

Aus dem Lehrstuhl für Pharmakologie
der Universität Würzburg
Kommissarische Leitung: Prof. Antje Gohla



**Untersuchung der Rolle der ERK-Dimerisierung bei der ERK1/2-
vermittelten Proliferation von Tumorzellen**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Tamara Gruse

aus Walldürn

Nürnberg, Mai 2017

Referentin:	Prof. Dr. Kristina Lorenz
Korreferent bzw. Korreferentin:	Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen
Dekan:	Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2018

Die Promovendin ist Zahnärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Krebserkrankung.....	1
1.2	Die Entstehung eines bösartigen Tumors	2
1.3	Die Tumorbehandlung und mögliche Behandlungsstrategien	3
1.4	Die Signalkaskade.....	4
1.4.1	Der MAPK-Signalweg.....	4
1.4.2	Der ERK1/2-Signalweg.....	6
1.5	Die Rolle des MAPK-Signalweges bei der Tumorgenese	8
1.5.1	Erhöhte Expression des EGF-Rezeptors.....	8
1.5.2	Aktivierende K-Ras- und B-Raf-Mutationen.....	8
1.6	Die zielgerichtete Tumorbehandlung: <i>Targeted therapy</i>	9
1.6.1	Ras-Inhibitoren	10
1.6.2	Raf-Inhibitoren	10
1.6.3	MEK-Inhibitoren.....	10
1.6.4	EGFR-Inhibitoren.....	11
1.7	Ziele der Dissertation	12
2	Material	14
2.1	Chemikalien	14
2.2	Zellkulturmedien	15
2.3	Geräte	16
2.4	Software	16
2.5	Eukaryotische Zellen	16
2.6	Adenoviren.....	17

2.7	Primärantikörper.....	17
2.8	Sekundärantikörper.....	17
2.9	MAPK-Inhibitoren/-Antikörper.....	18
2.10	Kits	18
3	Methoden	19
3.1	Kultur von eukaryotischen Zellen	19
3.1.1	Kryokonservierung von Zellen	19
3.1.2	Auftauen von Zellen.....	19
3.1.3	Kultur von Zellen.....	20
3.1.4	Bestimmung der Zellzahl und Aussäen von Zellsuspensionen.....	20
3.2	Transduktion von Zellen mit Adenoviren	21
3.3	Herstellung der Lysate	22
3.3.1	Westernblot	22
3.3.2	Dot Blot.....	23
3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	23
3.5	Westernblot	25
3.6	Ablösen gebundener Antikörper von Membranen (<i>Strippen</i>)	27
3.7	Proteinbestimmung mittels <i>BCA-Assay</i>	27
3.8	Dot Blot (Tüpfelblot)	28
3.9	[³ H]-Thymidineinbau.....	28
3.10	Immunfluoreszenzfärbung.....	29
3.11	Statistikanalysen und Programme.....	30
4	Ergebnisse.....	31
4.1	Expression eines Myc-markierten ERK2-Peptids in verschiedenen Krebszelllinien.....	31

4.2	Myc-ERK2 ³⁰⁹⁻³⁵⁷ hat keinen Einfluss auf die ERK1/2-Phosphorylierung am TEY-Motiv	34
4.3	Myc-ERK2 ³⁰⁹⁻³⁵⁷ beeinflusst die Proliferation von Tumorzellen.....	36
4.4	Die MEK-Inhibitoren U0126 und PD98059 vermindern die Proliferation von Tumorzellen	39
4.5	Myc-ERK2 ³⁰⁹⁻³⁵⁷ hemmt die Proliferation von SCC68-Zellen signifikant besser als die MEK-Inhibitoren U0126 und PD98059 und der Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Cetuximab.....	41
5	Diskussion	45
6	Zusammenfassung.....	53
7	Literaturverzeichnis	55
8	Anhang.....	61
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	61
8.2	Abkürzungsverzeichnis	62
8.3	Eidesstattliche Erklärung.....	64

1 Einleitung

1.1 Die Krebserkrankung

Krebserkrankungen sind eine der führenden Todesursachen weltweit. Laut der *World Health Organization* (WHO) starben im Jahr 2012 über 8,2 Millionen Menschen an einem Tumor. 14 Millionen Neuerkrankungen wurden 2012 registriert, wobei dieser Wert von Jahr zu Jahr ansteigt. Laut der WHO sind im Jahr 2030 mehr als 21 Millionen Krebsneuerkrankungen pro Jahr zu erwarten. Auch die Todesfälle werden auf über 13 Millionen Menschen weltweit ansteigen (Stewart & Wild 2014).

Dieser enorme Anstieg der Krebsneuerkrankungen ist u.a. auf demographische Faktoren, wie z.B. gesteigerte Lebenserwartung und Bevölkerungswachstum, aber auch auf das Verhalten der Menschen zurückzuführen (World Health Organization 2015). Rauchen, Übergewicht, Bewegungsmangel und Alkoholkonsum, sowie Schadstoffe und Verunreinigungen in Lebensmitteln gelten als Risikofaktoren für eine Krebsentstehung. Insgesamt müssen ca. 51% der Männer bzw. 43% der Frauen damit rechnen, im Laufe ihres Lebens einmal an Krebs zu erkranken (Robert Koch Institut 2013).

Die am häufigsten vorkommende Krebsart beim Mann ist der Lungenkrebs (16,7%), gefolgt vom Prostatakrebs (15%) und Darmkrebs (10%), wobei der Lungenkrebs die häufigste krebsbedingte Todesursache darstellt (23,6%). Bei der Frau ist mit über 25% aller Krebsfälle besonders der Brustkrebs vertreten, an dem auch die meisten Frauen sterben (14,7%). Auch Darmkrebserkrankungen sind vermehrt vorzufinden (9,2%) (Stewart & Wild 2014).

1.2 Die Entstehung eines bösartigen Tumors

Die Entstehung eines bösartigen Tumors ist ein sehr komplexer Prozess, der über mehrere Schritte und von Patient zu Patient unterschiedlich verläuft (Boyle & Levin 2008).

Die tumorbedingte Neubildung geht meist von einer kleinen Zahl gesunder Zellen aus, die durch Genmutationen so verändert werden, dass sie uneingeschränkt wachsen können. Vor allem drei Gruppen von Genen sind in der Krebsentstehung entscheidend: die sogenannten Onkogene, Tumorsuppressorgene und Reparaturgene (Vogelstein & Kinzler 1993, Pecorino 2012). Diese Gene kommen in allen gesunden Körperzellen vor und sind normalerweise für die Regulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung zuständig. Üblicherweise besteht ein gut kontrolliertes Gleichgewicht zwischen Zellwachstum, induziert durch Onkogene (z.B. Ras), und der Aktivität von Tumorsuppressorgenen, die das Wachstum unterdrücken (Vogelstein, Lane et al. 2000, Schmitz 2011). Ist die DNS einer Zelle beschädigt, greifen Tumorsuppressorgene (z.B. p53) in den Zellzyklus ein, halten diesen an und verhindern somit, dass die entartete Zelle vermehrt wird. Falls dieses Gleichgewicht zwischen neugebildeten und abgestorbenen Zellen aufgrund von karzinomrelevanten Mutationen außer Balance gerät, greifen die Reparaturgene ein. Sie erkennen kleinste Zellschädigungen und können diese sofort reparieren. Bei einer Krebserkrankung sind jedoch in der Regel Onkogene, Tumorsuppressorgene und Reparaturgene aufgrund von Mutationen verändert und können ihre eigentliche Funktion nicht mehr erfüllen. Es kommt zu einem unkontrollierten Wachstum des Tumors (Hanahan & Weinberg 2000).

Des Weiteren spielt auch die Apoptose, d.h. der programmierte Zelltod, eine entscheidende Rolle in der Krebsentstehung. Zellen, die entartet sind oder durch die Reparaturgene nicht mehr erneuert werden können, bekommen den Befehl „Selbstmord“ zu begehen (z.B. durch Caspasen). Die geschädigten Zellen sterben ab, und eine weitere Vermehrung bleibt aus. Jedoch kann auch dieses System aufgrund von Mutationen verändert sein und somit nicht mehr richtig funktionieren (Fiandalo & Kyprianou 2012).

1.3 Die Tumorbehandlung und mögliche Behandlungsstrategien

Zur derzeitigen Standardtherapie bei Tumorerkrankungen gehört die möglichst vollständige chirurgische Entfernung des bösartigen Gewebes (Resektion) und eine nachgeschaltete lokale Strahlentherapie mit unterstützender systemischer Behandlung mit Chemotherapeutika. Seit Einführung dieser Kombinationstherapie in den 60er Jahren konnte gezeigt werden, dass sich bei einigen Tumoren, wie z.B. beim Hoden- und Brustkrebs, die 5-Jahres-Überlebens- und zum Teil auch die Heilungsraten der Patienten deutlich verbesserte (Schmoll, Höffken et al. 2006).

Die Radiochemotherapie ist jedoch mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen behaftet. Aufgrund der hochenergetischen Strahlen und der zellschädigenden Chemotherapeutika, die auch auf gesunde Zellen wirken, leiden die Patienten meist an starken Nebenwirkungen, wie z.B. Übelkeit und Erbrechen, Haarausfall, Hautausschlägen, Schleimhautentzündungen und allgemeinem Unwohlsein. Higgins et al. konnten außerdem zeigen, dass ungefähr 40% der Tumore Resistenzen gegen die Chemotherapeutika entwickeln und somit diese Therapieform bei den Patienten nicht anschlägt (Higgins 2007).

In den letzten Jahren konnten die Behandlungserfolge der Standardtherapie bei Tumorerkrankungen weiter verbessert und dadurch Nebenwirkungen mit Hilfe von neuen Medikamenten tolerierbar gemacht werden. Jedoch bleibt bei den meisten Krebsarten eine Heilung weitestgehend aus. Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate aller Tumorpatienten beträgt bei Männern 61% und bei Frauen 67% (Robert Koch Institut 2013). Bei bösartigen Tumoren der Bauchspeicheldrüse liegen die 5-Jahres-Überlebensraten sogar unter 10%. Diese Erkenntnis macht deutlich, dass in der Krebsforschung neue Wege beschritten werden müssen.

Um noch gezieltere Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln, wurde intensiv in Richtung zielgerichteter Krebstherapie (*Targeted therapy*) geforscht (Green 2004, Hughes, Caenepeel et al. 2016). Hierbei versucht man, die Krebszellen direkt anzugreifen, um somit den Patienten weniger durch mögliche Nebenwirkungen zu belasten. Zu dieser neuen Art der Behandlung gehören z.B.

monoklonale Antikörper, die auf Rezeptoren wirken, die in onkogene Signalkaskaden involviert sind und diese so blockieren. Des Weiteren wurden kleine Moleküle entwickelt, die als Kinaseinhibitoren fungieren.

Da man schon seit einiger Zeit weiß, dass der sogenannte Raf-MEK-ERK-Signalweg eine große Rolle in der Tumorgenese spielt, wird seit längerem nachdrücklich in Richtung dieser Signalkaskade geforscht (Levidou, Saetta et al. 2012).

1.4 Die Signalkaskade

Die Raf-MEK-ERK-Signalkaskade spielt eine wichtige Rolle in vielen zellulären Prozessen, u.a. Proliferation, Differenzierung, Wachstum, Hypertrophie und Apoptose (Kolch 2000). Sie gehört zur Familie der mehrstufigen Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und wird schrittweise über mehrere vorgeschaltete Prozesse aktiviert (Raman, Chen et al. 2007).

1.4.1 Der MAPK-Signalweg

Der MAPK-Signalweg besteht aus drei hintereinander geschalteten Kinasen: der MAP3K (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase), der MAP2K (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase) und der MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase). Diese Kinasen gehören zur Familie der Serin-/Threoninkinasen und werden u.a. über Mitogene aktiviert, welche die Zellteilung stimulieren (Raman, Chen et al. 2007).

Extrazelluläre Stimuli, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Hormone oder Mitogene, aktivieren u.a. Rezeptortyrosinkinasen (RTK) oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) in der Zellmembran (siehe Abb. 1). Über eine Serie von Aktivierungsprozessen wird u.a. ein kleines monomeres G-Protein aktiviert, das wiederum die erste Kinase, MAP3K, aktiviert. Diese phosphoryliert und aktiviert daraufhin MAP2K, welche MAPK phosphoryliert und aktiviert. Diese MAPK wird

auch als Effektor kinase bezeichnet, da sie für die Aktivierung von Zielproteinen und Transkriptionsfaktoren zuständig ist.

Die extrazellulär-signalregulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2) sind solche Effektor kinasen.

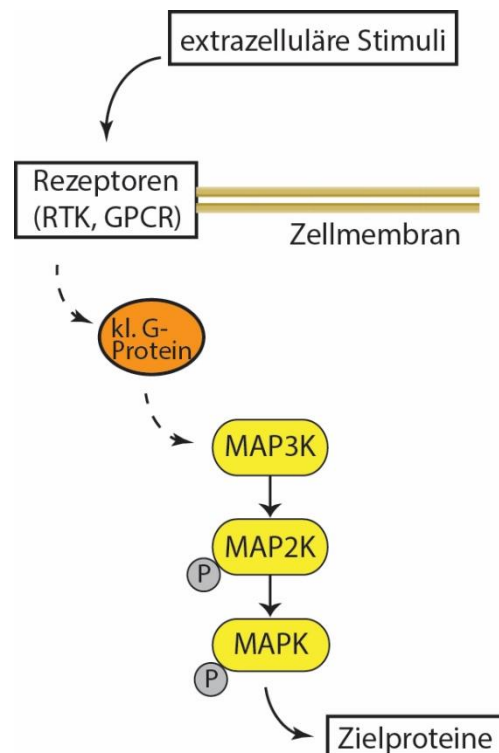


Abb. 1: Schematische Darstellung des MAPK-Signalweges

RTK = Rezeptortyrosinkinase, GPCR = G-Protein-gekoppelter Rezeptor, MAP3K = Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase, MAP2K = Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase, MAPK = Mitogen-aktivierte Proteinkinase, P = Phosphorylierungsstelle.

1.4.2 Der ERK1/2-Signalweg

Die extrazellulär-signalregulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2) sind ubiquitäre, vielseitige Serin-/Threoninkinasen, die viele verschiedene Zielproteine in allen zellulären Kompartimenten des Körpers phosphorylieren und somit aktivieren können (Seger & Krebs 1995, Levidou, Saetta et al. 2012).

ERK1 (44kDa) und ERK2 (42kDa) besitzen zu 84% identische Aminosäuresequenzen, weshalb sie auch meist als ERK1/2 zusammengefasst werden (Casar, Pinto et al. 2009, Rose, Force et al. 2010, Roskoski 2012).

Durch Stimulation eines EGF-Rezeptors (*Epidermal growth factor receptor*) oder anderer Rezeptortyrosinkinasen wird ein GTP-Austausch an dem kleinen monomeren G-Protein Ras-GDP, das an der Zellmembran lokalisiert ist, ausgelöst (siehe Abb. 2). Daraufhin kommt es zu einer Membranrekrutierung der Proteinkinase Raf-1 (MAP3K), die über einen noch nicht genau verstandenen Mechanismus aktiviert wird (Wellbrock, Karasarides et al. 2004). Aktiviertes Raf-1 phosphoryliert und aktiviert nun die Kinasen MEK1/2 (*Mitogen-activated protein kinase kinases 1/2*, MAP2K), die wiederum ERK1/2 (MAPK) durch Phosphorylierung von Threonin183 und Tyrosin185, dem sogenannten TEY-Motiv, aktivieren (Payne, Rossomando et al. 1991). Nach Aktivierung kommt es zu einer Homo- oder Heterodimerisierung von ERK1 und ERK2, das wiederum zu einer Bindung der G $\beta\gamma$ -Untereinheit eines aktivierten G-Proteins führen kann (Lorenz, Schmitt et al. 2009, Ruppert, Deiss et al. 2013). Lorenz et al. konnten 2009 zeigen, dass diese Interaktion zwischen dem ERK-Dimer und der G $\beta\gamma$ -Untereinheit eine Autophosphorylierung an Threonin188 an ERK2 (bzw. Threonin208 an ERK1) auslöst, die schließlich zu einer vermehrten Lokalisation von ERK1/2 im Zellkern führt (Lorenz, Schmitt et al. 2009). Dort kommt es zu einer Aktivierung von verschiedenen Zielproteinen und Transkriptionsfaktoren, z.B. Elk-1 (*ETS-like 1 transcription factor*) oder Myc, die u.a. bei der Entstehung von Herzhypertrophie, Zelldifferenzierung, Angiogenese und der Proliferation von Zellen von großer Bedeutung sind. Auch außerhalb des Zellkerns besitzt stimuliertes ERK1/2 wichtige Funktionen. Es phosphoryliert u.a. BIM (*B-cell lymphoma 2-interacting mediator of cell death*), ein pro-apoptotisches Protein,

das dadurch gehemmt wird. ERK1/2 besitzt somit im Zytosol anti-apoptotische Funktionen. Es konnte gezeigt werden, dass ungefähr 50% des aktivierten ERK1/2 im Zytosol verbleiben (Calvo, Agudo-Ibanez et al. 2010).

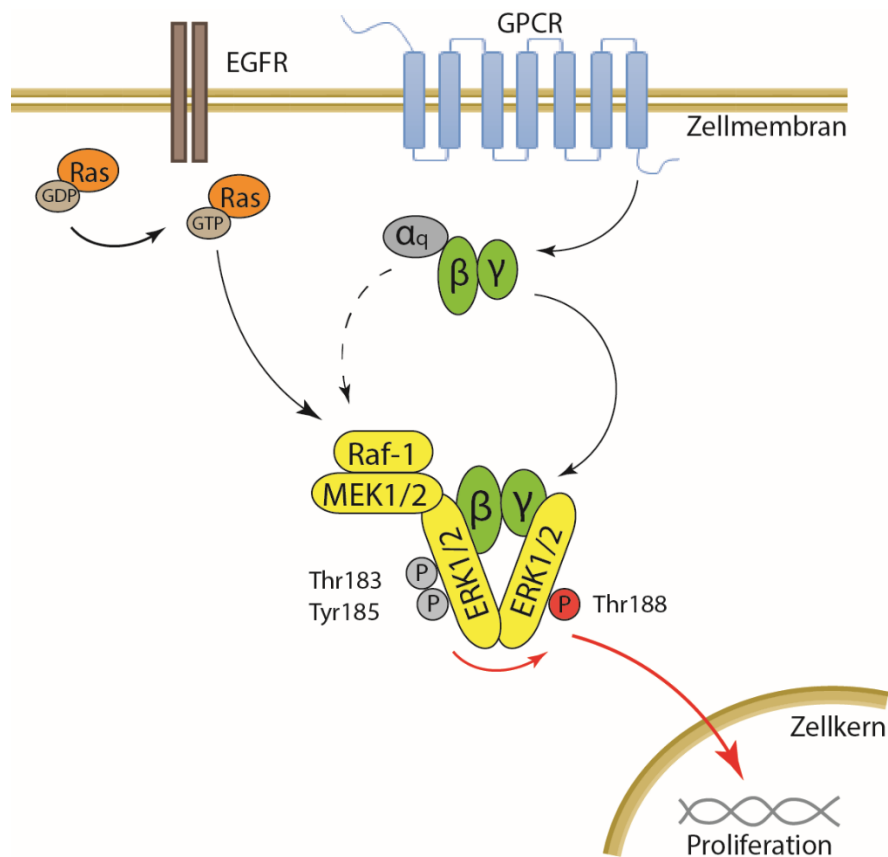


Abb. 2: Schematische Darstellung des ERK1/2-Signalweges

EGFR = *Epidermal growth factor receptor*, GPCR = *G-Protein-gekoppelter Rezeptor*, Ras = *Rat sarcoma*, GDP/GTP = *Guanosindi-/triphosphat*, Raf-1 = *Rat fibrosarcoma-1*, MEK1/2 = *Mitogen-activated protein kinase kinases 1/2*, ERK1/2 = *Extrazellulär-signalregulierte Kinasen 1/2*, Thr = *Threonin*, Tyr = *Tyrosin*, P = *Phosphorylierungsstelle*.

1.5 Die Rolle des MAPK-Signalweges bei der Tumorgenese

Bei vielen Erkrankungen, u.a. Herzhypertrophie, Diabetes und Entzündungen, ist die Raf-MEK-ERK-Signalkaskade fehlreguliert (Lawrence, Jivan et al. 2008, Roskoski 2012). Auch bei Tumorerkrankungen spielt der Signalweg eine signifikante Rolle, da dieser bei ungefähr 50% der Krebserkrankungen deutlich aktiviert ist (Matallanas & Crespo 2010, Herrero, Pinto et al. 2015).

1.5.1 Erhöhte Expression des EGF-Rezeptors

Die Aktivierung des EGF-Rezeptors war einer der ersten Ansätze, der mit der Entstehung von Tumoren in Zusammenhang gebracht wurde (Humblet 2004). Bei Kopf-Hals-, Eierstock- oder Speiseröhrenkarzinomen besteht eine signifikante Verbindung zwischen der EGFR-Expression, einer verkürzten Rezidivfreiheit des Tumors und geringen Überlebensraten der Patienten (Nicholson, Gee et al. 2001, Rivera, Garcia-Castano et al. 2009). In 80-90% der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches ist eine gesteigerte Aktivität des EGF-Rezeptors zu finden (Kabolizadeh, Kubicek et al. 2012, Hartmann & Grandis 2016). Diese Korrelation ist bei anderen Tumoren, z.B. Brust- und Darmkarzinomen, nicht so stark ausgeprägt. Nichtsdestotrotz ist die EGFR-Expression in den meisten Krebsarten als ein wichtiger prognostischer Indikator anzusehen.

1.5.2 Aktivierende K-Ras- und B-Raf-Mutationen

Eine Aktivierung des MAPK-Signalweges kann nicht nur durch Stimulation eines EGF-Rezeptors bzw. einer anderen Rezeptortyrosinkinase ausgelöst werden, sondern auch durch aktivierende Mutationen in nachgeschalteten Proteinen, wie z.B. K-Ras oder B-Raf, erfolgen.

Ras gehört zur Gruppe der monomeren G-Proteine und umfasst drei Isoformen: H-, K- und N-Ras (Aoki, Niihori et al. 2008). In 20% aller Tumorfälle ist eine Mutation in einem der Ras-Gene vorhanden. Davon sind 85% im K-Ras-, 15% im

N-Ras- und weniger als 1% im H-Ras-Protein zu finden (Downward 2003). Daher spielt besonders K-Ras eine wichtige Rolle in der Tumorforschung. K-Ras kann v.a. im Exon 2 aktivierende Punktmutationen besitzen, wodurch es unempfindlich gegenüber dem GTPase-aktivierenden Protein (GAP) wird (Roberts & Der 2007). Dieses Protein ist normalerweise dafür zuständig, dass Ras-GTP (aktiviertes Ras) wieder in den inaktiven Zustand (Ras-GDP) übergeht, indem das GTP hydrolytisch abgespalten wird. Dieser Mechanismus ist aufgrund der Punktmutation jedoch gestört, und es kommt somit zu einer Daueraktivierung des MAPK-Signalweges. Da bei 90% der Bauchspeicheldrüsen-, 20-30% der Lungen- und 55% der metastasierenden Darmtumore eine Mutation der Ras-Proteine vorhanden ist, klassifiziert man dies als ein Proto-Onkogen (Kiaris & Spandidos 1995, Martinelli, Morgillo et al. 2017).

Raf ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die 3 Isoformen umfasst: Raf-1, A-Raf, B-Raf (Dhillon & Kolch 2004). Insbesondere die B-Raf-Kinase hat großes Interesse auf sich gezogen, da sie zu 60-70% in Melanomen, 40% in Schilddrüsen- und 5-20% in Darmtumoren mutiert ist (Roskoski 2012, Dalpa, Gourvas et al. 2017). Da eine aktivierende Mutation von Raf eine Daueraktivierung der nachfolgenden Signalkaskade auslöst, wird B-Raf ebenfalls als ein Proto-Onkogen angesehen (Garnett & Marais 2004).

1.6 Die zielgerichtete Tumorbehandlung: *Targeted therapy*

Angesichts der wesentlichen Bedeutung des MAPK-Signalweges in der Tumorgenese sind weltweit Wissenschaftler auf der Suche nach möglichen therapeutischen Angriffspunkten in dieser Signalkaskade – in Form von zielgerichteten Inhibitoren (siehe Abb.3). Es wird vermutet, dass eine Blockade des ERK1/2-Signalweges nicht nur einen anti-proliferativen Effekt, sondern ebenfalls eine hemmende Wirkung auf Angiogenese im Tumorgewebe und die Entstehung von Metastasen haben kann (Kohno & Pouyssegur 2006).

1.6.1 Ras-Inhibitoren

Gegen die Ras-Aktivierung wurde ein sogenannter Farnesyltransferaseinhibitor (FTI) entwickelt (Sebolt-Leopold & Herrera 2004). Dieser verhindert, dass eine Isoprenoid-Gruppe an das Ras-Protein angehängt wird, wodurch sich dieses nicht mehr an die Zellmembran anheften kann. Somit bleibt es im inaktiven Zustand. Obwohl der FTI in Mausversuchen großes Potential zeigte, blieben klinische Erfolge aus. Die Ursachen dafür sind bisher noch weitestgehend ungeklärt (Downward 2003).

1.6.2 Raf-Inhibitoren

Als Raf-Inhibitoren wurden mehrere Antikörper entwickelt, wobei v.a. das BAY43-9006 (Sorafenib, Handelsname Nexavar®) seit 2000 in klinischen Studien eingesetzt wird. Bay43-9006 ist ein Multikinaseinhibitor, der gegen die Kinasen B-Raf und Raf-1, aber auch gegen andere Kinasen wirkt, z.B. gegen den VEGF-Rezeptor (*Vascular endothelial growth factor*) (Adnane, Trail et al. 2006). Dadurch besitzt dieses Medikament zwei Wirkmechanismen: Zum einen verhindert es Zellproliferation und Zellüberleben, zum anderen vermindert es die Entstehung von Versorgungsgefäßen im Tumor. Sorafenib wird erfolgreich bei fortgeschrittenem Nieren- und Leberkrebs und seit 2013 auch bei Schilddrüsentumoren eingesetzt (Mattina, Carlisle et al. 2017)

1.6.3 MEK-Inhibitoren

PD98059 und U0126 waren die ersten spezifischen MEK-Inhibitoren. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass sie die Proliferation von Tumorzellen in Nierenkarzinomen und Fibrosarkomen komplett unterdrücken können (Kohno & Pouyssegur 2006). Es wird vermutet, dass diese zwei Inhibitoren die Phosphorylierung von MEK1/2 nicht aktiv hemmen, sondern eine Konformationsänderung auslösen. Dadurch können MEK1/2 nicht mehr von übergeschalteten Kinasen phosphoryliert und somit aktiviert werden (English &

Cobb 2002). PD184352, ein weiterentwickelter MEK-Inhibitor, erreichte sogar die Phase II klinischer Studien. Es konnte zwar in Tumorgewebe gezeigt werden, dass PD184352 die Phosphorylierung von ERK1/2 deutlich vermindert, Phase-II-Studien blieben jedoch weitestgehend erfolglos (Rinehart, Adjei et al. 2004). Neuere MEK-Inhibitoren, z.B. GSK 1120212 (Trametinib) werden in Kombination mit EGFR-Inhibitoren erfolgreich bei der Behandlung von Adenokarzinomen der Lunge eingesetzt (Martinelli, Morgillo et al. 2017).

1.6.4 EGFR-Inhibitoren

Eine andere Art von Antikörpertherapie stellt das Medikament Cetuximab (Handelsname Erbitux®) dar. Dies ist ein monoklonaler Antikörper, der an den extrazellulären Anteil des membranständigen EGF-Rezeptors bindet und somit dessen Aktivierung durch extrazelluläre Stimuli blockiert. Cetuximab wurde 2004 als erster EGFR-Antikörper in Deutschland zugelassen und zeigt gute Erfolge in klinischen Studien (Karapetis, Khambata-Ford et al. 2008). Heute wird das Medikament standardmäßig zur Therapie von metastasierenden kolorektalen Karzinomen eingesetzt. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass es eine eingeschränkte Nutzung dieses Medikamentes gibt. Cetuximab ist nur wirksam und auch zugelassen, wenn der Tumor keine aktivierende K-Ras-Mutation besitzt (Allegra, Jessup et al. 2009, Van Cutsem, Kohne et al. 2011). Dies ist damit zu erklären, dass das K-Ras dem EGF-Rezeptor nachgeschaltet ist und somit eine Hemmung des Rezeptors keine oder nur wenig Wirkung auf den nachfolgenden Signalweg haben kann. Ähnlich wie K-Ras-Mutationen führen auch B-Raf-Mutationen zu einem Therapieversagen.

Obwohl mehrere Studien zeigen konnten, dass eine Behandlung mit Cetuximab bei Patienten mit einem K-Ras-Wildtyp eine signifikante Steigerung der Lebenserwartung bewirkt, gibt es dennoch eine erhebliche Zahl dieser K-Ras- und B-Raf-negativen Patienten, die nicht auf die Therapie ansprechen (Karapetis, Khambata-Ford et al. 2008).

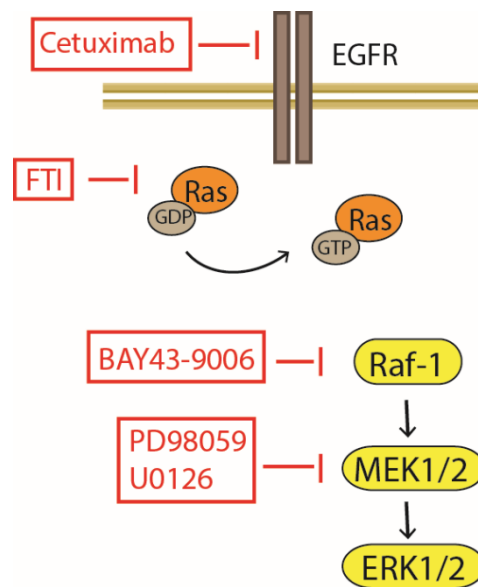


Abb. 3: Schematische Darstellung der Wirkung der Inhibitoren auf den MAPK-Signalweg

EGFR = *Epidermal growth factor receptor*, Ras = *Rat sarcoma*, GDP/GTP = Guanosindiphosphat, Raf-1 = *Rat fibrosarcoma-1*, MEK1/2 = *Mitogen-activated protein kinase kinases 1/2*, ERK1/2 = *Extrazellulär-signalregulierte Kinasen 1/2*, FTI = Farnesyltransferaseinhibitor, BAY43-9006 = Raf-Inhibitor, PD98059 = MEK-Inhibitor, U0126 = MEK-Inhibitor.

1.7 Ziele der Dissertation

In diesem Projekt soll die Rolle der 2009 von Lorenz et al. neu entdeckten Phosphorylierungsstelle an Threonin188 in der Tumorzellproliferation erarbeitet werden. Des Weiteren soll untersucht werden, ob ein kleines Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷-Peptid, das 2013 in der Arbeitsgruppe entwickelt wurde und das die ERK1/2-Dimerisierung hemmt (unpubliziert), verwendet werden kann, um das Dimer-*Interface* als Zielstruktur für die Proliferationshemmung von Tumorzellen zu evaluieren.

Lorenz et al. konnten 2009 zeigen, dass die ERK^{Thr188}-Phosphorylierung eine wichtige Funktion für die Lokalisation von ERK2 im Zellkern hat. Hier aktiviert

ERK2 nukleäre Zielproteine, die u.a. eine gesteigerte Proteinsynthese in Kardiomyozyten auslösen können (Lorenz, Schmitt et al. 2009). Voraussetzung für die ERK^{Thr188}-Phosphorylierung ist die Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1/2 am TEY-Motiv, eine Homo- oder Heterodimerisierung von ERK1 und ERK2 und die Bindung einer G β γ -Untereinheit eines aktivierten G-Proteins (siehe 1.4.2).

In bisher unveröffentlichten Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷-Experimenten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ direkt an ERK2 bindet, eine Dimerisierung somit hemmen und eine Lokalisation von ERK2 im Zellkern verhindern kann.

Aufgrund dieser Ergebnisse soll im Rahmen dieses Projekts die mögliche proliferationshemmende Wirkung des Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ auf verschiedene Tumorzelllinien (Caco-2, SCC68, PC/1-1 und PC/13-1) untersucht werden. Mit Hilfe verschiedener Experimente soll herausgefunden werden, ob das Peptid Einfluss auf die nukleäre Wirkung von ERK2 hat und die Proliferation der genannten Tumorzellen verringern kann. Des Weiteren soll diese Peptidwirkung auch mit der Wirkung der MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 und dem EGFR-Antikörper Cetuximab verglichen werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Sigma
Acrylamid-/Bisacrylamidlösung 30%/0,8% (m/v)	Roth
Albumin (Fraktion V)	AppliChem
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	MERCK
Benzamidin	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem
Bromphenolblau	AppliChem
p-Cumarsäure	Roth
Diamidinphenylindol (DAPI)	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	AppliChem
Ethanol	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem
Fluoromount G	Biozol
Glycerin	Apotheke
Glycin	AppliChem
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	MERCK
Luminol	Alexis
Magermilchpulver	AppliChem
β -Mercaptoethanol	MERCK
Methanol	Apotheke
Natriumazid (NaN_3)	MERCK
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem
Natriumfluorid (NaF)	MERCK

Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem
Natriumpyrophosphat (Na ₄ P ₂ O ₇)	Sigma-Aldrich
Nonidet P-40	AppliChem
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem
PeqGOLD Protein-Marker	Peqlab
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	PAN Biotech
Polylysin	Sigma
<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)	AppliChem
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem
[³ H]-Thymidin (250μCi)	PerkinElmer
Trichloressigsäure (TCA)	AppliChem
Trinatriumtetraoxovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma
Triton X-100	AppliChem
Tromethamin (Tris)	AppliChem
Tween 20	AppliChem
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	AppliChem

2.2 Zellkulturmedien

Bezeichnung	Hersteller
<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i> (DMEM, 1g Glucose)	PAN Biotech
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (DPBS)	Sigma
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech
L-Glutamin (200mM)	PAN Biotech
Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml, 10mg/ml)	PAN Biotech
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI)	Gibco
Trypsin-EDTA	PAN Biotech

2.3 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
EBA 12R Zentrifuge	Hettich
Flüssigszintillationszähler (<i>β-Coulter</i>) LS1801	Beckman
SPECTRAmax PLUS	Molecular Devices
TCS SP5 Konfokal-Mikroskop	Leica

2.4 Software

Bezeichnung	Hersteller
Illustrator (Version CS6)	Adobe
Leica LAS AF software	Leica
Photoshop (Version CS6)	Adobe
Prism (Version 6.0.1.)	GraphPad
SoftMax Pro	Molecular Devices

2.5 Eukaryotische Zellen

Caco-2 = Zellen eines Adenokarzinoms des Darms

PC/1-1 = Zellen eines Plattenepithelkarzinoms der Glottis (Stimmklappenapparat)

PC/13-1 = Zellen eines Plattenepithelkarzinoms der Mundschleimhaut

SCC68 = Zellen eines Plattenepithelkarzinoms der Zunge

Die Plattenepithelkarzinomzelllinien wurden freundlicherweise von Dr. Stefan Hartmann von der Zahnklinik Würzburg zur Verfügung gestellt. Sie wurden im

kryokonservierten Zustand geliefert und für die Versuche aufgetaut und kultiviert (Heo, Snyderman et al. 1989).

Alle Zelllinien sind K-Ras-negativ.

2.6 Adenoviren

LacZ-exprimierendes Adenovirus

Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷-Peptid-exprimierendes Adenovirus

YFP-markiertes ERK2 T188T Adenovirus

2.7 Primärantikörper

Bezeichnung	Art	Verdünnung	Hersteller	Katalognr.
Anti-c-Myc	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz	sc-789
Anti-ERK2	Kaninchen	1:2000-1:6000	Santa Cruz	sc-153
Anti-pERK1/2 (TEY)	Kaninchen	1:1000-1:4000	Cell Signaling	#9101

Der c-Myc-Antikörper wurde in Blockmilch, alle ERK-Antikörper in BSA-Puffer angesetzt (siehe 3.5).

2.8 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller	Katalognr.
Kaninchen IgG	1:1000-1:10000	Dianova	11035144
Maus IgG	1:10000	Dianova	115035003

Alle Zweitantikörper wurden in BSA verdünnt (siehe 3.5) und mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt.

2.9 MAPK-Inhibitoren/-Antikörper

Bezeichnung	Wirkung	Hersteller	Katalognr.
Cetuximab	EGFR-Antikörper	Klinikapotheke	
PD98059	MEK-Inhibitor	Calbiochem	#513000
U0126	MEK-Inhibitor	Calbiochem	#662005

2.10 Kits

Bezeichnung	Hersteller
<i>BCA Protein Assay Kit</i>	Pierce
<i>ECL Plus Western Blotting Substrate</i>	Pierce
<i>Irgasafe Plus liquid scintillation cocktail</i>	PerkinElmer

3 Methoden

3.1 Kultur von eukaryotischen Zellen

3.1.1 Kryokonservierung von Zellen

Die aus humanen Geweben gewonnenen Tumorzellen wurden nach Erhalt in einem Einfriermedium kryokonserviert, um sie für längere Zeit bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufzubewahren. Das Einfriermedium enthält sogenannte Kryoprotektiva, wie z.B. DMSO oder Glycerin, die verhindern, dass die Zellen Gefrierschäden erleiden (Schmitz 2011).

Zum Einfrieren wurden die Zellen vorsichtig trypsiniert, in etwas Medium resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wurde zentrifugiert (830rpm, RT, 3min), der entstandene Überstand abgesaugt und das Zellpellett in 3ml Einfriermedium resuspendiert. Je 1ml der Zell-Einfriermedium-Suspension wurde in ein Kryoröhrchen pipettiert, bei -20°C zwei Stunden gekühlt und über Nacht bei -80°C gelagert. Danach wurde das Kryoröhrchen in einem Stickstofftank bei -196°C aufbewahrt.

Einfriermedium

Medium	70% (v/v)
DMSO	10% (v/v)
FCS	20% (v/v)

3.1.2 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde das kalte Kryoröhrchen unter laufendem, warmem Wasser zügig erwärmt und in ein mediumgefülltes Zentrifugenröhrchen überführt. Da das im Einfriermedium enthaltene DMSO nicht nur eine kryoprotektive Wirkung hat, sondern bei Raumtemperatur auch ein Zellgift darstellt, muss hier schnell gearbeitet und das DMSO von den Zellen entfernt

werden (Schmitz 2011). Hierfür wurde die Zell-Medium-Suspension zentrifugiert (830rpm, RT, 3min) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellett wurde in frischem Medium resuspendiert und auf eine kleine Zellkulturschale überführt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel und nach zwei bis drei Tagen konnten die Zellen je nach Zelldichte auf eine große Zellkulturschale übertragen werden.

3.1.3 Kultur von Zellen

Die Adenokarzinomzellen des Darms (Caco-2) wurden bei 37°C und 7% CO₂ in RPMI-Medium kultiviert, die Plattenepithelkarzinomzellen (SCC68, PC/1-1, PC/13-1) bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM-Medium. Beiden Zellkulturmedien wurden vor Verwendung 10% (v/v) FCS, Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin zugesetzt.

Je nach Dichte wurden die Zellen nach zwei bis drei Tagen im Verhältnis 1:3 bzw. 1:4 passagiert. Hierfür wurde das Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt, mit DPBS gespült und die Zellen mit einem Trypsin/EDTA-Gemisch von der Zellkulturschale gelöst. Nach einer kurzen Einwirkzeit wurden die Zellen in etwas frischem Medium resuspendiert und in eine neue Schale überführt.

Die Behandlung der Zellen erfolgte unter der Sterilbank.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl und Aussäen von Zellsuspensionen

Um möglichst identische Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurden die Zellen vor dem Aussäen ausgezählt und später gleichmäßig in die einzelnen Zellkulturschalen verteilt. Das Auszählen erfolgte mit Hilfe einer sogenannten Neubauer-Zählkammer. Diese Kammer besteht aus einer 5mm dicken Glasplatte mit eingraviertem Zählgitter und einem dünnen Deckgläschen. Durch Aufbringen des Deckglases in 0,1mm Abstand zu der Glasplatte wird ein definierter Raum abgegrenzt, der die eigentliche Zählkammer bildet.

Nach dem Ablösen der Zellen mit Hilfe des Trypsin-/EDTA-Gemisches (siehe 3.1.3), wurden 10ml frisches Medium hinzugegeben, mehrmals resuspendiert

und die entstandene Zell-Medium-Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Mit Hilfe einer Pasteurpipette ließ sich diese Suspension durch Kapillarkräfte in die Neubauer-Zählkammer einbringen. Unter dem Lichtmikroskop wurden 16 Quadrate 4-mal ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Über den Mittelwert ließ sich mit folgenden Formeln die Zellzahl der Suspension berechnen:

Mittelwert $\times 10^4$ = Anzahl der Zellen/ml

Anzahl der Zellen/ml \times Volumen der Zellsuspension = Gesamtzellzahl

Nun konnten die Zellen mit Hilfe einer Multipipette gleichmäßig auf die mit Polylysin beschichteten Zellkulturschalen ausgesät werden.

Es werden folgende Zelldichten ausgesät:

Dot Blot: 6-Well-Platten, 60.000 Zellen/Well

Immunfluoreszenzfärbung: 12-Well-Platten, 30.000-80.000 Zellen/Well

[³H]-Thymidineinbau: 24-Well-Platten, 15.000 Zellen/Well

Westernblot: 12-Well-Platten, 30.000 Zellen/Well

3.2 Transduktion von Zellen mit Adenoviren

Mit Hilfe von Adenoviren ist es möglich, Fremd-DNS in eukaryotische Zellen zu übertragen. Dieses Verfahren wird Transduktion genannt.

Sechs Stunden nach Aussäen der Zellen in die Zellkulturschalen wurden die Gene für die gewünschten Proteine mittels Transduktion in die Zellen eingebracht.

3.3 Herstellung der Lysate

40 Stunden nach Transduktion wurden die Lysate für die weiteren Versuche hergestellt.

3.3.1 Westernblot

Zur Herstellung der Lysate für den *Westernblot* wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und Lysispuffer (150µl pro 12-Well) mit Zusatz von Phosphatase- und Proteaseinhibitoren dazugegeben. Des Weiteren wurde 4x Laemmli hinzugefügt (Laemmli 1970). Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Lysate in Reaktionsgefäße überführt, sonifiziert (Bandelin SonoPlus HD2000, 3 Ultraschallstöße bei Cycle 30%) und entweder direkt aufgetragen oder eingefroren.

Lysispuffer

2x TSE-Puffer pH 7,4	50% (v/v)
10x IBX	10% (v/v)
Triton X-100	1% (v/v)

2x TSE-Puffer pH 7,4

Tris-HCl pH 7,4	100mM
NaCl	600mM
EDTA	10mM
NaN ₃	3mM

10x IBX (Phosphataseinhibitormix)

NaF	500mM
Na ₄ P ₂ O ₇	50mM
Na ₃ VO ₄	1mM
NaN ₃	3mM

4x Laemmli

1M Tris-HCl pH 8,6	200mM
SDS	277mM
Glycerin	40% (v/v)
Bromphenolblau	0,75mM
β-Mercaptoethanol	2,85M

100x PMSF

PMSF in 99% Ethanol	100mM
------------------------	-------

100x Proteaseinhibitor

Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	0,1% (m/v)
Benzamidin	25mM
Tris-HCl pH 7,4	50mM

3.3.2 Dot Blot

Zur Herstellung der Lysate für den *Dot Blot* wurden 50µl Waschpuffer mit Zusatz von Phosphatase- und Proteaseinhibitoren pro 6-Well verwendet. Ab diesem Zeitpunkt waren die Proben auf Eis zu lagern. Nach 10-minütigem Schütteln bei 4°C wurden die Zellen vorsichtig mit Hilfe eines Zellschabers und einer Pipette in Reaktionsgefäße überführt, sonifiziert (siehe 3.3.1) und zentrifugiert (14000rpm, 4°C, 10min). Die Überstände wurden in neue Gefäße pipettiert und mit Hilfe einer Proteinbestimmung auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt (siehe 3.7). Nun konnten die Lysate entweder direkt aufgetragen oder eingefroren werden.

Waschpuffer

10x IBX in DPBS	10% (v/v)
--------------------	-----------

3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung und Charakterisierung von Proteinen nach ihrer molekularen Größe mit Hilfe eines angelegten elektrischen Feldes (Jensen 1965). Das im Ladepuffer, Gel und Laufpuffer enthaltene SDS (*Sodium dodecyl sulfate*) ist ein anionisches Detergens, das die Proteine denaturiert und deren Eigenladung überdeckt (Laemmli 1970, Rehm & Letzel 2009). Hierbei binden ca. 1,4g SDS an 1g Protein. Somit sind alle Proteine

negativ geladen und wandern bei einer angelegten Spannung Richtung Anode. Das Gel wirkt dabei wie eine Art Sieb: Kleine Proteine wandern relativ leicht und schnell durch das Gel, große Proteine sind zu sperrig und laufen nur sehr langsam. Zur Erkennung der jeweiligen Banden verwendet man zusätzlich einen Proteinmarker mit genau definierten Größen. Das Gel ist ein sogenanntes Laemmli-Gel oder auch Tris-Glycin-Gel und besteht aus zwei unterschiedlichen Schichten (Laemmli 1970). Die untere Schicht wird als Trenngel bezeichnet und dient der Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe. Die schmale obere Schicht bildet das Sammelgel, das die Proteine so lange in den Geltaschen fixiert bis eine Spannung angelegt wird.

Bei einer Spannung von 230V liefen die Gele ca. eine Stunde.

Ansatz für sechs kleine 12,5%ige Gele:

Trenngel

H ₂ O	10ml
4x Trenngelpuffer	7,5ml
Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8% (m/v)	12,5ml
TEMED	15µl
APS 10% (m/v)	195µl

Sammelgel

H ₂ O	7,5ml
4x Sammelgelpuffer	3ml
Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8% (m/v)	1,5ml
TEMED	12µl
APS 10% (m/v)	120µl

4x Trenngelpuffer

Tris-HCl pH 8,8	1,5M
SDS	0,4% (m/v)

4x Sammelgelpuffer

Tris-HCl pH 6,8	500mM
SDS	0,4% (m/v)

10x SDS-Gelelektrophoresepuffer

Tris-HCl	250mM
Glycin	1,92M
SDS	1% (m/v)

3.5 Westernblot

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine mit Hilfe des *Westernblot*-Verfahrens elektrophoretisch auf proteinbindende Polyvinylidenfluorid-Membranen (PVDF) übertragen und dort immobilisiert (Towbin, Staehelin et al. 1979, Burnette 2011). Dafür wurden zwei in Transferpuffer befeuchtete Filterpapiere, die in Methanol aktivierte Membran, das proteintragende Gel und erneut zwei Lagen feuchtes Filterpapier geschichtet und in eine Blotkammer eingespannt.

Es wurde für eine Stunde eine Spannung von 100V angelegt.

Transferpuffer

Tris-HCl	20mM
Glycin	150mM
Methanol	20% (v/v)

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für ein bis zwei Stunden mit Blockmilch inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen (Hauri & Bucher 1986). Nach dem Blocken wurde die Membran mehrmals kurz mit einem BSA- oder einem PBS+Tween-Puffer gewaschen.

Um die fixierten Proteine später sichtbar machen zu können, wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit einem Primärantikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist spezifisch gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet. Er ist entweder in BSA- oder Blockmilch verdünnt (siehe 2.7) und wird bis zu 5-mal wiederverwendet.

Um nichtgebundene Antikörper zu entfernen, wurde der Primärantikörper abgenommen und die Membran 3-mal 10 Minuten mit BSA- oder PBS+Tween-Puffer gewaschen.

Danach wurde die Membran ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur mit einem in BSA verdünnten Sekundärantikörper inkubiert. Dieser bindet an den antigengebundenen Primärantikörper und ist an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt. Mit Hilfe dieses Enzyms kann man die Proteine später detektieren.

Nach erneutem 3-maligem Waschen mit BSA oder PBS wurde die Membran mit einer luminolhaltigen Lösung entwickelt. Dafür mischte man die vorgegebenen Ansätze A und B in der Dunkelkammer zusammen und inkubierte die Membran für ca. 30 Sekunden. Durch die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase wurde eine Fluoreszenzreaktion zwischen Luminol und Wasserstoffperoxid katalysiert (Ogata, Arakawa et al. 1983). Die fluoreszierenden Proteine konnten daraufhin auf einem Röntgenfilm festgehalten werden.

Falls die Signale zu schwach waren, konnte man anstatt einer luminolhaltigen Lösung auch ein *ECL Plus Western Blotting Substrate Kit* verwenden. Die Lösungen wurden analog zur Herstellerinformation hergestellt.

Blockmilch

NaCl	100mM
Magermilchpulver	5% (m/v)
Tris-HCl pH 7,4	10mM
Tween20	0,1% (v/v)

BSA-Puffer

NaCl	150mM
Tris-HCl pH 7,4	50mM
Nonidet P40 (NP40)	0,2% (v/v)
Albumin Fraktion V (BSA)	0,25% (m/v)

1x PBS+Tween-Puffer

NaCl	137mM
KCl	2,7mM
KH ₂ PO ₄	1,5mM
Na ₂ HPO ₄	10,1mM
Tween 20	0,1% (v/v)

Luminol

Lösung A:	Tris-HCl 100mM pH 8,3	12,5ml
	p-Cumarsäure 90mM (gelöst in DMSO)	55µl

Lösung B:	Luminol 250mM (gelöst in DMSO)	125µl
	Tris-HCl 100mM pH 8,3	12,5ml
	H ₂ O ₂ 30% (v/v)	7,5µl

3.6 Ablösen gebundener Antikörper von Membranen (*Stripping*)

Um schon entwickelte Membranen mit einem neuen Antikörper inkubieren zu können, kann der hybridisierte Primärantikörper mit Hilfe eines sauren, SDS-haltigen Puffers (*Stripping*-Puffer) entfernt werden (Jansohn & Rothhämel 2011). Dafür wurde die getrocknete Membran eine Minute lang in Methanol aktiviert und dann zwei Stunden bei Raumtemperatur mit *Stripping*-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3-mal kurz mit Wasser gewaschen und dann erneut ein bis zwei Stunden mit Blockmilch geblockt. Das weitere Vorgehen war analog zu dem *Westernblot*-Verfahren (siehe 3.5).

Stripping-Puffer

Glycin pH 2,5	100mM
SDS	0,1% (m/v)

3.7 Proteinbestimmung mittels *BCA*-Assay

Um die gewonnenen Zelllysate auf die gleiche Proteinkonzentration einstellen zu können, wurde deren Proteingehalt mit Hilfe eines *BCA Protein Assay Kits* bestimmt. Hierbei kommt es zu einer Komplexbildung der Bicinchoninsäure (BCA) mit Kupferionen und dem Protein, wodurch eine violette Färbung entsteht, die photometrisch zur Proteinbestimmung genutzt werden kann (Smith, Krohn et al. 1985, Rehm & Letzel 2009).

Hierfür wurden auf einer transparenten 96-Well-Platte Triplets aus Albuminstandards in absteigender Konzentration (1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 62,5, 31,25µg/ml) und ein Triplett aus Wasser als Kontrollprobe

aufgetragen. Danach wurden die Zelllysatripletts pipettiert und zu jedem *Well* das BCA-Reagenz hinzugegeben. Dieses Reagenz besteht aus einer Lösung A und einer Lösung B, die analog den Herstellerangaben in einem Verhältnis 50:1 frisch zusammengemischt wurden. Anschließend wurde die Multiwellplatte bei 37°C inkubiert und nach 30 Minuten in einem SPECTRAMax PLUS Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 562nm ausgelesen.

Mit Hilfe der erhaltenen Proteinkonzentration der einzelnen Lysate konnten die Proben nun einheitlich eingestellt werden. Als Einstellungspuffer wurde DPBS verwendet.

3.8 Dot Blot (Tüpfelblot)

Bei der *Dot Blot*-Methode werden die Proteine nicht mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt und über *Westernblot* auf proteintragende Membranen übertragen, sondern direkt punktförmig auf die Membran getropft. Diese Methode dient nur als Proteinnachweis und gibt keine Auskunft über die Größe der einzelnen Proteine (Hawkes, Niday et al. 1982).

Hierfür wurden die Lysate wie unter 3.3.2 beschrieben hergestellt und direkt punktförmig auf die in Methanol aktivierte Membran übertragen. Nachdem der Lysattropfen eingezogen war, wurden unspezifische Bindungsstellen ein bis zwei Stunden mit Blockmilch (siehe 3.5) entfernt und der Primärantikörper (Anti-c-Myc, 1:1000, Santa Cruz sc-789) über Nacht bei 4°C inkubiert. Das weitere Vorgehen war analog zum *Westernblot*-Verfahren (siehe 3.5).

3.9 [³H]-Thymidineinbau

Um die Proliferation der Tumorzellen zu bestimmen, wurde ein [³H]-Thymidineinbauversuch durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen auf polylysinbeschichteten 24-*Well*-Platten ausgesät und sechs Stunden später mit

den entsprechenden Adenoviren transduziert. Ungefähr 40 Stunden nach der Transduktion wurde das virushaltige Medium abgesaugt und frisches Medium, das vorher mit Tritium ($[^3\text{H}]$, $1\mu\text{Ci/l}$) versetzt wurde, hinzugegeben. Dieses radioaktiv markierte Nukleosid wurde nun bei jeder Zellteilung in die neu generierte Zell-DNS eingebaut und diente somit als Marker für das Ausmaß der Proliferation unter verschiedenen Bedingungen. Nach 4-stündiger Einbau- und Vermehrungsphase wurde das radioaktive Medium abgesaugt, zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 5%igem TCA fixiert. Nach einer Stunde bei 4°C wurde das TCA wieder abgenommen und den Zellen je $400\mu\text{l}$ $0,5\text{M}$ NaOH hinzugegeben. Dieses wurde maximal eine Stunde bei 37°C belassen und führte zum Lösen des Präzipitats von der Zellkulturschale. Die NaOH-Suspension wurde in Szintillationsröhrchen (*SimportTM Scientific*) pipettiert, je $4,5\text{ml}$ Szintillationscocktail (*Irgasafe Plus liquid scintillation cocktail*) hinzugegeben und mit Hilfe eines Flüssigszintillationszählers (β -Counter) vermessen.

3.10 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzexperimente wurden Zellen auf polylysinbeschichtete Deckgläser in 12-Well-Platten ausgesät und nach sechs Stunden mit YFP-markiertem Wildtyp-ERK2 infiziert. Das gelb-fluoreszierende Protein (YFP) kann mit einem Laser angeregt und somit sichtbar gemacht werden. Ungefähr 40 Stunden nach Transduktion wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und $500\mu\text{l}$ frisch hergestelltes 4%iges PFA hinzugegeben. Nach 15-minütiger Fixation der Zellen wurde erneut mit PBS gewaschen und 30 Minuten mit je $300\mu\text{l}$ Diamidinphenylindol (DAPI) (700ng/ml) inkubiert. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an die DNS der Zellen anlagert und somit die Zellkerne fluorogen markiert. Ab diesem Zeitpunkt ist im Dunkeln zu arbeiten. Nach erneutem Waschen mit PBS konnten die Deckgläser nun vorsichtig auf Objektträger mit Fluoromount G versiegelt werden. Die Objektträger sind dunkel und bei 4°C zu lagern.

Zur Analyse der Proben wurde ein TCS SP5 Konfokal-Mikroskop mit einem 63*1.4 Öl-Objektiv (Leica) und das LAS AF-Programm (Leica) verwendet. YFP wurde mit einem Argon-Laser bei der Wellenlänge von 488nm angeregt und zwischen 550 und 620nm gemessen. Zur Anregung von DAPI benötigte man ultraviolettes Licht der Wellenlänge 405nm. Dieses wurde von einem Dioden-Laser erzeugt und das Signal wurde zwischen 430 und 453nm gemessen.

3.11 Statistikanalysen und Programme

Zur Bearbeitung und Erstellung von Abbildungen wurden Photoshop (Adobe) und Illustrator (Adobe) verwendet. Auswertungen und graphische Darstellungen wurden mit Hilfe von Excel (Microsoft) und Prism (GraphPad) erstellt. Die statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen wurde mit Hilfe des *t*-Tests und der *One Way* ANOVA-Methode bestimmt, an die ein Bonferroni-Test angeschlossen wurde. P-Werte <0,05 wurden als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Expression eines Myc-markierten ERK2-Peptids in verschiedenen Krebszelllinien

Seit Längerem ist bekannt, dass die Signalkaskade der extrazellulär-signalregulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2) eine wichtige Rolle in vielen zellulären Prozessen spielt. Gerade nukleäre Zielproteine von ERK1/2 haben wichtige Funktionen in biologischen Prozessen, die für Zellproliferation und Proliferation von Krebszellen entscheidend sind (Sharrocks 2001).

Um zielgerichtet in diese Signalkaskade, speziell in die Dimerisierung von ERK 1 und 2 eingreifen zu können, wurde in der Arbeitsgruppe Lorenz ein Myc-markiertes ERK2-Peptid entwickelt (siehe Abb. 4). Dieses Peptid (Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷) besteht aus der Aminosäuresequenz des Maus-ERK2 (Aminosäuren 309-357) mit einem N-terminalen Myc-tag. Es konnte gezeigt werden, dass Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ an ein aktiviertes ERK2 binden und die Dimerisierung von ERK1/2 hemmen kann (unpubliziert). Die Myc-Sequenz dient dem einfachen und spezifischen Nachweis des Peptids mit einem c-Myc-Antikörper. Das Peptid mit dem Myc-tag besteht aus 59 Aminosäuren und besitzt eine molekulare Masse von 7,1kDa.

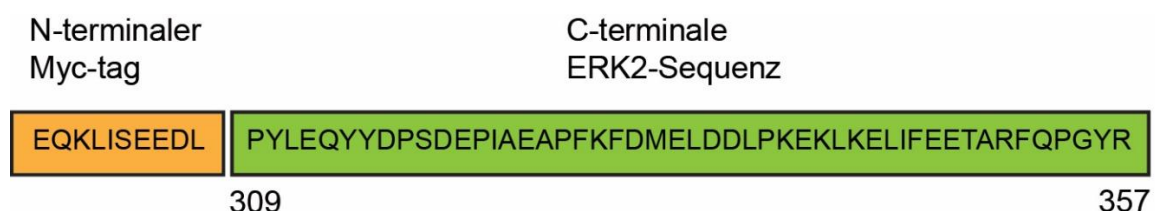


Abb. 4: Aminosäuresequenz des Myc-markierten ERK2-Peptids Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷

Das Peptid besitzt am C-terminalen Ende eine ERK2-Sequenz aus 49 Aminosäuren. N-terminal wurde eine Myc-Sequenz eingefügt. Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ = 7,1kDa.

Da die Detektion von Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ mit Hilfe von Immunoblots nach SDS-Gelelektrophorese aufgrund der geringen Größe des Peptids nicht erfolgreich war, wurde die *Dot Blot*-Methode angewandt, bei der das Zelllysate direkt auf eine PVDF-Membran aufgebracht und anschließend mittels Immunoblot die Myc-Markierung nachgewiesen wird (siehe 3.8). Hierfür wurden die vier Krebszelllinien (Caco-2, SCC68, PC/1-1, PC/13-1) mit Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ transduziert. Als Kontrolle in diesem und allen folgenden Versuchen dienten Zellen, die ebenfalls mit einem Adenovirus transduziert wurden, das jedoch das LacZ-Gen exprimiert. Dieses LacZ-Gen wurde aus dem Lactose-Operon von *E.coli*-Bakterien gewonnen und codiert für die β -Galactosidase. Anschließend wurden die aus diesen Zellen gewonnenen Zelllysate für die Expressionsanalyse verwendet.

Mit dieser Methode konnte eine Expression des Myc-markierten ERK2-Peptids Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ in den einzelnen Zelllinien nicht eindeutig nachgewiesen werden (siehe Abb. 5). Die LacZ-Kontrolle zeigte in allen vier Fällen ebenfalls ein auffälliges Signal, was zum einen auf die Unspezifität des c-Myc-Antikörpers zurückzuführen ist, zum anderen an einer hohen endogenen Myc-Expression in manchen Tumorzelllinien liegen kann (Sipos, Firneisz et al. 2016). Das Peptid ist in allen Zelllinien etwas stärker detektiert als die LacZ-Kontrolle.

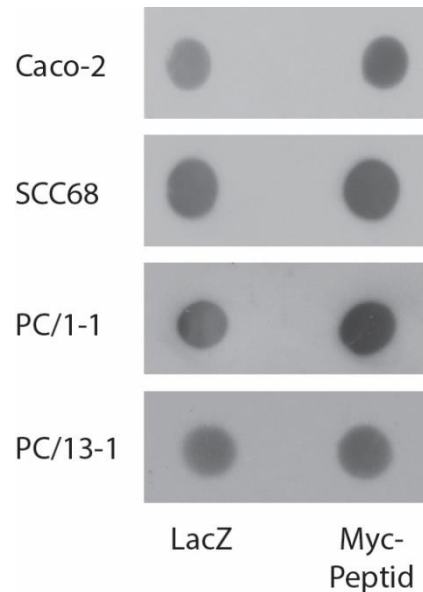


Abb. 5: Expression von Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ in verschiedenen Zelllinien

Dot Blot-Detektion von Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ in den Caco-2-, SCC68-, PC/1-1- und PC/13-1-Zellen nach Transduktion mit Adenoviren, die für das Myc-Peptid oder ein Kontrollgen (LacZ) kodieren. Für die Detektion des Peptids wurde ein anti-c-Myc-Antikörper verwendet. n=1-2 Versuche.

Da die *Dot Blot*-Detektion des Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷-Peptids in den verschiedenen Zelllinien nicht eindeutig war, wurden weitere Versuche unternommen, die Expression des Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ nachzuweisen. Hierfür wurde die RNA des Myc-Peptids in den verschiedenen Zelllinien mittels reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und späterer Gelelektrophorese nachgewiesen. Diese Ergebnisse wurden freundlicherweise von Angela Tomasovic, einer naturwissenschaftlichen Doktorandin der AG Lorenz, zur Verfügung gestellt.

Mit dieser Methode konnte erfolgreich gezeigt werden, dass das Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷-Peptid in allen vier Zelllinien exprimiert wurde. Die LacZ-Kontrolle zeigte keine sichtbaren Banden (siehe Abb. 6 A-D).

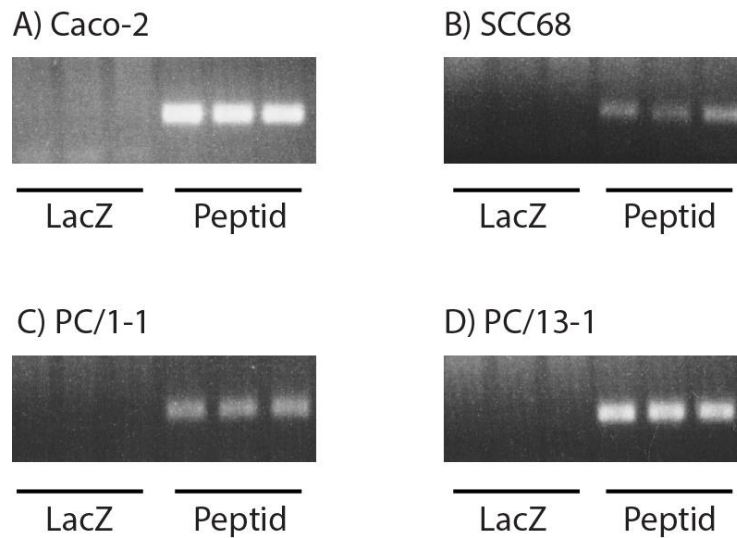


Abb. 6: Myc- ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ wird in den vier Krebszelllinien exprimiert

Agarosegelelektrophorese nach reverse Transkriptase-PCR mit den Zelllinien (A) Caco-2, (B) SCC68, (C) PC/1-1 und (D) PC/13-1. Die Zellen wurden mit Adenoviren, die für das Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (Peptid) oder ein Kontrollgen (LacZ) kodieren, transduziert. Myc-RNA \approx 180 Basenpaare. (Versuch A. Tomasovic)

4.2 Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ hat keinen Einfluss auf die ERK1/2-Phosphorylierung am TEY-Motiv

Um herauszufinden, ob Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ eine mögliche Auswirkung auf die Aktivierbarkeit und Aktivität von ERK1/2 hat, wurde zunächst die Phosphorylierung von ERK1/2 am sogenannten TEY-Motiv in Gegenwart von Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ untersucht. Dazu wurden die verschiedenen Zelllinien (Caco-2, SCC68, PC/1-1 und PC/13-1) mit Adenoviren, die für Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷, das Kontrollvirus (LacZ) oder Wildtyp-ERK2 kodieren, transduziert. Nach Lysatherstellung und Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 (pERK1/2(TEY)) mit Hilfe des *Westernblot*-Verfahrens nachgewiesen.

Das Signal, das mit pERK1/2(TEY)-Antikörpern unter Kontrollbedingungen (LacZ) und nach Expression von Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ detektiert wurde, war vergleichbar (siehe Abb. 7 A-D). Eine Überexpression von ERK2 in diesen Zellen führte jedoch teilweise zu einem stärkeren pERK1/2-Signal.

Dieser Versuch zeigt, dass Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ die Aktivierbarkeit von ERK1/2 durch die vorangeschaltete Kinase MEK nicht zu behindern scheint, da die Phosphorylierung von ERK1/2 am TEY-Motiv unverändert bleibt.

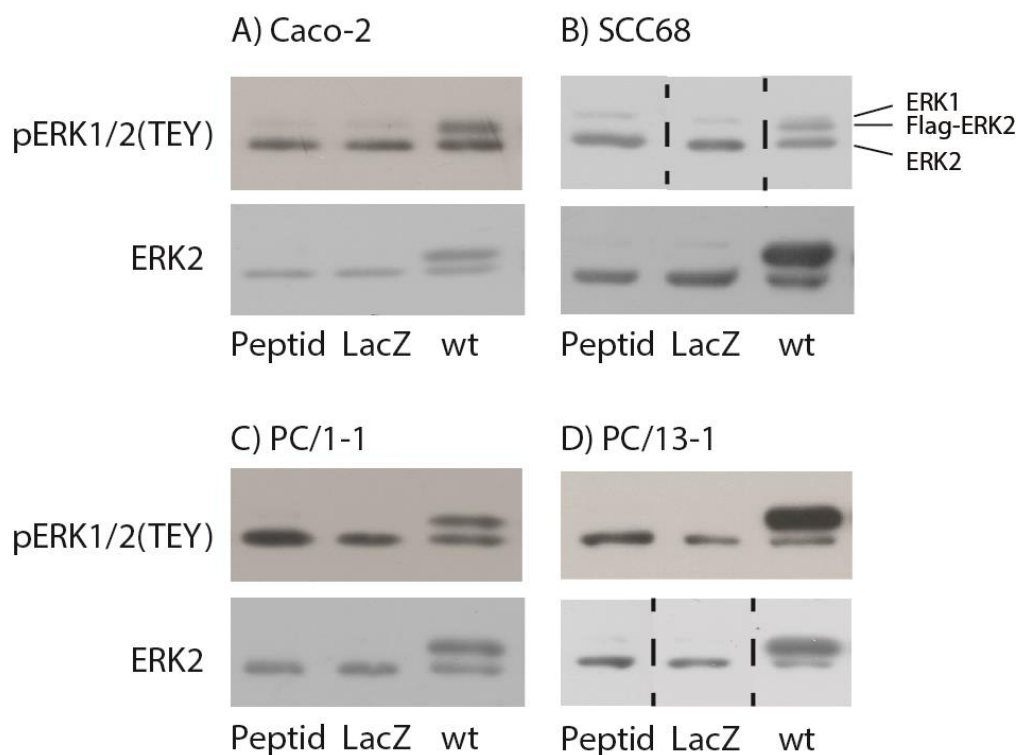


Abb. 7: Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK1/2 am TEY-Motiv (pERK1/2(TEY))

Repräsentativer Immunoblot mit anti-pERK1/2(TEY)-Antikörpern und anti-ERK2-Antikörpern von Zellen (Caco-2, SCC68, PC/1-1, PC/13-1), die mit Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (Peptid), der LacZ-Kontrolle oder Flag-ERK2-Wildtyp transduziert wurden. Gestrichelte Linien bezeichnen Schnittstellen innerhalb eines Blots, in dem für die Fragestellung nicht relevante Banden entweder herausgeschnitten oder in einer anderen Reihenfolge dargestellt wurden. ERK1 = 44kDa, ERK2 = 42kDa. n=1-3 Versuche.

4.3 Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ beeinflusst die Proliferation von Tumorzellen

Lorenz et al. konnten 2009 zeigen, dass eine ERK^{Thr188}-Phosphorylierung langanhaltend ist und zu einer vermehrten nukleären Lokalisation von ERK2 im Zellkern führt (Lorenz, Schmitt et al. 2009). Im Zellkern aktiviert die Kinase weitere Zielproteine, die unter anderem eine vermehrte Zellproliferation auslösen können. Voraussetzung für die Phosphorylierung von ERK2 an Thr188 (bzw. an Thr208 von ERK1) ist die Phosphorylierung von ERK1/2 im TEY-Motiv durch die *Mitogen-activated protein kinase kinases 1/2* (MEK1/2), die die Dimerisierung von ERK-Molekülen initiiert und damit eine Interaktion mit G β γ -Untereinheiten der G-Proteine ermöglicht. Das unter 4.1 beschriebene Peptid zeigte in bisher unveröffentlichten Experimenten, dass es direkt an ERK2 bindet (*Cross-linking-Experiment*, Susanne Homann), die Dimerbildung von ERK2 hemmen (Co-Immunpräzipitation, Susanne Homann) und die Lokalisation von YFP-ERK2 im Zellkern verhindern kann (Konfokalmikroskopie in neonatalen Kardiomyozyten, Angela Tomasovic).

Um zu testen, ob Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ einen funktionellen Einfluss auf nukleäre ERK1/2-Wirkungen hat, wurde der Effekt von Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ auf die Proliferation von den oben bereits beschriebenen Tumorzellen untersucht.

Für die Quantifizierung der Zellteilung wurde der Einbau von radioaktiv markiertem [³H]-Thymidin in die Zellen gemessen. [³H]-Thymidin wird als radioaktiv markiertes Nukleosid bei jeder Zellteilung in die DNS der Zelle eingebaut. Nach einer definierten Inkubationszeit von vier Stunden und mehreren Waschschritten zur Entfernung des überschüssigen [³H]-Thymidins wird das eingebaute Tritium mit Hilfe eines β -Zählers bestimmt. Je mehr eingebautes Tritium nachgewiesen wird, desto stärker war die Zellproliferation.

In allen vier Zelllinien zeigte sich nach Transduktion mit Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ eine signifikante Verminderung der Proliferation im Vergleich zur LacZ-Kontrolle (siehe Abb. 8 A-D). Die Proliferation von Caco-2- und SCC68-Zellen wurde durch

das Peptid um mehr als 60% im Vergleich zur Kontrolle reduziert, bei den PC/1-1- und PC/13-1-Zellen um mehr als 80%.

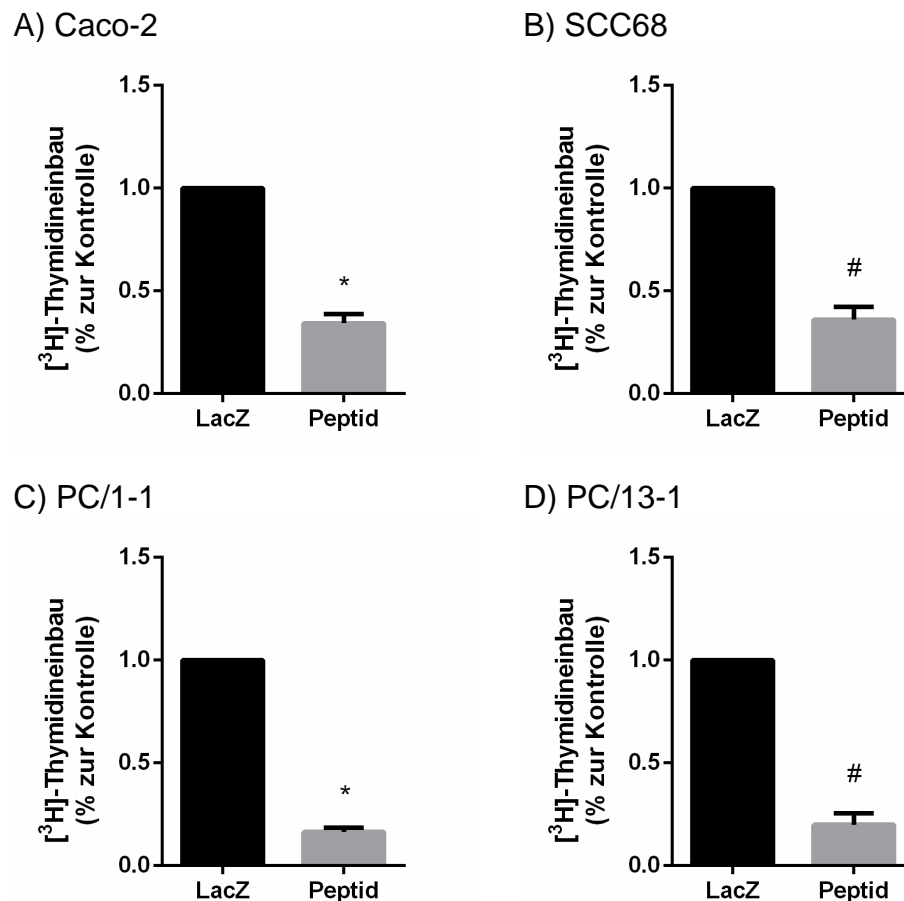


Abb. 8: Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ hemmt die Proliferation von verschiedenen Tumorzelllinien

Analyse der Zellproliferation mittels [³H]-Thymidineinbauversuchen nach Transduktion der Zellen mit Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (Peptid) oder dem Kontrollvirus (LacZ). Es wurden vier verschiedene Zelllinien untersucht: (A) Caco-2, (B) SCC86, (C) PC/1-1, (D) PC/13-1. Die Inkubationszeit betrug vier Stunden. Die Graphen zeigen die Proliferation normiert auf die Proliferation der unbehandelten Kontrollzellen (LacZ). Je n=3 Versuche; *, P<0,0001; #, P<0,0005.

Um sicher zu gehen, dass die Hemmung der Tumorzellproliferation auf der Wirkung des Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ und nicht auf einem toxischen Effekt nach Transduktion mit Adenoviren beruht, wurden in der Arbeitsgruppe Lorenz Konzentrationskurven mit den Plattenepithelkarzinomzellen SCC68 erarbeitet. Diese Ergebnisse wurden freundlicherweise von Angela Tomasovic zur Verfügung gestellt.

Die Konzentrationskurven zeigen anschaulich, dass die LacZ-Kontrolle auch bei einer größeren Menge an Transfektionsmix weitestgehend unverändert bleibt und das Adenovirus somit wirkungslos zu sein scheint (siehe Abb. 9). Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ zeigt bei höheren Dosen einen proportional größeren Effekt auf die Proliferation der SCC68-Zellen.

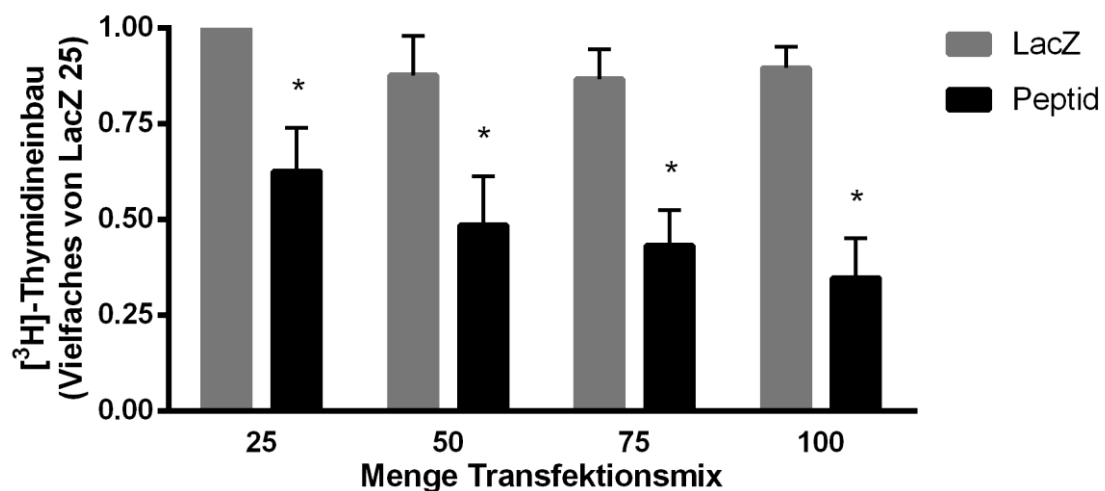


Abb. 9: Transduktion mit Adenoviren hat keinen toxischen Effekt auf die SCC68-Zellen

Konzentrationskurven nach [³H]-Thymidineinbauversuchen mit der SCC68-Zelllinie nach Erhöhung der Menge an Transfektionsmix. Die SCC68-Zellen wurden mit Adenoviren, die für das Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (Peptid) oder ein Kontrollgen (LacZ) kodieren, transduziert. *, P<0,05. (Versuch A. Tomasovic)

4.4 Die MEK-Inhibitoren U0126 und PD98059 vermindern die Proliferation von Tumorzellen

Im Folgenden sollte untersucht werden, wie effektiv eine Hemmung durch die klassischen, gut charakterisierten MEK-Inhibitoren Einfluss auf die Proliferation in diesen vier Tumorzelllinien nimmt (siehe 1.6.3).

Dazu wurden U0126 und PD98059 als Inhibitoren des MAPK-Signalweges verwendet. Sie hemmen die *Mitogen-activated protein kinase kinases 1/2* (MEK1/2) vermutlich nicht aktiv, sondern führen zu einer Konformationsänderung von MEK1/2, wodurch dieses nicht mehr aktiviert werden kann. Damit wird die Phosphorylierung von ERK1/2 an Threonin183 und Tyrosin185 (TEY-Motiv), die Aktivierung von ERK1/2 sowie die Autophosphorylierung an Threonin188 gehemmt (Kohno & Pouyssegur 2006, Ruppert, Deiss et al. 2013).

U0126 und PD98059 wurden zu diesem Zweck ebenfalls im [³H]-Thymidineinbauversuch getestet.

Der MEK-Inhibitor PD98059 zeigte in allen vier Tumorzelllinien unter diesen Bedingungen eine signifikante Hemmung der Zellproliferation, während U0126 keine signifikante Proliferationshemmung bewirkte (siehe Abb. 10 A-D). Im Vergleich zu SCC68- und PC/1-1-Zellen konnte bei den Caco-2- und PC/13-1-Zellen eine leichte Tendenz einer Hemmung durch U0126 beobachtet werden.

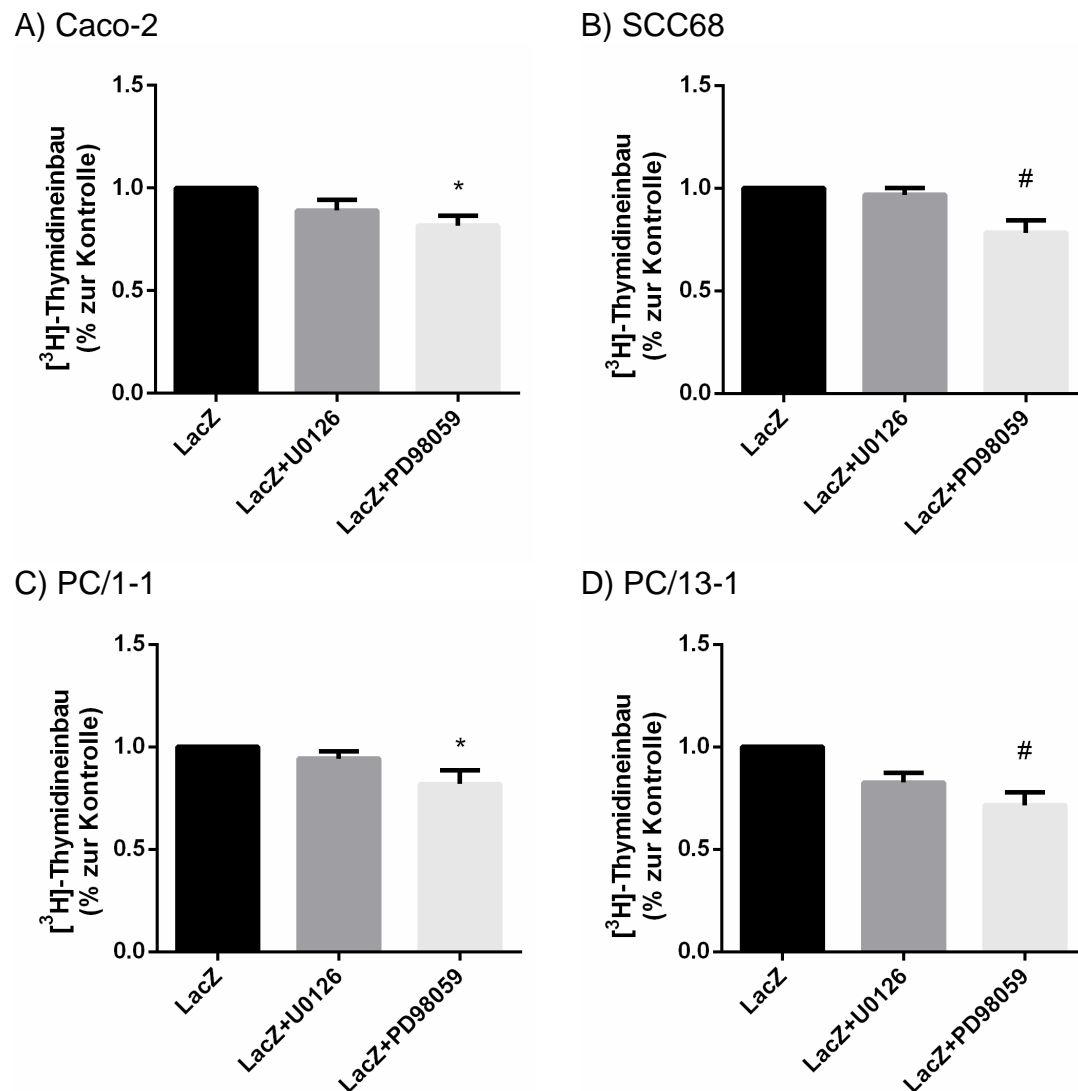


Abb. 10: Effekt von MEK-Inhibitoren auf die Proliferation von Tumorzellen

Analyse der Zellproliferation mittels $[^3\text{H}]\text{-Thymidineinbau}$ versuchen nach Transduktion mit dem Kontrollvirus (LacZ) und Zugabe der MEK-Inhibitoren U0126 oder PD98059. Es wurden die Zelllinien (A) Caco-2, (B) SCC86, (C) PC/1-1 und (D) PC/13-1 untersucht. U0126 und PD98059 wurden in den folgenden Konzentrationen hinzugefügt: U0126 (10 μM) und PD98059 (30 μM). Die Zellen wurden für vier Stunden mit den Inhibitoren und dem Tritium inkubiert. Die Graphen zeigen die Proliferation normiert auf die Proliferation der unbehandelten Kontrollzellen (LacZ). n=5-8 Versuche; *, P<0,03; #, P<0,002.

4.5 Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ hemmt die Proliferation von SCC68-Zellen signifikant besser als die MEK-Inhibitoren U0126 und PD98059 und der Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Cetuximab

Mit den bisherigen Proliferationsversuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ als auch der MEK-Inhibitor PD98059 einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen besitzt. Der MEK-Inhibitor U0126 zeigte nur eine Tendenz einer Hemmung. Wie in der Einleitung erwähnt, gibt es auch die Möglichkeit ERK1/2 durch Hemmung des EGF-Rezeptors zu beeinflussen. Im Folgenden sollte nun auch die Wirkung des EGF-Rezeptor-Antikörpers Cetuximab untersucht und ferner alle proliferationshemmenden Wirkungen miteinander verglichen werden.

Zu diesem Zweck wurden [³H]-Thymidineinbauversuche an den Plattenepithelkarzinomzellen SCC68 durchgeführt. Diese Zellen waren in der Zellkultur leicht zu handhaben und wurden daher für weitere Versuche eingesetzt. Um alle Inhibitoren bzw. Antikörper miteinander vergleichen zu können, wurden 16 Stunden nach Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷- bzw. LacZ-Transduktion U0126, PD98059 und Cetuximab zu den Zellen hinzugegeben. Die Inkubationszeit der Zellen mit den genannten Substanzen betrug ungefähr 28 Stunden.

Die Proliferationsversuche zeigten, dass U0126 und PD98059 die Proliferation der Tumorzellen um ungefähr 40% im Vergleich zur Kontrolle verminderten (siehe Abb. 11). Der EGFR-Antikörper Cetuximab zeigte eine leichte Tendenz einer Hemmung. Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ hingegen hatte einen sehr ausgeprägten Einfluss auf die Proliferation. Die Vermehrung der Tumorzellen konnte mit dem Peptid um annähernd 75% verringert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ die Proliferation der SCC68-Zellen signifikant besser hemmt als U0126, PD98059 und Cetuximab.

Aufgrund der deutlich längeren Inkubationszeit der MEK-Inhibitoren zeigte dieses Experiment eine stärkere Hemmung der Tumorzellproliferation als die vorangegangenen Versuche (siehe Abb. 10).

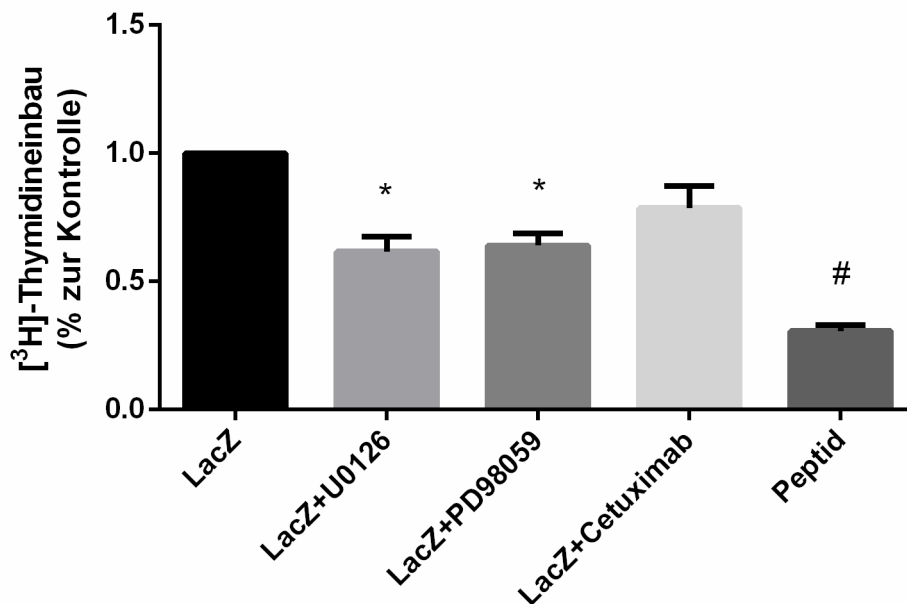


Abb. 11: Vergleich der proliferationshemmenden Wirkung von PD98059, U0126, Cetuximab und Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ in SCC68-Zellen

Analyse der Zellproliferation mittels [³H]-Thymidineinbauversuchen nach Transduktion der SCC68-Zellen mit Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (Peptid) oder dem Kontrollvirus (LacZ) und nach Zugabe der MEK-Inhibitoren U0126 und PD98059 und des Rezeptortyrosinkinaseinhibitors Cetuximab. U0126, PD98059 und Cetuximab wurden in den folgenden Konzentrationen hinzugefügt: U0126 10µM, PD98059 30µM, Cetuximab 50µg/500µl. Die Inkubationszeit betrug ungefähr 28 Stunden. Die Graphen zeigen die Proliferation normiert auf die Proliferation der LacZ-transduzierten Kontrollzellen. n=7 Versuche; *, P<0,0002; #, P<0,0001.

Um nachzuweisen, dass die Zellproliferationshemmung durch die MEK-Inhibitoren mit der ERK1/2-Inhibition korreliert, wurde die MEK-vermittelte

ERK1/2-Phosphorylierung im *Westernblot* mit anti-pERK1/2(TEY)-Antikörpern analysiert. Hierfür wurde U0126 und PD98059 eine Stunde vor Lysatherstellung zu den Zellen hinzugegeben (Alessi, Cuenda et al. 1995). Um die Versuchsdurchführung mit dem Proliferationsexperiment vergleichen zu können (siehe Abb. 11), wurden die SCC68-Zellen ebenfalls mit Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ transduziert. Als Ladekontrolle wurde ein ERK2-Antikörper verwendet.

Das *Westernblot*-Experiment zeigte, dass beide MEK-Inhibitoren die Phosphorylierung von ERK1/2 fast komplett hemmen (siehe Abb. 12). Bei U0126 war die Hemmung noch deutlicher zu sehen als bei PD98059. Die Zellen wurden alle mit dem LacZ-Kontrollvirus transduziert. Das Signal von LacZ- und Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷-transduzierten Zellen war vergleichbar.

Der Kontrollblot mit dem anti-ERK2-Antikörper zeigte eine einheitliche Proteinbeladung der Gele.

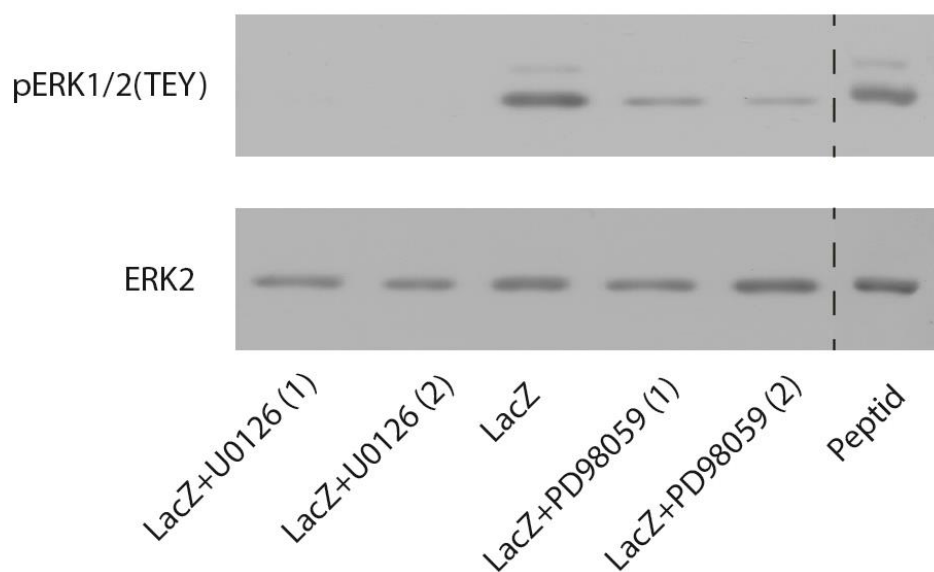


Abb. 12: U0126 und PD98059 hemmen die MEK-vermittelte Phosphorylierung am TEY-Motiv von ERK1/2

Repräsentativer Immunoblot mit anti-pERK1/2(TEY)- und anti-ERK2-Antikörpern von SCC68-Zellen, die mit der LacZ-Kontrolle und Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (Peptid) transduziert wurden. Folgende Konzentrationen von U0126 und PD98059 wurden hinzugefügt:

U0126(1) 5 μ M, U0126(2) 10 μ M, PD98059(1) 10 μ M, PD98059(2) 30 μ M. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde. Gestrichelte Linien bezeichnen Schnittstellen innerhalb eines Blots, in dem für die Fragestellung nicht relevante Banden entweder herausgeschnitten oder in einer anderen Reihenfolge dargestellt wurden. n=2 Versuche.

5 Diskussion

In diesem Projekt sollte die Rolle der 2009 von Lorenz et al. neu entdeckten ERK^{Thr188}-Phosphorylierung von ERK2 bei der Entstehung von Tumoren untersucht werden, um diese Phosphorylierungsstelle gegebenenfalls als therapeutischen Angriffspunkt bei Tumorerkrankungen zu nutzen.

Lorenz et al. konnten 2009 *in vitro* und *in vivo* zeigen, dass diese Phosphorylierungsstelle eine große Bedeutung in der Lokation von ERK2 im Zellkern und der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren bzw. nukleären Zielproteinen hat (Lorenz, Schmitt et al. 2009). Sie stellten fest, dass durch Blockade der ERK^{Thr188}-Phosphorylierung mit Hilfe einer an Threonin188 phosphorylierungsdefizienten ERK2-Mutante (ERK2^{T188A} oder ERK2^{T188S}) nukleäre Zielproteine, die eine wichtige Bedeutung in der Entstehung einer pathologischen Herzhypertrophie haben (u.a. Elk-1), weniger stark aktiviert werden als unter Kontrollbedingungen. Im Gegensatz dazu konnte anhand einer an Threonin188 daueraktivierten ERK2-Mutante (ERK2^{T188D}) gezeigt werden, dass die simulierte ERK^{Thr188}-Phosphorylierung zu einer verstärkten pathologischen Herzhypertrophie führt. Mittels Konfokalmikroskopie mit COS1-Zellen (Zellen aus der Niere eines Affen) konnte außerdem gezeigt werden, dass nach Stimulation nur ERK2^{T188D} vermehrt im Zellkern zu finden war, Wildtyp ERK2 und ERK2^{T188S} blieben unbeeinflusst. Auch Versuche mit histologischen Schnitten von transgenen Mäusen verdeutlichten dieses Ergebnis.

Khokhlatchev et al. generierten 1998 eine monomere ERK2^{Δ4}-Mutante, bei der vier Aminosäuren (174 bis 177) fehlten (Khokhlatchev, Canagarajah et al. 1998). Da diese Aminosäuren eine wichtige Funktion bei der Dimerisierung von ERK1/2 haben, kann diese „Δ4-Mutante“ nicht mehr dimerisieren. Die Arbeitsgruppe Lorenz konnte anhand von Experimenten mit dieser ERK2^{Δ4}-Mutante zeigen, dass eine Überexpression der Mutante eine dominant-negative Wirkung auf die nukleären Funktionen von ERK1/2 hat, d.h. die Aktivierung nukleärer Zielproteine wird verringert, ohne zytosolische Funktionen von ERK, wie z.B. das Zellüberleben, zu beeinflussen. Vor allem nukleäre Zielproteine spielen eine entscheidende Rolle in biologischen Prozessen, die für Zellproliferation und

Proliferation von Krebszellen entscheidend sind. Der durch ERK1/2 aktivierte Transkriptionsfaktor Elk-1 ist z.B. in Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Angiogenese, Entzündungen und Tumorentstehung involviert (Sharrocks 2001). Aufgrund der vielversprechenden Versuchsergebnisse mit der ERK2^{Δ4}-Mutante wurde in der Arbeitsgruppe ein Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷-Peptid entwickelt, um die endogene ERK1/2-Dimerisierung hemmen zu können, ohne dazu eine aktivierbare Kinase überexprimieren zu müssen. In noch nicht veröffentlichten Experimenten der AG Lorenz konnte gezeigt werden, dass Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ in HEK-Ad Zellen (menschliche, embryonale Nierenzellen) direkt an ERK2 binden und die Dimerisierung hemmen kann (Susanne Homann). Mit Hilfe des generierten Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ sollte nun herausgefunden werden, ob die Hemmung der ERK1/2-Dimerisierung auch zu einer Verminderung der Proliferation von Tumorzellen führt.

Im Rahmen dieses Projekts konnten wir mit [³H]-Thymidineinbauversuchen zeigen, dass bei Anwesenheit des Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ die Proliferation der Tumorzellen von vier verschiedenen Zelllinien (Caco-2, SCC68, PC/1-1 und PC/13-1) deutlich verringert werden konnte (siehe Abb. 8 A-D).

Darüber hinaus wurde die proliferationshemmende Wirkung des Peptids mit der Wirkung der MEK-Inhibitoren U0126 und PD98059 und des Rezeptortyrosinkinaseinhibitors Cetuximab auf die Vermehrung der Tumorzellen verglichen. Wir konnten mittels [³H]-Thymidineinbauversuchen an SCC68-Zellen zeigen, dass alle Inhibitoren bzw. Antikörper eine Verminderung der Proliferation der Tumorzellen bewirken, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß (siehe Abb. 11). Eine Behandlung der Zellen mit U0126 und PD98059 konnte die Proliferation um ungefähr 40% verringern. Zellen, denen Cetuximab hinzugefügt wurde, zeigten lediglich eine Tendenz einer Hemmung. Am effektivsten wirkte Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷. Bei Anwesenheit von Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ konnte die Vermehrung der Tumorzellen um bis zu 75% verringert werden. Es zeigte sich also, dass Cetuximab, das ganz oben in dieser Signalkaskade wirkt, weniger Auswirkungen auf die Proliferation der Tumorzellen zu haben scheint als U0126 und PD98059. Die MEK-Inhibitoren zeigten außerdem eine geringere Wirkung auf die Zellvermehrung als Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷, das am Ende des Signalweges steht.

Unsere Hypothese ist, dass je weiter oben man in der Signalkaskade eingreift, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass Ausgleichsmechanismen auftreten. Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ wirkt sehr weit unten im Signalweg und ist daher weitestgehend vor Prozessen, die der Hemmung der Dimerisierung entgegenwirken könnten, geschützt und wirkt somit am effektivsten. Daher lässt sich vermuten, dass noch unbekannte Aktivierungsmechanismen in diesem Raf-MEK-ERK-Signalweg eine gewisse Rolle spielen könnten.

Die [³H]-Thymidineinbauversuche mit Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ deuten darauf hin, dass die Alternativstrategie effektiv in die Proliferation eingreift. Unsere Hypothese ist, dass Threonin188 nicht phosphoryliert wird und ERK2 somit nicht in den Zellkern wandert, um dort eine vermehrte Proliferation auszulösen. Um diese Theorie zu untermauern, bedarf es noch weiterer Experimente.

Zum einen gilt es, die direkte Interaktion von ERK2 mit Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ in den Krebszellen zu beweisen. Hierfür kann die *Cross-linking*-Methode verwendet werden. ERK2 alleine besitzt eine atomare Masse von 42kDa (Casar, Pinto et al. 2009). Nach einer Kopplung mit Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ würde diese 49,1kDa betragen. Diese Massenzunahme könnte man anhand einer Gelelektrophorese mit anschließendem *Westernblot* belegen.

Zum anderen muss noch eindeutig gezeigt werden, dass bei Anwesenheit des Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ keine ERK^{Thr188}-Phosphorylierung stattfindet. Dieser Nachweis erfolgt ebenfalls mit Hilfe der *Westernblot*-Methode. Falls das Peptid durch Hemmung der ERK1/2-Dimerisierung eine ERK^{Thr188}-Phosphorylierung verhindern kann, würde ein Signal auf den anti-phospho-T188-Antikörper ausbleiben.

Außerdem muss gezeigt werden, dass die Wirkung von Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ die Lokalisation von ERK2 im Zellkern verhindert. Hierfür wurden im Rahmen dieses Projekts Immunfluoreszenzversuche für Lokalisationsstudien an verschiedenen Tumorzelllinien durchgeführt. Mittels Konfokalmikroskopie verglichen wir YFP-markierte ERK2(T188T)-Wildtypzellen mit Wildtypzellen, denen Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ hinzugefügt wurde (siehe Abb. 13). Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Ergebnisse der PC/1-1-Zelllinie lassen vermuten, dass das gelb-leuchtende ERK2 bei den Wildtypzellen eher im Zellkern lokalisiert ist als bei den Zellen, die

mit Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ behandelt wurden. Dies betraf jedoch nur einen Teil aller untersuchten Zelllinien und bedarf noch weiterer Experimente mit eventueller Bedingungsanpassung oder Variation der Methode (z.B. unterschiedliche Proliferationsstadien untersuchen, Zellen stimulieren bzw. synchronisieren).

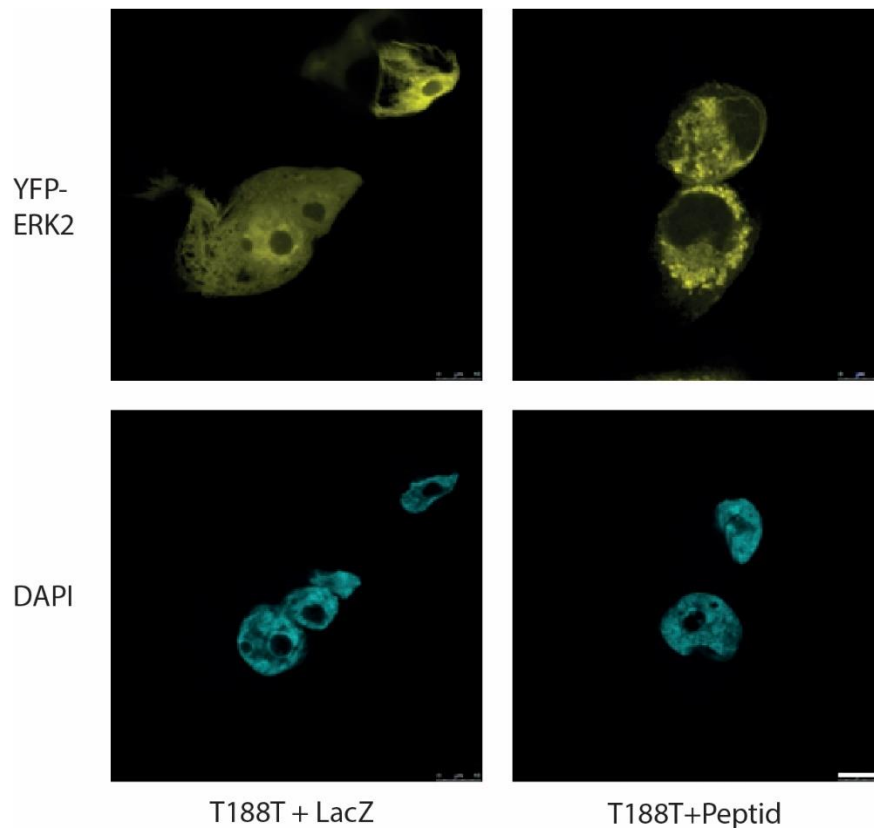


Abb. 13: Wirkung von Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ auf die ERK2-Lokation im Zellkern

Immunfluoreszenzfärbung mit PC/1-1-Zellen nach Transduktion mit ERK2-YFP, Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ (Peptid) oder dem Kontrollvirus (LacZ). Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau). Der Maßstab zeigt 10µm.

Um die Lokalisation von ERK2 im Zellkern weiter zu untersuchen, könnte man u.a. auch die Aktivität von nukleären Zielproteinen von ERK, wie z.B. Elk-1 oder Myc, mit Hilfe des *Westernblot*-Verfahrens nachweisen. Falls unsere Theorie stimmt, sollte bei Anwesenheit von Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ das Antikörpersignal auf das

phosphorylierte und somit aktivierte Zielprotein schwächer ausfallen als bei der Kontrolle.

Des Weiteren könnte in diesem Zusammenhang auch untersucht werden, ob die zytosolischen ERK-Funktionen, wie z.B. der anti-apoptotische Effekt, bei Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷-Wirkung unbeeinflusst bleiben. Hierfür könnten *Westernblots* mit Antikörpern gegen phospho-BIM oder phospho-p90RSK durchgeführt werden. BIM (*B-cell lymphoma 2-interacting mediator of cell death*), ein pro-apoptotisches Protein, wird von aktiviertem ERK1/2 direkt phosphoryliert und dadurch gehemmt (Ewings, Wiggins et al. 2007). p90RSK (*p90 ribosomal s6 kinase*) ist eine Proteinkinase, die nach ERK1/2-Aktivierung Einfluss auf die Transkription besitzt und das pro-apoptotische Protein Bad phosphorylieren und dadurch hemmen kann (Valks, Cook et al. 2002). BIM und p90RSK besitzen somit nach Phosphorylierung und Aktivierung durch ERK1/2 einen anti-apoptotischen Effekt (in Kardiomyozyten).

Ferner können anhand der Caspase-3-Aktivitätsmethode apoptotische Vorgänge in den Zellen nachgewiesen werden. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die Proteine, die die lebenden Zellen vor apoptotischen Vorgängen schützen sollen, inhibieren können. Bei der Apoptose spielt v.a. die hydrolysierende Caspase-3 eine Schlüsselrolle (Thornberry & Lazebnik 1998).

Auch mit Hilfe der TUNEL-Methode könnte untersucht werden, ob Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ Einfluss auf die anti-apoptotische Wirkung von ERK hat (Gavrieli, Sherman et al. 1992). Bei apoptotischen Vorgängen kommt es durch Endonukleasen zur Fragmentierung der DNS. Freiwerdende Hydroxygruppen können mit Hilfe des Enzyms TdT (*Terminal desoxynucleotidyl transferase*) mit Fluorescein-markiertem dUTP gekoppelt und mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

In schon durchgeführten Experimenten der Arbeitsgruppe Lorenz wurde untersucht, welchen Einfluss eine Hemmung der Dimerisierung von ERK1/2 bzw. eine Verhinderung der Phosphorylierung an Threonin188 an ERK2 auf den anti-apoptotischen Effekt von ERK hat. Mit Hilfe der „Δ4-Mutante“, die eine Dimerisierung von ERK1/2 ausschließt, konnte anhand der Caspase-3-Aktivitätsmethode und des TUNEL-Experimentes gezeigt werden, dass die

Apoptose in NRCM-Zellen (Neonatale Rattenkardiomyozyten) im Vergleich zu Kontrollen unverändert bleibt (A. Tomasovic, unpubliziert). Apoptose-Versuche mit der ERK2^{T188A}-Mutante kamen zum selben Ergebnis (Ruppert, Deiss et al. 2013). Im Gegensatz dazu konnten Ruppert et al. in Kardiomyozyten zeigen, dass nach Behandlung mit dem MEK-Inhibitor PD90859 BIM und p90RSK nicht phosphoryliert werden und es somit zu vermehrtem Zelltod kommt (Ruppert, Deiss et al. 2013).

Noch unveröffentlichte Caspase- bzw. TUNEL-Versuche mit NRCM, die mit dem Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷-Peptid transduziert wurden, zeigten, dass Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ keinen verschlechterten Einfluss auf die Apoptose zu haben scheint. Außerdem wurden TUNEL-Experimente mit PD98059 durchgeführt. Hier stellte sich heraus, dass bei dem MEK-Inhibitor im Vergleich zu Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ vermehrt Apoptose auftritt (A. Tomasovic, unpubliziert).

Zu der heute noch standardmäßigen Therapie von tumor erkrankten Patienten gehört v.a. die Behandlung mit Chemotherapeutika. Diese besitzen zwei unterschiedliche Wege der Tumorbekämpfung: die zytostatische und zytotoxische Wirkung (Skipper 1964, Rixe & Fojo 2007). Zum einen wird die Proliferation der Tumorzellen verhindert, zum anderen die Apoptose gefördert. Ohne apoptotische Vorgänge würde der Tumor in seiner Größe stagnieren. Der programmierte Zelltod ist daher bei der Bekämpfung von Krebserkrankungen wünschenswert.

Die zellschädigenden Chemotherapeutika verursachen jedoch starke Nebenwirkungen für den Patienten. Es kann u.a. zu Erbrechen, Haarausfall und Schleimhautentzündungen kommen, da die toxischen Substanzen auch auf gesunde, nicht entartete Zellen wirken. Außerdem entwickeln ungefähr 40% der Tumore Resistenzen gegen die eingesetzten Chemotherapeutika (Higgins 2007). Ruppert et al. konnten 2013 in Experimenten zu Herzhypertrophie in transgenen Mäusen zeigen, dass die an Threonin188 phosphorylierungsdefiziente ERK2-Mutante (ERK2^{T188A}) einen hemmenden Effekt auf pathologische Herzhypertrophie besitzt, jedoch keine negativen Auswirkungen auf das physiologische, gesunde Herzwachstum aufweist. Somit lässt sich vermuten, dass die selektive Hemmung der ERK^{Thr188}-Phosphorylierung keine

kardiotoxischen, sondern sogar kardioprotektive Wirkungen besitzt (Ruppert, Deiss et al. 2013).

Dieser positive Effekt wäre auch beim Einsatz des Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ oder analog wirkenden Substanzen wünschenswert.

Da Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ die Phosphorylierung und Aktivierung am TEY-Motiv nicht beeinflusst, sondern nur die Dimerisierung von ERK1/2 und somit die vermehrte Lokalisation von ERK2 im Zellkern zu hemmen scheint, würden die zytosolischen Wirkungen von ERK bestehen bleiben. Aufgrund dieser partiellen ERK-Hemmung lässt sich vermuten, dass bei einer Behandlung mit Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ weniger Nebenwirkungen für den Patienten zu erwarten sind als bei einer Chemotherapie oder einer Behandlung mit MEK-Inhibitoren.

Im Vergleich mit den MEK-Inhibitoren U0126 und PD98059 und dem Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Cetuximab zeigte sich ein weiterer Vorteil des Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷-Peptids. Im Rahmen dieses Projekts konnte anhand von Zellkulturen gezeigt werden, dass Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ die effektivste proliferationshemmende Wirkung auf die Tumorzellen besitzt. Daraus könnten kürzere Behandlungszeiten, weniger zu erwartende Nebenwirkungen für die Patienten und eine bessere Tumorbekämpfung resultieren.

Des Weiteren gibt es bei der Anwendung des Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ oder analog wirkenden Substanzen keine Einschränkungen. Cetuximab z.B. darf nur bei Patienten ohne aktivierende K-Ras- bzw. B-Raf-Mutationen angewandt werden (Allegra, Jessup et al. 2009). Ras und Raf sind dem EGF-Rezeptor, gegen den Cetuximab wirkt, nachgeschaltet. Daher hätte eine Behandlung mit Cetuximab bei Patienten mit aktivierenden Ras-/Raf-Mutationen keine oder nur geringe Auswirkungen auf den nachfolgenden Signalweg. Eine mögliche Krebstherapie mit dem Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷-Peptid oder einer entsprechend wirkenden Substanz würde im Vergleich dazu gezielt am Ende des Raf-MEK-ERK-Signalweges eingreifen.

Ferner ist zu erwähnen, dass das Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷-Peptid auch in anderen Erkrankungen als mögliches therapeutisches Mittel eingesetzt werden könnte. Wie schon erwähnt, spielt der Raf-MEK-ERK-Signalweg nicht nur bei Tumorerkrankungen eine große Rolle, sondern wird u.a. auch mit einer pathologischen Herzhypertrophie in Verbindung gebracht (Muslin 2008, Rose,

Force et al. 2010). Lorenz et al. konnten 2009 *in vitro* und *in vivo* zeigen, dass die ERK^{Thr188}-Phosphorylierung eine Schlüsselfunktion in der Entstehung einer pathologischen Herzhypertrophie darstellt (Lorenz, Schmitt et al. 2009). Unveröffentlichte Experimente der Arbeitsgruppe mit NRCM-Zellen und Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ konnten zeigen, dass in Anwesenheit des Peptids eine Herzhypertrophieentwicklung deutlich verringert werden kann.

Außerdem hat ein fehlregulierter MAPK-Signalweg eine wichtige Bedeutung bei neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. Alzheimer, Parkinson) (Kim & Choi 2010), bei Krankheiten, die Beeinträchtigungen der Entwicklung mit sich führen (z.B. Noonan-Syndrom, Kardio-fazio-kutanes Syndrom) (Tidyman & Rauen 2009) und bei der Diabeteserkrankung (Tanti & Jager 2009). Hier wäre ebenfalls ein therapeutischer Einsatz von Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ oder analog wirkenden Substanzen denkbar.

6 Zusammenfassung

Bei vielen Erkrankungen wie z.B. Herzhypertrophie, Diabetes und Entzündungen spielt die Raf-MEK-ERK-Signalkaskade eine wichtige Rolle. ERK1/2 ist in vielen zellulären Prozessen, u.a. Proliferation, Differenzierung, Wachstum, Hypertrophie und Apoptose involviert. Auch in der Tumorentstehung besitzt dieser MAPK-Signalweg eine signifikante Funktion, da er bei ca. 50% aller Krebsarten deutlich aktiviert ist (Matallanas & Crespo 2010, Herrero, Pinto et al. 2015).

Lorenz et al. haben im Jahr 2009 eine neue Phosphorylierungsstelle an Threonin188 an ERK2 entdeckt. Sie fanden heraus, dass diese ERK^{Thr188}-Phosphorylierung langanhaltend ist und zu einer vermehrten Lokalisation von ERK2 im Zellkern führt. Hier aktiviert die Kinase weitere Zielproteine und Transkriptionsfaktoren, die u.a. bei der Entstehung einer pathologischen Herzhypertrophie und der vermehrten Zellproliferation entscheidend sind.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der neu entdeckten Phosphorylierungsstelle an Threonin188 bei der Entstehung und der möglichen Therapie von Tumoren zu erarbeiten. Dafür wurde ein Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷-Peptid verwendet, das 2013 in der Arbeitsgruppe Lorenz entwickelt wurde. Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ zeigte in bisher unveröffentlichten Versuchen, dass es direkt an ERK2 bindet, eine Dimerisierung von ERK1/2 hemmen und eine vermehrte Lokalisation von ERK2 im Zellkern verhindern kann.

Im Rahmen dieses Projekts konnten wir belegen, dass mit Hilfe des Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷-Peptids die Tumorzellproliferation von verschiedenen Krebszelllinien (Caco-2, SCC68, PC/1-1 und PC/13-1) signifikant vermindert werden konnte. Nach Transduktion mit Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ konnte ein Herabsetzen der Proliferationsrate um 60-80% erreicht werden.

Des Weiteren konnten wir zeigen, dass Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK1/2 am TEY-Motiv besitzt. Die Aktivierung von ERK1/2 durch die Kinasen MEK1/2 (*Mitogen-activated protein kinase kinases 1/2*) wird somit nicht beeinflusst und die zytosolischen ERK-Funktionen, wie z.B. der anti-apoptotische Effekt, würden somit bestehen bleiben.

Außerdem fanden wir anhand von Experimenten an der SCC68-Zelllinie heraus, dass Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ im Vergleich zu den MEK-Inhibitoren U0126 und PD98059 und verglichen mit dem EGF-Rezeptor-Antikörper Cetuximab die Proliferation signifikant besser hemmt.

Immunfluoreszenzversuche, die im Zuge dieser Arbeit mit den verschiedenen Krebszelllinien durchgeführt wurden, lassen vermuten, dass ERK2 in Anwesenheit des Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷ weniger im Zellkern lokalisiert ist.

Die vielversprechenden Ergebnisse mit dem Myc-ERK2³⁰⁹⁻³⁵⁷-Peptid und den verschiedenen Tumorzelllinien zeigen uns, dass wir auf dem richtigen Weg sind und es sich lohnt, in dieser Richtung weiter zu forschen, um zukünftig die Krebserkrankung effektiver bekämpfen zu können.

7 Literaturverzeichnis

Adnane, L., P. A. Trail, et al. (2006). "Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature." Methods in enzymology **407**: 597-612.

Alessi, D. R., A. Cuenda, et al. (1995). "PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo." The Journal of biological chemistry **270**(46): 27489-27494.

Allegra, C. J., J. M. Jessup, et al. (2009). "American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy." Journal of clinical oncology **27**(12): 2091-2096.

Aoki, Y., T. Niihori, et al. (2008). "The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders." Human mutation **29**(8): 992-1006.

Boyle, P. and B. Levin (2008). World Cancer Report 2008, World Health Organization 106-109.

Burnette, W. N. (2011). "Western blotting." Clinical chemistry **57**(1): 132-133.

Calvo, F., L. Agudo-Ibanez, et al. (2010). "The Ras-ERK pathway: understanding site-specific signaling provides hope of new anti-tumor therapies." BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology **32**(5): 412-421.

Casar, B., A. Pinto, et al. (2009). "ERK dimers and scaffold proteins: unexpected partners for a forgotten (cytoplasmic) task." Cell cycle (Georgetown, Tex.) **8**(7): 1007-1013.

Dalpa, E., V. Gourvas, et al. (2017). "K-Ras, H-Ras, N-Ras and B-Raf mutation and expression analysis in Wilms tumors: association with tumor growth." Medical oncology (Northwood, London, England) **34**(1): 6.

Dhillon, A. S. and W. Kolch (2004). "Oncogenic B-Raf mutations: crystal clear at last." Cancer cell **5**(4): 303-304.

Downward, J. (2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy." Nature reviews. Cancer **3**(1): 11-22.

English, J. M. and M. H. Cobb (2002). "Pharmacological inhibitors of MAPK pathways." Trends in pharmacological sciences **23**(1): 40-45.

- Ewings, K. E., C. M. Wiggins, et al. (2007). "Bim and the pro-survival Bcl-2 proteins: opposites attract, ERK repels." Cell cycle (Georgetown, Tex.) **6**(18): 2236-2240.
- Fiandalo, M. V. and N. Kyprianou (2012). "Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis." Experimental oncology **34**(3): 165-175.
- Garnett, M. J. and R. Marais (2004). "Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene." Cancer cell **6**(4): 313-319.
- Gavrieli, Y., Y. Sherman, et al. (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." The Journal of cell biology **119**(3): 493-501.
- Green, M. R. (2004). "Targeting targeted therapy." The New England journal of medicine **350**(21): 2191-2193.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hartmann, S. and J. R. Grandis (2016). "Treatment of head and neck cancer in the elderly." Expert opinion on pharmacotherapy **17**(14): 1903-1921.
- Hauri, H. P. and K. Bucher (1986). "Immunoblotting with monoclonal antibodies: importance of the blocking solution." Analytical biochemistry **159**(2): 386-389.
- Hawkes, R., E. Niday, et al. (1982). "A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies." Analytical biochemistry **119**(1): 142-147.
- Heo, D. S., C. Snyderman, et al. (1989). "Biology, cytogenetics, and sensitivity to immunological effector cells of new head and neck squamous cell carcinoma lines." Cancer research **49**(18): 5167-5175.
- Herrero, A., A. Pinto, et al. (2015). "Small Molecule Inhibition of ERK Dimerization Prevents Tumorigenesis by RAS-ERK Pathway Oncogenes." Cancer cell **28**(2): 170-182.
- Higgins, C. F. (2007). "Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters." Nature **446**(7137): 749-757.
- Hughes, P. E., S. Caenepeel, et al. (2016). "Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy Combinations for the Treatment of Cancer." Trends in immunology **37**(7): 462-476.
- Humblet, Y. (2004). "Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours." Expert opinion on pharmacotherapy **5**(7): 1621-1633.

Jansohn, M. and S. Rothhämel (2011). Gentechnische Methoden, Spektrum Akademischer Verlag.

Jensen, K. (1965). "A simple method for protein electrophoresis in polyacrylamide gel " Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation **17**: 192-194.

Kabolizadeh, P., G. J. Kubicek, et al. (2012). "The role of cetuximab in the management of head and neck cancers." Expert opinion on biological therapy **12**(4): 517-528.

Karapetis, C. S., S. Khambata-Ford, et al. (2008). "K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer." The New England journal of medicine **359**(17): 1757-1765.

Khokhlatchev, A. V., B. Canagarajah, et al. (1998). "Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation." Cell **93**(4): 605-615.

Kiaris, H. and D. Spandidos (1995). "Mutations of ras genes in human tumors (review)." International journal of oncology **7**(3): 413-421.

Kim, E. K. and E. J. Choi (2010). "Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases." Biochimica et biophysica acta **1802**(4): 396-405.

Kohno, M. and J. Pouyssegur (2006). "Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy." Annals of medicine **38**(3): 200-211.

Kolch, W. (2000). "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions." The Biochemical journal **351 Pt 2**: 289-305.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Lawrence, M. C., A. Jivan, et al. (2008). "The roles of MAPKs in disease." Cell research **18**(4): 436-442.

Levidou, G., A. A. Saetta, et al. (2012). "ERK/pERK expression and B-raf mutations in colon adenocarcinomas: correlation with clinicopathological characteristics." World journal of surgical oncology **10**: 47.

Lorenz, K., J. P. Schmitt, et al. (2009). "A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy." Nature medicine **15**(1): 75-83.

Martinelli, E., F. Morgillo, et al. (2017). "Cancer resistance to therapies against the EGFR-RAS-RAF pathway: The role of MEK." Cancer treatment reviews **53**: 61-69.

Matallanas, D. and P. Crespo (2010). "New druggable targets in the Ras pathway?" Current opinion in molecular therapeutics **12**(6): 674-683.

Mattina, J., B. Carlisle, et al. (2017). "Inefficiencies and Patient Burdens in the Development of the Targeted Cancer Drug Sorafenib: A Systematic Review." PLoS biology **15**(2): e2000487.

Muslin, A. J. (2008). "MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets." Clinical science **115**(7): 203-218.

Nicholson, R. I., J. M. Gee, et al. (2001). "EGFR and cancer prognosis." European journal of cancer **37 Suppl 4**: S9-15.

Ogata, K., M. Arakawa, et al. (1983). "Detection of toxoplasma membrane antigens transferred from SDS-polyacrylamide gel to nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin-biotin, peroxidase anti-peroxidase and immunoperoxidase methods." Journal of immunological methods **65**(1-2): 75-82.

Payne, D. M., A. J. Rossomando, et al. (1991). "Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)." The EMBO journal **10**(4): 885-892.

Pecorino, L. (2012). Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics, Oxford University Press.

Raman, M., W. Chen, et al. (2007). "Differential regulation and properties of MAPKs." Oncogene **26**(22): 3100-3112.

Rehm, H. and T. Letzel (2009). Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics, Spektrum Akademischer Verlag.

Rinehart, J., A. A. Adjei, et al. (2004). "Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer." Journal of clinical oncology **22**(22): 4456-4462.

Rivera, F., A. Garcia-Castano, et al. (2009). "Cetuximab in metastatic or recurrent head and neck cancer: the EXTREME trial." Expert review of anticancer therapy **9**(10): 1421-1428.

Rixe, O. and T. Fojo (2007). "Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient?" Clinical cancer research **13**(24): 7280-7287.

Robert Koch Institut (2013). Krebs in Deutschland 2009/2010: 16-23.

Roberts, P. J. and C. J. Der (2007). "Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer." Oncogene **26**(22): 3291-3310.

- Rose, B. A., T. Force, et al. (2010). "Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale." Physiological reviews **90**(4): 1507-1546.
- Roskoski, R., Jr. (2012). "ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation." Pharmacological research **66**(2): 105-143.
- Ruppert, C., K. Deiss, et al. (2013). "Interference with ERK(Thr188) phosphorylation impairs pathological but not physiological cardiac hypertrophy." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **110**(18): 7440-7445.
- Schmitz, S. (2011). Der Experimentator: Zellkultur, Spektrum Akademischer Verlag.
- Schmoll, Höffken, et al. (2006). Kompodium Internistische Onkologie Standards in Diagnostik und Therapie Teil 1, Springer Verlag.
- Sebolt-Leopold, J. S. and R. Herrera (2004). "Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer." Nature reviews. Cancer **4**(12): 937-947.
- Seeger, R. and E. G. Krebs (1995). "The MAPK signaling cascade." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **9**(9): 726-735.
- Sharrocks, A. D. (2001). "The ETS-domain transcription factor family." Nature reviews. Molecular cell biology **2**(11): 827-837.
- Sipos, F., G. Firneisz, et al. (2016). "Therapeutic aspects of c-MYC signaling in inflammatory and cancerous colonic diseases." World journal of gastroenterology **22**(35): 7938-7950.
- Skipper, H. E. (1964). "Perspectives in cancer chemotherapy: therapeutic design" Cancer research **24**: 1295-1302.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Analytical biochemistry **150**(1): 76-85.
- Stewart, B. W. and C. P. Wild (2014). World cancer report 2014, World Health Organization 16-22.
- Tanti, J. F. and J. Jager (2009). "Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation." Current opinion in pharmacology **9**(6): 753-762.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." Science (New York, N.Y.) **281**(5381): 1312-1316.

Tidyman, W. E. and K. A. Rauen (2009). "The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation." Current opinion in genetics & development **19**(3): 230-236.

Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76**(9): 4350-4354.

Valks, D. M., S. A. Cook, et al. (2002). "Phenylephrine promotes phosphorylation of Bad in cardiac myocytes through the extracellular signal-regulated kinases 1/2 and protein kinase A." Journal of molecular and cellular cardiology **34**(7): 749-763.

Van Cutsem, E., C. H. Kohne, et al. (2011). "Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status." Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology **29**(15): 2011-2019.

Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (1993). "The multistep nature of cancer." Trends in genetics **9**(4): 138-141.

Vogelstein, B., D. Lane, et al. (2000). "Surfing the p53 network." Nature **408**(6810): 307-310.

Wellbrock, C., M. Karasarides, et al. (2004). "The RAF proteins take centre stage." Nature reviews. Molecular cell biology **5**(11): 875-885.

World Health Organization (2015). "Cancer." Retrieved 05.12.2016, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des MAPK-Signalweges	5
Abb. 2: Schematische Darstellung des ERK1/2-Signalweges	7
Abb. 3: Schematische Darstellung der Wirkung der Inhibitoren auf den MAPK-Signalweg	12
Abb. 4: Aminosäuresequenz des Myc-markierten ERK2-Peptids Myc- ERK2 ³⁰⁹⁻³⁵⁷	31
Abb. 5: Expression von Myc-ERK2 ³⁰⁹⁻³⁵⁷ in verschiedenen Zelllinien	33
Abb. 6: Myc- ERK2 ³⁰⁹⁻³⁵⁷ wird in den vier Krebszelllinien exprimiert.....	34
Abb. 7: Myc-ERK2 ³⁰⁹⁻³⁵⁷ hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK1/2 am TEY-Motiv (pERK1/2(TEY))	35
Abb. 8: Myc-ERK2 ³⁰⁹⁻³⁵⁷ hemmt die Proliferation von verschiedenen Tumor- zelllinien	37
Abb. 9: Transduktion mit Adenoviren hat keinen toxischen Effekt auf die SCC68-Zellen	38
Abb. 10: Effekt von MEK-Inhibitoren auf die Proliferation von Tumorzellen	40
Abb. 11: Vergleich der proliferationshemmenden Wirkung von PD98059, U0126, Cetuximab und Myc-ERK2 ³⁰⁹⁻³⁵⁷ in SCC68-Zellen.....	42
Abb. 12: U0126 und PD98059 hemmen die MEK-vermittelte Phosphorylierung am TEY-Motiv von ERK1/2	43
Abb. 13: Wirkung von Myc-ERK2 ³⁰⁹⁻³⁵⁷ auf die ERK2-Lokation im Zellkern	48

8.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
BCA	Bicinchoninsäure
BIM	<i>B-cell lymphoma 2-interacting mediator of cell death</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Caco-2	Zellen eines Adenokarzinoms des Darms
COS-1	Zellen aus der Niere eines Affen
DAPI	Diamidinphenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
Elk-1	<i>ETS-like 1 transcription factor</i>
ERK1/2	Extrazellulär-signalregulierte Kinasen 1/2
FCS	Fetales Kälberserum
FTI	Farnesyltransferaseinhibitor
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
[³ H]	Tritium
HEK-Ad	Menschliche, embryonale Nierenzellen
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
LacZ	Für die β -Galactosidase codierendes Gen aus dem Lactose-Operon von <i>E.coli</i>
MAP2K	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase

MAP3K	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK1/2	<i>Mitogen-activated protein kinase kinases 1/2</i> , ERK-Kinase
NRCM	Neonatale Rattenkardiomyozyten
P	Phosphorylierungsstelle
p90RSK	<i>p90 ribosomal s6 kinase</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC/1-1	Zellen eines Plattenepithelkarzinoms des Kehlkopfes
PC/13-1	Zellen eines Plattenepithelkarzinoms der Mundschleimhaut
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	<i>Rat fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SCC68	Zellen eines Plattenepithelkarzinoms der Zunge
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
T188T	Wildtyp-ERK2
TCA	Trichloressigsäure
TdT	<i>Terminal desoxynucleotidyl transferase</i>
TEY	Thr-Glu-Tyr (T ¹⁸³ -E-Y ¹⁸⁵)
Thr	Threonin
TUNEL	<i>Terminal desoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
Tyr	Tyrosin
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
YFP	Gelb-fluoreszierendes Protein

8.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation eigenständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Die Gelegenheit zum Promotionsverfahren wurde mir nicht kommerziell vermittelt. Insbesondere wurde keine Person oder Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Tamara Gruse

Nürnberg, Mai 2017

Lebenslauf

Tamara Gruse

Beruflicher Werdegang

Seit 2015

Assistenz Zahnärztin und angestellte Zahnärztin

Universitärer Werdegang

2008-2013

Studium der Zahnmedizin an der Julius-
Maximilians-Universität in Würzburg