeit eine alleinige MEKi in den getesteten BRAF- Linien bereits

ausreichte, eine ERK5 Phosphorylierung zu induzieren. Eine BRAF- Monoinhibition war dazu jedoch nicht in der Lage (s. Kapitel 4.1.3). Durch eine ERKi kam es wiederum zu einer ERK5- Aktivierung in der BRAF- Linie. Das spricht dafür, dass auch bei BRAF- mutierten Melanomzellen ERK5- Phosphorylierung primär ein *Escape*-Mechanismus ist, der es Tumorzellen erlaubt einer dem Zellwachstum/-überleben abträglichen ERK1/2 Inhibition zu entgehen. In der Zeitkinetik mit Vemurafenib-Stimulation in der BRAF- Linie A375 wurde deutlich, dass eine BRAFi zu keiner langanhaltenden ERK1/2- Inhibition führte, und diese bereits nach 24 h reaktiviert wurde (s. Abbildung 16). Grund könnte möglicherweise eine Instabilität des BRAF- Inhibitors sein, was durch eine repetitive Gabe des Inhibitors in kürzeren Zeitintervallen ausgeschlossen werden könnte. Interessant wäre es in diesem Zusammenhang auch, die DUSP4- Expression in gezeigten Versuch zu untersuchen, um gegebenenfalls abgrenzen zu können, ob neben der ERK1/2- Phosphorylierung auch das Zielgen wiederkehrt. Leider gelang es nicht mehr dies im Zeitrahmen dieser Arbeit zu untersuchen, doch sollten diese Aspekte im Zuge weiterer Untersuchungen abgeklärt werden.

In einer in BLM- Zellen durchgeführten Zeitkinetik dauerte es 8-16 h bis ERK5 unter MEKi aktiviert wurde [85]. Diese verspätete ERK5- Induktion lässt einen sekundären Mechanismus einer ERK5- Aktivierung mutmaßen. Es ist bekannt, dass ERK5 über bestimmte Wachstumsfaktoren aktiviert werden kann [39, 42]. In BRAF V600E- positiven Melanomzellen wurde eine erhöhte Aktivierung des Wachstumsfaktorrezeptors PDGFR β mit einer BRAFi Resistenz in Verbindung gebracht [29]. Interessanterweise ließ sich in weiterführenden Arbeiten der Arbeitsgruppe sowohl für BRAF- als auch NRAS- mutierte Melanomzellen unter MEKi eine erhöhte PDGFR β - Expression nachweisen. Außerdem war eine Inhibition dieses Wachstumsfaktorrezeptors (PDGFR β i) in der Lage, die Trametinib-induzierte ERK5-Expression in diesen Zellreihen aufzuheben.

Unter Zusammenschau dieser Ergebnisse lassen sich verschiedene Ansätze formulieren. Die Induktion des Umgehungskreislaufes basierend auf einer ERK5- Aktivierung wird über ERK1/2 vermittelt und könnte über eine adaptive Überexpression von PDGFR β gesteuert sein. Die berichteten Befunde lassen darauf schließen, dass eine BRAFi als Auslöser dieser prognostizierten Vorgänge bezüglich Dauer oder Intensität ihrer MAPK- Hemmung nicht ausreicht, um den MEK5/ERK5- Signalweg zu aktivieren.

Eine andere Erklärung wäre, dass eine BRAFi- Resistenz im Gegensatz zu einer MEKi- Resistenz in geringerem Maße durch ERK5- Aktivierung vermittelt wird, da die Möglichkeit einer Umgehung von BRAF über CRAF- Induktion besteht. Melanomzellen können in ihrer Abhängigkeit von BRAF zu CRAF wechseln [86] und so bliebe eine sekundäre ERK5- Phosphorylierung aus. Für diese These spricht auch, dass in den getesteten BRAF- Linien keine Basalaktivität von ERK5 nachgewiesen werden konnte. Jedoch schließt das Panel der untersuchten BRAF-Linien bisher lediglich vier Zellreihen ein und ist daher nicht aussagekräftig genug. Bei einer Rate von circa 30% ERK5- Basalaktivität in den getesteten NRAS Linien könnte das fehlende Auftreten in den BRAF- Zellreihen Zufall sein. Zudem konnte die Arbeitsgruppe von Tusa et al. eine basale ERK5- Aktivierung in BRAF- Linien beobachten [87]. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass in der Publikation von einer direkten ERK5- Phosphorylierung durch eine BRAF- Überexpression die Rede ist [87], was den diskutierten, onkogen- unabhängigen Mechanismus im malignen Melanom in Frage stellen würde [88]. Jedoch wurden diese Daten primär in HEK- Zellen (*Human Embryonic Kidney*) und somit in einem komplett anderen Zelltyp erhoben [87]. Dies spricht wiederum dafür, dass es sich bei der ERK5- Aktivierung um einen möglichen Mechanismus handelt, der abhängig von der Zell- und somit auch der Tumorentität ist (s. Kapitel 1.2.1).

Neben Wachstumsfaktoren wird Stress als zweiter, exogener Aktivierungsstimulus von MEK5/ERK5 beschrieben. Es fällt auf, dass ERK5 in Melanomzellen primär unter Inhibitoreinfluss phosphoryliert vorliegt. Therapiestress stellt in jedem Fall einen adäquaten Stressstimulus dar und könnte somit unter den bereits diskutierten Umständen zu einem mangelnden Ansprechen bzw. einem Vorteil unter Therapie führen [70]. Diese These deckt sich beispielsweise mit den ERK5- vermittelten Vorgängen in der Behandlung des Kolon- und Mammakarzinoms [59, 60, 62]

Eine Inhibition auf verschiedenen Ebenen des MAPK- Signalwegs führt zu einer ERK5- Aktivierung sowohl in NRAS- als auch in BRAF- mutierten Melanomzellen. In Folge einer genaueren Betrachtung der einzelnen Komponenten der MAPK- Kaskade, konnten in dieser Dissertation neue Aussagen über auslösende Faktoren in diesem Zusammenhang getroffen werden.

5.2 Rolle von ERK5 in der Tumorgenese des malignen Melanoms

Über den MEK5/ERK5- Signalweg werden bekanntermaßen Zellproliferation und -überleben positiv reguliert [22, 39]. Interessanterweise ergab eine Analyse des Phosphorylierungsstatus von ERK5 in Melanomzellen mit NRAS- Mutation, dass ERK5 in einer Vielzahl der getesteten Zellreihen basal phosphoryliert ist. Durch eine Zellzyklusanalyse konnte bestätigt werden, dass diese basale Aktivierung eine Rolle für die Proliferation in diesen Zellreihen spielt. So führte eine pharmakologische Inhibition von ERK5 durch XMD 08-92 in der repräsentativ verwendeten Zellreihe FM79 zu einem frappierenden Zellzyklusarrest (Abbildung 11A). Diese Beobachtung scheint nicht auf alle Tumore der RAS- Familie zuzutreffen und konnte in anderen RAS- mutierten Tumorentitäten, wie zum Beispiel in Zellen des Kolonkarzinoms nicht nachgewiesen werden [88].

Eine alleinige ERK5- Inhibition hat in Melanomlinien mit einer Basalaktivität von ERK5 augenscheinlich keine apoptotische Wirkung. Diese Beobachtung trifft auch auf Melanomzellen mit fehlender/ geringer ERK5- Basalaktivität zu. Im CFSE- Langzeitexperiment trat auch in BLM- Zellen kein proapoptotischer Effekt einer ERK5- Inhibition ein (s. Abbildung 20). Erwähnenswert ist im Zusammenhang mit dem CFSE- Experiment außerdem, dass eine Trametinibstimulation im Langzeitverlauf in BLM- Zellen nicht in der Lage war, das Zellwachstum dauerhaft, effektiv zu verhindern. Im Gegenteil mussten die Zellen im Laufe des Versuchs passagiert werden (s. Kapitel 4.1.5). Diesen Eindruck eines mangelnden Effektes auf das Zellsterben sowohl einer MEKi als auch einer ERKi gewinnt man auch bei Betrachtung der durchgeführten Kristallviolett-färbungen (vgl. Abbildung 10 und 19). Wir wissen, dass eine MEKi und eine ERKi zu einer Phosphorylierung von ERK5 in Melanomzellen führen und ERK5 in anderen RAS- mutierten Tumorentitäten eine MEK1/2- Inhibitorresistenz fördert [68, 69]. Weiterhin wird Melanomzellen mit NRAS- Mutation eine grundlegende, verstärkte MEKi- Resistenz verglichen mit BRAF- mutierten Linien zugeschrieben [36]. Anhand unserer Versuchsergebnisse ist zu vermuten, dass ERK5 auch in Melanomzellen zu MEKi- Resistenz beiträgt und diese bereits durch einen basal vorhandenen Proliferationsvorteil prägt. Die ERK5- Aktivität war jedoch weder ohne noch mit vorliegender Basalaktivität wesentlich für das Zellüberleben, sondern erst, wenn die Melanomzellen unter MEK- oder ERK- Inhibition gesetzt wurden. Eine über ERK5 durch

Therapie induzierte Stressresistenz könnte so mit einer Inhibition umgangen werden. Dass ERK5 in Melanomzellen nur unter bestimmten Bedingungen einen entscheidenden Einfluss auf zelluläre Prozesse nimmt, steht in Konflikt mit der Rolle von ERK5 in den bereits erwähnten Knock-out Mäusen aus der Publikation von Hayashi et al. Eine Abwesenheit von ERK5 führte dort zu einer embryonalen Letalität und induzierte kardiovaskuläre Defekte und Hämorrhagien in adulten Mäusen, da die Endothelzellen zugrunde gingen [46]. Bei der ERK5- Aktivierung in Tumorzellen scheint es sich dagegen um einen adaptiven zelltypabhängigen Mechanismus zu handeln. Ein Effekt wie man ihn im Rahmen der Embryogenese beobachtet hat, ist daher in diesem Zusammenhang nicht unbedingt zu erwarten. Außerdem wurde ERK5 durch eine konditionell induzierte Gendeletion komplett ausgeschaltet und daraufhin die Veränderungen in den Mäusen beobachtet. In der hier vorliegenden Arbeit wurde lediglich die Kinaseaktivität *in vitro* gehemmt. Unterstützend lässt sich in diesem Zusammenhang auf Forschungsarbeiten unserer als auch anderer Arbeitsgruppen verweisen, in dem es unter pharmakologischer ERK5- Inhibition im Mausexperiment *in vivo* im Gegensatz zu Hayashi et al. zu keiner endothelialen Apoptose kam [48, 85] und auch keine weiteren, negativen Auswirkungen einer XMD 08-92- Anwendung *in vivo* diagnostiziert wurden [68, 69]. Offensichtliche neuronale Defekte, zu denen es bei einer ERK5- Deletion in Primärzellen sympathischer Neuronen *in vitro* kam, wurden ebenso wenig festgestellt [89]. Obwohl bisher im Maussystem keine negativen Auswirkungen pharmakologischer ERK5- Inhibition auf Nerven- und Gefäßsystem beobachtet wurden, sollte dennoch ein möglicher negativer Langzeiteffekt auf vaskuläre und neuronale Funktionen eingehend untersucht werden, bevor klinische Studien im Menschen durchgeführt werden.

Neben zytoprotektiven Eigenschaften von ERK5 wurden weitere zelluläre Einflüsse beleuchtet. Der Transkriptionsfaktor KLF2 (Krüppel-like Faktor 2) wurde als Zielgen von ERK5 mittels RT-qPCR Analyse bestätigt (s. Kapitel 4.1.1). Zusammen mit KLF4 wird KLF2 durch ERK5 reguliert [90]. Die Faktoren vermitteln vasoprotektive und antiinflammatorische Prozesse [90, 91]. Sie sind eng miteinander verwandt, überschneiden sich in vielen ihrer Effektoren und sind daher in ihrer Wirkung auf bestimmte Zielgene teilweise schwer voneinander zu differenzieren [90-92]. In Endothelzellen wurde der Einfluss von KLF2 auf die Zellmigration untersucht, der diese über einen Verlust des

promigratorischen Proteins PAK1 (*p21-activated kinase 1*) hemmte [80]. Auch in Zellen des Prostatakarzinoms wurde dieser negative Effekt beobachtet und dort über eine Hemmung der MMP2 (Matrix Metalloprotease 2) durch KLF2 vermittelt [93]. Ebenfalls in Endothelzellen konnte eine inhibitorische Wirkung einer Überexpression von ERK5 auf die endotheliale-zu-mesenchymale Transition (EndMT) beobachtet werden [94]. Die EndMT ähnelt dem Mechanismus der epithelialen-zu-mesenchymalen Transition (EMT) [95]. Wie bereits angesprochen in Kapitel 1.2.1. wird der Einfluss von ERK5 auf die EMT kontrovers diskutiert und scheint von dem Zelltyp abhängig zu sein [39, 53-55]. Während KLF2 die Zellmigration in bestimmten Zellen beeinflusst, wurde KLF4 in Melanomzellen als Faktor identifiziert, der in Stresssituationen den Metastasierungsprozess regulieren kann [96] und außerdem über direkte Steuerung des Tumorsuppressors p53 den Eintritt in die zelluläre Seneszenz verhindert und die Tumorprogression anregt [97]. Beiden KLFs wird darüber hinaus zugeschrieben, in der Entstehung von Stammzeleigenschaften beteiligt zu sein, was für eine Tumoresistenz mit verantwortlich sein könnte [98, 99].

Die Zellmigration wird durch ERK5 beeinflusst und bisher ist die Art und Weise vor allem in Tumorzellen des malignen Melanoms unklar. Aufgrund der Literaturlage evolvierte die Sorge, dass eine ERK5- Inhibition womöglich über Förderung der Migration die Metastasierung begünstigt und in diesem Zusammenhang Vorsicht geboten ist, bevor man Versuche mit dem Inhibitor in den Menschen transferiert. Zu diesem Zwecke wurden Migrationsassays mittels *Cell Tracking* durchgeführt. Dabei hatte eine Stimulation mit XMD 08-92 promigratorische Effekte auf die Zelllinie BLM, wohingegen dies bei einer Doppelbehandlung mit MEKi nicht der Fall war (s. Abbildung 21A). Die Linie BLM weist augenscheinlich eine sehr geringe/fehlende ERK5-Basalaktivität auf, weswegen die Wirkung des Inhibitors eher nicht auf eine Hemmung von ERK5 beruht. Es muss von einem *off-target* ausgegangen werden, der womöglich einer vermeintlichen Überdosierung geschuldet ist. Durch die hohe Konzentration von XMD 08-92 und die damit verbundenen, fehlenden Zell-Zell-Kontakte migrieren die Zellen aus platztechnischen Gründen vermehrt. Dadurch lässt sich auch der filopodische Phänotyp unter XMD 08-92 erklären, der als Reaktion auf eine zelltoxischen Stimulanzindosis entstehen kann (s. Abbildung 21B), aber auch im Metastasierungsvorgang eine Rolle spielt [100]. In den gezeigten

Geschwindigkeitsanalysen wurde eine tendenziell schnellere Fortbewegung unter ERK5-Inhibition dargestellt. Diese erhöhte Geschwindigkeit, welche ebenfalls eine Reaktion auf eine mögliche Überdosierung abbildet, resultiert in einer Zunahme der zurückgelegten Strecke und liefert so ein verzerrtes Bild der Zellmigration. Eine migratorische Wirkung von ERK5 wird größtenteils über KLF2/4 vermittelt [89, 90]. In der aufgeführten RT-qPCR ließ sich mit dem ERK5- Inhibitor allein keine Repression der geringen basal vorhandenen KLF2- Expression verglichen mit der Kontrolle erreichen (s. Abbildung 10). Das heißt, es ist unwahrscheinlich, dass das beobachtete Migrationsverhalten ein Resultat einer KLF2- Hemmung ist.

Unter einer Doppelbehandlung trat keine verstärkte Migration ein, sodass zusammenfassend etwaige fördernde Effekte, auch im Sinne einer *off- target* Wirkung auf die Migration im Setting eine Ko- Behandlung nicht zu erwarten sind. Ob eine ERK5-Hemmung möglicherweise auch negative Auswirkungen auf die Tumorgenese haben könnte, muss jedoch sicher in Zukunft durch weitere *in vivo* Studien geklärt werden, bevor eine klinische Entwicklung erfolgen kann

5.3 MEKi/ERK5i- Synergismus als Angriffspunkt in der zielgerichteten Melanomchemotherapie

ERK5 wird unter Standardtherapiebedingungen in Melanomzellen phosphoryliert oder ist teilweise bereits basal aktiviert. Die Frage ist nun, ob und unter welchen Bedingungen sich aus diesen Ergebnissen eine Konsequenz für die Melanomtherapie ergibt und Patienten in Zukunft von einer therapeutischen Erweiterung um eine ERK5- Inhibition profitieren könnten. Eine zielgerichtete ERK5- Therapie scheint auch in anderen Tumorentitäten erfolgreich zu sein. Unter ERK5- Inhibition wurde beispielsweise in humanen Zellreihen der akuten myeloischen Leukämie *in vitro* Apoptose induziert und die Tumorprogression gehemmt [101].

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, dass eine ERK5 Inhibition allein keinen signifikanten, proapoptotischen Effekt in Melanomzellen besitzt (s. Kapitel 4.1.2). Eine Kombination mit MEKi führt jedoch zu einem dramatischen Anstieg des Zellsterbens. Die proapoptotische Funktion einer MEKi wird durch eine ERK5- Inhibition sensibilisiert. Dieser synergistische Effekt konnte durch verschiedene Kombinationen reproduziert und so *off- target* Effekte ausgeschlossen werden. Trametinib konnte erfolgreich durch Cobimetinib ersetzt werden und die Wirkung von

XMD 08-92 wurde durch den ERK5- Inhibitor BIX02188 [95] nachgeahmt. Je weiter abwärts ein Signalweg inhibiert wird, desto spezifischer wird die Wirkung der Hemmung auf die Zielgene. Eine Inhibition am Ende der MAPK- Kaskade auf Ebene von ERK1/2 führt zu einer pERK5-Expression und eine ERK5-Inhibition steigert das ERKi- induzierte Zellsterben. Passend dazu erzielte ein dualer ERK1/ERK5- Inhibitor (ADTL-EI1712) potente, zelltoxische Erfolge in verschiedenen Tumorzelltypen [102]. Diese Feststellung spricht dafür, dass eine ERKi/ERK5- Doppelbehandlung einen zielgerichteten Therapieansatz liefert, bei dem es durch Vermeidung einer breiten Wirkungsstreuung zu weniger Nebenwirkungen bei dem Patienten kommt [71]. Diese Erkenntnisse gelten sowohl für Melanomzellen mit NRAS- als auch mit BRAF- Mutation. Auch in der Zelllinie LOX- IMVI konnte in nachfolgenden Arbeiten der Forschungsgruppe der Synergismus einer MEKi/ERK5i- Doppelbehandlung nachgewiesen werden [85]. Abbildung 13 zeigt, dass BRAF- Linien bereits grundlegend sensitiver auf eine MEK1/2- Inhibition reagieren als NRAS- Linien. Da ERK5 unter MEKi aktiviert wird, sollte anstatt der standardmäßigen BRAFi/MEKi- Doppelbehandlung eine Kombination aus ERK5i und MEKi auch in BRAF- Linien in klinischen Studien berücksichtigt werden, um einen möglichen Erfolg zu prüfen. *In vivo* führte diese Kombibehandlung in BRAF- mutierten Melanomzellen zu einer Tumorreduktion um 50% im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit BRAF- Monoinhibition [87]. Eine Triple- Therapie aus BRAF/MEK/ERK5- Inhibition würde vermutlich zu einem Anstieg der Nebenwirkungen führen, ist aber auch nach den Ergebnissen dieser Arbeit nicht notwendig.

Nachdem ein klarer, synergistischer Effekt einer Kombinationsbehandlung, die eine ERK5- Inhibition beinhaltet, im Kurzzeitexperiment belegt wurde, konnte dieser auch im Langzeitverlauf in BLM- Zellen nachgewiesen werden (s Kapitel 4.1.5). Sinn war es, dadurch den möglichen Einfluss von ERK5 auf eine Resistenzentwicklung unter MEKi, beziehungsweise die Vermeidung dieser Entwicklung, durch Kombination mit einem ERK5- Inhibitor zu untersuchen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Komplettierung der Therapie mit einer ERK5- Inhibition eine MEKi- induzierte Resistenz verhindern oder zumindest hinauszögern kann.

Basierend auf diesen Daten hat die Arbeitsgruppe im Anschluss an die vorliegende Arbeit Mausexperimente durchgeführt, die den Synergismus *in vivo* bestätigen (s. Abbildung 22).

Diskussion

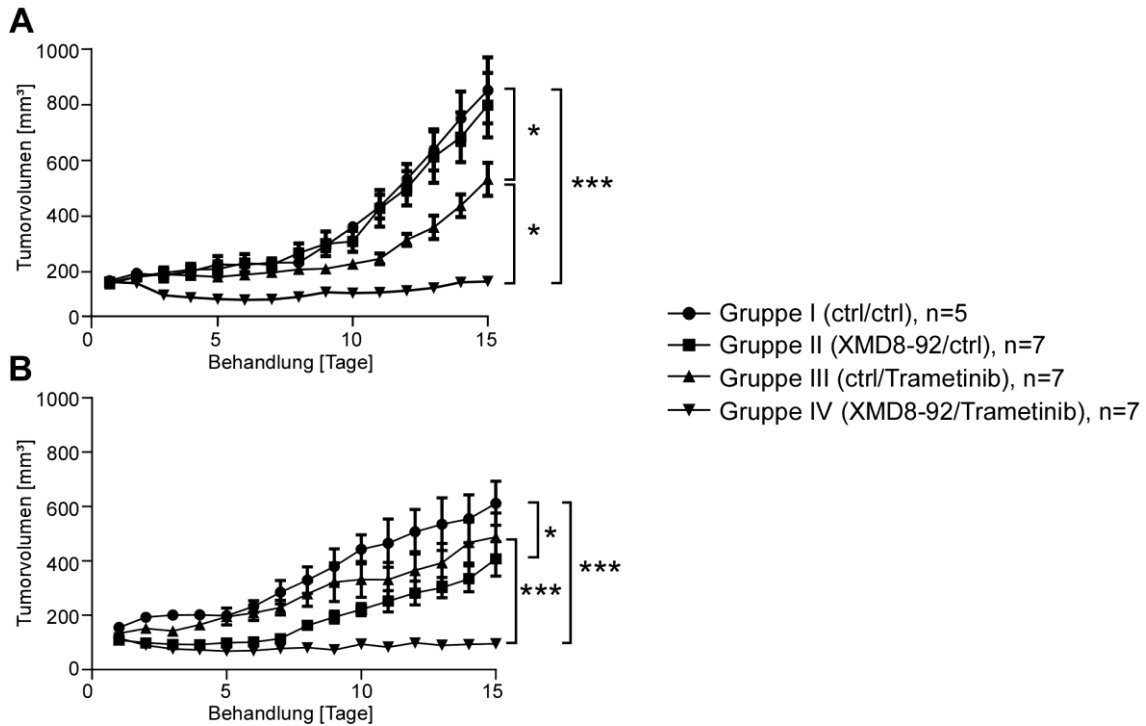


Abbildung 22: Wachstumskurven von Melanomen mit NRAS- Mutation im Mausmodell unter MEK1/2- +/- ERK5- Inhibition

Es erfolgten subkutane Injektionen von BLM- (A) und FM79- Zellen (B) in immundefiziente NOD/SCID Mäuse. Tag 1 des Versuchsaufbaus markierte ein Tumolvolumen von ~150 mm³. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Mäuse einmal täglich für 14 aufeinanderfolgende Tage mit 0,1 mg/kg KG Trametinib, 100 mg/kg KG XMD 08-92 oder einer Kombination aus beiden Inhibitoren in Form von peritonealen Injektionen behandelt. Als Referenz dienten jeweils unbehandelte Kontrollen. Die Tumore wurden täglich mit einem Messschieber gemessen und das Tumolvolumen berechnet. In den Wachstumskurven sind die resultierenden Daten aufgetragen. Die verschiedenen Behandlungskonditionen wurden als Gruppen miteinander verglichen und statistisch ausgewertet (***p<0.001, *p<0.05, two-way ANOVA). Modifiziert nach Adam et al., *Journal of Investigative Dermatology* 2020 [85]. Mit freundlicher Genehmigung der Arbeitsgruppe Prof. Schmidt.

In der Zelllinie FM79 mit hoher ERK5- Basalaktivität hatte XMD 08-92 im Gegensatz zu der BLM- Linie eine transiente arretierende Wirkung auf die Tumorprogression. Durch eine ERK5- Inhibition wurde das Tumorstadium verlangsamt, jedoch nicht dauerhaft aufgehoben. Im Gegensatz dazu steht ein Paper von Tusa et al., in dem ein anhaltender zelltoxischer Effekt durch ERK5- Inhibition in Melanomzellen mit ERK5- Aktivität erreicht wurde [87]. Diese Studie beschäftigte sich jedoch primär mit BRAF- mutierten Melanomzellen und konnte diese Beobachtung nur in RAS- mutierten hepatozellulären Karzinomzellen reproduzieren, nicht jedoch in NRAS- mutierten Melanomzellen.

Eine MEKi- Monostimulation war in FM79 ineffektiver als in Zellen mit einer geringeren basalen ERK5- Phosphorylierung. So lässt sich *in vivo* ein Proliferationsvorteil unter Stress in Melanomzellen mit ERK5- Basalaktivität bestätigen, der womöglich an eine intrinsische MEKi- Resistenz gekoppelt ist. In BLM- Zellen war eine Behandlung mit

Trametinib zwar erfolgreicher, konnte jedoch das Tumorwachstum nicht auf Dauer unterdrücken. Nur eine Doppelbehandlung aus MEKi und ERK5i resultierte in beiden NRAS- Zellreihen in einer persistierenden Reduktion des Tumorwachstums *in vivo*. Das Zellwachstum wurde über die gesamte Dauer des Versuchs effektiv gehemmt. Sollte ERK5 über KLF2/4 Stammzeleigenschaften vermitteln [98, 99], deuten die Daten daraufhin, dass die Doppelbehandlung diesem Charakter entgegenwirken kann. Es ist außerdem nachdrücklich darauf hinzuweisen, dass anhand der Mausexperimente klar belegt wird, dass selbst Melanome mit einer basalen ERK5- Aktivierung nicht langfristig von einer alleinigen ERK5i profitieren, sondern bereits nach circa einer Woche Behandlung erneut proliferieren (Abbildung 22B). Das heißt, dass eine Doppelbehandlung auch in diesem Fall und somit immer die Therapieform der Wahl sein dürfte.

Unter Einbeziehung dieser diskutierten Daten sollte die verwendete, zielgerichtete Kombinationstherapie als mögliche Alternative zu der Immuntherapie berücksichtigt werden, die momentan die einzige verfügbare Behandlungsoption für Melanompatienten im metastasierten Stadium mit NRAS- Mutation darstellt.

5.4 Ausblick: Eventuelle Problematik in der therapeutischen Anwendung - Offene Fragen und Ansätze

Diese Dissertation beschäftigt sich mit ERK5 als Angriffspunkt in der zielgerichteten Therapie des malignen Melanoms. Während neue Erkenntnisse über das Verhalten des Proteins bei Inhibition des MAPK- Signalwegs und über die Auswirkung seiner zielgerichteten Hemmung gewonnen werden konnten, beschäftigt sich dieses Kapitel mit offen gebliebenen Fragen und möglichen Problematiken einer ERK5- Therapie, die Bestand zukünftiger Forschungsarbeiten sein sollten.

Für die Versuche wurde primär der ERK5- Inhibitor XMD 08-92 verwendet, der den C-Terminus und somit die Autophosphorylierung von ERK5 blockiert [48].

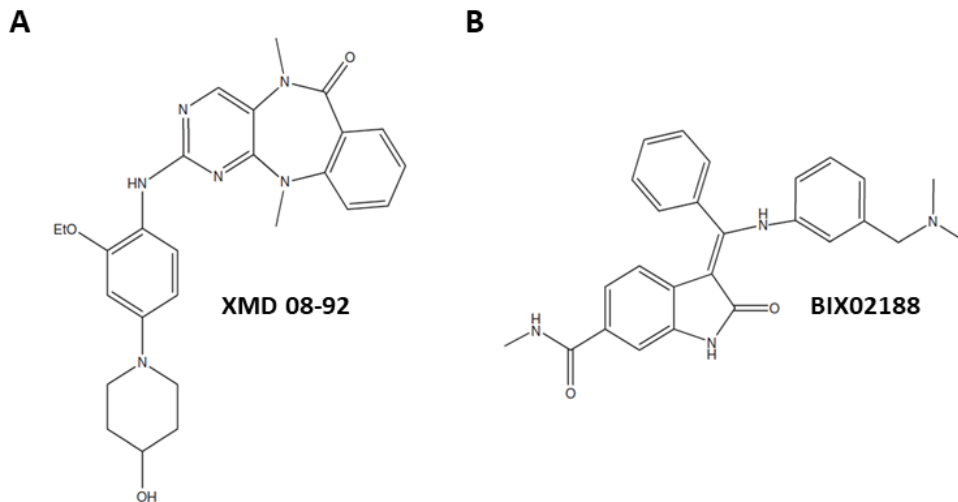


Abbildung 23: Chemische Struktur von XMD 08-92 und BIX02188

Der ERK5- Inhibitor XMD 08-92 wurde durch eine Modifikation des Polokinase- Inhibitors BI2536 entwickelt. Er besitzt keine Polokinase Aktivität mehr und ist nach der Abänderung hoch selektiv für ERK5. Die zweite chemische Struktur stellt den MEK5/ERK5- Inhibitor BIX02188 dar. Bei BIX02188 handelt es sich um ein Indol-6-Carboxamid aus der Gruppe der aromatischen, heterozyklischen Amide (modifiziert nach Nithianandarajah-Jones et al. 2012 [40]).

XMD 08-92 besitzt neben seiner Wirkung auf ERK5 auch Eigenschaften eines Bromodomäneninhibitors [103]. Bromodomänen (BRD) sind Proteinsequenzen, die die Acetylierung von Lysin als posttranslationale Modifikation erkennen und die Gentranskription steuern. Eine Dysregulation führt zu einem fehlerhaften Ablesen des epigenetischen Codes und einer DNA- Schädigung [104]. Die resultierende Frage ist, ob die Wirkung von XMD 08-92 auf Zellproliferation und Tumorwachstum durch Inhibition von ERK5 oder durch einen Effekt auf zelluläre Bromodomänen hervorgerufen wird. Ein Vergleich von mehreren ERK5 Inhibitoren in HeLa- (Cervixkarzinom) und HUVEC- (Endothel) Zellen zeigte, dass die Inhibitoren, die den größten antiproliferativen Effekt besaßen, gleichzeitig die Interaktion zwischen BRD und Acetyl- Lysin Resten blockierten [103]. Zu diesen Inhibitoren gehörte unter anderem XMD 08-92. Aus diesem Grund wurde der MEK5/ERK5 Inhibitor BIX02188, von dem kein Einfluss auf Bromodomänen bekannt ist, verwendet, um die Spezifität von XMD 08-92 zu prüfen. BIX02188 hemmt die Interaktion zwischen MEK5 und ERK5 und verhindert dessen Phosphorylierung [105]. Er führte in dieser Dissertation zu gleichen Ergebnissen wie XMD 08-92. In einer anderen Arbeit hatte eine Inhibition von ERK5 durch XMD 08-92 in Melanomzellen, in denen ERK5 durch *small hairpins* ausgeschaltet wurde, keinen Effekt auf die Zellproliferation [87]. Dies spricht weiter dafür, dass XMD 08-92 spezifisch für die Hemmung von ERK5 ist und zu den resultierenden Effekten im Zellorganismus führt.

Trotzdem ist die Dysregulation der Bromodomänen ein vielversprechendes therapeutisches Ziel in der Onkologie. Durch Inhibition von BRDs wird deren Interaktion mit der DNA und somit der Einfluss auf die Gentranskription gehemmt. So wird zum Beispiel das Onkogen cMYC unter anderem über Bromodomänen reguliert [106]. Auch in der Therapie des malignen Melanoms könnte daher eine selektive BRD- Hemmung erfolgreich sein. Eine Studie konnte bereits einen synergistischen Effekt einer Kombination aus MEKi und einem BRD- Inhibitor in NRAS- mutierten Melanomzellen zeigen. Eine Doppelbehandlung hemmte das Tumorwachstum und verlängerte das Überleben von tumortragenden Mäusen [107].

Da die neuronale Differenzierung und die Angiogenese dem Einfluss von ERK5 unterliegt [52], sollten mögliche Nebenwirkungen in diesem Bereich entschieden ausgeschlossen werden [64]. Während der Embryogenese soll ERK5 eine notwendige physiologische Funktion innehaben [45]. Unerwünschte Wirkungen einer ERK5- Inhibition könnten somit einen teratogenen Charakter tragen. Des Weiteren wirkt ERK5 zum Beispiel über die Regulation der KLF- Effektorproteine antiinflammatorisch [90]. Außerdem soll ERK5 eine funktionelle Rolle in der T-Zell Aktivierung einnehmen. Im Prostatakarzinom unterdrückte ERK5 eine T-Zell- Infiltration, die durch eine ERK5- Deletion wiederum induziert werden konnte [108]. Das lässt darauf schließen, dass eine Immunantwort über ERK5 unterdrückt wird und eine ERK5- Inhibition das Immunsystem dagegen stärken könnte. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, den ERK5- Aktivierungsstatus in immuntherapieresistenten Melanomzellen zu prüfen. Womöglich ist eine ERK5- Aktivität für ein mangelndes Ansprechen auf eine Immuntherapie mit verantwortlich und Melanomzellen könnten mit XMD 08-92 für die Immuntherapie sensibilisiert werden. In T-Zell- Leukämiezellen war ERK5 auf der anderen Seite essentiell für Tumorwachstum und Überleben [66], was die Adressierung von ERK5 zu einem vielversprechenden Angriffspunkt in der Leukämie therapie macht, aber auch bedeuten könnte, dass durch eine ERK5- Inhibition in anderen Tumorentitäten eine T-Zell Immunität supprimiert werden könnte. Eine Klärung der Kompatibilität von ERK5 Inhibition und T-Zellaktivierung, welcher in der Melanomtherapie eine wichtige Rolle bei der Elimination residueller Tumorzellen zukommt, sollte daher ein wichtiger Aspekt bei der klinischen Entwicklung von ERK5- Inhibitoren für die Melanomtherapie sein.

Diskussion

ERK5 ist eine Kinase, die im Zellkern Transkriptionsfaktoren phosphoryliert. Es wurde bisher davon ausgegangen, dass die Effekte von ERK5 auf zellulärer Ebene von der Kinaseaktivität herrühren. Einige selektive ERK5 Inhibitoren, die diese Kinaseeigenschaft hemmen, vermochten es jedoch nicht, Einfluss auf Proliferation und Inflammation zu nehmen [103]. Nichtenzymatische Eigenschaften wie die DNA-Bindung scheinen sich dagegen auf die transkriptionelle Aktivität von ERK5 im Zellkern auszuwirken [103]. Außerdem konnten XMD 08-92 und BIX02188 jeweils allein eine Akkumulation von ERK5 im Zellkern nicht verhindern [87]. ERK5 wird hauptsächlich von MEK5 phosphoryliert, unterliegt einer Autophosphorylierung am C-Terminus und wandert in den Zellkern. Die Phosphorylierung am C-Terminus ist nötig, damit ERK5 sein Potential als Regulator verschiedener Transkriptionsfaktoren wie MEF2C im Nukleus ausschöpfen kann [41]. Diskutiert werden sollte, ob anstelle der MEK5-Interaktion im Zytoplasma die nukleäre Translokation oder der Efflux aus dem Zellkern strategisch durch Therapeutika angegangen werden sollte, um ERK5 und die Auswirkung auf die Tumorgenese effektiv zu hemmen. Eine Lokalisation von ERK5 im Zellkern scheint in frühen Stadien des hepatozellulären Karzinoms aufzutreten und ist mit einer schlechten Prognose im Prostatakarzinom assoziiert [109]. Auch existieren MEK5-unabhängige Mechanismen, die einer Wanderung von ERK5 in den Zellkern initiieren. Eine Überexpression von Cdc37 destabilisiert einen ERK5 Komplex mit dem Chaperon Hsp90, in dem ERK5 normalerweise im Zytoplasma gehalten wird. Dadurch induzierte diese eine ERK5- Autophosphorylierung am C- Terminus und führt zu einer nukleären Translokation [110]. Am Rande sei erwähnt, dass Cdc37 neben ERK5 auch das Onkogen BRAF stabilisiert [111], was zu einer gegenseitigen Konsolidierung in BRAF- mutierten Melanomzellen führen könnte. Eine Phosphorylierung am C- Terminus durch Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) führt ebenfalls zu einer Translokation in den Zellkern. Besonders die Kinase CDK5 scheint direkt Einfluss auf die Aktivierung von ERK5 zu nehmen [112]. Tatsächlich konnten durch den dualen ERK5/CDK Inhibitor TG02 im Multiplen Myelom sowohl *in vitro* als auch im Mausmodell *in vivo* vielversprechende Ergebnisse erzielt werden [113]. Vor kurzem wurden durch Pearson et al. neue Erkenntnisse über die Bedeutung der Phosphorylierung am C-Terminus von ERK5 gewonnen [114]. Die Aminosäure Thr732 innerhalb der terminalen C-Region wurde als wichtiger Regulator der nukleären Translokation identifiziert und konnte die Interaktion

Diskussion

zwischen ERK5 und seinen Zielgenen direkt steuern. Eine Phosphorylierung an Thr732 scheint die Transkriptionsaktivität von ERK5 zu stärken und könnte sich prognostisch in der Tumorgenese auswirken. Durch eine Aktivierung in dieser Region wurde ERK5 zwar unabhängig von MEK5 in den Zellkern befördert, jedoch ist diese abhängig von der c-terminalen ERK5- Autophosphorylierung, die wiederum durch MEK5 begünstigt ist. Die Mechanismen, die hinter der nukleären Translokation von ERK5 stehen, sind kompliziert und nach wie vor nicht vollständig geklärt. Das zentralste Element scheint jedoch die Autophosphorylierung am C- Terminus zu sein, die sich in jedem diskutierten Ansatz wiederfinden lässt und die Hemmung dieses Vorgangs zu dem vermeintlich erfolgversprechendsten Konzept macht. Trotzdem wäre es in diesem Kontext interessant zu prüfen, ob in Krebszellen der Export von ERK5 aus dem Zellkern negativ beeinträchtigt ist [109]. Weitere Forschung ist nötig, um gegebenenfalls einen effektiveren Nutzen aus einer therapeutischen ERK5- Inhibition ziehen zu können.

6 Zusammenfassung

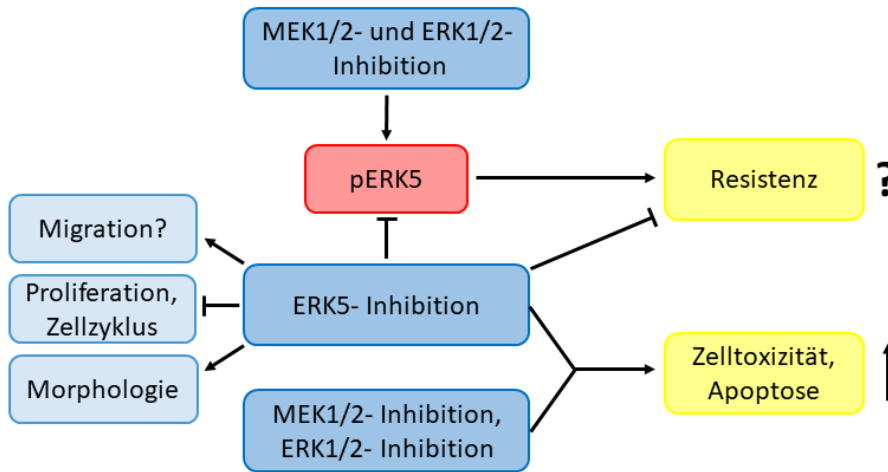


Abbildung 24: Überblick über die Rolle des MEK5/ERK5- Signalwegs in der Tumorgenese des malignen Melanoms

Dieses Schaubild stellt den Einfluss des MEK5/ERK5- Signalwegs auf zelluläre Prozesse in der Tumorgenese des malignen Melanoms dar. Außerdem bildet das Diagramm die Auswirkung einer ERK5-Inhibition ab und den Effekt einer Doppelbehandlung aus MEK1/2- oder ERK1/2- Hemmung mit einer ERK5- Inhibition.

In dieser Dissertation wird der MEK5/ERK5- Signalweg als möglicher Angriffspunkt in der zielgerichteten Melanomtherapie identifiziert. Die Adressierung von ERK5 bietet eine Alternative, um einer Resistenzentwicklung gegenüber Inhibitoren des MAPK-Signalwegs entgegenzuwirken. Das maligne Melanom ist ein hochaggressiver Tumor mit steigender Inzidenz. Zunehmende Sonnenstunden im Rahmen des Klimawandels mit erhöhter Belastung der Haut durch UV-Strahlung werden die Problematik des malignen Melanoms für den Menschen in den nächsten Jahren weiter zunehmen lassen.

Die Aktivierung des MEK5/ERK5- Signalwegs scheint eine Reaktion von Tumorzellen auf Therapiestress zu sein. Diese Aktivierung liefert den Melanomzellen einen Überlebensvorteil und verhindert ein langfristiges Therapieansprechen. ERK5 beeinflusst den Zellzyklus von Melanomzellen und ist somit möglicherweise von wichtiger Bedeutung in der Tumorgenese des malignen Melanoms.

Patienten mit NRAS- Mutation profitieren auffallend weniger von einer gezielten MEKi-Therapie als solche mit BRAF Mutation. Für ersteres Patientenkollektiv steht aktuell lediglich die Immuntherapie zur Verfügung, wodurch oft nur ein kurzes, progressionsfreies Intervall erreicht werden kann und die Patienten häufig unter schweren Nebenwirkungen leiden. Grund für die problematische Behandlung könnte das häufige Auftreten einer basalen ERK5- Aktivierung in NRAS- mutierten Melanomen sein. Diese

Zusammenfassung

Arbeit liefert eine positive Prognose über den Nutzen einer ERK5- Inhibition als Erweiterung des Therapieschemas. Diese These gilt auch für Melanompatienten mit einer BRAF- Mutation. Patienten, die an einem malignen Melanom erkrankt sind, weisen zu 80% eine Mutation in einem dieser beschriebenen Onkogene auf. Die Arbeit lässt darauf schließen, dass eine ERK5- Inhibition in der Therapie von beiden Gruppen erfolgreich sein könnte und somit das Leben nahezu aller Melanompatienten betrifft.

7 Abstract

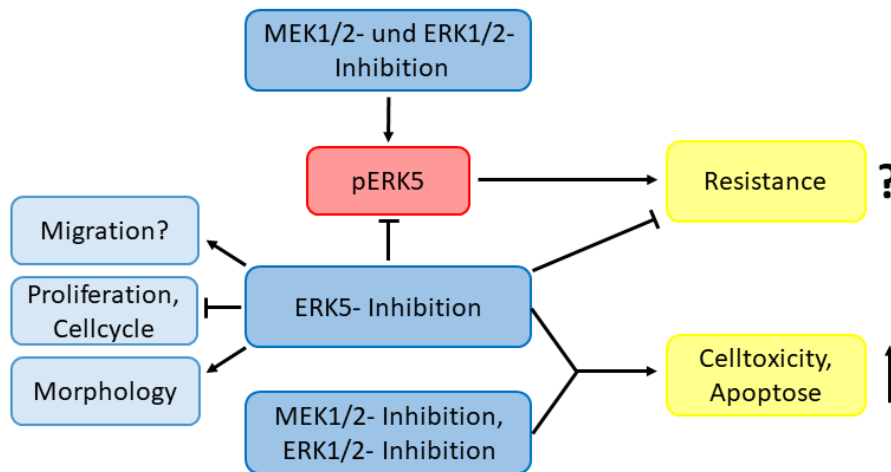


Figure 25: Overview concerning the MEK5/ERK5 pathway and its role in tumorigenesis

This figure portrays the influence of the MEK5/ERK5- pathway on cellular processes within the development of the malignant melanoma. Furthermore it gives an impression of the effects evolving from an ERK5- Inhibition and from co- targeting MEK1/2 or ERK1/2 together with ERK5.

In this thesis, targeting the MEK5/ERK5- pathway is identified as a possible treatment option for malignant melanoma in order to prevent the development of resistances against inhibitors of the MAPK- pathway.

The malignant melanoma is a highly aggressive tumor with an increasing incidence. A rising amount of sun exposure due to climate change will lead to increasing skin damage among the population and thus the malignant melanoma may emerge as an important medical problem throughout the following decade.

The activation of the MEK5/ERK5 pathway seems to be a cellular response to therapeutic stress. It therefore results in sustained proliferation and survival in melanoma cells and prevents an efficient therapy in the longterm. ERK5 has influence on the cell cycle progression of melanoma cells and could be of utmost importance for the tumorigenesis in malignant melanoma.

Patients suffering from NRAS- mutant melanoma benefit remarkably less from MAPK- pathway targeting regimens than those with BRAF- mutation. In these cases immunotherapy remains as the only valuable treatment option yet barely achieving a short progression free survival with severe side effects. The obstacle of effective therapy could be the frequently found occurrence of a basal ERK5- activity especially observed in NRAS- mutant melanoma cells.

Abstract

Our data imply that MEKi/ERK5i co-treatment could provide a new therapeutic approach as an adjunct to targeted therapy of malignant melanoma improving its overall effectiveness. This discovery does not only apply for NRAS- mutant melanoma but also for patients with BRAF- mutation. In 80% of malignant melanoma the driver mutation can be found in one of these two oncogenes suggesting the majority of melanoma patients might benefit from MEK5/ERK5- Inhibition.

8 Literaturverzeichnis

1. Cicenas, J., et al., *KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma*. Med Oncol, 2017. **34**(2): p. 26.
2. Schadendorf, D. and A. Hauschild, *Melanoma in 2013: Melanoma--the run of success continues*. Nat Rev Clin Oncol, 2014. **11**(2): p. 75-6.
3. Rastrelli, M., et al., *Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification*. In Vivo, 2014. **28**(6): p. 1005-11.
4. Duncan, L.M., *The classification of cutaneous melanoma*. Hematol Oncol Clin North Am, 2009. **23**(3): p. 501-13, ix.
5. Shannan, B., et al., *Heterogeneity in Melanoma*. Cancer Treat Res, 2016. **167**: p. 1-15.
6. Barnes, B., et al., *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. 2016, Robert Koch-Institut.
7. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2018*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(1): p. 7-30.
8. Carr, S., C. Smith, and J. Wernberg, *Epidemiology and Risk Factors of Melanoma*. Surg Clin North Am, 2020. **100**(1): p. 1-12.
9. Whiteman, D.C., A.C. Green, and C.M. Olsen, *The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031*. J Invest Dermatol, 2016. **136**(6): p. 1161-1171.
10. Lai, V., W. Cranwell, and R. Sinclair, *Epidemiology of skin cancer in the mature patient*. Clin Dermatol, 2018. **36**(2): p. 167-176.
11. Schadendorf, D., et al., *Melanoma*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15003.
12. Burnet, N.G., et al., *Years of life lost (YLL) from cancer is an important measure of population burden--and should be considered when allocating research funds*. Br J Cancer, 2005. **92**(2): p. 241-5.
13. Elwood, J.M., *Melanoma and sun exposure*. Semin Oncol, 1996. **23**(6): p. 650-66.

14. Elwood, J.M. and J. Jopson, *Melanoma and sun exposure: an overview of published studies*. Int J Cancer, 1997. **73**(2): p. 198-203.
15. Gandini, S., et al., *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure*. Eur J Cancer, 2005. **41**(1): p. 45-60.
16. Olsen, C.M., et al., *Biologic markers of sun exposure and melanoma risk in women: pooled case-control analysis*. Int J Cancer, 2011. **129**(3): p. 713-23.
17. Chin, L., L.A. Garraway, and D.E. Fisher, *Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era*. Genes Dev, 2006. **20**(16): p. 2149-82.
18. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 252-64.
19. Bevona, C., et al., *Cutaneous melanomas associated with nevi*. Arch Dermatol, 2003. **139**(12): p. 1620-4; discussion 1624.
20. FitzGerald, M.G., et al., *Prevalence of germ-line mutations in p16, p19ARF, and CDK4 in familial melanoma: analysis of a clinic-based population*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8541-5.
21. Luke, J.J., et al., *Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(8): p. 463-482.
22. Samatar, A.A. and P.I. Poulidakos, *Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges*. Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(12): p. 928-42.
23. Larkin, J., et al., *Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma*. N Engl J Med, 2015. **373**(1): p. 23-34.
24. Larkin, J., et al., *Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma*. N Engl J Med, 2019. **381**(16): p. 1535-1546.
25. Flaherty, K.T., et al., *Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations*. N Engl J Med, 2012. **367**(18): p. 1694-703.
26. Ribas, A., et al., *Combination of vemurafenib and cobimetinib in patients with advanced BRAF(V600)-mutated melanoma: a phase 1b study*. Lancet Oncol, 2014. **15**(9): p. 954-65.
27. Houben, R., et al., *Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis*. J Carcinog, 2004. **3**: p. 6.

28. Fedorenko, I.V., et al., *Beyond BRAF: where next for melanoma therapy?* Br J Cancer, 2015. **112**(2): p. 217-26.
29. Nazarian, R., et al., *Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation.* Nature, 2010. **468**(7326): p. 973-7.
30. Sullivan, R.J. and K. Flaherty, *MAP kinase signaling and inhibition in melanoma.* Oncogene, 2013. **32**(19): p. 2373-9.
31. Johannessen, C.M., et al., *COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation.* Nature, 2010. **468**(7326): p. 968-72.
32. Hartsough, E., Y. Shao, and A.E. Aplin, *Resistance to RAF inhibitors revisited.* J Invest Dermatol, 2014. **134**(2): p. 319-325.
33. Hatzivassiliou, G., et al., *RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth.* Nature, 2010. **464**(7287): p. 431-5.
34. Poulikakos, P.I., et al., *RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF.* Nature, 2010. **464**(7287): p. 427-30.
35. Nathanson, K.L., et al., *Tumor genetic analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436).* Clin Cancer Res, 2013. **19**(17): p. 4868-78.
36. Dummer, R., et al., *Binimetinib versus dacarbazine in patients with advanced NRAS-mutant melanoma (NEMO): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial.* Lancet Oncol, 2017. **18**(4): p. 435-445.
37. Shi, H., et al., *Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy.* Cancer Discov, 2014. **4**(1): p. 80-93.
38. Roberts, P.J. and C.J. Der, *Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer.* Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3291-310.
39. Hoang, V.T., et al., *Oncogenic signaling of MEK5-ERK5.* Cancer Lett, 2017. **392**: p. 51-59.
40. Nithianandarajah-Jones, G.N., et al., *ERK5: structure, regulation and function.* Cell Signal, 2012. **24**(11): p. 2187-96.
41. Buschbeck, M. and A. Ullrich, *The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling.* J Biol Chem, 2005. **280**(4): p. 2659-67.

42. Lochhead, P.A., R. Gilley, and S.J. Cook, *ERK5 and its role in tumour development*. Biochem Soc Trans, 2012. **40**(1): p. 251-6.
43. Inesta-Vaquera, F.A., et al., *Alternative ERK5 regulation by phosphorylation during the cell cycle*. Cell Signal, 2010. **22**(12): p. 1829-37.
44. Gomez, N., T. Erazo, and J.M. Lizcano, *ERK5 and Cell Proliferation: Nuclear Localization Is What Matters*. Front Cell Dev Biol, 2016. **4**: p. 105.
45. Hayashi, M. and J.D. Lee, *Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice*. J Mol Med (Berl), 2004. **82**(12): p. 800-8.
46. Hayashi, M., et al., *Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure*. J Clin Invest, 2004. **113**(8): p. 1138-48.
47. Kato, Y., et al., *BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C*. Embo j, 1997. **16**(23): p. 7054-66.
48. Yang, Q., et al., *Pharmacological inhibition of BMK1 suppresses tumor growth through promyelocytic leukemia protein*. Cancer Cell, 2010. **18**(3): p. 258-67.
49. Mulloy, R., et al., *Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade*. Oncogene, 2003. **22**(35): p. 5387-98.
50. Cude, K., et al., *Regulation of the G2-M cell cycle progression by the ERK5-NFkappaB signaling pathway*. J Cell Biol, 2007. **177**(2): p. 253-64.
51. Girio, A., et al., *Erk5 is activated and acts as a survival factor in mitosis*. Cell Signal, 2007. **19**(9): p. 1964-72.
52. Drew, B.A., M.E. Burow, and B.S. Beckman, *MEK5/ERK5 pathway: the first fifteen years*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1825**(1): p. 37-48.
53. Zhou, C., et al., *Proteomic analysis of tumor necrosis factor-alpha resistant human breast cancer cells reveals a MEK5/Erk5-mediated epithelial-mesenchymal transition phenotype*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(6): p. R105.
54. Chen, R., Q. Yang, and J.D. Lee, *BMK1 kinase suppresses epithelial-mesenchymal transition through the Akt/GSK3beta signaling pathway*. Cancer Res, 2012. **72**(6): p. 1579-87.
55. Wu, J., et al., *MicroRNA-200b-3p suppresses epithelial-mesenchymal transition and inhibits tumor growth of glioma through down-regulation of ERK5*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **478**(3): p. 1158-64.

56. Diepenbruck, M. and G. Christofori, *Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe?* Curr Opin Cell Biol, 2016. **43**: p. 7-13.
57. Puisieux, A., T. Brabletz, and J. Caramel, *Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(6): p. 488-94.
58. Xiong, Y., L. Zhang, and T. Wang, *Phosphorylation of BMK1 induces prostatic carcinoma cell proliferation by promoting entry into the S phase of the cell cycle*. Oncol Lett, 2016. **11**(1): p. 99-104.
59. Miranda, M., et al., *MEK5-ERK5 pathway associates with poor survival of breast cancer patients after systemic treatments*. Oncoscience, 2015. **2**(2): p. 99-101.
60. Weldon, C.B., et al., *Identification of mitogen-activated protein kinase kinase as a chemoresistant pathway in MCF-7 cells by using gene expression microarray*. Surgery, 2002. **132**(2): p. 293-301.
61. Montero, J.C., et al., *Expression of Erk5 in early stage breast cancer and association with disease free survival identifies this kinase as a potential therapeutic target*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5565.
62. Pereira, D.M., et al., *MEK5/ERK5 signaling inhibition increases colon cancer cell sensitivity to 5-fluorouracil through a p53-dependent mechanism*. Oncotarget, 2016. **7**(23): p. 34322-40.
63. Simoes, A.E., et al., *Aberrant MEK5/ERK5 signalling contributes to human colon cancer progression via NF-kappaB activation*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1718.
64. Yang, Q. and J.D. Lee, *Targeting the BMK1 MAP kinase pathway in cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(11): p. 3527-32.
65. Hayashi, M., et al., *Big mitogen-activated protein kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway is essential for tumor-associated angiogenesis*. Cancer Res, 2005. **65**(17): p. 7699-706.
66. Garaude, J., et al., *ERK5 activates NF-kappaB in leukemic T cells and is essential for their growth in vivo*. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7607-17.
67. Stecca, B. and E. Rovida, *Impact of ERK5 on the Hallmarks of Cancer*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(6).
68. de Jong, P.R., et al., *ERK5 signalling rescues intestinal epithelial turnover and tumour cell proliferation upon ERK1/2 abrogation*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11551.

69. Vaseva, A.V., et al., *KRAS Suppression-Induced Degradation of MYC Is Antagonized by a MEK5-ERK5 Compensatory Mechanism*. *Cancer Cell*, 2018. **34**(5): p. 807-822.e7.
70. Song, C., et al., *Targeting BMK1 Impairs the Drug Resistance to Combined Inhibition of BRAF and MEK1/2 in Melanoma*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 46244.
71. Benito-Jardon, L., et al., *Resistance to MAPK Inhibitors in Melanoma Involves Activation of the IGF1R-MEK5-Erk5 Pathway*. *Cancer Res*, 2019. **79**(9): p. 2244-2256.
72. Schrama, D., et al., *BRAFV600E mutations in malignant melanoma are associated with increased expressions of BAALC*. *J Carcinog*, 2008. **7**: p. 1.
73. Ugurel, S., et al., *B-RAF and N-RAS mutations are preserved during short time in vitro propagation and differentially impact prognosis*. *PLoS One*, 2007. **2**(2): p. e236.
74. Van Muijen, G.N., et al., *Antigen expression of metastasizing and non-metastasizing human melanoma cells xenografted into nude mice*. *Clin Exp Metastasis*, 1991. **9**(3): p. 259-72.
75. Lockshin, A., et al., *Exceptional lethality for nude mice of cells derived from a primary human melanoma*. *Cancer Res*, 1985. **45**(1): p. 345-50.
76. Giard, D.J., et al., *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. *J Natl Cancer Inst*, 1973. **51**(5): p. 1417-23.
77. Monks, A., et al., *Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines*. *J Natl Cancer Inst*, 1991. **83**(11): p. 757-66.
78. Fodstad, O., et al., *A new experimental metastasis model in athymic nude mice, the human malignant melanoma LOX*. *Int J Cancer*, 1988. **41**(3): p. 442-9.
79. Guldberg, P., et al., *Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma*. *Cancer Res*, 1997. **57**(17): p. 3660-3.
80. Komaravolu, R.K., et al., *Erk5 inhibits endothelial migration via KLF2-dependent down-regulation of PAK1*. *Cardiovasc Res*, 2015. **105**(1): p. 86-95.
81. Cagnol, S. and N. Rivard, *Oncogenic KRAS and BRAF activation of the MEK/ERK signaling pathway promotes expression of dual-specificity*

- phosphatase 4 (DUSP4/MKP2) resulting in nuclear ERK1/2 inhibition.* Oncogene, 2013. **32**(5): p. 564-76.
82. Ma, B., et al., *DUSP4/MKP2 overexpression is associated with BRAF(V600E) mutation and aggressive behavior of papillary thyroid cancer.* Onco Targets Ther, 2016. **9**: p. 2255-63.
83. Hugo, W., et al., *Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance.* Cell, 2015. **162**(6): p. 1271-85.
84. Patterson, K.I., et al., *Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets.* Biochem J, 2009. **418**(3): p. 475-89.
85. Adam, C., et al., *Efficient suppression of NRAS-driven melanoma by co-inhibition of ERK1/2 and ERK5 MAPK pathways.* Journal of Investigative Dermatology, 2020.
86. Montagut, C., et al., *Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma.* Cancer Res, 2008. **68**(12): p. 4853-61.
87. Tusa, I., et al., *ERK5 is activated by oncogenic BRAF and promotes melanoma growth.* Oncogene, 2018. **37**(19): p. 2601-2614.
88. Lochhead, P.A., et al., *Tumor cells with KRAS or BRAF mutations or ERK5/MAPK7 amplification are not addicted to ERK5 activity for cell proliferation.* Cell Cycle, 2016. **15**(4): p. 506-18.
89. Finegan, K.G., et al., *Regulation of neuronal survival by the extracellular signal-regulated protein kinase 5.* Cell Death Differ, 2009. **16**(5): p. 674-83.
90. Ohnesorge, N., et al., *Erk5 activation elicits a vasoprotective endothelial phenotype via induction of Kruppel-like factor 4 (KLF4).* J Biol Chem, 2010. **285**(34): p. 26199-210.
91. Sangwung, P., et al., *KLF2 and KLF4 control endothelial identity and vascular integrity.* JCI Insight, 2017. **2**(4): p. e91700.
92. Chiplunkar, A.R., et al., *The Kruppel-like factor 2 and Kruppel-like factor 4 genes interact to maintain endothelial integrity in mouse embryonic vasculogenesis.* BMC Dev Biol, 2013. **13**: p. 40.

93. Wang, B., et al., *KLF2 Inhibits the Migration and Invasion of Prostate Cancer Cells by Downregulating MMP2*. Am J Mens Health, 2019. **13**(1): p. 1557988318816907.
94. Moonen, J.R., et al., *Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to fibro-proliferative vascular disease and is modulated by fluid shear stress*. Cardiovasc Res, 2015. **108**(3): p. 377-86.
95. Medici, D. and R. Kalluri, *Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype*. Semin Cancer Biol, 2012. **22**(5-6): p. 379-84.
96. Zhang, D., et al., *Regulation of the adaptation to ER stress by KLF4 facilitates melanoma cell metastasis via upregulating NUCB2 expression*. J Exp Clin Cancer Res, 2018. **37**(1): p. 176.
97. Rowland, B.D., R. Bernards, and D.S. Peeper, *The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(11): p. 1074-82.
98. Wernig, M., et al., *In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 318-24.
99. Yeo, J.C., et al., *Klf2 is an essential factor that sustains ground state pluripotency*. Cell Stem Cell, 2014. **14**(6): p. 864-72.
100. Jacquemet, G., H. Hamidi, and J. Ivaska, *Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **36**: p. 23-31.
101. Kang, C., et al., *The Pharmacological Inhibition of ERK5 Enhances Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia Cells*. Int J Stem Cells, 2018. **11**(2): p. 227-234.
102. Wang, G., et al., *Discovery of a Novel Dual-Target Inhibitor of ERK1 and ERK5 That Induces Regulated Cell Death to Overcome Compensatory Mechanism in Specific Tumor Types*. J Med Chem, 2020.
103. Lin, E.C., et al., *ERK5 kinase activity is dispensable for cellular immune response and proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(42): p. 11865-11870.
104. Perez-Salvia, M. and M. Esteller, *Bromodomain inhibitors and cancer therapy: From structures to applications*. Epigenetics, 2017. **12**(5): p. 323-339.
105. Tatake, R.J., et al., *Identification of pharmacological inhibitors of the MEK5/ERK5 pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **377**(1): p. 120-5.

106. Delmore, J.E., et al., *BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc*. Cell, 2011. **146**(6): p. 904-17.
107. Echevarria-Vargas, I.M., et al., *Co-targeting BET and MEK as salvage therapy for MAPK and checkpoint inhibitor-resistant melanoma*. EMBO Mol Med, 2018. **10**(5).
108. Loveridge, C.J., et al., *Increased T-cell Infiltration Elicited by Erk5 Deletion in a Pten-Deficient Mouse Model of Prostate Carcinogenesis*. Cancer Res, 2017. **77**(12): p. 3158-3168.
109. Tubita, A., et al., *Beyond Kinase Activity: ERK5 Nucleo-Cytoplasmic Shuttling as a Novel Target for Anticancer Therapy*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(3).
110. Erazo, T., et al., *Canonical and kinase activity-independent mechanisms for extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) nuclear translocation require dissociation of Hsp90 from the ERK5-Cdc37 complex*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(8): p. 1671-86.
111. Smith, J.R. and P. Workman, *Targeting CDC37: an alternative, kinase-directed strategy for disruption of oncogenic chaperoning*. Cell Cycle, 2009. **8**(3): p. 362-72.
112. Zhuang, K., et al., *CDK5 functions as a tumor promoter in human colorectal cancer via modulating the ERK5-AP-1 axis*. Cell Death Dis, 2016. **7**(10): p. e2415.
113. Alvarez-Fernandez, S., et al., *Potent antimyeloma activity of a novel ERK5/CDK inhibitor*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(10): p. 2677-87.
114. Pearson, A.J., et al., *Discovery of a Gatekeeper Residue in the C-Terminal Tail of the Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase 5 (ERK5)*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(3).

Publikation

Christian Adam, Lorenza Fusi, **Neele Weiss**, Simon G. Goller, Katharina Meder, Verena G. Frings, Hermann Kneitz, Matthias Goebeler, Roland Houben, David Schrama, Marc Schmidt: *Efficient suppression of NRAS-driven melanoma by co-inhibition of ERK1/2 and ERK5 MAPK pathways*. Journal of Investigative Dermatology, 2020.

Danksagung

Mein Dank geht an die Medizinischen Fakultät Würzburg und die Graduiertenschule für Lebenswissenschaften (*Graduate School of Life Sciences (GSLS)*), die mir meine Promotion in dieser Form ermöglicht haben und an die Menschen, die mir auf dem Weg dorthin immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Zuallererst bedanke ich mich bei meiner Arbeitsgruppe AG Schmidt in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Würzburg unter der Leitung von Chefarzt Prof. Goebeler.

Ein besonderer Dank gilt hier meinem Doktorvater Prof. Marc Schmidt. Unter seiner Betreuung und fortwährenden Unterstützung war es mir möglich, diese Arbeit zu verwirklichen.

Außerdem bin ich sehr dankbar für die Betreuung durch Herrn Christian Adam, dessen Unterstützung maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen hat, indem er mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mir so eine lehreiche und freudige Zeit im Labor bereitet hat.

Meinen restlichen Betreuern und Mitarbeitern der AG Schmidt, sowie der übrigen Forschungsgruppen der Dermatologie Würzburg möchte ich ebenfalls herzlich danken. Besonders danke ich an dieser Stelle Helga Sennefelder, Lorenza Fusi und Katharina Meder.

Bei Herrn PD Roland Houben möchte ich mich ebenfalls herzlich für seine Funktion als Mitglied meines Promotionskomitees und für seine Unterstützung während meiner Laborarbeit bedanken. Danke an Prof. Svenja Meierjohann für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Dissertation und für die Beantwortung von Fragen auf dem Weg meiner Promotion als Beisitzerin meines Promotionskomitees.

D., vielen Dank, dass du jegliche Launen von mir aushältst, für mich da bist und mich immer wieder geduldig auf den Boden der Tatsachen zurückholst. Mit dir an meiner Seite kann ich alles schaffen und so sein, wie ich bin. Danke!

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie. Meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinen Großeltern. Danke, für das Lesen meiner Arbeit in allen Stufen ihrer Entstehung, danke für jeden Rat, jede Unterstützung und die fortwährende Motivation, die es mir ermöglicht hat, meinen Weg zu gehen. Ich bin so glücklich, euch zu haben.

Curriculum vitae

Eidesstattliche Erklärung

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “ Function of the MEK5/ERK5-Pathway in the targeted Therapy of Melanoma“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/ or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Bedeutung des MEK5/ERK5-Signalwegs in der zielgerichteten Melanomtherapie“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

