

**Generierung von K-Ras(G12C)-Inhibitor-resistenten Lungen-
und Pankreaskarzinomzellen zur Charakterisierung von
Signalwegen, die eine adaptive Resistenz gegen K-Ras(G12C)-
Inhibitoren vermitteln**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin des

Fachbereichs Zahnmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Aaltonen, Kiian Jari

aus Frankfurt am Main

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Medizinische Klinik und Poliklinik IV -
Innere Medizin, Professur für Signaltransduktion zellulärer Motilität

Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. rer. nat. Klaudia Giehl

Zweitgutachter: Herr PD. Dr. Dr. Strowitzki, Moritz

Tag der Disputation: 20.04.2026

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Das Tumorprotein Ras	1
1.2	Ras-Proteine	3
1.3	Der Ras- <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i> (ERK)-Signalweg	5
1.4	Der Ras-Phosphoinositid-3-Kinase(PI3-Kinasen)-AKT-mTOR-Signalweg	8
1.5	Das ribosomale Protein S6	9
1.6	K-Ras Inhibitoren und Inhibitor-Resistenzen	11
1.7	Ziele der Arbeit	13
2	<i>Material</i>	14
2.1	Chemikalien	14
2.2	Lösungen und Puffer	15
2.3	Inhibitoren	17
2.4	Eukaryotische Zelllinien	17
2.5	Primäre Antikörper	18
2.6	Sekundäre Antikörper	19
2.7	Primäre Antikörper und Toxine für die Immunfluoreszenz	19
2.8	Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz	20
2.9	Verbrauchsmaterialien	20
2.10	Geräte	21
2.11	Software	22
3	<i>Methoden</i>	23
3.1	Sterilisation von Materialien und Lösungen	23
3.2	Kultivieren von Tumorzellen	23
3.3	Kultivieren von resistenten Tumorzellklone	23
3.4	Bestimmung der Zellzahl unter Verwendung der Neubauer-Zählkammer	24
3.5	Passagieren von adhärenenten Zellen	25
3.6	Einfrieren von Zellen	25
3.7	Auftauen von Zellen	25
3.8	Berechnung der Verdopplungszeit	26
3.9	RNA-Isolation mit RNeasy Kit von Qiagen	26
3.10	RNA-Konzentrationsbestimmung	27
3.11	Herstellung von Zelllysaten	27
3.12	Proteinbestimmung mittels BCA Protein Assay	28
3.13	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	29
3.14	Coomassie-Blau Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	31
3.15	Immunblot	31

3.16	Ponceau-Rot Färbung	32
3.17	Detektion von Proteinen mit spezifischen primären Antikörpern.....	33
3.18	Nachweis der primären Antikörper mittels sekundärer Antikörper	33
3.19	Densitometrische Bestimmungen	34
3.20	Bestimmung der Toxizität von AMG510.....	35
3.21	Generierung Inhibitor-resistenter Zellen mittels „ <i>increasing drug dose method</i> “	35
3.21.1	Herstellung von Proteinlysaten der Inhibitor-resistenter Zellen.....	37
3.21.2	RNA-Präparation der Inhibitor-resistenten Zellen	37
3.22	Einfluss von AMG510 bei Kurzzeit-Anwendung	38
3.23	Generierung von „Revertanten Zellen“.....	38
3.24	Immunfluoreszenz Analyse.....	39
3.25	Berechnung der Veränderung der Zellgröße der resistenter Zellen	40
3.26	Datenanalyse und Statistik	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Bestimmung der Toxizität von AMG510.....	41
4.1.1	Wirkung von AMG510 auf MiaPaCa-2 Zellen	41
4.1.2	Wirkung von AMG510 auf H358-Zellen	44
4.1.3	Wirkung von AMG510 auf HCC-44-Zellen	46
4.2	Einfluss von AMG510 auf Ras-abhängige Signalwege	51
4.2.1	Beeinflussung der Proteinexpression und Aktivität durch AMG510 in MiaPaCa-2- und H358-Zellen	51
4.3	Generierung von Inhibitor-resistenten Zellklonen mittels der „ <i>increasing drug dose method</i> “.....	54
4.3.1	Charakterisierung der Proliferation von resistenten MiaPaCa-2-Zellen	54
4.3.2	AMG510- bzw. MRTX849-induzierte Veränderungen in der Proliferationsrate	60
4.3.3	Charakterisierung der Proliferation von resistenten H358-Zellen.....	64
4.3.4	Veränderungen Ras-abhängiger Signalwege in den resistenten Zellklone	72
4.4	Reversibilität der K-Ras(G12C)-Inhibitor-induzierten Veränderungen	79
4.4.1	Charakterisierung von morphologischen und proliferativen Veränderungen der revertanten Zellen	79
4.4.2	Veränderungen Ras-abhängiger Signalwege nach dem Absetzen von AMG510 in MiaPaCa-2-Zellklone.....	84
4.4.3	Veränderungen der Zytoskelett-Organisation und der Proteinlokalisierung in MiaPaCa-2-Zellklone nach Absetzen von AMG510	86
5	Diskussion	91
5.1	Auswirkungen einer transienten Gabe von AMG510 auf die Proliferation, Morphologie und Apoptose in K-Ras(G12C)-exprimierende Zelllinien	91
5.2	Veränderungen in der Aktivität von Signaltransduktionskaskaden nach K-Ras(G12C)-Inhibition mit AMG510	94
5.3	Zelluläre und molekulare Veränderungen bei der Resistenzentwicklung gegen AMG510 und MRTX849.....	99
5.3.1	Veränderte Zell-Proliferation nach Resistenzentwicklung.....	99
5.3.2	Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen AMG510 und MRTX849 in MiaPaCa-2- und H358-Zelllinien.....	100
5.3.3	Veränderungen in der Zellmorphologie im Verlauf der Resistenzentwicklung.....	102
5.4	Reversible Mechanismen in den resistenten AMG510-behandelten MiaPaCa-2-Zellen	106

6	<i>Zusammenfassung</i>	108
7	<i>Summary</i>	109
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	110
9	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	115
10	<i>Tabellenverzeichnis</i>	117
11	<i>Ehrenwörtliche Erklärung</i>	118
12	<i>Danksagung</i>	119
13	<i>Supplement</i>	120

1 Einleitung

1.1 Das Tumorprotein Ras

Die Entstehung von Krebs vollzieht sich durch eine schrittweise Anhäufung von genetischen Veränderungen, welche eine Umwandlung von einer „normalen“ eukaryotischen Zelle in eine maligne Zelle antreiben. Verschiedene wesentliche Veränderungen der Zellphysiologie treiben diesen Prozess an. Dazu zählen die Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren und -signalen, die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, die Umgehung des programmierten Zelltods, abnorme Angiogenese, ein unbegrenztes Replikationspotenzial, eine Möglichkeit der Gewebsinvasion und die Metastasierung [1]. Die Gene der Ras-Proteine gehören zu denen am häufigsten mutierten Onkogenen, die bei humanen Karzinomen entdeckt wurden. Dabei treten Mutationen in Ras-Genen in ca. 30 % aller humanen Tumore auf und die Mutation im *K-Ras* Gen gehört zu den häufigsten Veränderungen in malignen Pankreaskarzinom- und *non-small cell lung cancer* (NSCLC)-Zellen [2, 3]. Des Weiteren befinden sich 98 % der Mutationen aller *Ras Gene* in einem der drei Hotspots für Mutationen: den Aminosäuren G12, G13 und Q61. Durch die Punktmutation wird die intrinsische GTPase-Aktivität reduziert und es kommt zu einer konstitutiven Aktivierung des Ras-Proteins, was nun überwiegend in der GTP-gebundenen Form vorliegt [4] (siehe Abbildung 1.1). Dieses verursacht eine Hyperaktivierung von Ras-Effektorproteinen und somit eine Deregulation von *downstream* Signalkaskaden. Diese Prozesse können die Transformation in eine maligne Tumorzelle begünstigen [5]. Zusätzlich ist die Beteiligung von Ras-Proteinen an Tumoren weitaus größer, als es die Mutationshäufigkeit vermuten lässt. Aufgrund der Störung der GDP-GTP-Regulierung, des Verlusts der Effektivität von GAPs (*GTPase activating proteins*) und der anhaltenden Aktivierung von GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*), kommt es zu weiteren Mechanismen, die eine Förderung der Tumorgenese begünstigen [4]. Bislang wurde der Großteil an biochemischen und strukturellen Studien zu Ras an H-Ras durchgeführt [6]. Jedoch prädominiert bei humanen Tumoren K-Ras als mutierte Isoform (85 %), gefolgt von N-Ras (11 %) und zuletzt H-Ras (4 %) [4]. Ein spezifisches Mutationsprofil der Ras-Isoformen liegt je nach Tumortyp vor. Mutiertes K-Ras liegt vor allem bei Pankreasadenokarzinomen, kolorektalen Tumoren und Lungenadenokarzinomen vor [7].

Mutiertes N-Ras tritt vor allem bei malignen Melanomen (15 %) auf und H-Ras bei Harnblasentumoren (6 %) [7, 8].

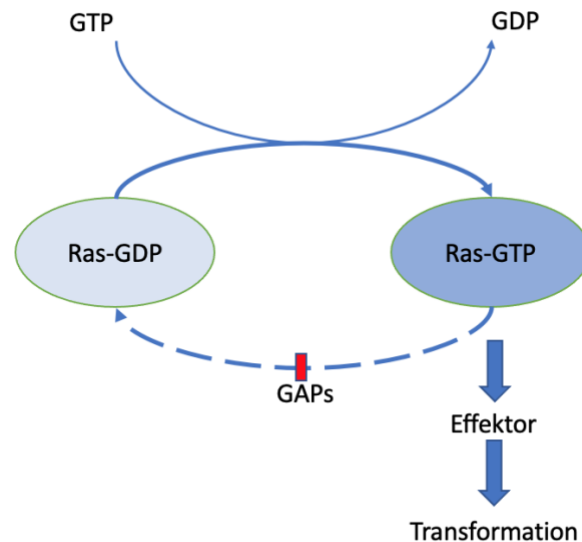


Abbildung 1.1 Verlust der Wirksamkeit der GAPs. Durch den Verlust der Funktion der GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) kommt es zu stark verminderten Hydrolyse des Ras-GTP und somit einer verstärkten Aktivierung der Effektoren und nachfolgend ggf. zur Transformation der Zelle.

Ein standardisierter Therapieansatz gegen mutierte Ras-Proteine ist schwer zu erreichen, da es durch spezifische Punktmutationen an den drei Hotspots des Proteins (z.B. Codon 12, 13 und 61) und die Struktur des Proteins kein eindeutiges *target* für das Medikament gibt [7, 9]. Daher wurde versucht, für die verschiedenen Krebsarten eine Ras-mutationstypspezifische Therapie zu entwickeln [4]. Hierfür wurden bereits verschiedene Inhibitoren entwickelt und teilweise auch klinisch zugelassen [10].

1.2 Ras-Proteine

Ras-Proteine sind Regulatoren der Signaltransduktion und nehmen einen entscheidenden Einfluss auf den Metabolismus der Zelle. Ras-Proteine werden in allen Eukaryoten exprimiert und gehören zu den wichtigsten Proteinen der zellulären Signaltransduktion. Sie gehören zur Familie der Membran-assoziierten monomeren GTPasen mit einem Molekulargewicht von 20-40 kDa, die zwischen einer aktiven GTP-gebundenen Form und einer inaktiven GDP-gebundenen Form wechseln [11]. Beim Menschen umfasst die Ras-Superfamilie mehr als 150 monomere GTP-bindende Proteine, die in sechs Unterfamilien eingeteilt werden: *rat sarcoma* (Ras)-Protein, *ras homologous* (Rho)-Proteine, *secretion-associated ras-related factor1/ADP-ribosylationfactor* (Sar1/Arf)-Proteine, *ras-related in brain* (Rab)-Proteine, *ras-like nuclear* (Ran)-Proteine und Rad-Proteine (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1 Die Ras Superfamilie mit ihren sechs Subfamilien. Tabelle übernommen aus [2]

Subfamilie	Mitglieder	Funktion Regulation ...
Ras	H-Ras, N-Ras, K-Ras 4A, K-Ras 4B M-Ras, R-Ras, Rheb, RalA, RalB Rap1A, Rap1B, Rap2A, Rap2B, TC21, Rin, Rit	der Zellzyklusprogression der Apoptose der Exozytose
Rho	RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, RhoG, RhoH Rac1, Rac2, Rac3 Cdc42, Rnd1, Rnd2 Rif, CHP, WECH1, TC10	des Aktinzytoskeletts der Zellzyklusprogression der Apoptose
Arf	Arf1, Arf2, Arf3, Arf4, Arf5, Arf6	des vesikulären Transports des Aktinzytoskeletts
Rab	Rab1-Rab63	des vesikulären Transports
Ran	Ran	des nukleären Transports
Rad	Rad, Gem, Kir, Rem1, Rem2, Ges	der Zellmorphologie Großteils nicht bekannt

Das menschliche Genom besitzt drei Ras-Gene, die für vier Proteine mit einer großen strukturellen Ähnlichkeit kodieren. Die verschiedenen Gene sind auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert: N-Ras auf Chromosom 1 (1p22-p32), H-Ras auf Chromosom 11 (11p15,1-p15,5) sowie K-Ras auf Chromosom 12 (12p12-1-pter). Aus dem K-Ras Gen können auf der Grundlage alternativen Spleißens des Exons IV zwei K-Ras Proteine entstehen, K-Ras 4A und K-Ras 4B, die sich nur in ihrem Carboxyterminus unterscheiden [12]. Die unterschiedlichen Ras-Proteine sind in den ersten 168-169 Aminosäuren, die als G-Domäne bezeichnet werden, zu mehr als 90 % identisch. Im Gegensatz hierzu

unterscheiden sich die terminalen 20 Aminosäuren des C-Terminus. Diese werden als hypervariable Domäne bezeichnet [13]. Jene Unterschiede innerhalb der letztgenannten Domäne korrelieren darüber hinaus ebenfalls mit den funktionellen Unterschieden der verschiedenen Ras-Isoformen. Hieraus resultiert die Annahme, dass sie spezielle Funktionen besitzen [2].

Ras-Proteine funktionieren wie ein molekularer Schalter, der in einer aktiven und inaktiven Form vorliegen kann. Die jeweilige Form hat einen Einfluss auf nachgeschalteten Signalwege. In einer nicht mutierten Zelle liegt überwiegend inaktives GDP-gebundenes Ras vor. Im Zuge des Bindens von Wachstumsfaktoren, Neurotransmittern, Hormonen oder Chemokinen an extrazelluläre, membranständige Rezeptoren kommt es zu einer Ras-Aktivierung aufgrund der Aktivierung von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren / *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs), die einen Austausch von GDP zu GTP verursachen. Dies führt zu einer Konformationsänderung im Ras-Protein, welche das Freilegen der Effektor-Bindungsstelle zur Folge hat (siehe Abbildung 1.2) [14].

Aktivierte GTP-gebundene Ras-Proteine stimulieren verschiedene *downstream* Signalwege, die für viele Funktionen der Zelle verantwortlich sind: die Genexpression, die Zellzyklusprogression, die Zellproliferation, die Differenzierung, das Zellüberleben, die Migration sowie die Integrität des Zytoskeletts und zellulären Adhäsion. Das aktivierte Ras-Protein kann nachfolgend inaktiviert werden. Ein solcher Prozess kann im Rahmen der intrinsischen GTPase-Aktivität des Proteins erfolgen, welche GTP zu GDP spaltet. GAPs können diesen Prozess bis zu einem Faktor von 10^5 beschleunigen [13, 15].

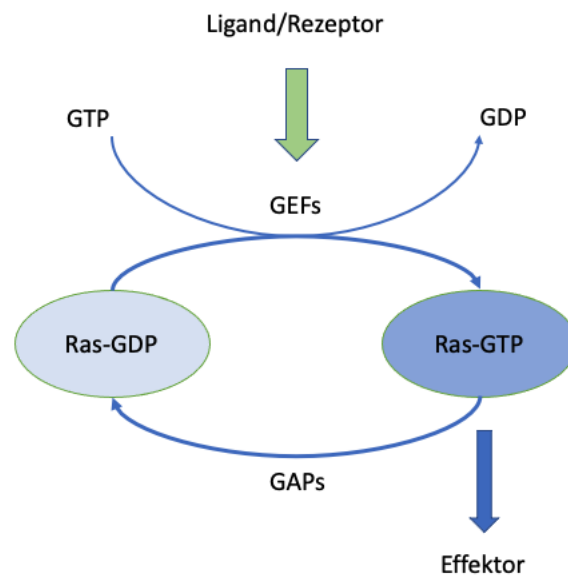


Abbildung 1.2 Ras-Aktivierungszyklus. Durch extrazelluläre Signale kommt es zu einer Aktivierung der Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) und somit zu einem Austausch von Ras-GDP zu Ras-GTP. Durch die Aktivierung der GTPase-aktivierende-Proteine (GAPs) kommt es zu einer Hydrolyse und somit Inaktivierung des Ras-GTP.

1.3 Der Ras-*Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK)-Signalweg

Die *Mitogen-Activated Protein* (MAP)-Kinasen sind Proteinkinasen, die zu einer Familie von Serin/Threonin-Proteinkinasen gehören. Sie nehmen eine zentrale Rolle in der Zellantwort auf externe Stimuli ein. Zudem sind sie in einige fundamentale und zelluläre Prozesse involviert. Zu nennen sind hier die Proliferation, die Differenzierung, die Stressantwort, die Motilität, das Überleben und die Apoptose. Weitergehend nehmen sie auch eine wichtige Rolle in der Tumorgenese ein [14, 15]. Neben den *c-Jun N-terminal kinases 1-3* (JNK1-3), den *stress activated protein kinases* (SAPK1A, 1B, 1C), der ERK5 und den p38 Isoformen (p38 α , β , γ und δ), gehört die *extracellular signal-regulated kinase 1* (ERK1) synonym die *Mitogen-Activated-Proteinkinase 2* (MAPK2) und die *extracellular signal-regulated kinase 2* (ERK2) synonym *Mitogen-activated-Proteinkinase 1* (MAPK1) zu den wichtigen Effektoren des Ras-Proteins.

Der MAPK/ERK-Signalweg wird durch einige Rezeptoren aktiviert, die in Wachstums- und Differenzierungsprozesse involviert sind. Hierzu gehören speziell zahlreiche Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs), G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) und auch

Integrine sowie Ionenkanäle [15-17]. Beispielsweise kommt es aufgrund der Bindung des *epidermal growth factors* (EGF) an einen EGF-Rezeptor, der eine Rezeptortyrosinkinase ist, und zu einer Ras-Aktivierung [18]. An der phosphorylierten intrazellulären Domäne der aktivierten RTK/des aktivierten EGFR können Adapterproteine wie das *growth factor-receptor-bound protein 2* (GRB2) binden und über die SH3-Domäne die Ras-aktivierenden GEFs wie *Son Of Sevenless* (SOS) binden und an die Membran translozieren [16, 19]. Aktiviertes Ras-GTP rekrutiert nun die Serin/Threonin-Kinasen der Raf-Familie an die Zellmembran. Raf wird anschließend durch verschiedene Reaktionen wie Phosphorylierung/Dephosphorylierung, und Assoziation mit einem sogenannten *scaffolding*-Protein freigesetzt. Die aktivierte Raf-Kinase führt mithilfe der jeweiligen Phosphorylierung spezifischer Serinreste zur Aktivierung der *Mitogen-Activated Protein-Kinase-Kinases* (MAPKKs). Diese aktivieren durch die Phosphorylierung eines Tyrosin- und Threoninrests die MAP-Kinase ERK1/2 (bei ERK2 (42 kDa): Threoninrest 185 und Tyrosinrest 187). Weitergehend sind verschiedene Feedback- und Signalamplifikationsfunktionen des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs vorhanden. Auf der Grundlage mehrerer *downstream* befindlicher Kinasen, kann es durch die Aktivierung einer vorangeschalteten Kinase zu einer Signalverstärkung kommen (siehe Abbildung 1.3) [20-23].

Die aktivierten Kinasen ERK1/2 phosphorylieren mehr als 600 Zielproteine im Zytosol und dem Nucleus. Unter diese Proteine fallen unter anderem Transkriptionsfaktoren, Phosphatasen, Kinasen und Zytoskelettproteine [24]. Promotoren von Wachstumsfaktorgenen enthalten meist Bindungsstellen für die von Ras-ERK aktivierten Transkriptionsfaktoren [23]. Das Zellwachstum wird mithilfe dieser Faktoren moduliert. Hierzu gehört z.B. die Bildung eines CDK4-Cyclin-Komplexes durch ERK-getriggerte Signale. Einerseits hat die Bildung des CDK4-Cyclin-Komplex durch ERK-vermittelte Signale einen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Zellwachstums und darüber hinaus wirkt es durch die Repression von pro-apoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie, ebenfalls anti-apoptotisch [25]. Zusätzlich bewirken aktivierte ERK1/2 Kinasen eine Hemmung der rezeptorinduzierten Apoptose [26]. Die Hochregulation der Expression von mesenchymalen Genen kann des Weiteren zu Veränderungen in der Zytoskelettorganisation und der Expression von Zytoskelettproteinen führen [27].

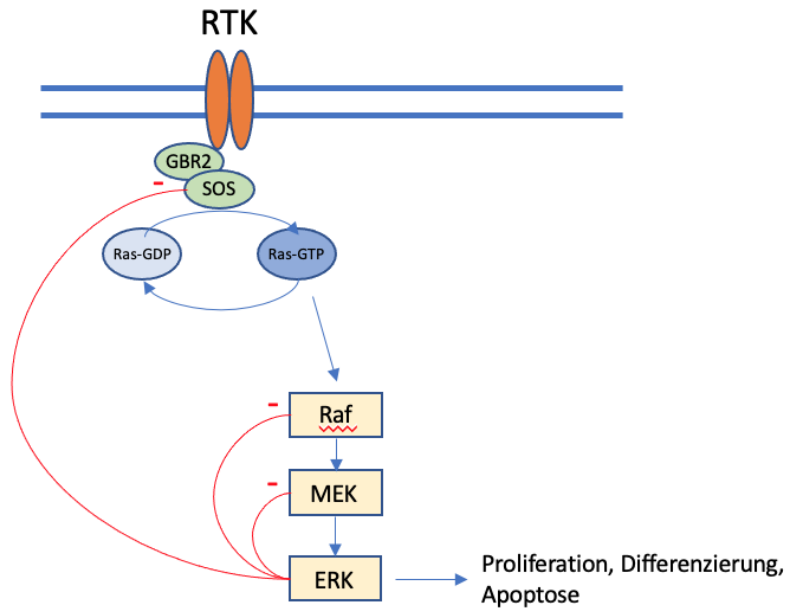


Abbildung 1.3 Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg. Der Signalweg wird durch das Binden von extrazellulären Signalmolekülen an die Rezeptortyrosinkinase aktiviert. Dies führt zur Rekrutierung von Adapterproteinen wie GRB2 und SOS an die Membran und Aktivierung von Ras. Die Phosphorylierung von Raf führt zur Aktivierung von MEK und nachfolgend von ERK. ERK interagiert mit verschiedenen Zielproteinen und nimmt somit Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und Apoptose. ERK wirkt regulierend über eine Hemmung der vorangeschalteten Signalwege (Abbildung verändert nach Mendoza et al. 2011).

Der Ras-ERK-Signalweg ist darüber hinaus zwar einerseits für die Homöostase der Zelle mitverantwortlich. Andererseits ist er jedoch in etwa einem Drittel aller humanen Karzinomen dereguliert und somit an der schrittweisen Entstehung von Tumoren beteiligt (siehe Kapitel 1.1 Das Tumorprotein Ras). Wichtige, durch eine onkogene Aktivierung der Ras-ERK-Kaskade aktivierte Transkriptionsfaktoren sind AP1 und c-Myc, die an der Zellproliferation und -differenzierung beteiligt sind [21]. Die Expression verschiedener Zellzyklusmoleküle wird ebenfalls durch den Ras-ERK-Signalweg verändert. Bei einem hohen Maß an ERK-Signalen kann es darüber hinaus zu einer Induktion von Seneszenzmarkern (p15, p16 und p21) kommen, welche anschließend zu einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus führen [28].

Der Ras-ERK-Signalweg nimmt weitergehend auch Einfluss auf den programmierten Zelltod, welcher als Apoptose bezeichnet wird und die häufigste Art des Zelluntergangs im Organismus darstellt. Hierbei steht das gesteuerte und kontrollierte Absterben von Zellen im Mittelpunkt. Apoptose ist somit ein wichtiger Schritt des Organismus und hat eine große Bedeutung für die Entwicklung, die Homöostase sowie Regeneration. Im Zuge

verschiedener Erkrankungen, zu denen neben neurodegenerativen Erkrankungen und dem *Acquired Immune Deficiency Syndrom* (AIDS) auch die Tumorerkrankungen gehören, tritt ein gestörtes Ablaufen der Apoptoseprozesse auf [29]. Der programmierte Zelltod kann über den intrinsischen oder den extrinsischen Weg induziert und vollzogen werden. Der Ras-ERK-Signalweg kann dabei beide Möglichkeiten beeinflussen. Im Kontext des intrinsischen Wegs hemmt der Ras-ERK-Signalweg die Expression von pro-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie (z.B. Bad) und fördert die Expression von anti-apoptotischen Proteinen (z.B. Bcl-2 und Bcl-XL) [30]. Daneben kann der extrinsische Weg ebenfalls durch den Ras-ERK-Signalweg reguliert werden. Mögliche Auslöser dieser Regulation sind verschiedene aktivierte Todesrezeptoren (Fas, TRAIL, TNF) [26]. Bei der Regulation und dem Verlauf der Apoptose spielen Proteasen der Familie der Caspasen eine entscheidende Rolle. Sie können entweder auf der Grundlage des extrinsischen Wegs und dabei über einen Rezeptor (z.B. TNF-Rezeptor) oder im Rahmen des intrinsischen Wegs über die Mitochondrien aktiviert werden, wobei auf einen apoptotischen Stimulus mit der Ausschüttung von pro-apoptotischen Faktoren reagiert wird. Die Caspasen-Aktivierung läuft anschließend in kontrollierten, kaskadenartigen Schritten ab und leitet die Apoptose ein. Spaltprodukte der verschiedenen Caspasen können auch als Marker für die Apoptose verwendet werden. Insgesamt entscheidet das Verhältnis von pro-apoptotischen Proteinen (z.B.: BAX, Bad) zu anti-apoptotischen Proteinen (z.B.: Bcl-2), ob es zur Ausführung oder zum Stillstand der Apoptose kommt [31-33].

1.4 Der Ras-Phosphoinositid-3-Kinase(PI3-Kinasen)-AKT-mTOR-Signalweg

Der Phosphoinositid-3-Kinase-AKT-mTOR-Signalweg ist ein wichtiger Ras-vermittelter Signalweg, der durch extrazelluläre Stimuli einen Einfluss auf Zellproliferation, Zellzyklus, Zellwachstum, Apoptose, Zelladhäsion und Zellmotilität nimmt [19, 34, 35].

Die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-Kinasen) lassen sich anhand ihrer Struktur in drei Klassen (I-III) einteilen [34]. Im Folgenden wird auf die Klasse I eingegangen, da sie eine eindeutige Rolle in der Onkogenese einnimmt. Mithilfe extrazellulärer Stimuli (z. B. Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone) und nachgeschalteten aktivierten Rezeptoren

kommt es über Ras-Proteine zu einer direkten oder indirekten Aktivierung der Klasse I-PI3-Kinasen [36, 37]. Klasse I-PI3-Kinasen phosphorylieren in ihrem aktiven Zustand Phosphatidylinositol(4,5)-diphosphat (PIP2) und es entsteht an der Plasmamembran der *second messenger* Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat (PIP3). Dieser ist in die Rekrutierung und Aktivierung von zahlreichen *downstream* Effektoren involviert, einschließlich der Serin/Threonin-Kinase Akt/PKB [2]. Der PI3-Kinase/AKT-Signalweg ist durch die Inhibition von BAD und *foxhead box O* (FOXO) für die Unterdrückung von apoptotischen Signalen mitverantwortlich [38-40]. Zudem ist der Ras/PI3-Kinase/AKT-Signalweg an der Regulation der Progression des Zellzyklus beteiligt [41]. Die Beschleunigung des Zellzyklus und der Inhibition von pro-apoptotischen Signalen durch den PI3-Kinase-Signalweg kann zur Tumorgenese beitragen [2]. Zum anderen sind PI3-Kinase-abhängige Signalwege an der Regulation von Zellmotilität und an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt. Die Veränderungen des Zytoskeletts, der Verlust der Zell-Zell-Adhäsion in Verbindung mit einer veränderten Zell-Matrix-Interaktion wie auch die Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen führt zu einer erhöhten Zellmotilität. Diese sind alle Bestandteile, die eine Metastasierung [2, 42] und ggf. eine Veränderung der Morphologie ermöglichen.

1.5 Das ribosomale Protein S6

Das eukaryotische Ribosom (80S) besteht aus der großen (60S) und der kleinen (40S) Untereinheit. Die große Untereinheit besteht aus den 5S, den 5,8S und 28S ribosomalen RNAs, die kleine Untereinheit hingegen aus der 18S rRNA [43, 44]. Generell sind ribosomale Proteine RNA-bindende Proteine, die primär an der Regulation der Proteintranslation beteiligt sind [45]. Darüber hinaus sind sie auch bei der Ribosomenbiogenese im Nucleolus beteiligt. Eine Dysregulation der Ribosomenbiogenese kann zur Tumorentstehung führen [46]. Die eukaryotischen ribosomalen Proteine fungieren als RNA-Chaperone, die für die Faltung und Stabilisierung der rRNAs, sowie für das Zusammenbauen der ribosomalen Untereinheiten zuständig sind [47]. Zusätzlich haben ribosomale Proteine zahlreiche extra-ribosomale Funktionen, dazu zählen die Regulierung des Zellzyklus, der Zellproliferation, Migration, Apoptose, DNA-Reparatur, sowie der malignen Transformation und Tumorgenese [45].

Das ribosomale Protein S6 ist ein Bestandteil der eukaryotischen kleinen ribosomalen Untereinheit [48, 49]. Das Gen für das humane ribosomale Protein S6 ist auf dem Chromosom 9p21 lokalisiert. Es umfasst sechs Exons und bildet ein Protein mit 249 Aminosäuren [50, 51]. Die Gene der ribosomalen Proteine werden durch die RNA Polymerase II transkribiert. Nach der Transkription erfolgt das Verlagern der produzierten mRNAs vom Nucleoplasma in das Zytoplasma, damit die mRNA dort schlussendlich translatiert wird. Anschließend werden die fertiggestellten ribosomalen Proteine zurück in den Nucleus transportiert [44].

Weitergehend ist das ribosomale Protein S6 an den Prozessen der Ribosomenbiogenese, der Proteintranslation, der Zellproliferation, des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung, der DNA-Reparatur, der Apoptose und final des Glukosestoffwechsels in normalen Zellen und Krebszellen beteiligt [52-54]. Das S6-Protein ist eines von zwei ribosomalen Proteinen, die bekanntermaßen von Proteinkinasen phosphoryliert werden [55]. Das S6-Protein verfügt über fünf evolutionär konservierte C-terminale Serinreste (S235, S236, S240, S244 und S247), diese Serinreste können von verschiedenen Proteinkinasen (z.B. *S6kinase1* (S6K1), *ribosomal protein S6 kinases* phosphoryliert werden [49, 56].

Der PI3-Kinase/AKT/mTORC1/S6K-Signalweg ist der bedeutendste Signalweg, der an der Regulation der Phosphorylierung des ribosomalen Protein S6 beteiligt ist. Die Phosphorylierung von S6 wird außerdem als Marker genutzt, um die Aktivität von mTORC1 zu bestimmen [43, 57-59]. Der andere bedeutende Signalweg in der S6 Aktivitäts-Regulation ist der MAPK Signalweg. Das ribosomale Protein S6 bildet somit als *downstream effector* ein Knotenpunkt für den PI3-Kinase/AKT/mTORC1/S6K und dem MAPK Signalweg. Zusätzlich bestehen synergistische Effekte zwischen dem PI3-Kinase/AKT/mTORC1/S6K und dem MAPK Signalweg [60]. Neben den beiden genannten Signalwegen gibt es weitere Faktoren, die an der Regulation der Phosphorylierung von S6 beteiligt sind: extrazelluläre Proteine, Kinasen, Phosphatasen, Membranrezeptoren, Transkriptionsfaktoren und Adapterproteine. Allerdings sind die nachfolgenden Effektoren und Mechanismen, die durch S6 und pS6 reguliert werden, nach wie vor nur unzureichend bekannt [47].

1.6 K-Ras Inhibitoren und Inhibitor-Resistenzen

Wie in Kapitel 1.1 dargestellt ist K-Ras eines der häufigsten mutierten Onkogene in Tumoren. Ein therapeutischer Ansatz gegen mutiertes K-Ras hat sich als schwer erwiesen. K-Ras Proteine fungieren als ein molekularer Schalter, der zwischen einem aktiven GTP-gebundenen Zustand und einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand wechselt. Mutationen treten meist im Codon 12, 13 und 61 auf und führen zu einer Störung der GAP induzierten GTP-Hydrolyse. Im Zuge dessen erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass sich das Protein im aktiven GTP-gebundenen Zustand befindet. Tritt ein solcher Fall ein kann dieses eine Transformation und Tumorgenese auf der Grundlage einer verstärkten Signaltransduktion der *downstream* Signalwege, die für die Zellproliferation zuständig sind, zur Folge haben. Jene Signalwege beinhalten den MAPK und den PI3-Kinase Signalweg [61, 62]. Obwohl die molekulare Struktur von K-Ras die Entwicklung von Inhibitoren erheblich erschwert hat, wurden in den letzten sieben Jahren Verbindungen identifiziert, die sich kovalent an Cystein 12 in der GDP-gebundenen Form des K-Ras^{G12C}-Proteins binden und somit die Signalübertragung verhindern. Dies bewirkte in präklinischen Modellen eine Tumorregression [63-67].

Speziell seit 2013 ist es gelungen, durch die Entwicklung von spezifischen K-Ras^{G12C}-Inhibitoren namens AMG510 (Sotorasib) und MRTX849 (Adagrasib), die Aktivität des mutierten K-Ras^{G12C}, durch kovalente Bindung der Substanzen an G12C, zu inhibieren. Dabei kommt es zu einer Arretierung des Proteins in seiner GDP-gebundenen, inaktiven Form [63, 66, 68, 69]. Derzeit laufende Studien, in den Tumor-Patienten mit K-Ras^{G12C}-Mutationen mit MRTX849 therapiert werden. In diesen Studien zeigte sich eine *objective response rate* von 45 % unter MRTX849 Gabe bei nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) [70]. Die Studien zu AMG510 zeigten eine *objective response rate* von 32.2 % und eine *median progression-free* Überleben von 6.3 Monaten bei NSCLC. Jedoch variiert der therapeutische Erfolg abhängig von der Tumorentität und dem verwendeten K-Ras^{G12C}-Inhibitor [71]. Die Arbeitsgruppe um Hong [71] zeigt, dass der therapeutische Effekt teilweise nur vorübergehend ist und es nach einem *median progression-free* Zeitraum von 6.3 Monaten zu einem Fortschritt des Tumorwachstums kommt. Als Grund werden Resistenzmechanismen der Tumorzellen angenommen, die intrinsisch und erworben sein können [72-74].

Es gibt zwei Haupt-Modelle, die die Entwicklung von Resistenz beschreiben. Die Mehrheit der Zellen eines Tumors weisen eine Mutation auf, die sie für den Inhibitor sensibel machen. Daher wird davon ausgegangen, dass Subklone oder einzelne Zellen innerhalb des Tumors mit genetischen Unterschieden zu einer Entstehung einer Resistenz gegen das Medikament beitragen [75-77]. Gegenwärtig existiert die generelle Annahme, dass eine Resistenz durch die Selektion von Subklonen in einem Tumor verursacht wird. Jedoch haben neue Ergebnisse zu einem alternativen Modell geführt: Die sensiblen Zellen bleiben im Rahmen der Therapie statisch. Zusätzlich erwerben sie aber nahezu „spontan“ *de-Novo*-Mutationen, die die Resistenz ermöglichen [78]. Einer erworbenen Arzneimittelresistenz aufgrund der Selektion von wenigen Tumorzellen, können unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen. Zu diesen Mechanismen der Resistenzbildung im Tumor gehören die Veränderungen auf der Basis von Mutation oder Amplifikation im *Drug-Target*. Hierzu gehört die sogenannte „gatekeeper“-Mutation, im Kontext derer eine Mutation in Aminosäure-Resten auftritt, die entscheidend für die Bindung des Inhibitors am Zielmolekül ist. Aufgrund der Mutation kann der Inhibitor nicht an seine Zielstruktur binden und es kommt zu einer mangelnden Inhibition. Ein weiterer zu benennender Mechanismus ist eine genomische Veränderung in der Tumorzelle durch die Überexpression/Aktivierung des *Targets* bzw. vom *Target* abhängige Signalwege, die das Überleben und die Proliferation auch in Gegenwart des Inhibitors zur Folge haben. Eine weitere Möglichkeit ist die Aktivierung von parallelen oder alternativen Signalwegen, um die Effekte eines speziellen Inhibitors zu umgehen. Zuletzt bestehen auch adaptive, nicht-genetische Mechanismen, wie die Rückkopplungsreaktivierung von betroffener Signalwegen. Beispielsweise können durch eine Inhibitorbehandlung die negativen Rückkopplungssignale, die normalerweise einen Signalweg regulieren, reduziert werden. Durch diesen Verlust wird eine Reaktivierung dieses Signalwegs ermöglicht [79].

1.7 Ziele der Arbeit

Seit der Entwicklung der spezifischen K-Ras^{G12C}-Inhibitoren AMG510 (Sotorasib) und MRTX849 (Adagrasib) war es gelungen, das mutierte K-Ras durch eine kovalente Bindung des Inhibitors an die Zielstruktur zu inhibieren. Jedoch zeigte sich ein nur temporärer therapeutischer Effekt, der auf erworbene Resistenzmechanismen deutet. Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung von AMG510 (Sotorasib)- und MRTX849 (Adagrasib)-resistenten Zellklone der Lungenkarzinom-Zelllinie H358 und der Pankreaskarzinom-Zelllinie MiaPaCa-2 durch Anwendung der *“increasing drug dose method”*. Der Prozess der Resistenzentwicklung sollte durch Charakterisierung der Proliferation mittels Dokumentation der Änderungen der Proliferationszeiten, der Zellzahl und der Verdopplungszeit dokumentiert werden. Außerdem sollten Veränderungen in der Aktivität von Ras-abhängigen Signalwegen charakterisiert werden, da zuvor durchgeführte Experimente einen kurzzeitigen Einfluss der spezifischen K-Ras^{G12C}-Inhibitoren auf den Ras/Raf/MEK/ERK- sowie den PI3-Kinase/AKT-Signalweg belegten. Zusätzlich wurden während der Generierung Veränderungen der Zellmorphologie dokumentiert. Mithilfe der resistenten Zellklone sollten weiterführend die langfristigen Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene untersucht werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
30 % Acrylamid (Rotiphorese [®] Gel A)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	3037.1
2 % Bisacrylamid (Rotiphorese [®] Gel B)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	3039.1
<i>Bovine Serum Albumin</i> , Fraction V (BSA)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund	BSA-DG-50G
Milchpulver, <i>Blotting Grade</i> , fettarm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	T145.3
SuperSignal [®] West Pico PLUS Luminal/Enhancer Solution	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold	1863096
SuperSignal [®] West Pico PLUS Peroxide Solution	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold	1863097
Mowiol 4-88	Merck Millipore, Darmstadt	475904
Triton [™] X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	T8787-250ML
TWEEN [®] 20 viscous liquid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	P1379-500ML
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	32213-2.5L-M
Glycine for molecular biology	AppliChem GmbH, Darmstadt	A1067,1000
Tris ultrapure	AppliChem GmbH, Darmstadt	A1086,1000
D(+)-Saccharose $\geq 99,5$ % p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	4621.1
PEFABLOC [®] SC	SERVA GmbH, Heidelberg	31682.02
PEPSTATIN A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	P-5318
Aprotinin $\geq 3,0$ PEU/mg	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	A162.2
Leupeptin Hemisulfate	AppliChem GmbH, Darmstadt	A2183,0010
Trypsin inhibitor from <i>Glycine max</i> (soybean)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	93620-1G
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	9592.3

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	T9281-25ML
DTT BioChemica	AppliChem GmbH, Darmstadt	A1101,0005
4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	D9542-10MG
Trichloressigsäure ≥ 99 % p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	8789.2
Natriumchlorid	Bernd Kraft GmbH, Duisburg	04170.5600
EGTA ≥ 99 % p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	3054.2
EDTA ≥ 99 % p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	8043.3
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat z.A.	Merck KGaA, Darmstadt	1.06346.1000
Natriumdesoxycholat	Merck KGaA, Darmstadt	1.06504.0250
Kaliumchlorid $\geq 99,5$ % p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	6781.1
SDS ultrapure	AppliChem GmbH, Darmstadt	A1112,0100
Ponceau-S	Taufkirchen	P-3504
Bromphenol Blue	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	B-6131
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	26616
Nonidet P-40	Roche Deutschland Holding GmbH	22618300

Alle verwendeten und hier nicht aufgeführte Chemikalien sind in analysenreiner und kontrollierter Qualität von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Serva (Heidelberg) oder Merck Millipore (Darmstadt) bezogen worden.

2.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 2.2: Verwendete Lösungen und Puffer

CMF-PBS 140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ HPO ₄	1x Lösung pH-Wert 7,2
---	--------------------------

Laufpuffer SDS-Gele 50 mM Tris 500 mM Glyzin 0,1 % (m/V) SDS	1x Lösung
RIPA-Lysispuffer 150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl, pH 7,2 1,0 % (V/V) Triton X-100 0,5 % (V/V) Natriumdesoxycholat 0,1 % (M/V) SDS Proteinase-Inhibitoren 1 mM Pefabloc 1 µM Aprotinin 2,1 µM Leupeptin 5 µM <i>Soybean</i> Trypsininhibitor (STI) Phosphatase-Inhibitoren 10 mM Na-Pyrophosphat 25 mM Na-Glycerophosphat 2 mM Na-Orthovanadat	1x Lösung
Ponceaurot-Färbelösung 0,2 % (m/V) Ponceau-S 3 % (m/V) Trichloressigsäure in Wasser gelöst	
SDS-Probenpuffer 200 mM Tris/HCl 5 mM EDTA 1 M Saccharose 1 mM DTT 2 % (m/V) SDS 0.1 % (m/V) Bromphenolblau in ddH ₂ O	5x Lösung pH: 8,5
Protease-Inhibitor-Mix 100 mM Pefabloc 0,1 mM Aprotinin 2, mM Leupeptin 0,5 mM Soybean Trypsininhibitor (STI)	100x Lösung gelöst in Tris/HCl pH: 7,2
TBS 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 150 mM NaCl	1x Lösung

2.3 Inhibitoren

Tabelle 2.3: Verwendete Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller
Staurosporin in DMSO gelöst, Stammlösung 10 mM	LKT Laboratories, Inc., Minnesota, USA
Sotorasib (AMG510) in DMSO gelöst, Stammlösung 10 mM	MedChemExpress, New Jersey, USA
Adagrasib (MRTX849) in DMSO gelöst, Stammlösung 10 mM	MedChemExpress, New Jersey, USA

2.4 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 2.4: Verwendete eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Bestellnummer	Beschreibung
H358	CRL-5807, ATCC, Manassas, USA	etabliert aus einem humanen bronchoalveolärem Karzinom (NSCLC), epithelähnlicher Morphologie, adhärentes Wachstum, aktivierende Punktmutation von K-Ras in Kodon 12 mit Austausch von Glycin gegen Cystein (G12C), ein Allel ist mutiert
HCC-44	ACC 534 DSMZ, Braunschweig	etabliert aus einem humanem Adenokarzinom (NSCLC), epitheliale Morphologie, adhärentes einlagiges Wachstum, aktivierende Punktmutation von K-Ras in Kodon 12 mit Austausch von Glycin gegen Cystein (G12C), beide Allele sind mutiert
MiaPaCa-2	CRM-CRL-1420 ATCC, Manassas, USA	etabliert aus einem humanem Pankreaskarzinom mit epithelähnliche Morphologie, aktivierende Punktmutation von K-Ras in Kodon 12 mit Austausch von Glycin gegen Cystein (G12C), beide Allele sind mutiert

2.5 Primäre Antikörper

Verdünnung der primären Antikörper:

- (1) 0,5 % Milchpulver in TBS
- (2) 3 % BSA in TBS
- (3) 0.3 % BSA/CMF-PBS
- (4) 0.3 % BSA/CMF-PBS

Tabelle 2.5: Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller	Bestellnummer
Caspase 3	1:1000 (1)	<i>mouse</i>	Cell Signaling, Leiden; NL	9662
Caspase 3	1:500-1:2000 (1)	<i>rabbit</i>	Proteintech, Planegg-Martinsried	19677-1-AP
Cleaved Caspase 3	1:1000 (1)	<i>rabbit</i>	Cell Signaling, Leiden; NL	9664
GAPDH	1:5000 (2)	<i>rabbit</i>	Rockland, Pennsylvania, USA	600-401-GV0
β-Aktin	1:4000 (2)	<i>mouse</i>	Sigma, Taufkirchen	A-5441
α-Tubulin	1:5000 (2)	<i>mouse</i>	Sigma, Taufkirchen	T-5168
(pan)Ras (OP40)	1:500 (2)	<i>mouse</i>	Calbiochem/Merck, Darmstadt	3046868
ERK 1/2 (44/42-MAPK)	1:3000 (2)	<i>mouse</i>	Cell Signaling, Leiden; NL	4370
p-ERK 1/2 (p44/42-MAPK)	1:1000 (2)	<i>rabbit</i>	Cell Signaling, Leiden; NL	4696
S6	1:1000 (2)	<i>mouse</i>	Cell Signaling, Leiden; NL	2317
pS6	1:2000 (2)	<i>rabbit</i>	Cell Signaling, Leiden; NL	4858
AKT	1:2000 (2)	<i>mouse</i>	Cell Signaling, Leiden; NL	2920
pAKT	1:2000 (2)	<i>rabbit</i>	Cell Signaling, Leiden; NL	9271
RPS6	1:1000 (2)	<i>mouse</i>	Proteintech, Planegg-Martinsried	66886-1-Ig

2.6 Sekundäre Antikörper

Alle sekundären Antikörper wurden in 1 x TBS angesetzt.

Tabelle 2.6: Verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller	Bestellnummer
Goat anti-mouse IgG CF680 (ms680)	1:100000	<i>goat</i>	Biotium, California, USA	20817
IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG (rb800)	1:120000	<i>goat</i>	LI-COR Inc., Lincoln, USA	926-32211
IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG (ms800)	1:100000	<i>goat</i>	LI-COR Inc., Lincoln, USA	925-32210
anti-mouse IgG HRP-linked (msHRP)	1:10000	<i>horse</i>	Cell Signaling, Leiden; NL	7076
anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody rbHRP	1:10000	<i>goat</i>	Sigma, Taufkirchen	A6154
anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (rbHRP)	1:10000	<i>goat</i>	Cell Signaling, Leiden, NL	7044

2.7 Primäre Antikörper und Toxine für die Immunfluoreszenz

Alle primären Antikörper und Toxine für Immunfluoreszenz-Analysen wurden in 0,3 % BSA/CMF-PBS angesetzt.

Tabelle 2.7: Verwendete primäre Antikörper und Toxine für die Immunfluoreszenz

Antikörper/Toxin	Verdünnung	Spezies	Hersteller	Bestellnummer
Phalloidin Texas Red (Toxin)	1:500 (3)	-	Sigma Taufkirchen	P-5282
Phalloidin Alexa488	1:250 (3)	-	Sigma Taufkirchen	P-1951
DAPI (1:10 vorverdünnt, 10 mM)	1:1000 (3)	-	Sigma Taufkirchen	D9542-10MG
ERK 1/2 (44/42-MAPK)	1:100 (3)	<i>mouse</i>	Cell Signaling, Leiden, NL	4370

p-ERK1/2 (p44/42-MAPK)	1:100 (3)	<i>rabbit</i>	Cell Signaling, Cambridge, Leiden, NL	4696
Paxillin	1:200 (3)	<i>mouse</i>	BD Bioscience, Heidelberg	610052
Vinculin	1:250 (3)	<i>mouse</i>	Sigma, Taufkirchen	V-4139
Vimentin	1:500 (3)	<i>mouse</i>	Sigma, Taufkirchen	V-6630
α-Tubulin	1:500 (3)	<i>mouse</i>	Sigma, Taufkirchen	T-5168
Ki67	1:100 (3)	<i>mouse</i>	Dianova, Hamburg	DIA-670-P1

2.8 Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

Alle sekundären Antikörper für die Immunfluoreszenz-Analysen werden in 0,3 % BSA/CMF-PBS angesetzt.

Tabelle 2.8: Verwendete sekundäre Antikörper und Toxine für die Immunfluoreszenz

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller	Bestellnummer
Goat anti Rabbit IgG (H+L) Alexa 488	1:1000 (3)	<i>goat</i>	Mol.Probes, Oregon, USA	A-11008
Goat anti Mouse IgG (H+L) Cy3	1:1000 (3)	<i>goat</i>	Dianova, Hamburg	115-165-003

2.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.9: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Bestellnummer
Protran 0.45 μm Nitrocellulose Transfer Membrane	GE Healthcare, München	#106000002
Whatman® Chromatography Paper (3 mm)	GE Healthcare, München	#3030-931
Zellkulturschalen (6-well, 12-well, 60 mm, 100 mm, T25, T75)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht	#83.3920.005, #83.3921, #83.3901 #83.3902, #83.3910.002, #83.3911.002

Mikroplatte, steril, 96 k	Greiner Bio-One, Frickenhausen	655161
Millex-GS Sterilfilter (0.22 µm)	Merck Millipore, Darmstadt	#SLGS033SB
Injekt®-F, 1 ml	B Braun, Melsungen	9166017V
Injekt® Solo	B Braun, Melsungen	4606051V
BD Microlance™ 3 (25G x 5/8“ (0,5 x 16 mm))	Becton Dickinson, Heidelberg	300600
15 ml Röhren	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht	62.554.502
50 ml Röhren	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold	227261
1,5 ml Reagenzgefäß	Greiner Bio-One, Frickenhausen	616201
1,5 ml Reagenzgefäß Safe-Lock	Eppendorf SE, Hamburg	0030.120.086
0,5 ml Reagenzgefäß	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht	72.699

Alle weiteren und hier nicht aufgeführten Materialien wurden in Standard-Qualität von aktuellen Lieferanten bezogen.

2.10 Geräte

Tabelle 2.10: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Fusion SL4-3500.WL, <i>Chemiluminescence Imaging System</i>	Vilber Lourmat, Eberhardzell
LICOR Odyssey® CLx <i>Infrared Imaging System</i>	LI-COR Inc., Bad Homburg
LICOR Odyssey® Sa <i>Infrared Imaging System</i>	LI-COR Inc., Bad Homburg
Nanodrop 1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Olympus IX81, Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Hamburg
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
Inkubator HERAccl 150i	Heraeus, Hanau
Axiovert 25 Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Biometra Multigel Gelelektrophorese Einheit	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Consort EV245 Spannungsgerät	VWR, Darmstadt
VWR 949313 Analog Heizblock	VWR, Darmstadt
Vortex-Schüttler VV3	VWR, Darmstadt
Labofuge 400	Heraeus, Hanau

HERAfreeze HFU T Series Ultratiefkühlschrank	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Wipp- und 3D-Schüttler, SHRK04DG	OHAUS, Europe GmbH, Schweiz
Mini-Zentrifuge, SPROUT™	Heathrow Scientific LLC, Illinois, USA
BioTek, ELx800, Absorbance Microplate Reader	BioTek Instruments, Winooski, USA
CanoScan 8800F, Scanner	Canon, Krefeld
FiveEasy™ FE20, pH-Meter	Mettler Toledo, Gießen
PCB 1000-2, Laborwaage	KERN & SOHN GmbH, Balingen
Wasserbad WB10	Memmert GmbH, Schwabach

2.11 Software

Tabelle 2.11: Verwendete Software

Software/Version	Hersteller
CellSens Dimension 1.6	LEAD Technologies, Charlotte, USA
Endnote 20	Clarivate Analytics, Pa, USA
Fusion (Version 15.18)	Vilber Lourmat, Eberhardzell
GraphPad Prism5	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Image Studio (Version 5.2)	LI-COR Inc., Bad Homburg
Microsoft® Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft® PowerPoint 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft® Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NanoDrop 1000 (Version 3.8.1)	PeqLab, Erlangen
MP Navigator EX1.0	Canon, Krefeld
Gen5 2.00.Ink	BioTek Instruments, Winooski, USA
AnalySIS 3.2 Imaging System	Soft Imaging System, Münster
Fiji/ImageJ (Version 2.9.0)	National Institute of Health, USA

3 Methoden

3.1 Sterilisation von Materialien und Lösungen

Durch Autoklavieren bei 120 °C werden hitzebeständige Lösungen und Plastikmaterialien sterilisiert. Glasgegenstände werden für drei Stunden bei 180 °C sterilisiert. Eine Sterilfiltration wird bei nicht hitzebeständigen Lösungen durchgeführt. Der verwendete Sterilfilter (0,2 µm oder 0,45 µm Porenweite) richtet sich nach dem Grad der Sterilität und Konsistenz der Lösung.

3.2 Kultivieren von Tumorzellen

Die etablierten Tumorzelllinien H358, HCC-44 und MiaPaCa-2 werden in 60 mm oder 100 mm Zellkultur-Schalen bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Medium dient DMEM-Medium mit 10 % FCS (*fetal calf serum*). Das Kulturmedium wird alle 48 Stunden gewechselt.

DMEM-Komplett Medium

DMEM (high Glucose)

mit:	10 % (V/V)	Fötales Kälberserum (Capricorn, Ebsdorfergrund)
	1 % (V/V)	Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids (100x) (Gibco/Thermo Fisher Scientific, Langenselbold))
	1 % (V/V)	GlutaMAX™-I (100x) (Gibco Thermo Fisher Scientific, Langenselbold)

3.3 Kultivieren von resistenten Tumorzellklone

Die Kultivierung der Tumorzellen erfolgt in 60 mm oder 100 mm Zellkultur-Schalen bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit in DMEM-Komplett Medium. Das Kulturmedium wird im 48-h-Rhythmus gewechselt mit der jeweiligen Zugabe von DMSO oder des Inhibitors AMG510 oder MRTX849.

3.4 Bestimmung der Zellzahl unter Verwendung der Neubauer-Zählkammer

Nach Absaugen des Kulturmediums aus einer 100 mm Zellkultur-Schale, werden die Zellen mit 3-5 ml einer 1x CMF-PBS-Lösung gespült, anschließend mit 2,5 ml Trypsin (0,05 % in DPBS (1x) (Capricorn, Ebsdorfergrund)) für zwei bis fünf Minuten bei 37 °C inkubiert und das Ergebnis der Ablösung der Zellen unter einem Mikroskop kontrolliert. Die abgelösten Zellen werden mit 5 ml DMEM-Komplett Medium von der Schale abgewaschen, aufgenommen und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Dieses wird für 3 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 10 ml DMEM-Komplett Medium resuspendiert. Die Zellzählung erfolgt mittels Hämatocytometer (Neubauer-Zählkammer) und die Zellzahl kann im Mikroskop mit einem 10x Objektiv mittels Zählkreuz bestimmt werden. Durch die Umrechnung des Volumens von $0,1\text{mm}^3$ mit 10^4 erhält man die Zellzahl in 1 ml Zellsuspension.

1x CMF-PBS pH 7,4

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	8 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM

Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % in DPBS (1x) (Capricorn, Ebsdorfergrund))

Trypsin	0,5 g
EDTA	0,2 g
In 1 Liter Puck's Kochsalzlösung	

3.5 Passagieren von adhärenenten Zellen

Die Zellen werden, wie in 3.4 beschrieben, vom Schalenboden gelöst und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen können nun nach erfolgter Zählung, durch das korrekte Verdünnen und Pipettieren, in eine neue Kulturschale ausgesät werden. Es ist aber auch mittels Verdünnung eine Aussaat in eine neue Kulturschale möglich.

3.6 Einfrieren von Zellen

Die Zellen von einer 60 mm oder einer 100 mm Zellkultur-Schale mittels 2,5 ml Trypsin vom Schalenboden gelöst (siehe Kapitel Passagieren von adhärenenten Zellen) und abschließend in 1 ml DMEM-Komplett Medium resuspendiert. Die Suspension wird in ein Kryoröhrchen überführt und 1 ml Einfriermedium tropfenweise hinzugegeben. Anschließend wird das Kryoröhrchen verschlossen und 3-4x invertiert. Im sog. Mr. Frosti Einfrierbehälter wird das Kryoröhrchen über Nacht bei -80 °C gelagert. Durch das Isopropanol-Bad im Einfrierbehälter werden die Zellen langsam auf -80 °C gekühlt. Am nächsten Tag werden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff zur Langzeitlagerung eingefroren.

Einfriermedium

Das für das Einfrieren von Zellen verwendete Medium besteht bei 10 ml Einfriermedium aus 7 ml DMEM-Komplett, 2 ml FCS (hitzeinaktiviert) und 1 ml DMSO. Dieses wird zusammen in einem Röhrchen gemischt, anschließend sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

3.7 Auftauen von Zellen

Bei dem Auftauen von Zellen wird das Kryoröhrchen direkt aus dem Stickstoffbehälter im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Es werden 5 ml DMEM-Komplett Medium in einem Röhrchen vorgelegt und der Inhalt des Kryoröhrchen wird in das Medium überführt. Dies wird bei Raumtemperatur für 3 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zell-Pellet in 2 ml DMEM-Komplett Medium resuspendiert. In eine

100 mm Zellkultur-Schale werden 8 ml DMEM-Komplett vorgelegt und die resuspendierten Zellen anschließend in die Zellkultur-Schale gegeben. Ein Mediumwechsel erfolgt nach 24 h, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

3.8 Berechnung der Verdopplungszeit

Die Berechnung der Verdopplungszeit wird mit dem Programm GraphPad Prism5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Es wurde das Programm *Exponential* (Malthusian) *growth* verwendet. Die Verwendete Formel lautet: $Y=Y_0 \cdot \exp(k \cdot x)$

3.9 RNA-Isolation mit RNeasy Kit von Qiagen

Bei der RNA-Präparation werden die Zellen zuerst unter dem Mikroskop hinsichtlich ihrer Vitalität kontrolliert. Das Medium der Zellen in einer 60 mm Zellkultur-Schale wird abgesaugt und die Zellen werden einmal mit 2,5 ml 1x CMF-PBS gewaschen. Danach werden die Zellen in 200 µl RLT-Puffer + β-Mercaptoethanol (1:100) (RNeasy Mini Kit) lysiert. Mittels *Cellscraper* werden die Zellen abgeschabt und das Lysat in ein 1,5 ml RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Das Zelllysate wird mit einer sterilen, RNAfreien 1 ml Spritze und einer Kanüle (26 G x 1; Durchmesser: 0,45 x 0,25 mm) mit 5 Hüben homogenisiert.

Die Lysate können nun entweder bei -20°C eingefroren werden oder die RNA-Isolation kann direkt durchgeführt werden.

Hierzu werden, nach Anleitung des Herstellers, 200 µl 70 % reinen Ethanol zu jeder Probe hinzugegeben und durch auf- und abpipettieren gemischt. Die Probe wird auf die RNeasy-Säule gegeben und bei Raumtemperatur für 30 s bei 5500 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Es erfolgt die Hinzugabe von 350 µl RW1 Puffer und die Probe wird bei Raumtemperatur für 30 s bei 5500 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird wiederum verworfen. Es werden 80 µl DNase-Mix (RNase-Free DNase Set (50) Qiagen) auf die Säule gegeben, für 15 min inkubiert und danach wird die Säule bei Raumtemperatur für 30 s bei 5500 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Es

werden 500 µl RPE Puffer hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 30 s bei 5500 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Es werden 700 µl RPE Puffer hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 2 min bei 5500 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Die Säule wird in ein frisches *Collection Tube* eingeführt und bei Raumtemperatur 1 min bei 5500 x g zum Trocknen der Säule zentrifugiert. Die Säule wird in ein neues beschriftetes Reaktionsgefäß gestellt und die RNA wird durch die Zugabe von 50 µl RNase freiem Wasser eluiert. Die Säule wird 1 min inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur erneut für 1 min bei 5500 x g zentrifugiert. Das Eluat wird aufgefangen. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgt an dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold).

3.10 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgt am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold). Der Puffer, in dem die gelöste RNA vorliegt, wird als Blank-Wert verwendet. 1 µl der Probe wird für die Messung im NanoDrop eingesetzt.

3.11 Herstellung von Zelllysaten

Die Zellen werden bis zu der gewünschten Konfluenz in Zellkultur-Medium inkubiert. Nach dem Erreichen der gewünschten Konfluenz werden die Zellen unter dem Mikroskop bezüglich Vitalität kontrolliert und dabei die Puffermenge festgelegt, die zur Lyse verwendet werden soll. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen werden einmal mit 5 ml eiskaltem 1x TBS gewaschen. Danach wird der Lysispuffer hinzugegeben: bei einem konfluenten Zellrasen:

- 100 mm Schale: 500 µl Lysispuffer und PI-Mix (1:100) und Phosphatase-Inhibitoren
- 60 mm Schale: 250 µl Lysispuffer und PI-Mix (1:100) und Phosphatase-Inhibitoren
- 6-*well* Platte: 100 µl Lysispuffer und PI-Mix (1:100) und Phosphatase-Inhibitoren
- 12-*well* Platte: 50 µl Lysispuffer und PI-Mix (1:100) und Phosphatase-Inhibitoren

Das Volumen des Lysispuffer kann je nach Zelllinie und Konfluenz variieren. Mittels *Cellscraper* werden die Zellen abgeschabt und das Lysat in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Ab einem Volumen von 100 µl Lysispuffer werden die Zellen mit einer 1 ml Spritze und einer Kanüle (26 G x 1; Durchmesser: 0,45 x 0,25 mm) mit 6 Hüben homogenisiert. Bei Zelllysaten unter 100 µl Lysispuffer wird das Reaktionsgefäß in einem vorgekühlten, mit Eiswasser gefüllten Ultraschallgerät für 4 min homogenisiert. Anschließend erfolgt die Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 16800 x g. Der Überstand (das Lysat) wird in ein neues, bereits vorgekühltes, *Safe-Lock* Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Das Lysat kann nun zur BCA-Proteinbestimmung verwendet werden und/oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

RIPA-Puffer

50 mM	Tris HCl pH 7,2
150 mM	NaCl
0,1%	SDS
0,5 %	Na-Deoxycholat
1%	Triton X-100
10 mM	Na-Pyrophosphat
25 mM	Na-Glycerophosphat
2 mM	Na-Orthovanadate
1 mM	Pefabloc
1 µM	Aprotinin
23 µM	Leupeptin
5 µM	Soybean Trypsininhibitor (STI)

3.12 Proteinbestimmung mittels BCA Protein Assay

Das BCA Protein Assay Reagent A (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) plus Kupfer-(II)-Sulfat-Lösung wird zur Bestimmung der Proteinkonzentration des Lysats verwendet. In einer 96-well Platte wird mittels einer BSA-Stammlösung mit einer definierten Proteinkonzentration von 2 mg/ml eine Standardreihe mit aufsteigender BSA-

Konzentration (von 0 µg – 25 µg pro *well*) und einem Volumen von 20 µl pro *well* pipettiert. Zur Bestimmung der Proben werden 5 µl vom Proteinlysats mit 45 µl Milli-Q Wasser vermischt und davon 20 µl in je zwei *wells* der 96-*well* Platte für die Doppelwertbestimmung pipettiert. Zu 50 Volumenanteilen des BCA Protein Assay Reagent A wird ein Volumenanteil einer 4 % (m/V) Kupfer-(II)-Sulfat-Lösung hinzugeführt, vermischt und zu jedem *well* jeweils 180 µl hinzugefügt. Die Platte wird anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert und mittels des ELx800 Absorbance Microplate Readers (BioTek Instruments, Winooski, USA) analysiert. Anschließend wird über die Standardreihe mathematisch der Proteingehalt des Proteinlysats bestimmt.

3.13 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Durch die verschiedenen Verhältnisse von Acrylamid, Bisacrylamid und Wasser ist eine unterschiedliche Auftrennung von Proteinen durch die Polyacrylamidgelelektrophorese möglich. Bei Verwendung der kleineren Prozentanteile Acrylamid (7,5 – 10 %) können größere Proteine (>40 kDa) aufgetrennt werden. Verwendung höherer Prozentanteile (12,5 -15 %) verursacht eine bessere Auftrennung von kleineren Proteinen (<40 kDa). Die Zusammensetzung der entsprechenden Trenn- und Sammelgele ist in der Tabelle (Tabelle 3.1: Tris-Glycin-SDS-PAGE) dargestellt. Für Trenngele ist eine Polymerisationszeitraum von mehr als 3 h einzuhalten und für das Sammelgel liegt es bei etwa 20 min.

Nach dem Gießen eines Trenngels zwischen zwei Glasplatten (8 x 10 cm), die mit einem Spacer auf einem definierten Abstand von 1 mm gehalten werden, ist die Herstellung eines Sammelgels nötig, damit eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchführbar ist. Der Kamm im Sammelgel erzeugt die nötigen Taschen für die Proben und wird nach dem Auspolymerisieren des Gels gezogen. Anschließend wird das Gel in eine Laufkammer (Sigma-Aldrich) eingespannt und mit 1x SDS Laufpuffer befüllt.

Nach dem Herstellen der Proteinlysatsproben werden diese mit 20 % (V/V) 5x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 bis 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Diese werden dann in die präformierten Taschen aufgetragen und bei 80 V für 15 min im Sammelgel konzentriert. Anschließend wird die Gelelektrophorese bei 110 V für 60 – 90 min (in Abhängigkeit vom Prozentgehalt des Gels) fortgesetzt.

Tabelle 3.1: Tris-Glycin-SDS-PAGE

	7,5 %	8,5 %	10 %	12,5 %	12,5 % mod.	13,5 %	15 %	Sammelgel
	2 Gele	2 Gele	2 Gele	2 Gele	2 Gele	2 Gele	2 Gele	2 Gele
30 % Acrylamid	2 ml	2,3 ml	2,6 ml	3,25 ml	3,2 ml	3,95 ml	3,95 ml	0,38 ml
2 % Bisacrylamid	0,8 ml	0,9 ml	1 ml	1,2 ml	1,5 ml	1,3 ml	1,6 ml	0,15 ml
3M Tris pH 8,8	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	-
1M Tris pH 6,8	-	-	-	-	-	-	-	0,38 ml
10 % SDS	0,08 ml	0,08 ml	0,08 ml	0,08 ml	0,08 ml	0,08 ml	0,08 ml	0,03 ml
60 % Saccharose	-	-	-	-	-	-	-	0,75 ml
H₂O destiliert	4,1 ml	3,6 ml	3,2 ml	2,45 ml	2,45 ml	2,2 ml	1,4 ml	1,3 ml
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	4 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	20 µl
Trennbereich	200 - 60	150 - 50	130 - 40		C3 / CC3	100 - 20	60 - 10	-

1 x SDS Laufpuffer

50 mM Tris
500 mM Glycin
0.1 % (m/V) SDS
in ddH₂O

5x SDS-Probenpuffer

200 mM Tris/HCl
5 mM EDTA
1 M Saccharose
1 mM DTT
2 % (m/V) SDS
0.1 % (m/V) Bromphenolblau
in ddH₂O

3.14 Coomassie-Blau Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Coomassie-Blau Färbung wird für die Färbung von Proteinen, nach der Auftrennung in einem Polyacrylamidgel, genutzt. Nach erfolgter SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wird das Sammelgel von dem Trenngel entfernt und das Trenngel in einer Schale mit Coomassie-Blau Lösung gelegt. Diese wird bis zu dem nächsten Tag auf einen Schüttler gestellt und am folgenden Tag wird die Färbelösung gegen eine Coomassie-Entfärbelösung ersetzt. Nach 3–4 h wird das Gel dann mittels Flachbettscanner eingelesen und somit dokumentiert.

Coomassie Brilliant Blau Lösung

0.1 % (m/V) Coomassie[®] *Brilliant Blue* R-250
20 % (V/V) Isopropanol
10 % (V/V) Eisessig
Milli-Q auf 1 Liter auffüllen

Entfärbelösung

10 % (V/V) Eisessig
12.5 % (V/V) Isopropanol
Milli-Q auf 1 Liter auffüllen

3.15 Immunblot

Damit im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine mit spezifischen Antikörper detektiert werden können, müssen sie auf eine Nitrocellulosemembran überführt werden. Dafür wird die Tank-Blot Technik angewendet. Hierfür werden zwei in Transferpuffer eingeweichte dicke Vliese auf die eine Gitterhalterung der Blotapparatur gelegt und zwei in Transferpuffer getränkte *Whatman[®] Chromatography Paper* (GE Healthcare, München) auf diese gelegt. Auf diese wird die Nitrocellulosemembran (0,45 µm, GE Healthcare, München) gelegt und darauf das Polyacrylamidgel. Anschließend folgen erneut zwei eingeweichte Whatman-Papiere und Vliese und die zweite Gitterhalterung. Die Nitrocellulose und Whatman-Papiere sollen die gleiche Größe wie das Gel haben.

Das sogenannte *Sandwich* wird mit der Nitrocellulosemembran in Richtung der Anode der Blotkammer orientiert und eingeführt. In die mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer wird ein flaches Magnet-Rührstäbchen eingelegt und die Kammer an ein Spannungsgerät angeschlossen. Die Blotdauer richtet sich nach den zu übertragenden Proteinen:

- Proteine < 30 kDa bei 70 V für 30 - max. 45 min, bei Raumtemperatur
 - Proteine > 30 kDa bis < 72 kDa bei 70 V für 45 - 60 min, bei Raumtemperatur
 - Proteine > 72 kDa bei 20 V für 10 - 12 h im Kühlraum bei 4 °C
- Oder alternativ für 3 h bei 70 V im Kühlraum

Nach Ende des Transfers wird die Nitrocellulosemembran in VE-Wasser von den Resten des Transferpuffers befreit. Die Proteine auf der Membran können nun mit einer Ponceau-Rot Lösung gefärbt werden oder direkt abgesättigt und mit dem primären Antikörper inkubiert werden.

1x Transferpuffer

25 mM	Tris/HCl
0.1 % (m/V)	SDS
1.5 % (m/V)	Glycin
20 % (V/V)	Methanol
in ddH ₂ O	

3.16 Ponceau-Rot Färbung

Nach Ende des Transfer-Verfahrens wird die Nitrocellulosemembran mit einer Pinzette in eine mit VE-Wasser gefüllten Schale gelegt und kurz auf den Schüttler gewaschen. Anschließend wird die Nitrocellulosemembran für zwei bis vier Minuten in einer Ponceau-Rot Lösung auf einem Schüttler inkubiert. Danach wird die Membran mit Milli-Q Wasser solange gewaschen, bis die rot gefärbten Proteinbanden vor dem weißen Hintergrund gut sichtbar sind. Zu Dokumentationszwecken wird die Membran mit Bleistift beschriftet, die Markerbanden nachgezeichnet und der Blot mittels eines Flachbettscanners protokolliert. Anschließend wird die Nitrocellulosemembran mit 1x

TBS vollständig unter schütteln entfärbt. Die Membran wird danach in der gewünschten Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur überführt.

Ponceau-Rot Lösung

0.2 % (m/V) Ponceau S
3 % (m/V) Trichloressigsäure
in ddH₂O

1x TBS

10 mM Tris HCl, pH 7.4
150 mM NaCl

3.17 Detektion von Proteinen mit spezifischen primären Antikörpern

Zur Detektion von Proteinen über spezifische primäre Antikörper werden die in Blockierlösung inkubierten Nitrocellulosemembran mit TBS (1 x) gewaschen und in definierten Antikörperlösung (Tabelle 2.5) über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert werden.

3.18 Nachweis der primären Antikörper mittels sekundärer Antikörper

Zur Detektion von primären Antikörpern werden sekundäre Antikörper verwendet, die gegen die Spezies des primären Antikörpers gerichtet sind. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Nachweismethoden verwendet. In der ersten werden Fluorochromgekoppelte sekundäre Antikörper verwendet, die mit dem LICOR Odyssey CLx System detektiert werden. Die andere Methode verwendet HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppelte sekundäre Antikörper, die mittels einer Mischung aus Lumniol und einer stabilen Peroxidlösung als Licht im Fusion SL4-3500.WL nachgewiesen werden.

Zum Entfernen der nichtgebundenen primären Antikörper-Moleküle wird die Nitrocellulosemembran zweimal mit 1x TBS-T und einmal mit 1x TBS für jeweils 5 min gewaschen. Anschließend wird die Membran mit einem spezifischen sekundären

Antikörper (Tabelle 2.6) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Nitrocellulosemembran wieder zweimal mit 1x TBS-T und einmal mit 1x TBS für jeweils 5 min gewaschen.

Bei der Verwendung des LICOR Odyssey CLx Systems wird die Nitrocellulosemembran auf die Glasplatte des Systems gelegt und mit der automatischen Intensitätseinstellung der Software ImageStudio Version 5.2 (LI-COR Inc., Lincoln, USA) gescannt.

Bei der Verwendung des Fusion SL4-3500.WL Systems wird die Nitrocellulosemembran zuerst mit der zu gleichen Teilen gemischten SuperSignal West Pico PLUS Luminol/Enhancer und SuperSignal West Pico PLUS Stable Peroxide (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) eingelegt und für zwei Minuten inkubiert. Anschließend wird die Lichtemission mittels der Verwendung der lichtsensitiven Kamera des Systems detektiert.

1x TBS

10 mM	Tris HCl, pH 7.4
150 mM	NaCl

1x TBS-T

10 mM	Tris HCl, pH 7.4
150 mM	NaCl
1 % (V/V)	Tween®-20

3.19 Densitometrische Bestimmungen

In der hier vorliegenden Arbeit wurden densitometrische Intensitätswerte, die mit Hilfe der LICOR ImageStudio Software erzeugt wurden, unter Verwendung von Microsoft Excel 2016 weiterverarbeitet und auf eine Kontrolle normalisiert.

3.20 Bestimmung der Toxizität von AMG510

Zur Bestimmung der Toxizität des K-Ras^{G12C}-Inhibitors AMG510 werden die Zellen wie folgt in einer 6-well Platte ausgesät:

H358	3x 10 ⁵ pro well
MiaPaCa-2	1x 10 ⁵ pro well
HCC-44	1x 10 ⁵ pro well

Um morphologische und proliferative Veränderungen zu dokumentieren werden die Zellen regelmäßig am Olympus IX81, Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Hamburg) fotografiert. Die Erste als T0 betitelte Fotodokumentation erfolgt 24 h nach der Aussaat, bevor ein Mediumwechsel und die Hinzugabe des Inhibitors AMG510 bzw. des Lösungsmittels DMSO erfolgt. Die Zellen werden alle 24 h, vor dem Mediumwechsel, fotografiert (T24, T48, T72, T96). Das Medium + Inhibitor/DMSO wird an den Zeitpunkten T0 und T48 gewechselt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde zu den Zeitpunkten T48 und T96 das Medium abgenommen und die Anzahl der nicht-adhären Zellen im Medium mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Abschließend erfolgte 96 h nach der ersten Hinzugabe des Inhibitors eine Zählung der im Medium befindlichen und der adhären Zellen.

3.21 Generierung Inhibitor-resistenter Zellen mittels „*increasing drug dose method*“

Für die Generierung von Inhibitor-resistenten Zellklone wurden die humanen Zelllinien H358 und MiaPaCa-2 und die Inhibitoren AMG510 (Sotorasib) und MRTX (Adagrasib) ausgewählt. Es wurden jeweils niedrige Passagen der Zelllinien (MiaPaCa-2: p8 und H358: p10) verwendet. Die Zellen werden gemäß Protokoll abtrypsiniert, in der Neubauer-Zählkammer gezählt und auf je zwei 100 mm Zellkultur-Schalen ausgesät (MiaPaCa: 5 x 10⁵ Zellen und H358: 8 x 10⁵ Zellen). Es werden für jede Zelllinie jeweils zwei Kulturen (A und B) parallel angelegt, um Vergleiche ziehen zu können. Ein Mediumwechsel wird 24 h nach Aussaat mit 8 ml DMEM-Komplett und 8 µl DMSO

(1:1000) bzw. 8 µl Inhibitor der entsprechenden Konzentration durchgeführt. Der Mediumwechsel erfolgt alle 48 h bis die Zellen 95 % Konfluenz erreichen. Beim Erreichen der gewünschten Konfluenz (siehe unten) wird eine Fotodokumentation (≥ 3 Stellen) pro Schale am Axiovert 25 (Carl Zeiss AG, Oberkochen) vorgenommen. Bei 95 % Konfluenz werden die Zellen nach Standardanleitung abtrypsiniert und die Zellzählung mittels Neubauer-Kammer durchgeführt. Anschließend werden die Zellen erneut wie folgt ausgesät und bis zum Erreichen von 95 – 100 % Konfluenz inkubiert:

1x 100 mm Schale: zum Einfrieren	1 x 10 ⁶ Zellen
1x 60 mm Schale: für RNA	5 x 10 ⁵ Zellen
1x 100 mm Schale: für Proteinlysate	restliche Zellen
1x 100 mm Schale: zum Weiterziehen	5 x 10 ⁵ Zellen (MiaPaCa-2)
	8 x 10 ⁵ Zellen (H358)

Bei den MiaPaCa-2-Zellen erfolgt 24 h nach der Aussaat eine Fotodokumentation bei ca. 95 % Konfluenz am Axiovert 25 (≥ 3 Stellen) (Carl Zeiss AG, Oberkochen). Bei den H358 Zellen erfolgt eine weitere Fotodokumentation 48 h nach Aussaat, da die Zellen längere Zeit zum Abheften benötigen.

Im Rahmen der „*increasing drug dose method*“ wird nach jedem Passagieren der Zellen die Inhibitorkonzentration in halb-logarithmischen Abständen ausgehend von der Startkonzentration von 1 nM auf 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 µM, 5 µM, 10 µM erhöht. Bei Erreichen der Konzentrationen von 1 µM, 5 µM bzw. 10 µM werden zwei aufeinanderfolgende Passagen kultiviert, bevor die nächsthöhere Konzentration verwendet wird 24 h nach Aussaat der nächsten Passage der Inhibitor-resistenten Zellen erfolgt ein Mediumwechsel mit dem Wechsel auf die folgende Inhibitorkonzentration bzw. beibehalten derselben Konzentration. Von den Zellen mit halb-logarithmischen Inhibitor-Konzentrationen wird keine RNA präpariert.

3.21.1 Herstellung von Proteinlysaten der Inhibitor-resistenter Zellen

Nach der Fotodokumentation wird das Medium der Zellen in der 100 mm Schale abgesaugt und die Zellen einmal mit 5 ml eiskaltem 1x TBS gewaschen. Danach wird 500 µl RIPA-Puffer mit Proteinaseinhibitoren und Phosphataseinhibitoren hinzugegeben. Mittels *Cellscraper* werden die Zellen abgeschabt, das Homogenat in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und mit einer 1 ml Spritze und einer Kanüle (26 G x 1; Durchmesser: 0,45 x 0,25 mm) mit 6 Hüben homogenisiert. Anschließend erfolgt die Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 16800 x g. Der Überstand wird gleichmäßig in drei bereits vorgekühlte, Safe-Lock Reaktionsgefäß überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im -80 °C Gefrierschrank gelagert. Von dem Überstand werden 20 µl für die BCA-Proteinbestimmung und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet, zur Kontrolle der Lysatqualität.

3.21.2 RNA-Präparation der Inhibitor-resistenten Zellen

Für die RNA Isolierung werden die Zellen in einer 60 mm Schale nach Anleitung (siehe Kapitel 3.9: RNA-Isolation mit RNeasy Kit von Qiagen) mit 200 µl RLT-Puffer + β-Mercaptoethanol (1:1000) lysiert.

Die Lysate werden bei -20 °C eingefroren und die RNA-Isolation zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt.

3.22 Einfluss von AMG510 bei Kurzzeit-Anwendung

Um die Auswirkungen von AMG510 in einem Zeitraum von 24, 48, 72, und 96 Stunden auf die Zellmorphologie und auf einige Signaltransduktionswege zu untersuchen, werden MiaPaCa-2- und H358-Zellen mit einer definierten Zellzahl in 6-well Platten ausgesät:

Aussaat bei 24 h und 48 h Versuchen

H358	6×10^5 Zellen/well
MiaPaCa-2	6×10^5 Zellen/well

Aussaat bei 72 h und 96 h Versuchen:

H358	4×10^5 Zellen/well
MiaPaCa-2	4×10^5 Zellen/well

Die Zellen werden alle 24 h am Axiovert 25 Mikroskop fotografiert. Das Medium wurde 24 h nach Aussaat (T0) und dann alle 48 h gewechselt. Der Inhibitor/DMSO wird 24 h nach Aussaat hinzugefügt. Die Herstellung von Proteinlysaten für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgt wie in Kapitel 3.11 „Herstellung von Zelllysaten“ beschrieben.

3.23 Generierung von „Revertanten Zellen“

Um zu analysieren ob die durch AMG510 induzierten Effekte auf die Zellmorphologie und die Proteinphosphorylierung reversibel sind, wurden MiaPaCa-2-Zellen (Passage 22) die bereits gegen $10 \mu\text{M}$ AMG510 resistent waren, ausgewählt. Die Zellen werden laut Protokoll abtrypsiniert, in der Neubauer-Zählkammer gezählt und auf je vier 100 mm Zellkulturschalen je 5×10^5 Zellen ausgesät. Es werden jeweils Zellen aus der A- und B-Kultur-Reihe verwendet, um Vergleiche ziehen zu können. Ein Mediumwechsel der Zellen wird 24 h nach Aussaat mit 6 ml DMEM-Komplett Medium durchgeführt. Anschließend wird bei zwei Schalen $6 \mu\text{l}$ des Inhibitors (Endkonzentration: $10 \mu\text{M}$

AMG510) hinzugegeben und bei den anderen zwei Schalen der Inhibitor durch 6 μ l DMSO ersetzt. Der Medien- und Inhibitorwechsel erfolgt alle 48 h bis die Zellen eine Konfluenz von 95 % erreichen. Alle 24 h wird eine Fotodokumentation (≥ 3 Stellen) aus unterschiedlichen Bereichen der Zellkulturschale vorgenommen und die Konfluenz dokumentiert.

Bei Erreichen von 95 % Konfluenz werden die Zellen erneut fotografiert und anschließend wird wie folgt ausgesät:

1x 100 mm Schale Einfrieren	1 x 10^6 Zellen
1x 100 mm Schale Weiterziehen	5 x 10^5 Zellen
1x 100 mm Schale Proteinlysate	restliche Zellen

24 h nach der Aussaat erfolgt die Fotodokumentation (≥ 3 Stellen) und die Lyse der dafür ausgesäten Zellen in 300 μ l RIPA-Puffer (siehe Kapitel 3.11: Herstellung von Zelllysaten) Dieses Prozedere wird für insgesamt drei Passagen fortgesetzt.

3.24 Immunfluoreszenz Analyse

Für die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen wurden von den „Resistenten Zellen“ und von den „Revertanten Zellen“ 5 x 10^4 Zellen pro *well* in einer 4-*well* Platte ausgesät. 24 h nach Aussaat der Zellen wird das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 1x CMF-PBS gewaschen und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd in CMF-PBS für 10 min überschichtet. Die Zellen werden dreimal mit 1x CMF-PBS gewaschen und mittels 0,1 % Triton-X100 in CMF-PBS für 5-10 min durchgängig gemacht. Anschließend werden die Zellen dreimal mit 1x CMF-PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen für eine Stunde mit 3 % BSA in CMF-PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x CMF-PBS wird der primäre Antikörper (Tabelle 2.7) in 0.2 % BSA in CMF-PBS verdünnt und 30 μ l Antikörperlösung direkt auf die Zellen gegeben und für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend werden nochmals 30 μ l Antikörperlösung auf die Zellen getropft und der Ansatz weitere 30 min inkubiert. Im weiteren Verlauf wird der Fluorochrom-gekoppelte sekundäre Antikörper (Tabelle 2.8)

in 0.3 % BSA/CMF-PBS verdünnt, 30 µl auf die Zellen gegeben und für 1 h in einer feuchten, dunklen Kammer in das *well* inkubiert. Zum Schluss werden die Zellen mit 1x CMF-PBS mit 0,02 % Tween-20 und zweimal mit 1x CMF-PBS (1 x) gewaschen. Die Zellen werden kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und dann mit Elvanol und einem Deckglas eingebettet. Die Präparate werden mit dem Olympus IX81, Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Hamburg) analysiert und eine Fotodokumentation vorgenommen.

Elvanol-Lösung

- 10 % (m/V) Mowiol 4-88 (Merck)
- 25 % (V/V) Glyzerin
- 50 % (V/V) 0.2 M Tris/HCl, pH 8.5

3.25 Berechnung der Veränderung der Zellgröße der resistenter Zellen

Zu der Berechnung der Zellgröße wurde das Programm Fiji/ImageJ Version 2.9.0 (Software, National Institute of Health, USA) verwendet. Hierbei wurden pro Fotodokumentation jeweils 10 Zellen ausgesucht, manuell die Grenzen definiert, der Maßstab auf 100 µm geeicht und die prozentuale Fläche der resistenten Zellen in Relation zu Zellen der DMSO-Kontrolle berechnet.

3.26 Datenanalyse und Statistik

Die Bearbeitung von Rohdaten wurde in Microsoft Excel 2016 durchgeführt. Die prozessierten Rohdaten wurden in GraphPad Prism5 importiert und grafisch dargestellt, die Standardabweichung (SD) bestimmt, sowie statistisch mittels zweiseitigem Einstichproben t-test auf Signifikanz überprüft.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung der Toxizität von AMG510

Die Bestimmung der Toxizität des spezifischen K-RasG12C-Inhibitors AMG510 erfolgte mit den Zelllinien H358, HCC-44 und MiaPaCa-2, die aufgrund einer Punktmutation im Codon 12 eine konstitutive Aktivierung des Ras-Proteins besitzen. Von jeder Zelllinie wurde eine bestimmte Anzahl von Zellen in eine 6-well Platte ausgesät (siehe 3.19) und die Zellen anschließend über 96 h mit ansteigenden Konzentrationen des Inhibitors AMG510 behandelt. Während der Behandlung mit dem Inhibitor wurde eine Fotodokumentation durchgeführt, um Veränderungen der Morphologie zu untersuchen. Nach 96 h Inhibition wurden die noch adhärenen Zellen abtrypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellzahl der mit DMSO behandelten Zellen gilt hierbei als Kontrolle und wird als 100 % der nach 96 h abgehefteten (lebenden) Zellen gezählt. Anhand des Mittelwertes ($n \geq 3$) wurde der prozentuale Anteil der lebender Zellen im Vergleich zur Kontrolle ermittelt.

4.1.1 Wirkung von AMG510 auf MiaPaCa-2 Zellen

Abbildung 4.1 zeigt den durchschnittlichen Prozentsatz lebender MiaPaCa-2-Zellen 96 h nach Aussaat und Behandlung mit AMG510 oder dem Lösungsmittel DMSO ($n = 4$). Die Grafik zeigt eine kontinuierliche Abnahme der Anzahl der lebenden Zellen mit steigender Konzentration des Inhibitors AMG510. Der Mittelwert der lebenden Zellen bei Behandlung mit 10 nM AMG510 beträgt 57,98 % (SD: 13,54 %; $n = 4$). Die Abnahme der Lebendzellzahl setzt sich mit steigender Inhibitorkonzentration fort und beträgt bei Behandlung von 100 μ M AMG510 nach 96 h 1,03 % (SD: 1,00 %; $n = 4$).

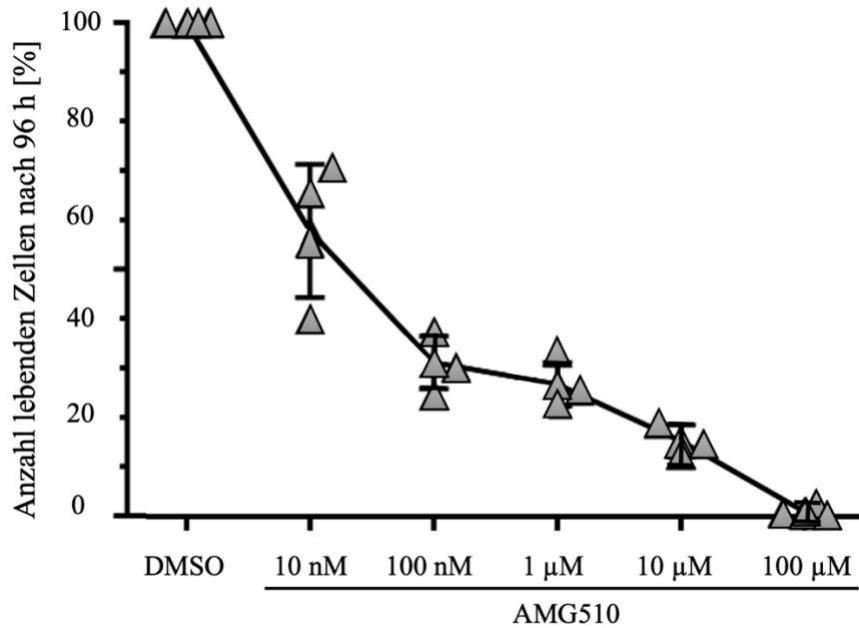


Abbildung 4.1 Zellzahl von MiaPaCa-2-Zellen nach 96 h Behandlung mit AMG510. Das Kurvendiagramm zeigt den durchschnittlichen prozentualen Anteil lebenden, adhärenen MiaPaCa-2-Zellen im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO = 100 %. Die Anzahl der lebenden MiaPaCa-2-Zellen nimmt mit steigender Konzentration des Inhibitors AMG510 stetig ab (Mittelwert $\pm$ SD, n = 4).

Neben den Veränderungen der Proliferation wurden alle 24 h auch morphologische Veränderungen fotografisch dokumentiert, die in Abbildung 4.2 zum Zeitpunkt 96 h dargestellt sind. Es ist zu erkennen, dass die einzelnen Zellen bei der Behandlung mit 10 nM AMG510 (B) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle größer und runder erscheinen. Diese Beobachtung verstärkt sich bei 100 nM AMG510 (C), wobei die Zellen eine Zunahme der Größe aufweisen und die Morphologie einem Spiegelei ähnelt. Zusätzlich ist eine Abnahme der Konfluenz in den wells zu sehen. Diese Veränderungen sind auch in den höheren Konzentrationen von 1 µM (D) und 10 µM AMG510 (E) zu sehen, wobei sich diese Veränderungen erst nach 48 h manifestieren. Bei einer Konzentration von 100 µM AMG510 (F), sind kaum noch Zellen vorhanden und die noch vorhandenen Zellen sind klein und rundlich. Zudem zeigen einige Zellen ein blebbing (schwarze Pfeile in Abbildung 4.2-E und F), das auf apoptotische Prozesse hindeutet.

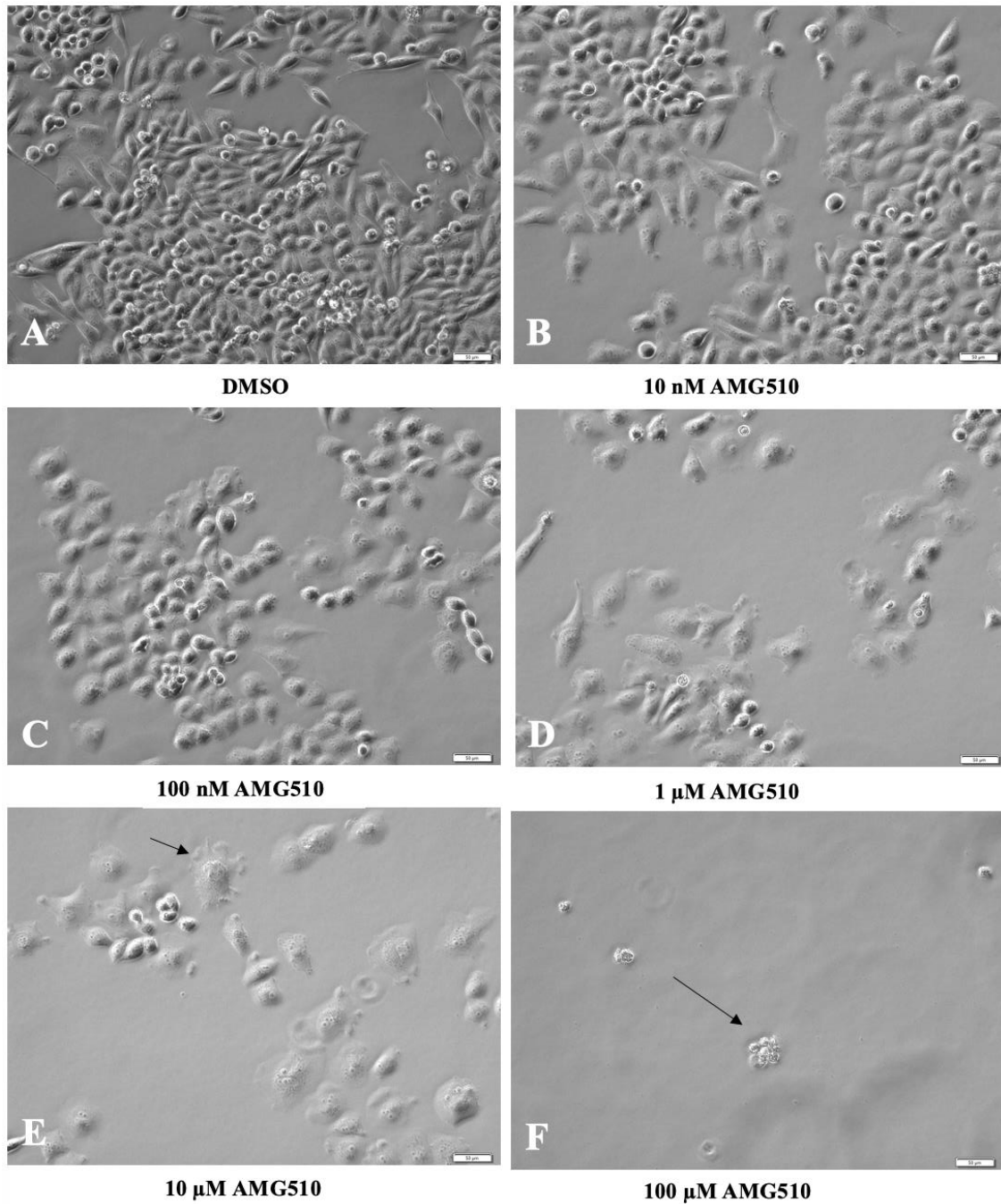


Abbildung 4.2 Einfluss von AMG510 auf die Morphologie von MiaPaCa-2 Zellen. Es wurden 1×10^5 MiaPaCa-2 Zellen in 100 mm Schalen ausgesät und für 96 h mit 0,1 % DMSO (A) bzw. 10 nM - 100 µM AMG510 (B - F) in DMEM komplett-Medium inkubiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Phasenkontrastaufnahmen ($n = 3$). Die schwarzen Pfeile in E und F zeigen den apoptotischen Prozess des *blebbings*. Ein Maßstab ist unten rechts dargestellt ($\cong 50 \mu\text{m}$).

4.1.2 Wirkung von AMG510 auf H358-Zellen

Die Wirkung von AMG510 auf H358-Zellen ist in Abbildung 4.3 grafisch dargestellt. Die durchschnittliche Anzahl lebender Zellen nach 96 h bei 10 nM AMG510 beträgt 77,86 % (SD: 8,97 %; n = 5) im Vergleich zur Kontrolle und beträgt 2,73 % (SD: 2,69 %; n = 5) bei einer Behandlung mit 100 μ M AMG510.

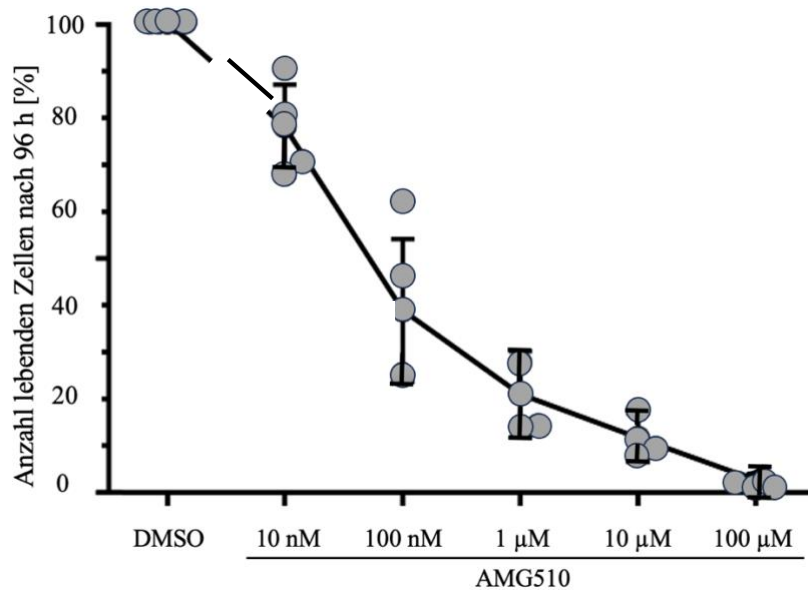


Abbildung 4.3 Zellzahl von H358-Zellen nach 96 h Behandlung mit AMG510. Das Kurvendiagramm zeigt den durchschnittlichen prozentualen Anteil an lebenden, adhären H358-Zellen im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO = 100 %. Die Anzahl der lebenden H358-Zellen nimmt mit steigender Konzentration des Inhibitors AMG510 stetig ab (Mittelwert $\pm$ SD, n = 4).

Die morphologischen Veränderungen der H358-Zellen wurden mittels Fotodokumentation beobachtet und sind in Abbildung 4.4 zum Zeitpunkt nach 96 h dargestellt. Im Gegensatz zu den MiaPaCa-2-Zellen sind bei der Behandlung mit 10 nM, 100 nM und 1 μ M AMG510 keine morphologischen Veränderungen erkennbar. Allerdings nimmt die Konfluenz der Zellen ab 1 μ M AMG510 ab. Bei einer Behandlung mit 10 μ M AMG510 erscheinen die Zellen kleiner als die Kontrollzellen. Bei einer Konzentration von 100 μ M AMG510 sind kaum noch Zellen vorhanden und die noch vorhandenen Zellen klein und rundlich. Zusätzlich zeigen einzelne Zellen ein blebbing (schwarze Pfeile in Abbildung 4.4-F), das auf apoptotische Prozesse hinweist.

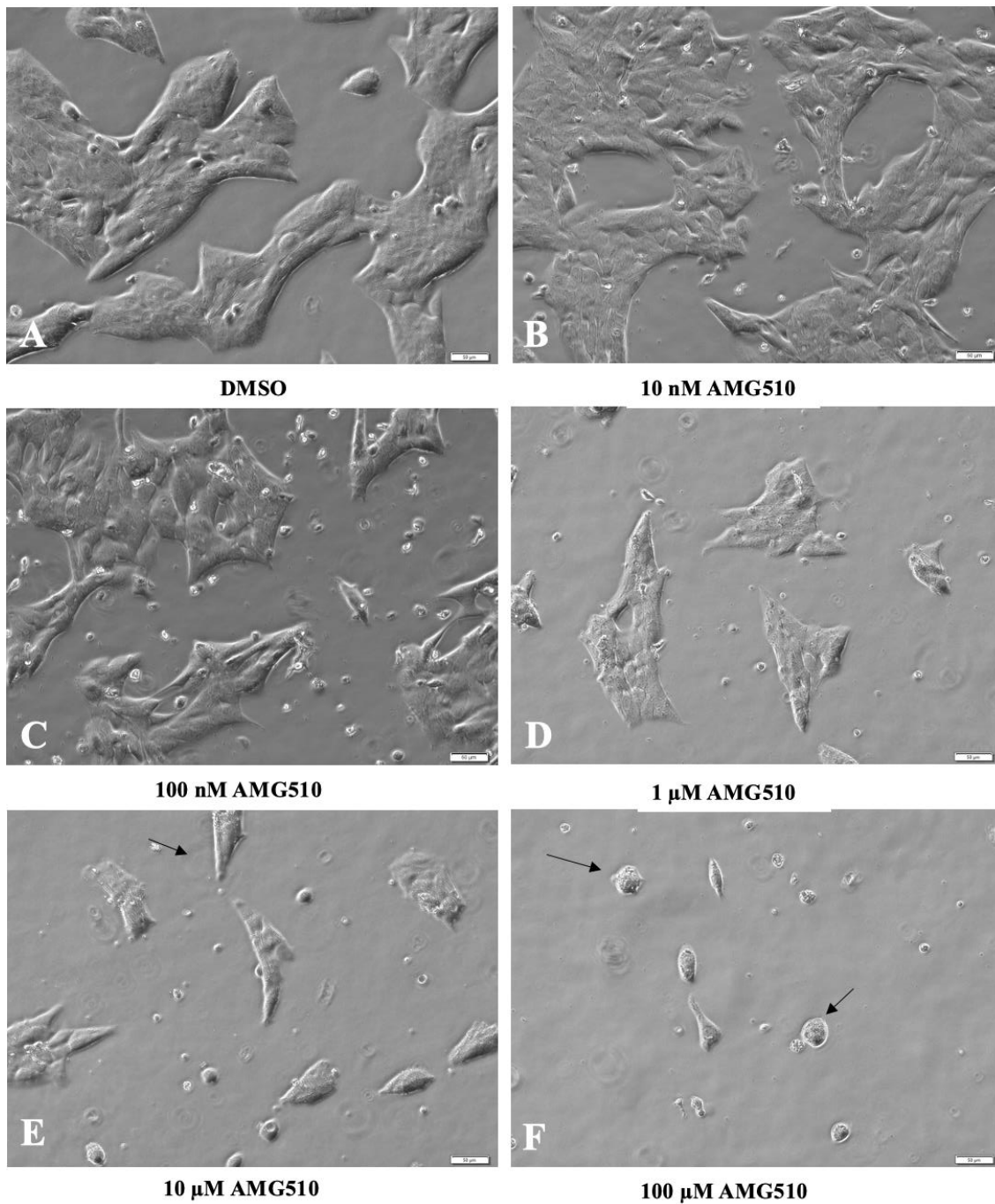


Abbildung 4.4 Einfluss von AMG510 auf die Morphologie von H358 Zellen. Es wurden 3×10^5 H358 Zellen in 100 mm Schale ausgesät und für 96 h mit 0,1 % DMSO (A) bzw. 10 nM - 100 μM AMG510 (B - F) in DMEM komplett-Medium inkubiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Phasenkontrast-aufnahmen ($n = 3$). Die schwarzen Pfeile in F zeigen den apoptotische Zellen. Ein Maßstab ist unten rechts dargestellt ($\cong 50 \mu\text{m}$).

4.1.3 Wirkung von AMG510 auf HCC-44-Zellen

Die Ergebnisse der Behandlung von HCC-44-Zellen mit AMG510 zeigen eine kontinuierliche Abnahme der Lebendzellzahl mit steigender Inhibitorkonzentration, die in Abbildung 4.5 grafisch dargestellt ist.

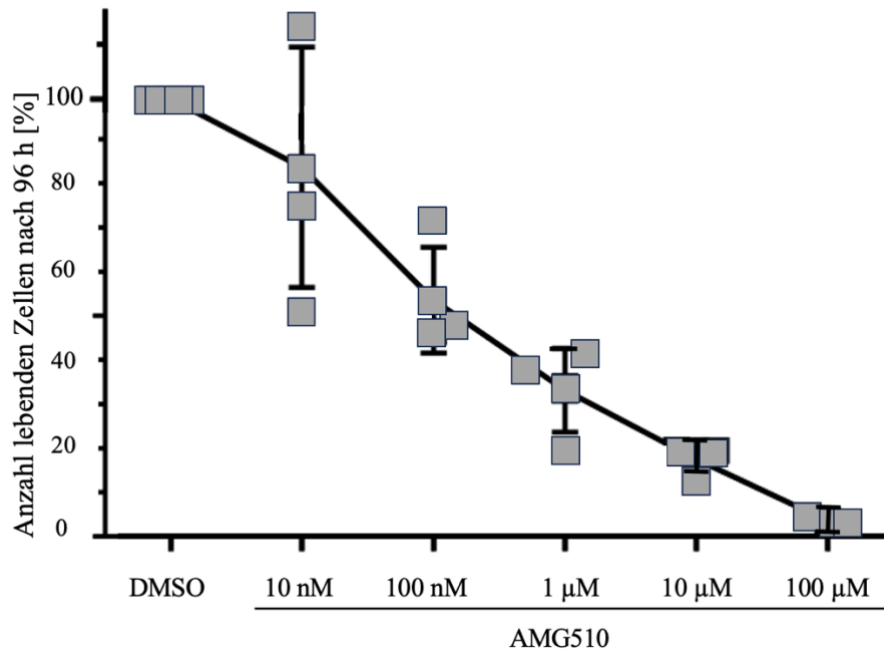


Abbildung 4.5 Zellzahl von HCC-44-Zellen nach 96 h Behandlung mit AMG510. Das Kurvendiagramm gibt den durchschnittlichen prozentualen Anteil an lebenden, abgehefteten HCC-44-Zellen an, im Vergleich zu der Kontrolle mit DMSO = 100 %. Die Anzahl an lebenden HCC-44-Zellen sinkt konstant mit steigender Konzentration des Inhibitors AMG510 (DMSO, 10 nM, 100 nM, 1 µM: n = 4, 10 µM und 100 µM n = 3).

Die Veränderungen in der Morphologie der HCC-44-Zellen sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Ab einer Konzentration von 100 nM AMG510 erscheinen die Zellen flacher und kontrastärmer. Diese Veränderung setzt sich bis zu einer Konzentration von 1 µM AMG510 fort. Bei einer Konzentration von 10 µM AMG510 ist ein rundliches, spiegeleiartiges Erscheinungsbild zu erkennen (schwarze Pfeile) und einige Zellen zeigen ein blebbing (roter Pfeil). Bei einer Konzentration von 100 µM sind nur noch wenige adhärenente Zellen vorhanden. Vor allem sind zahlreiche abgelöste tote, kugelförmige Zellen als kleine Zellkugeln zu sehen (weiße Pfeile). Neben den beobachteten Veränderungen der Morphologie ist eine deutliche Abnahme der Zellkonfluenz in den wells zu verzeichnen.

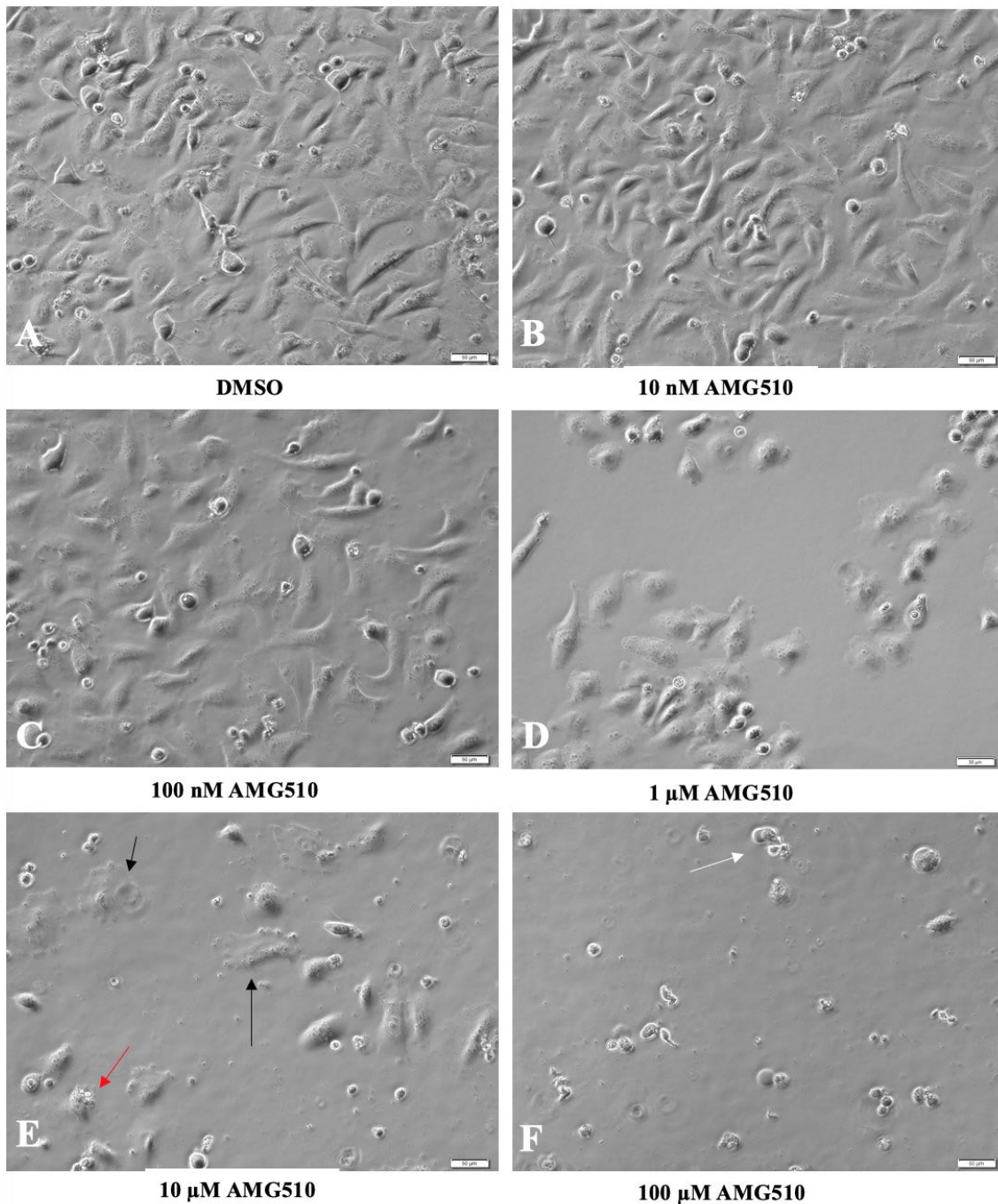


Abbildung 4.6 Einfluss von AMG510 auf die Morphologie von HCC-44 Zellen. Es wurden 1×10^5 HCC-44 Zellen in 100 mm Schale ausgesät und für 96 h mit 0,1 % DMSO (A) bzw. 10 nM - 100 μ M AMG510 (B - F) in DMEM komplett-Medium inkubiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Phasenkontrastaufnahmen ($n = 3$). Der rote Pfeil in E zeigt eine apoptotische Zelle. Die schwarzen Pfeile in E zeigen die Spiegellei-ähnliche Morphologie. Die weißen Pfeile in F zeigen tote Zellkugeln. Ein Maßstab ist unten rechts dargestellt ($\cong 50 \mu\text{m}$).

Die Bestimmung der Toxizität von AMG510 diente als Grundlage für die Festlegung der Zielkonzentrationen zur Generierung der Inhibitor-resistenten Zellen. Die Zellzahlbestimmungen und die Dokumentation der morphologischen Veränderungen zeigten, dass die Behandlung mit AMG510 über 96 h einerseits bei allen untersuchten Zelllinien zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Proliferation führt (Abbildung 4.7). In der Probe mit 100 μ M AMG510 sind kaum noch lebende, adhärenente Zellen nachweisbar und es sind durchschnittlich weniger als 4 % der Zellen adhärenent (MiaPaCa-2: 1,03 % $\pm$ 1 %; n=4, HCC-44: 3,5 % $\pm$ 1,04 %; n = 3 und H358: 2,73 % $\pm$ 2,69 %; n = 5).

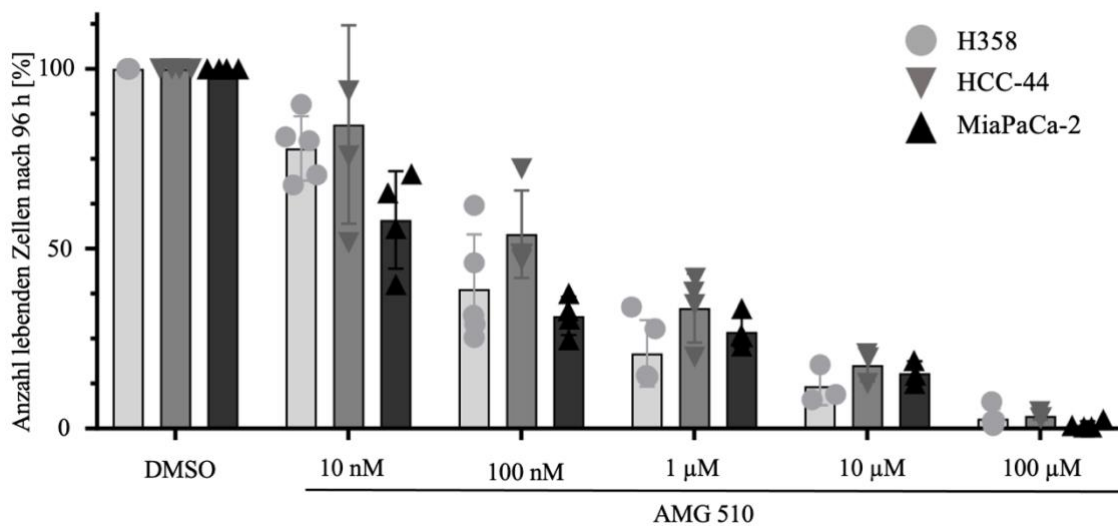


Abbildung 4.7 Vergleichende Darstellung des prozentualen Anteils der abgehefteten Zellen. Das Säulendiagramm zeigt den durchschnittlichen prozentualen Anteil der abgehefteten Zellen mit steigender Inhibitorkonzentration, im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO = 100 %, aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Hierbei zeigt sich eine kontinuierliche Abnahme der Zellzahl nach 96 h in Abhängigkeit von der AMG510 Konzentration in allen Zelllinien (n = siehe Tabelle 4.1).

Bei den MiaPaCa-2-Pankreaskarzinomzellen kommt es bereits bei einer Konzentration von 10 nM AMG510 zu einer starken Abnahme der Lebendzellzahl, wobei 57,98 % (SD: 13,54 %; n = 4) der Zellen im Vergleich zur Kontrolle adhären sind. Bei den Lungenkarzinomzelllinien kommt es erst bei 1 µM AMG510 zu einer Abnahme der abgehefteten Zellen unter 50 %. Die prozentualen Angaben sind in der Tabelle 4.1 dargestellt. Darüber hinaus gibt es Unterschiede in der Zellmorphologie der untersuchten Zelllinien. Abbildung 4.8 zeigt eine vergleichende Darstellung bei 10 µM AMG510. Während die MiaPaCa-2 und HCC-44-Zellen mit steigender Inhibitorkonzentration eine größere runde, an ein Spiegelei erinnernde Morphologie entwickeln, werden die H358-Zellen deutlich kleiner und runder als die Kontrollzellen.

Tabelle 4.1 Prozentuale Angabe abgehefteter Zellen. Die Tabelle zeigt den relativen Anteil abgehefteter, lebenden Zellen in %, im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO = 100 % nach 96 h Behandlung mit AMG510. Eine kontinuierliche Abnahme der Zellzahl ist bei allen Zelllinien mit steigender Konzentration des Inhibitors AMG510.

96 h Inhibition AMG510	MiaPaCa-2	HCC-44	H358
DMSO	100 % (SD: 0 % ; n = 4)	100 % (SD: 0 % ; n = 4)	100 % (SD: 0 % ; n = 5)
10 nM	57,98 % (SD: 13,54 % ; n = 4)	84,49 % (SD: 27,56 % ; n = 4)	77,86 % (SD: 8,97 % ; n = 5)
100 nM	31,3 % (SD: 5,36 % ; n = 4)	54,01 % (SD: 12,17 % ; n = 4)	38,78 % (SD: 15,19 % ; n = 5)
1 µM	26,9 % (SD: 4,47 % ; n = 4)	33,45 % (SD: 9,58 % ; n = 4)	20,92 % (SD: 9,32 % ; n = 5)
10 µM	15,4 % (SD: 3,24 % ; n = 3)	17,63 % (SD: 4,49 % ; n = 3)	11,73 % (SD: 5,22 % ; n = 3)
100 µM	1,03 % (SD: 1 % ; n = 4)	3,5 % (SD: 1,04 % ; n = 3)	2,73 % (SD: 2,69 % ; n = 5)

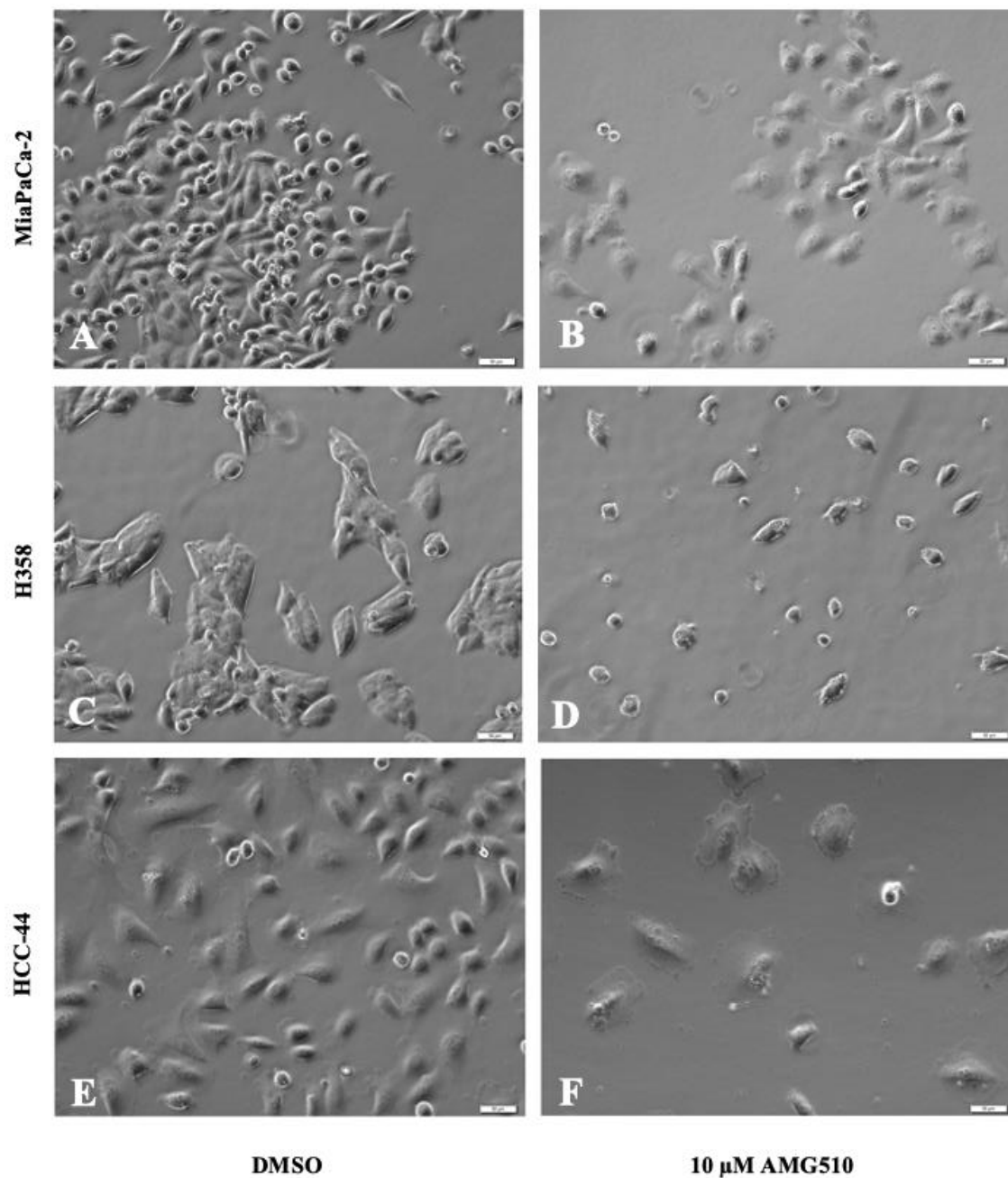


Abbildung 4.8 Morphologische Unterschiede bei einer Behandlung mit 10 μ M AMG510 für 96 h. Dargestellt sind die repräsentativen Phasenkontrastaufnahmen der Zelllinien MiaPaCa-2, HCC-44 und H358 unter Gabe von DMSO (A, C, E) und 10 μ M AMG510 (B, D, F). Ein Maßstab ist unten rechts dargestellt ($\cong 50 \mu$ m). n = 3

4.2 Einfluss von AMG510 auf Ras-abhängige Signalwege

Publizierte Daten [63-67] und unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe belegen einen Einfluss des Inhibitors AMG510 auf den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg. In Ergänzung zu den eigenen Beobachtungen dieser Arbeit, insbesondere des Einflusses auf die Proliferation und Morphologie, wurde der kurzzeitige Effekt von AMG510 auf den Ras/Raf/MEK/ERK- und den PI3-Kinase/AKT/mTORC1/S6K-Signalweg in Gesamtlysaten mittels Immunblottechnik analysiert. Die phosphorylierten Formen von ERK1/2 wurden analysiert, um einen Einfluss auf die Aktivität des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges nachzuweisen. Die Beeinflussung der Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 wurde als Markerprotein für den PI3-Kinase/AKT/mTORC1/S6K-Signalweg verwendet. Die Proteinmenge des Strukturproteins α -Tubulin wurde zur Kontrolle der Beladung der SDS-Polyacrylamidgele nachgewiesen. Zusätzlich wurde eine mögliche apoptotische Wirkung des Inhibitors durch die Detektion von *cleaved* Caspase 3 untersucht. MiaPaCa-2- und H358-Zellen wurden für einen Zeitraum von bis zu 96 h mit AMG510 inkubiert und anschließend lysiert. Die Veränderungen der Proteinexpression und Proteinphosphorylierung wurden mit spezifischen Antikörpern analysiert.

4.2.1 Beeinflussung der Proteinexpression und Aktivität durch AMG510 in MiaPaCa-2- und H358-Zellen

Die Abbildung 4.9 zeigt repräsentative Immunblots ($n = 3$) mit Lysaten der Zelllinien MiaPaCa-2 und H358. Auf der rechten Seite der Abbildung 4.9 ist die Quantifizierung der Signalintensitäten aus drei unabhängigen Versuchen mit H358- und MiaPaCa-2-Zellen, dargestellt als Balkendiagramm mit Mittelwert der relativen Intensität $\pm$ Standardabweichung (SD). Die ermittelten Werte sind jeweils auf die DMSO-Kontrolle (= 100 %) normiert.

In beiden Zelllinien führte die Behandlung mit AMG510 zu einer reduzierten Phosphorylierung von ERK1/2, jedoch bleibt die Expression von ERK1/2 unbeeinflusst. In den MiaPaCa-2-Zellen lag die pERK1/2-Menge nach 24 h bei $21,33 \% \pm 11,93 \%$ (10 nM) bzw. $58,67 \% \pm 54,63 \%$ (1 μ M). Zu dem Zeitpunkt 48 h zeigte sich bei 10 nM ein pERK1/2 Gehalt von $64,67 \% \pm 15,01 \%$ und bei 1 μ M von $77 \% \pm 33,78 \%$. Bei 72 h lag der Wert bei $70,33 \% \pm 37,61 \%$ (10 nM) und nach 96 h bei $44,33 \pm 10,12 \%$ (10 nM).

Auch in H358-Zellen war eine Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 zu beobachten. Hier lagen die Werte nach 24 h bei $4,73 \% \pm 1,01 \%$ (10 nM) und bei $59,7 \% \pm 60,65 \%$ (1 μ M), nach 48 h bei $19,17 \pm 5,95 \%$ (10 nM) und bei $28,69 \% \pm 18,69 \%$ (1 μ M), nach 72 h bei $75,83 \% \pm 49,9 \%$ (10 nM) und nach 96 h bei $63,07 \% \pm 21,97 \%$ (10 nM). Der Nachweis von ERK1/2 bleibt in allen Lysaten gleichmäßig, unabhängig von der Zugabe des Inhibitors AMG510 oder DMSO. Die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 zeigte in beiden Zelllinien initial eine Reduktion, gefolgt von einem teils deutlichen Anstieg im Verlauf. In MiaPaCa-2-Zellen lag die relative pS6/S6-Intensität nach 24 h bei $64 \% \pm 35 \%$ (10 nM) bzw. $96,67 \% \pm 38,53 \%$ (1 μ M), nach 48 h bei $354,3 \% \pm 135,3 \%$ (10 nM) und $135,5 \% \pm 55,86 \%$ (1 μ M; n = 2), nach 72 h bei $135 \% \pm 134,8 \%$ (10 nM) und nach 96 h bei $119,3 \% \pm 68,66 \%$ (10 nM). Die pS6/S6-Intensität der H358-Zellen lag nach 24 h bei $46,67 \% \pm 65,62 \%$ (10 nM) bzw. $87,67 \pm 75,06 \%$ (1 μ M) sowie nach 48 h bei $99 \% \pm 108,4 \%$ (10 nM) und $84,7 \pm 37,31 \%$ (1 μ M). Nach einem Zeitraum von 72 h stieg die Phosphorylierung auf $231 \% \pm 151,3 \%$ (10 nM) und nach 96 h auf $263,7 \% \pm 195,7 \%$ (10 nM) an. Der Nachweis von S6 ist in allen Lysaten konstant. Zu der Untersuchung möglicher apoptotischer Prozesse wurde *cleaved* Caspase 3 (cC3) analysiert. Hierbei diente eine 3-stündige Inkubation mit 1 μ M Staurosporin, als positive Kontrolle (nicht abgebildet). Nach der Behandlung mit 1 μ M AMG510 konnte cC3 in den beiden Zelllinien zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h detektiert werden, jedoch zeigt sich kein Nachweis zu den Zeitpunkten 72 h und 96 h.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die AMG510-Behandlung in den MiaPaCa-2- und H358-Zellen zu einer reduzierten Phosphorylierung von ERK1/2 führt, jedoch nimmt die Reduktion mit steigender Inkubationsdauer ab. Ebenfalls zeigt die Phosphorylierung des Proteins S6 eine initiale Suppression und weist nachfolgend einen Anstieg auf, insbesondere ab dem Zeitpunkt 72 Stunden. Der Nachweis von *cleaved* Caspase 3 zeigt eine zeitlich begrenzte Aktivierung von apoptotischen Prozessen durch die Behandlung mit AMG510. Die beobachteten zum Teil hohen Standardabweichungen können sich sowohl durch technische Einflüsse (z. B. Unterschiede in Proteinbeladung oder Antikörperbindung), als auch durch zelluläre Anpassungsmechanismen wie kompensatorische Signalwege oder *feedback* Reaktivierung erklären lassen. Insgesamt bestätigen die Daten, dass AMG510 einen kurzzeitigen Einfluss auf die Ras/Raf/MEK/ERK- und PI3-Kinase/AKT/mTORC1/S6K-Signalwege in K-Ras(G12C)-exprimierende Zelllinien hat.

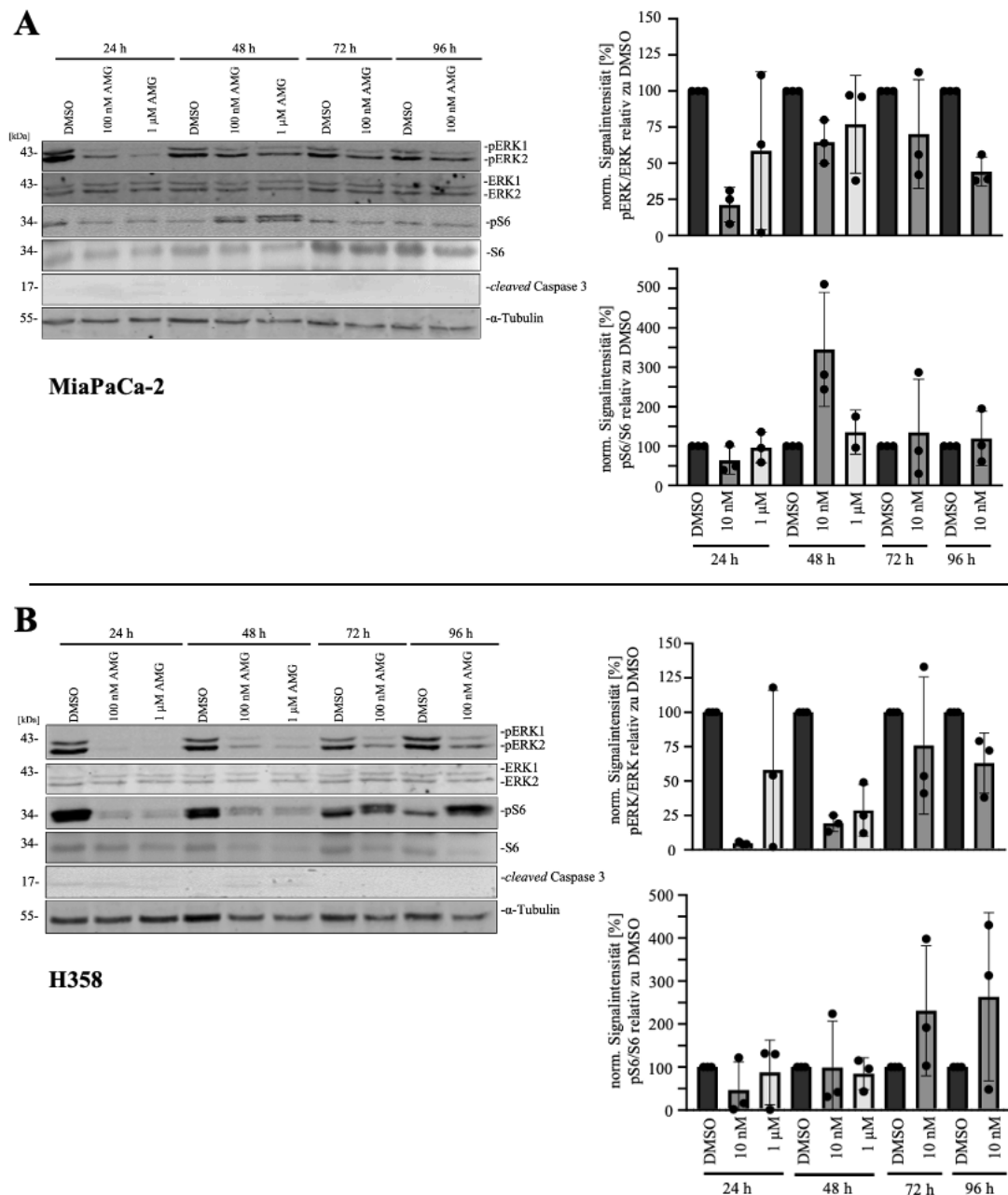


Abbildung 4.9: Beeinflussung der Proteinphosphorylierung und Proteinexpression durch AMG510 in MiaPaCa-2- und H358-Zellen. MiaPaCa-2- und H358-Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit 0,1 % DMSO in Komplettmedium über einen Zeitraum von 24 h bis 96 h mit AMG510 behandelt und anschließend in RIPA-Puffer lysiert. In einer Probe wurde Apoptose durch die Zugabe von 1 μM Staurosporin für 3 h induziert. Die Expression von pERK1/2, ERK1/2, pS6, S6, *cleaved* Caspase 3 und α-Tubulin als Ladungskontrolle wurden über spezifische Antikörper über spezifische Antikörper im Odyssey-Imaging System nachgewiesen. In (A) sind die Ergebnisse für die MiaPaCa-2-Zellen und in (B) die Ergebnisse für die H358-Zellen dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen die densitometrische Quantifizierung der relativen Signalintensitäten. Die Verhältnisse von pERK zu ERK bzw. pS6 zu S6 wurden berechnet und normalisiert auf die DMSO-Kontrolle der jeweiligen Zelllinie, die gleich 100 % gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Signalintensität ± SD (n = 3).

4.3 Generierung von Inhibitor-resistenten Zellklonen mittels der „increasing drug dose method“

4.3.1 Charakterisierung der Proliferation von resistenten MiaPaCa-2-Zellen

Für die Generierung von inhibitorresistenter Zellklone mittels „increasing drug dose method“ wurden die humanen Zelllinien MiaPaCa-2 und H358 ausgewählt. Von jeder Zelllinie wurden zwei Kulturen (A und B) angelegt, um Vergleiche anstellen zu können. Den Zellen wurde eine festgelegte Konzentration, beginnend mit 1 nM des Inhibitors AMG510 bzw. MRTX849 mit jedem Mediumwechsel hinzugegeben und diese mit dem Passagieren halb-logarithmisch erhöht. Das Passagieren erfolgte, wenn die Zellkultur eine Konfluenz von 95 % erreicht hatte. Die Kontroll-Kulturen erhielten DMSO in vergleichbarer Menge. Bei jedem Umsetzen der Zellen wurden die Zellen jeder Schale gezählt und die Zeit bis zum Erreichen der Konfluenz dokumentiert, um proliferative Unterschiede feststellen zu können. Zudem erfolgt während des Generierens der Zellklone eine Fotodokumentation, um morphologische Veränderungen festzuhalten. Bedingt durch den Versuchsaufbau zur Generierung der resistenten Zellklone gibt es für jede Konzentration nur eine Stichprobe ($n = 1$), außer wenn die Reihen A und B zusammengefasst werden ($n = 2$). Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Begriff ‚Zellklon‘ handelt es sich um diejenige Zellpopulation, die die Behandlung mit der entsprechenden Inhibitorkonzentration überlebt hat. Die Abbildung 4.10 zeigt die Mittelwerte der Zellzahlen der AMG510-resistenten MiaPaCa-2 (MiaPaCa-2^{resist}) Zellklone A und B. Der Mittelwert der DMSO-Kontrollen beträgt $1,97 \times 10^7$ Zellen (SD: $0,42 \times 10^7$ Zellen; $n = 24$) pro 10 cm Schale. Der Mittelwert der Zellzahl sinkt bei Zugabe von 10 nM AMG510 auf $1,5 \times 10^7$ Zellen ($n = 2$) pro 10 cm Schale. Bei einer Konzentration von 50 nM AMG510 halbiert sie sich auf 1×10^7 Zellen ($n = 2$) pro 10 cm Schale. Bis zu einer Konzentration von 1 μ M AMG510 nimmt die Zellzahl kontinuierlich ab, danach stabilisiert sich die Zellzahl bei einem Mittelwert von $0,49 \times 10^7$ Zellen (A und B: 1 μ M – 10 μ M AMG510, SD: $0,06 \times 10^7$ Zellen; $n = 12$) pro 10 cm Schale.

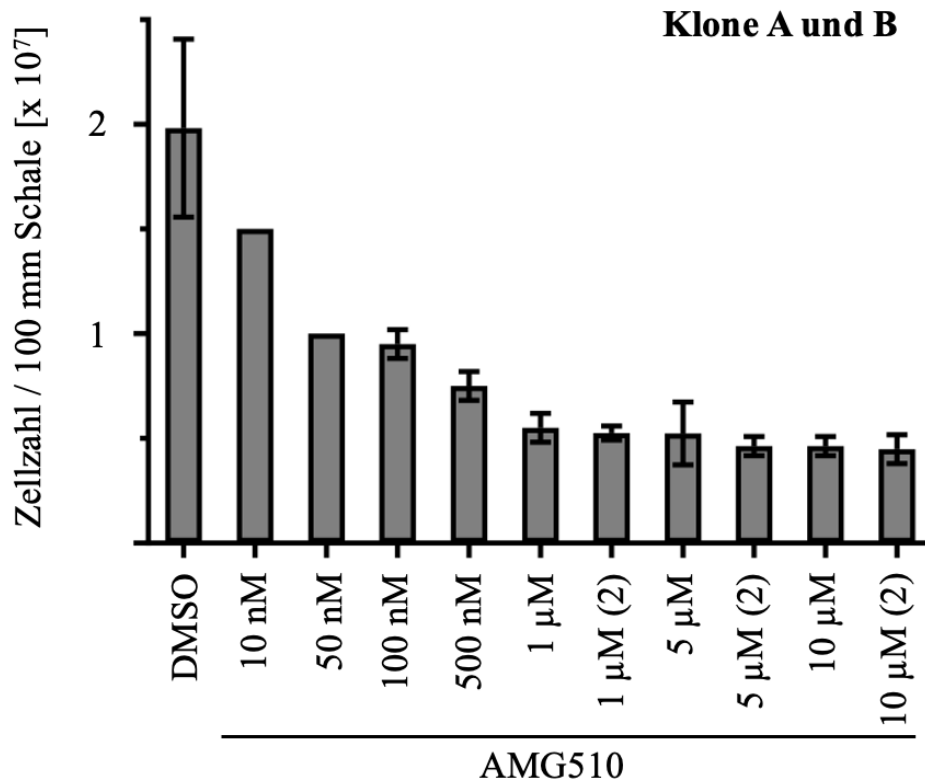


Abbildung 4.10 Abnahme der Zellzahl der MiaPaCa-2^{resist}-Zellklone mit steigender AMG510 Konzentration. Das Säulendiagramm zeigt den Mittelwert der Zellzählungen der gegen AMG510-resistenten MiaPaCa-2 Zellklone A und B. Die Zellen aus einer 100 mm Schale wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 95 % abtrypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Die Werte für die Klone A und B wurden gemittelt. Die (2) steht für eine weitere Passage mit der Inhibitorbehandlung von 1 µM, 5 µM bzw. 10 µM AMG510. (DMSO: n = 24, 10 nM – 10 µM AMG510: n = 2).

Die Abnahme der Zellzahl ist auch in den in Abbildung 4.11 dargestellten Fotografiken zu erkennen. Darüber hinaus zeigt sich, dass ab einer Konzentration von 50 nM AMG510 (C) die Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (D) eine Größenzunahme erfahren. Bei einer Konzentration von 10 µM AMG510 (G) unterscheidet sich die Zellgröße im Vergleich zu 1 µM AMG510 (E) nicht. Im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO nehmen die Zellen eine ausgedehnte, flache Morphologie an und zeigen nicht mehr die typische kleine und eher längliche Morphologie wie in der Kontrolle (B, D, F, H). Es bilden sich ebenfalls keine übereinanderliegenden Schichten wie in der DMSO-Kontrolle (B, D, F, H).

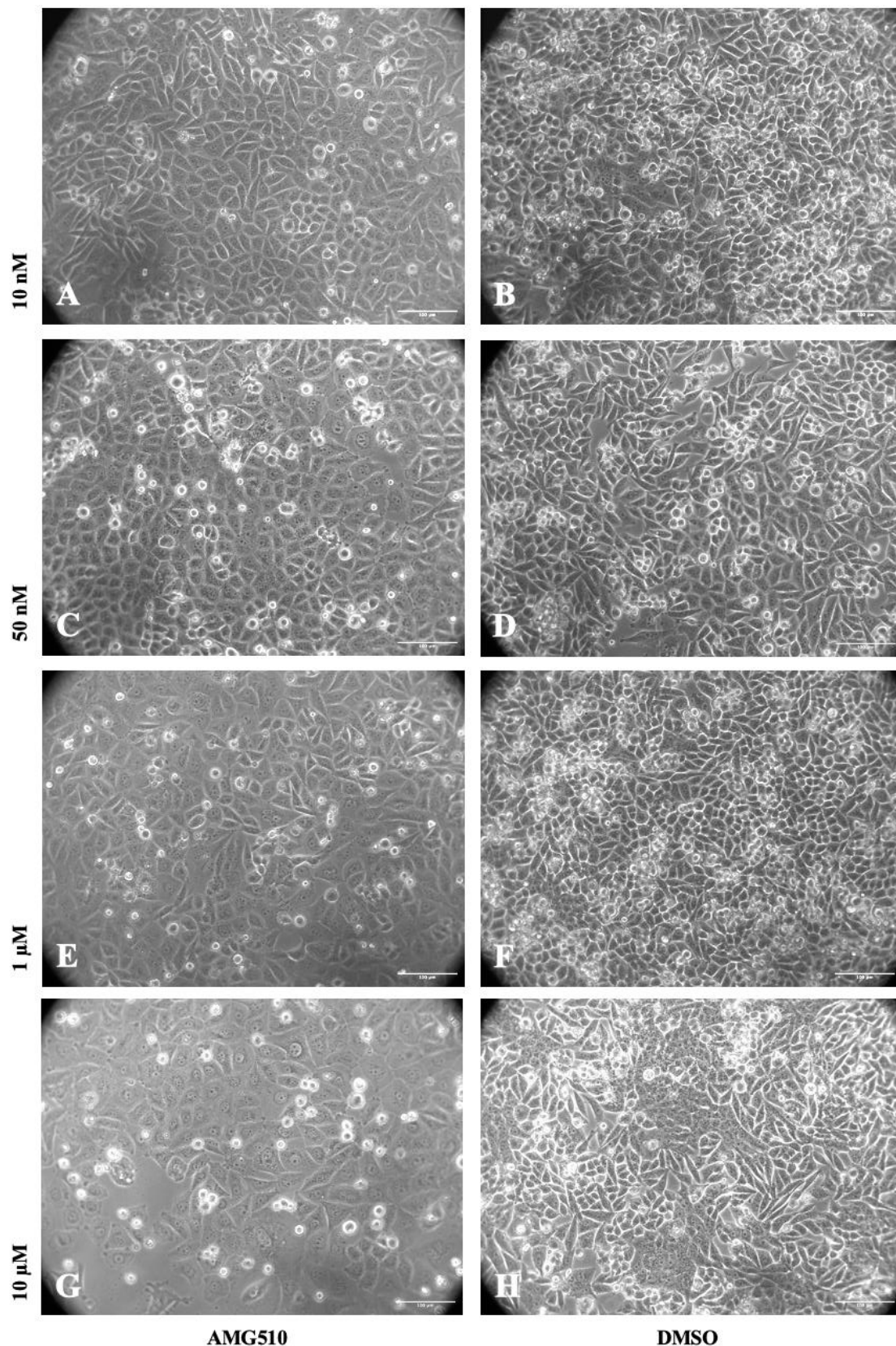


Abbildung 4.11 Morphologische Veränderungen der AMG510-resistenten MiaPaCa-2-Zellklone. Dargestellt sind exemplarische Phasenkontrastaufnahmen der AMG510-resistenten MiaPaCa-2 Zellklone (A, C, E, G) und der entsprechenden DMSO-Kontrolle (B, D, F, H). Ein Maßstab ist unten rechts dargestellt ($\cong 100 \mu\text{m}$). $n = 2$

Die Behandlung der MiaPaCa-2 Pankreaskarzinomzellen zur Generierung resistenter Zellklone mit dem zweiten K-Ras(G12C)-Inhibitor MRTX849 erfolgt analog zur Behandlung mit AMG510. Abbildung 4.12 zeigt die Mittelwerte der Zellzahl der MRTX849 MiaPaCa-2^{resist}-Zellklone A und B pro 10 cm Schale. Im Vergleich zu der Kontrolle sinkt die Zellzahl bei einer Konzentration von 50 nM MRTX849 auf weniger als die Hälfte, konkret auf $0,85 \times 10^7$ Zellen (SD: $0,05 \times 10^7$ Zellen; $n = 2$). Eine weitere Abnahme erfolgt mit steigender Inhibitorkonzentration: Bei 5 μ M MRTX849 sinkt die Zellzahl auf $0,45 \times 10^7$ Zellen (SD: $0,05 \times 10^7$ Zellen; $n = 2$) pro 10 cm Schale. Die Bestimmung des Wertes bei einer Konzentration von 10 μ M MRTX849 war aufgrund der zeitlichen Limitation der Arbeit nicht möglich.

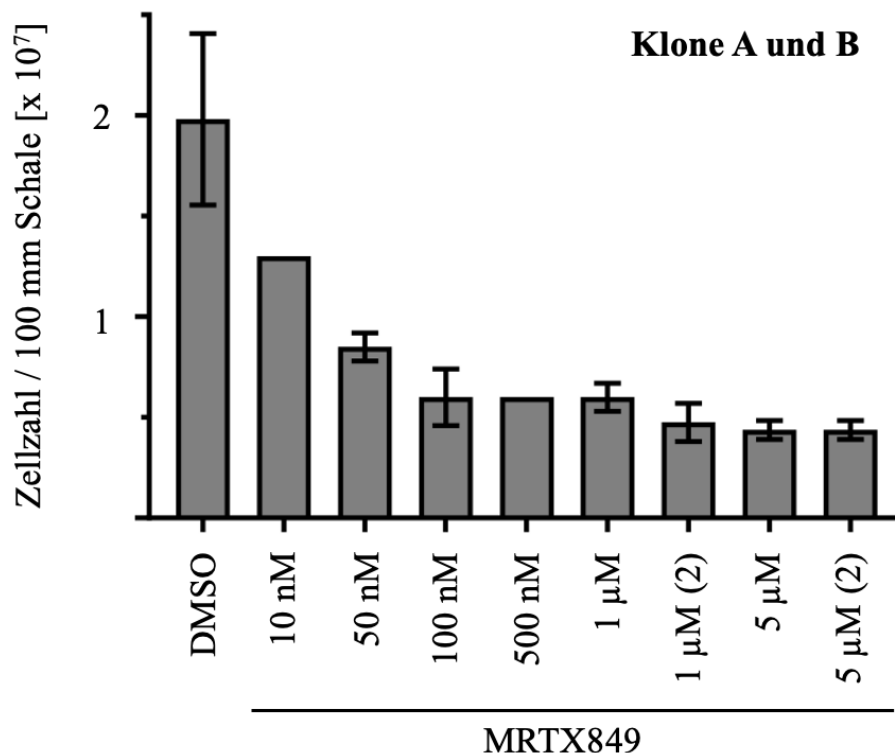


Abbildung 4.12: Abnahme der Zellzahl der MiaPaCa-2^{resist}-Zellklone mit steigender MRTX849 Konzentration. Das Säulendiagramm zeigt den Mittelwert der Zellzählungen der MRTX849-resistenten MiaPaCa-2-Zellklone A und B. Die Zellen aus einer 100 mm Schale wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 95 % abtrypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Die Werte für die Klone A und B wurden gemittelt. Die (2) steht für eine weitere Passage der Inhibitorbehandlung mit 1 μ M bzw. 5 μ M (DMSO: $n = 24$, 10 nM – 5 μ M MRTX849: $n = 2$).

Bezüglich der MRTX849-induzierten morphologischen Veränderungen konnten in den Gruppen A und B folgende Befunde erzielt werden. Abbildung 4.13 zeigt, dass MiaPaCa-2^{resist}-Zellklone bei 50 nM MRTX849 (C) eine ausgebreitete, flache Morphologie

aufweisen, ähnlich dem Phänotyp der gegen 50 nM AMG510-resistenten MiaPaCa-2-Zellen ((C) in Abbildung 4.11). Diese Veränderung ist bei 1 μ M MRTX849 noch deutlicher ausgeprägt (E). Bei einer Konzentration von 5 μ M MRTX849 werden die Zellen zusätzlich deutlich länger und bilden teilweise eine spindelförmige Morphologie aus (E).

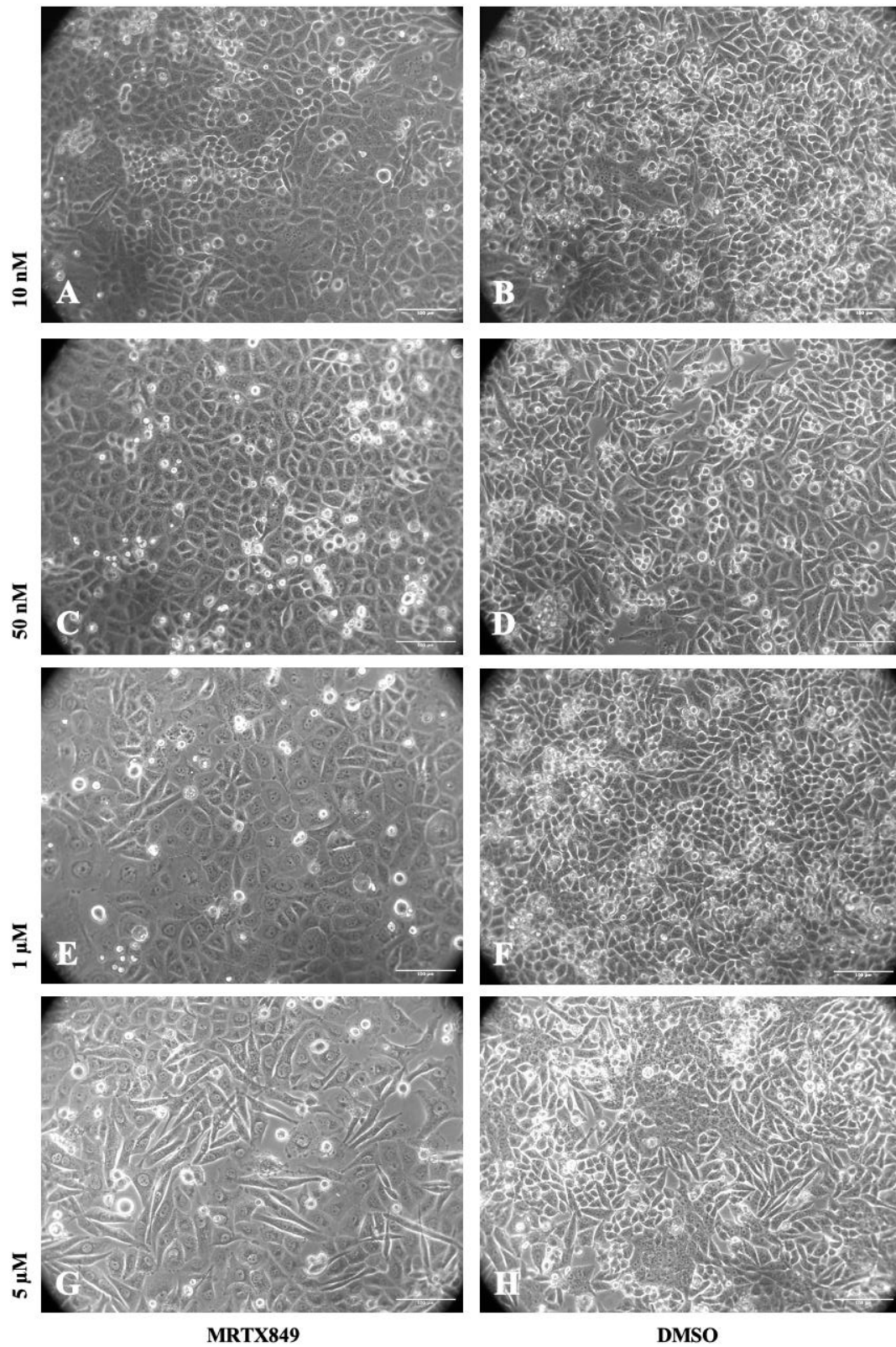


Abbildung 4.13 Morphologische Veränderungen der MRTX849-resistenten MiaPaCa-2-Zellklone. Dargestellt sind exemplarische Phasenkontrastaufnahmen der MRTX849-resistenten MiaPaCa-2 Zellklone (A, C, E, G) und der entsprechenden DMSO-Kontrolle (B, D, F, H). Ein Maßstab ist unten rechts dargestellt ($\cong 100 \mu\text{m}$). $n = 2$

Zusammenfassend zeigen die erhobenen Daten, dass die gegen AMG510- und MRTX849-resistenten MiaPaCa-2-Zellklone deutliche morphologische Veränderungen aufweisen, insbesondere eine Größenzunahme. Diese Größenzunahme könnte zu der in den Abbildung 4.10 und Abbildung 4.12 dargestellt Abnahme der Zellzahl beitragen.

4.3.2 AMG510- bzw. MRTX849-induzierte Veränderungen in der Proliferationsrate

Um AMG510- bzw. MRTX849-induzierte Veränderungen in der Proliferationsrate der resistenten Zellklone zu bestimmen, wurde neben der Zellzahl bei 95 %-Konfluenz auch die Zeit bis zum Erreichen der Konfluenz bestimmt. In Abbildung 4.14 (A) ist die Zeit der einzelnen Passagen der AMG510-resistenten MiaPaCa-2^{resist}-Zellklone (A und B) bis zum Erreichen von 95 % Konfluenz dargestellt. Die Zellzahlen der Zellklone A und B waren vergleichbar und wurden für die nachfolgenden Auswertungen gemittelt. Für die DMSO-Kontrolle konnte ein Mittelwert 6,2 Tagen (SD: 0,88 Tage; n = 24) bis zum Erreichen der gewünschten Konfluenz ermittelt werden. Während der Behandlung mit dem Inhibitor AMG510 benötigten die Zellen, gemittelt über alle Passagen und Konzentrationen 6,4 Tage (SD: 0,7 Tage; n = 24). Die Daten für die MRTX849-resistenten MiaPaCa-2-Zellklone sind in Abbildung 4.14 (B) gezeigt. Der Mittelwert für das Erreichen der 95 %-Konfluenz bei einer Konzentration von 1 nM bis 500 nM MRTX849 beträgt 6,3 Tage (SD: 0,47 Tage; n = 12). Bei 1 µM MRTX849 erhöht sich die Zeit bis zum Erreichen der Konfluenz auf 7,5 Tage (SD: 1,5 Tage; n = 4) und bei 5 µM MRTX849 verdreifacht sich die Zeit auf 20,75 Tage (SD: 6,22 Tage; n = 4) im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle.

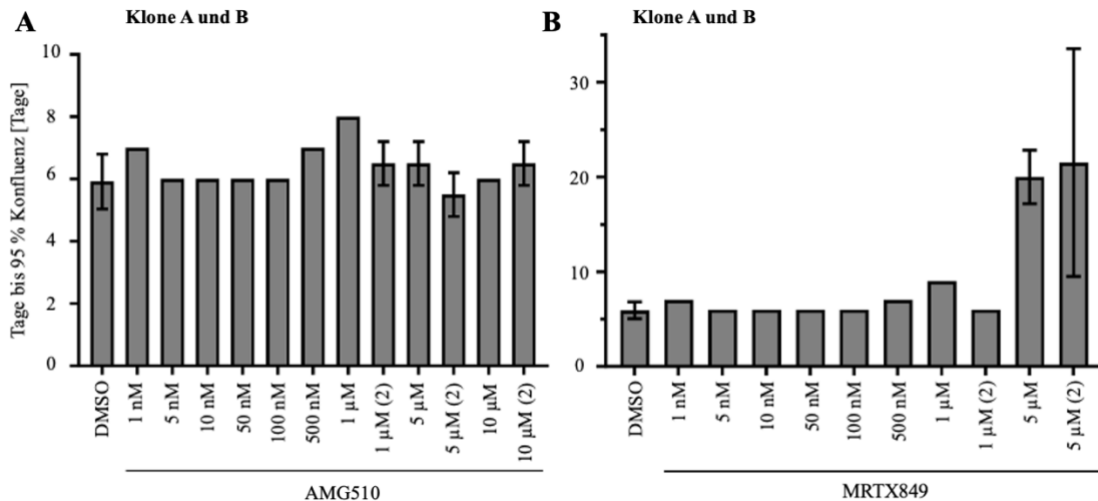


Abbildung 4.14: Proliferationsrate der resistenten MiaPaCa-2-Zellklone. Das Säulendiagramm zeigt in (A) die Zeitspanne der gegen AMG510 resistenten MiaPaCa-2 Zellklone A und B zum Erreichen von 95 % Konfluenz. (B) zeigt die Zeitspanne der gegen MRTX849 resistenten MiaPaCa-2 Zellklone A und B bis zum Erreichen der 95 % Konfluenz. Die Zellklone aus einer 100 mm Schale wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 95 % abtrypsiniert und die Tage bis zu dem Erreichen der Konfluenz bestimmt. Die Werte für die Klone A und B wurden gemittelt. Die (2) steht für eine weitere Passage der Inhibitorbehandlung mit 1 µM, 5 µM oder 10 µM AMG510/MRTX849. (DMSO: n = 24, MiaPaCa-2^{resist} je Passage: n = 2). Standardabweichungen sind ab n = 3 angegeben.

Aus den ermittelten Daten zur Zellzahl bei 95 % Konfluenz und der Zeit bis zum Erreichen der Konfluenz von 95 % wurde die Verdopplungszeit berechnet, um einen Zusammenhang zwischen Abnahme der Zellzahl, der Zunahme der Zellgröße und der Verlängerung der Zeit bis zum Erreichen der Konfluenz herzustellen. Zur Berechnung wurde das Programm GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) verwendet und die Verdopplungszeit anhand der erhaltenen Daten und der Formel für exponentielles Wachstum ($Y=Y_0 \cdot \exp(k \cdot x)$) berechnet.

Die Abbildung 4.15 zeigt die Verdopplungszeit der gegen AMG510-resistenten MiaPaCa-2-Zellklone der Gruppe A in Stunden. Die Verdopplungszeiten der Klone der Gruppe B zeigen eine gleiche Tendenz. Für die DMSO-Kontrollzellen A und B wurde ein Mittelwert der Verdopplungszeit von 31,16 h ($\pm 0,51$ h) berechnet (n = 12). Bei einer AMG510 Konzentration von 1 nM sind es 30,8 h (n = 1) und bei 10 nM 29,35 h. Diese Zeiten sind vergleichbar mit der Verdopplungszeit der DMSO-Kontrolle (n = 12). Ab 100 nM AMG510 kommt es zu einem Anstieg, der sich bei 1 µM AMG510 auf 42 h (n = 1) fortsetzt und bei 10 µM AMG510 das untersuchte Maximum von 45,43 h (n = 1) erreicht. Dies entspricht einer Steigerung um 145,8 % gegenüber der DMSO-Kontrolle (Verdopplungszeiten von Gruppe B: 1 nM: 25,78 Stunden, 10 nM: 29,35 Stunden, 100 nM: 34,53 Stunden, 1 µM: 50,57 Stunden, 10 µM: 44,34 Stunden (n = 1)).

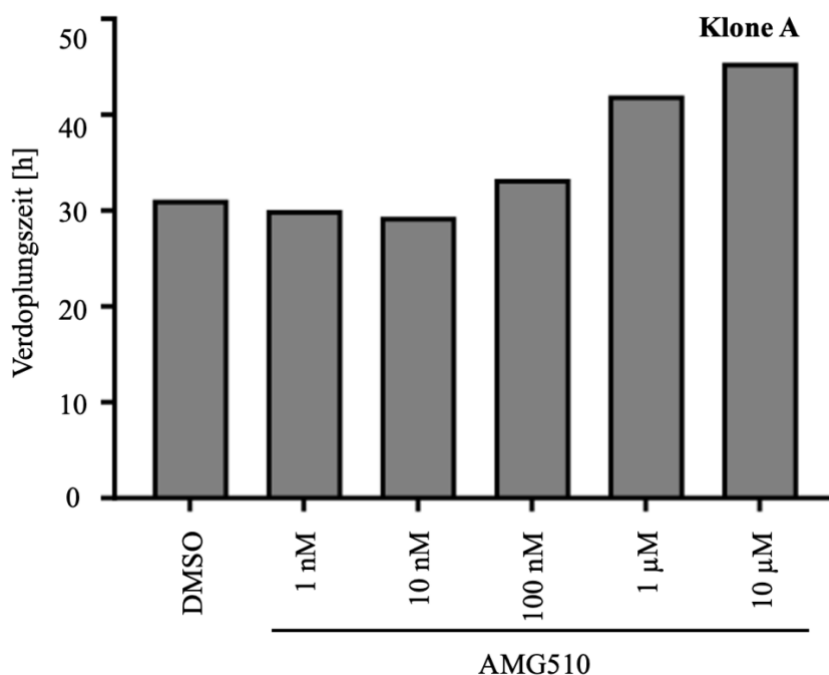


Abbildung 4.15 Verdopplungszeit der AMG510-resistenten MiaPaCa-2-Zellklone. Das Säulendiagramm zeigt die Verdopplungszeit der AMG510-resistenten MiaPaCa-2 Zellklone A. Aus den Daten der Zellzählung und der Tage bis zum Erreichen der Konfluenz wurden mit der Formel zum exponentiellen Wachstum ($Y=Y_0 \cdot \exp(k \cdot x)$) die Verdopplungszeiten berechnet. (DMSO: $n = 12$, AMG510: jeweils $n = 1$)

Die Verdopplungszeiten der MiaPaCa-2-Pankreaskarzinomzellklone der Reihe A mit einer Resistenz gegen MRTX849 sind in der Abbildung 4.16 dargestellt. Der Mittelwert der Verdopplungszeit der DMSO-Kontrolle beträgt 31,16 h ($\pm 0,51$ h) ($n = 12$). Die Verdopplungszeiten der Klone der Reihe B zeigen die gleiche Tendenz. Bei einer Konzentration von 1 nM und 10 nM MRTX849 weisen die Zellklone eine Verdopplungszeit von 29,47 h ($n = 1$) und 30,64 h ($n = 1$) auf. Bei einer Konzentration von 100 nM MRTX849 steigt sie auf 37,82 h ($n = 1$). Sie steigt auf 58,37 h ($n = 1$) bei 1 µM MRTX849 an und erreicht 136,1 h ($n = 1$) bei 5 µM MRTX849, was einer Vervierfachung der Verdopplungszeit gegenüber der DMSO-Kontrolle entspricht (Verdopplungszeiten der Gruppe B: 1 nM: 26,07 Stunden, 10 nM: 30,64 Stunden, 100 nM: 43,35 Stunden, 1 µM: 62,44 Stunden, 5 µM: 171 Stunden ($n = 1$)).

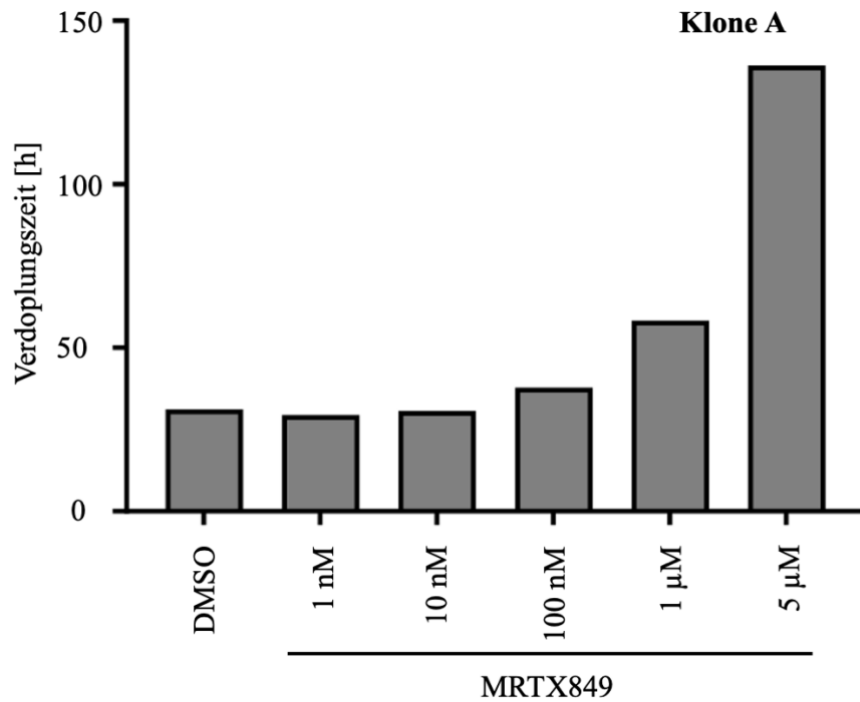


Abbildung 4.16 Verdopplungszeit der MRTX849-resistenten MiaPaCa-2-Zellklone. Das Säulendiagramm zeigt die Verdopplungszeit der gegen MRTX849 resistenten MiaPaCa-2 Zellklone A. Aus den Daten der Zellzählung und der Tage bis zum Erreichen der Konfluenz wurden mit der Formel zum exponentiellen Wachstum ($Y=Y_0 \cdot \exp(k \cdot x)$) die Verdopplungszeiten berechnet. (DMSO: $n = 12$, MRTX849: $n = 1$)

4.3.3 Charakterisierung der Proliferation von resistenten H358-Zellen

Die Charakterisierung der Proliferation der resistenten H358-Zellklone erfolgte analog zu den resistenten MiaPaCa-2-Zellen. In der Ergebnisdarstellung ist ein Wert für jede Konzentration dargestellt, außer wenn die Reihen A und B zusammengefasst werden, dann ergibt sich $n = 2$.

Die Abbildung 4.17 zeigt in **(A)** den Mittelwert der Zellzahlen der resistenten H358 (H358^{resist}) Zellklone A und B. Der Mittelwert der DMSO-Kontrolle beträgt $2,44 \times 10^7$ Zellen (SD: $0,46 \times 10^7$ Zellen; $n = 24$) pro 10 cm Schale. Der Mittelwert der Zellzahl erhöht sich bei einer Gabe von 10 nM AMG510 minimal auf $2,6 \times 10^7$ Zellen (SD: $0,1 \times 10^7$ Zellen; $n = 2$). Bei einer Konzentration von 50 nM AMG510 kommt es zu einer Abnahme der Zellzahl auf $1,65 \times 10^7$ Zellen (SD: $0,05 \times 10^7$ Zellen; $n = 2$). Bei 100 nM AMG510 sinkt der Mittelwert auf $0,7 \times 10^7$ Zellen (SD: $0,1 \times 10^7$ Zellen; $n = 2$) ab. Bei den folgenden Konzentrationen bis 10 μ M AMG510 stabilisiert sich die Zellzahl bei $1,2 \times 10^7$ Zellen (SD: $0,19 \times 10^7$ Zellen; $n = 14$). In Abbildung 4.17 **(B)** sind die Tage bis zu dem Erreichen der 95 %-Konfluenz der AMG510-resistenten H358-Zellen der Gruppe A und B dargestellt. Der Mittelwert bis zum Erreichen der Konfluenz der DMSO-Kontrolle beträgt 8,17 Tage (SD: 1,66 Tage ; $n = 24$). Bei den Konzentrationen 50 nM, 100 nM und 500 nM AMG510 kommt es zu einer deutlichen Verlängerung der Zeit. Bei 50 nM AMG510 beträgt der Mittelwert 14,5 Tage (SD: $\pm 1,5$ Tage; $n = 2$), 100 nM AMG510 sind es 13 Tage (SD: ± 4 Tage; $n = 2$) und bei 500 nM AMG510 sind es 16 Tage (SD: ± 3 Tage; $n = 2$). Der Mittelwerte für die Konzentrationen 1 μ M – 10 μ M AMG510 beträgt 9,6 Tage (SD: $\pm 2,13$ Tage; $n = 12$). Abbildung 4.17 **(C)** zeigt den Mittelwert der Verdopplungszeit der Reihe B. Diese beträgt für die DMSO-Kontrolle 38,66 h (SD: $\pm 0,45$ h ; $n = 12$). Bei 1 nM AMG510 kommt es zu einem Anstieg auf 43,7 h ($n = 1$) und bei 10 nM AMG510 auf 42,55 h ($n = 1$). Bei einer Konzentration von 100 nM AMG510 beträgt die Verdopplungszeit 122,8 h ($n = 1$), bei 1 μ M AMG510 75,6 h ($n = 1$) und bei 10 μ M AMG510 beträgt die Verdopplungszeit auf 82,56 h ($n = 1$). (Verdopplungszeiten der Gruppe A: DMSO : 38,66 h (SD: $\pm 0,45$ h ; $n = 12$), 1 nM : 45,1 h, 10 nM : 43,5 h, 100 nM : 74,31 h, 1 μ M : 38,08 h 10 μ M : 75,6 h ($n = 1$)).

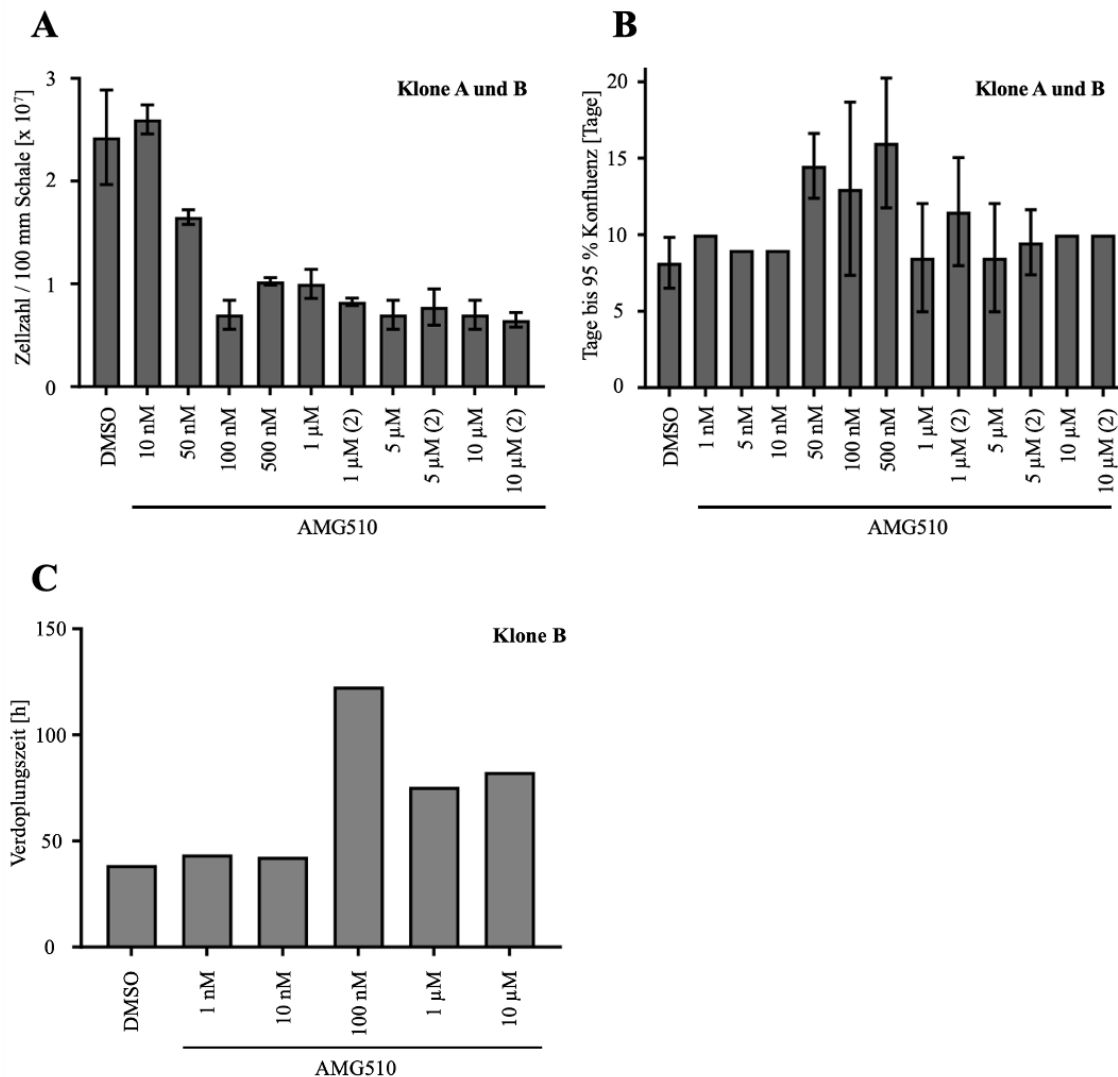


Abbildung 4.17 Charakterisierung der Proliferation der AMG510-resistenten H358-Zellklone. Die Zellzahl (A), die Tage bis zum Erreichen der 95 %-Konfluenz (B) und die Verdopplungszeit (C) wurden für die AMG510-resistenten H358^{resist}-Zellklone ermittelt. Die Werte der Klone A und B wurden gemittelt. (A) Das Säulendiagramm zeigt den Mittelwert der Zellzahlen der AMG510-resistenten H358-Zellklone. Die Zellen einer 100 mm Schale wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 95 % abtrypsinisiert und die Zellzahl bestimmt. (B) Das Säulendiagramm zeigt die Anzahl der Tage die bis zu dem Erreichen der 95 % Konfluenz in einer 100 mm Schale benötigt wurden. Die (2) steht für eine weitere Passage der Inhibitorbehandlung mit 1 μ M, 5 μ M oder 10 μ M AMG510. (DMSO: n = 24, 10 nM – 10 μ M AMG510: n = 2). (C) Das Säulendiagramm zeigt die Verdopplungszeit der gegen AMG510 resistenten H358-Zellklone B. Die Verdopplungszeit wurde aus den Daten der Zellzählung und den Tagen bis zur Konfluenz mit der Formel für exponentiellen Wachstum ($Y=Y_0 \cdot \exp(k \cdot x)$) berechnet. DMSO: n = 12, AMG510: n = 1.

Die Abbildung 4.18 zeigt in (A) die Mittelwerte der Zellzahlen der MRTX849-resistenten H358^{resist}-Zellklone A und B. Der Mittelwert der DMSO-Kontrolle liegt bei $2,44 \times 10^7$ Zellen (SD: $0,46 \times 10^7$ Zellen; n = 24) pro 10 cm Schale. Bei 10 nM MRTX849 beträgt der Mittelwert der Zellzahl $2,5 \times 10^7$ Zellen (SD: $0,7 \times 10^7$ Zellen; n = 2). Bei 50 nM MRTX849 sinkt die Zellzahl auf $1,15 \times 10^7$ Zellen (SD: $0,15 \times 10^7$ Zellen; n = 2) und bei 100 nM MRTX849 auf $0,95 \times 10^7$ Zellen (SD: $0,15 \times 10^7$ Zellen; n = 2). Das Diagramm

in Abbildung 4.18 **(B)** zeigt den Mittelwert der Zeit bis zu dem Erreichen der Konfluenz von 95 %. Der Mittelwert der DMSO-Kontrolle beträgt 8,17 Tage (SD: 1,66 Tage; n = 24). Die Zugabe des Inhibitors MRTX849 führt zu einer Verlängerung der Zeit. Bei einer Konzentration von 10 nM MRTX849 erhöht sich der Mittelwert auf 11 Tage (SD: 3 Tage; n = 2), bei 50 nM MRTX849 beträgt der Mittelwert 14 Tage (SD: 2 Tage; n = 2) und bei 100 nM MRTX849 verlängert sich die Zeitspanne um das Sechsfache auf 49,5 Tage (SD: 7,5 Tage; n = 2). Das Diagramm in Abbildung 4.18 **(C)** zeigt repräsentativ die Verdopplungszeiten der MRTX849-resistenten H358-Zellen der Reihe B. Die Verdopplungszeiten der Reihe A zeigen eine gleiche Tendenz. Die Verdopplungszeit der DMSO-Kontrolle beträgt 38,66 Stunden (SD: ($\pm$ 0,45 h) n = 12). Es kommt verglichen zur Kontrolle bei 1 nM MRTX849 zu einem Anstieg auf 45,1 h (n = 1) und setzt sich bei 10 nM MRTX849 auf 74,8 h (n = 1) fort. Bei einer Konzentration von 100 nM MRTX849 kommt es zu einem starken Anstieg der Verdopplungszeit auf 303,4 h (n = 1). (Die Verdopplungszeiten der Gruppe A sind wie folgt: DMSO : 38,66 h (n = 12), 1 nM : 65,55 h, 10 nM : 69,46 h, 100 nM : 393,5 h (n = 1)). Eine weitere Dokumentation der Veränderung der Zellzahl bei höheren Konzentrationen von MRTX849 war im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

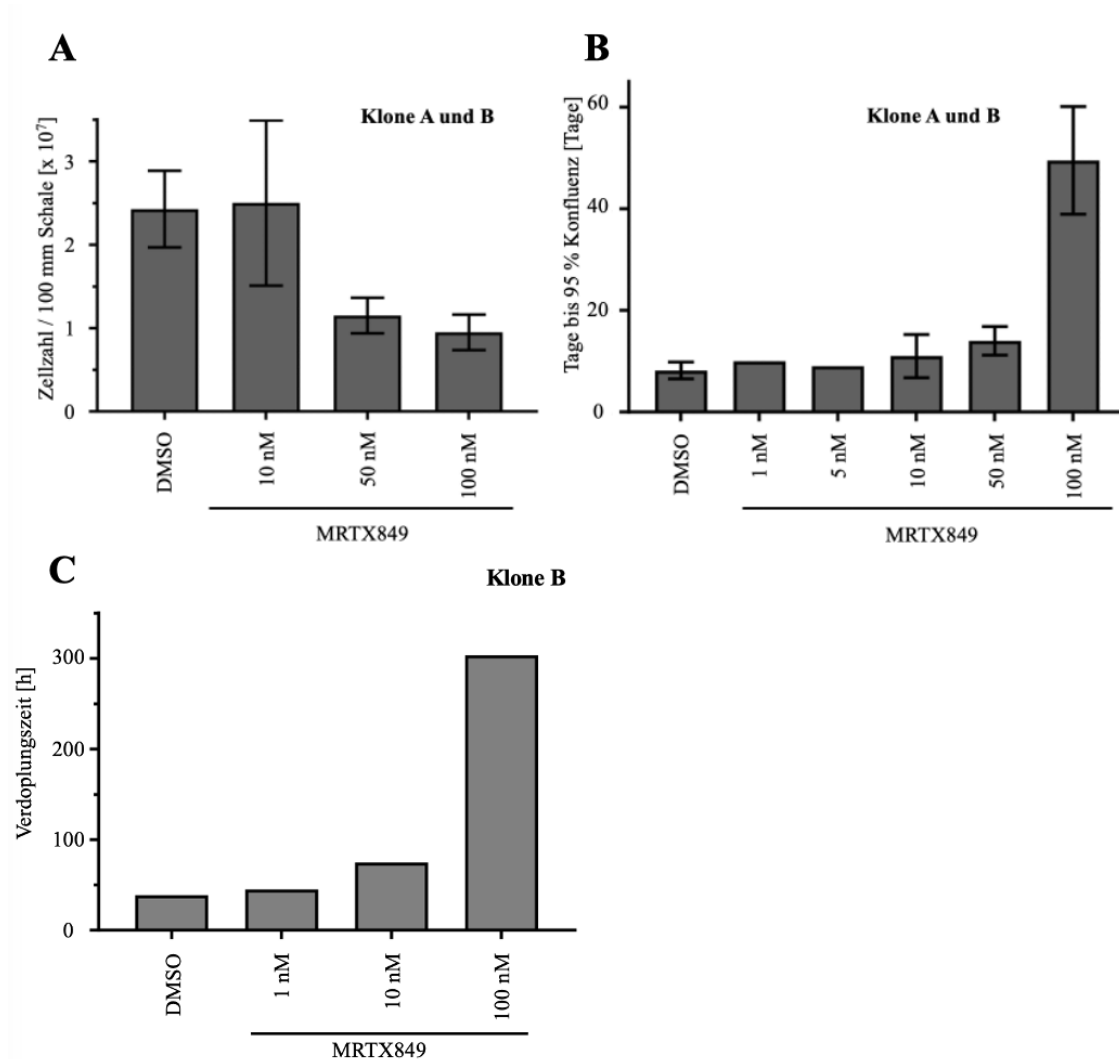


Abbildung 4.18 Charakterisierung der Proliferation der MRTX849-resistenten H358-Zellklone. Die Zellzahl (A), die Tage bis zum Erreichen der 95 %-Konfluenz (B) und die Verdopplungszeit (C) wurden für die MRTX849-resistenten H358^{resist}-Zellklone ermittelt. (A) Das Säulendiagramm zeigt den Mittelwert der Zellzählungen der MRTX849-resistenten H358-Zellklone Reihe A und B. Die Zellen einer 100 mm Schale wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 95 % abtrypsinisiert und die Zellzahl bestimmt. (B) Das Säulendiagramm zeigt die Anzahl der Tage die bis zu dem Erreichen der 95 % Konfluenz in einer 100 mm Schale benötigt wurden. (DMSO: n = 24, 1 nM – 100 nM MRTX849: n = 2). (C) Das Säulendiagramm zeigt die Verdopplungszeit der MRTX849-resistenten H358-Zellklone Reihe B. Die Verdopplungszeit wurde aus den Daten der Zellzählung und Tage bis Konfluenz mit der Formel zum exponentiellen Wachstum ($Y=Y_0 \cdot \exp(k \cdot x)$) berechnet. DMSO: n = 12, MRTX849: n = 1.

Neben den Veränderungen der Proliferation, zeichnen sich auch die resistenten H358-Zellklone durch morphologische Veränderungen aus. In der Abbildung 4.19 sind die morphologischen Veränderungen der AMG510 H358^{resist} dargestellt. Bei den Kontrollzellen (B) und den 10 nM AMG510-resistenten Zellen (A) zeigt sich ein kleiner, kompakter Phänotyp, der sich in Cluster angeordnet. Erste morphologische Veränderungen sind ab einer Konzentration von 50 nM AMG510 (C) im Vergleich zur

passagenentsprechenden DMSO-Kontrolle (D) zu erkennen. Hierbei verändern einzelne H358^{resist}-Zellen ihre Morphologie zu einem länglichen, spindelförmigen Phänotyp. In (E) hat sich dieser Phänotyp bei einem Großteil der H358^{resist} entwickelt. Außerdem kommt es im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle (F) zu einer Zunahme der Zellgröße. Der neue Phänotyp bleibt bei einer Konzentration von 10 µM AMG510 (G) unverändert.

Die gegen MRTX849-resistenten H358-Zellklone zeigen ebenfalls deutliche Veränderungen in der Morphologie, wie in Abbildung 4.20 dargestellt. In Abb. A ist die Morphologie bei einer Konzentration von 10 nM MRTX849 gezeigt. Bei dieser Konzentration sind die Zellen morphologisch vergleichbar zu den DMSO-Kontrollzellen (B, D, F). Veränderungen der Morphologie werden ab einer Konzentration von 50 nM MRTX849 sichtbar (C). Die H358-Zellen verlieren ihre typische kleine, kompakte, geordnete Clusterform und es sind ungeordnete Cluster aus runden, deutlich größeren H358-Zellen zu erkennen (C). Diese Veränderungen des Phänotyps sind bei 100 nM MRTX849 noch deutlicher zu beobachten (E). Bemerkenswert ist, dass drei Phänotypen parallel zueinander in der Kultur auftreten. Diese unterschiedlichen Phänotypen werden exemplarisch in Abbildung 4.21 dargestellt. In (A) sind überwiegend runde, clusterbildende Zellen zu sehen. In (B) dominiert ein eckiger, clusterbildender Phänotyp, während in (C) langgezogene, spindelförmige Zellen dargestellt sind.

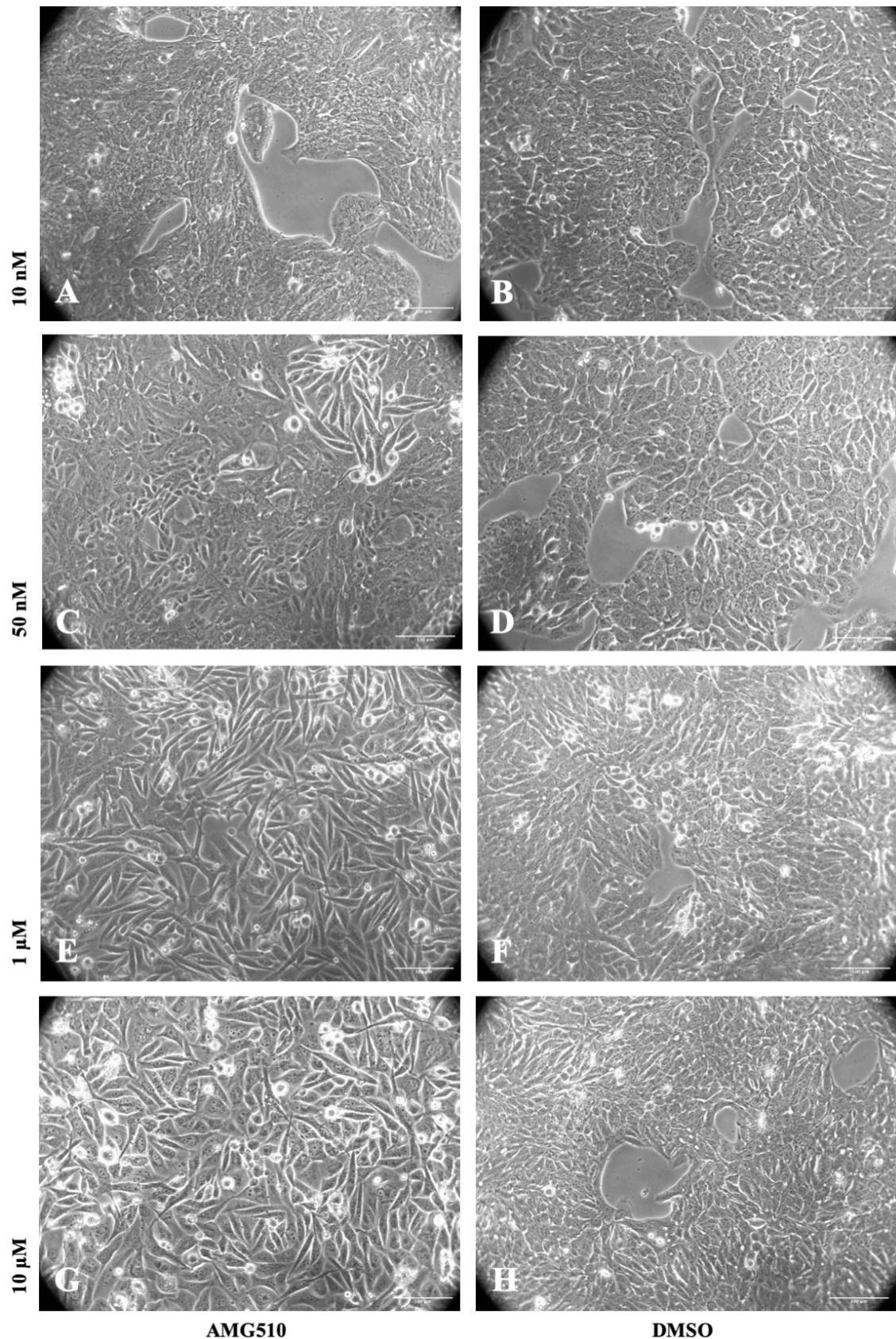


Abbildung 4.19 Morphologische Veränderungen der AMG510-resistente H358-Zellklone. Dargestellt sind exemplarische Phasenkontrastaufnahmen der AMG510-resistenten H358-Zellklone (A, C, E, G) und der Passagen-entsprechenden DMSO Kontrollen (B, D, F, H). Ein Maßstab ist unten rechts dargestellt ($\cong 100 \mu\text{m}$). $n = 2$

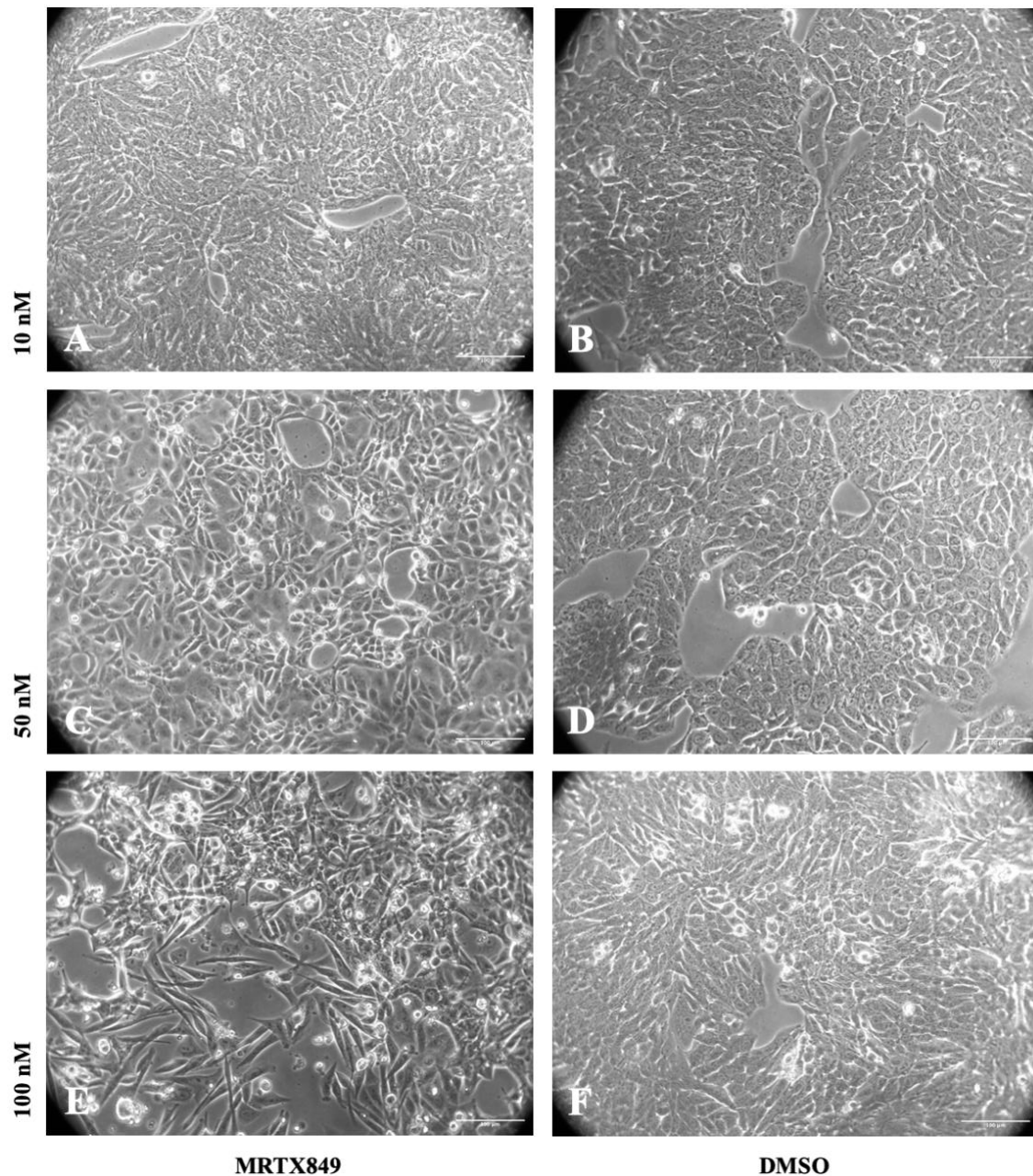
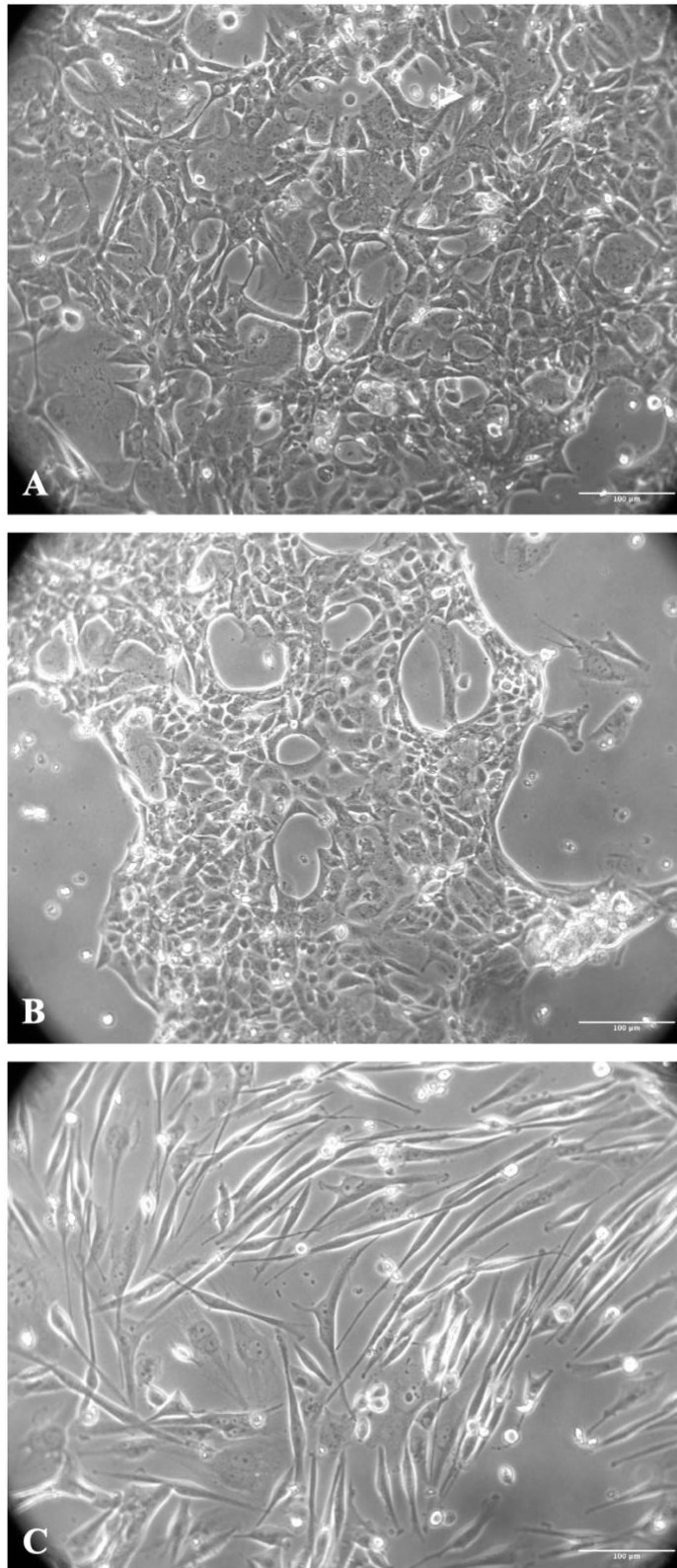


Abbildung 4.20 Morphologische Veränderungen der MRTX849-resistente H358-Zellklone. Dargestellt sind exemplarische Phasenkontrastaufnahmen der MRTX849-resistenten H358-Zellklone (A, C, E) und der Passagen-entsprechenden DMSO Kontrollen (B, D, F). Ein Maßstab ist unten rechts dargestellt ($\cong 100 \mu\text{m}$). $n = 2$



100 nM MRTX849

Abbildung 4.21 Morphologische Unterschiede der H358^{resist}-Zellklone bei 100 nM MRTX849. Dargestellt sind exemplarische Phasenkontrastaufnahmen der 100 nM MRTX849-resistenten H358-Zellklone (A, B, C). Ein Maßstab ist unten rechts dargestellt ($\cong 100 \mu\text{m}$). $n = 2$

4.3.4 Veränderungen Ras-abhängiger Signalwege in den resistenten Zellklone

Nach den Ergebnissen zu den kurzzeitigen Veränderungen in der Aktivität von ERK1/2 und S6 durch den K-Ras(G12C)-Inhibitor AMG510 (siehe 4.2) stellte sich die Frage, ob und welche Veränderungen in diesen Signalwegen in den resistenten Zellklonen zu beobachten sind. Es liegen drei Isoformen des Proteins AKT vor (AKT1, AKT2 und AKT3). In den hier untersuchten Zelllinien wird insbesondere AKT1 und AKT2 exprimiert, während AKT3 kaum nachweisbar ist [80]. Im Folgenden wird daher der Begriff „AKT1/2“ verwendet, schließt aber ebenfalls AKT3 mit ein.

4.3.4.1 Aktivität von ERK1/2, AKT und S6 in MiaPaCa-2^{resist}-Zellklonen

Zur Analyse der Phosphorylierung der Proteine ERK1/2, AKT1/2, und S6 ribosomales Protein wurden RIPA-Lysate der AMG510-resistenten MiaPaCa-2-Zellen hergestellt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Immunblot unter Verwendung spezifischer Antikörper. Durch den Versuchsaufbau zur Generierung von Inhibitor-resistenten Zellklonen gab es für jede Konzentration jeweils ein Lysat ($n = 1$) und zwei Lysate wenn die Proben der Klone A und B zusammengefasst wurden ($n = 2$).

Die Abbildung 4.22 zeigt den Immunblot der AMG510-resistenten MiaPaCa-2-Zellklone B ($n = 1$). Die Ergebnisse für die Zellklone A waren vergleichbar und wurden in der densitometrischen Analyse gemeinsam mit den Daten der Reihe B ausgewertet. Eine Quantifizierung ist als Balkendiagramm als Mittelwert der relativen Signalintensität $\pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt, jeweils normiert auf die DMSO-Kontrolle (=100 %) abgebildet. Werte über 100 % entsprechen einer erhöhten, Werte unter 100 % einer reduzierten Phosphorylierung.

Die densitometrische Analyse der Signalintensität ergab eine bis zu 2,5-fachen Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle der jeweiligen Passage: 1 nM: 169 % $\pm$ 17,44 %, 10 nM: 205,1 % $\pm$ 82,9 %, 100 nM: 225,6 % $\pm$ 71,54 %, 1 μ M: 146,4 % $\pm$ 134,9 %, 10 μ M 247,9 % $\pm$ 7,26 % (jeweils SD; $n = 2$). Die Expression von ERK1/2 bleibt in allen Proben vergleichbar (zweiter Blot in der Abbildung 4.22). Die Phosphorylierung des ribosomalen Protein S6 war in den MiaPaCa-2^{resist}-Zellklone deutlich erhöht, mit einer bis zu 8,9-fachen Anstieg im Vergleich zur Kontrolle: 1 nM: 152,3 % $\pm$ 14,7 %, 10 nM: 205,9 % $\pm$ 79,88 %, 100 nM 889,8 % $\pm$

933,7 %, 1 μ M: 575,4 % $\pm$ 38,85 %, 10 μ M 495,6 % $\pm$ 199,2 % (jeweils SD; n = 2) (dritter Blot in der Abbildung 4.22). Der Nachweis von S6 ist gleichmäßig in allen Lysaten, unabhängig von Verwendung des Inhibitors oder des Lösungsmittels (vierter Blot in der Abbildung 4.22), sodass die Expression des Proteins, im Gegensatz zur Phosphorylierung im Verlauf der Resistenzentwicklung nicht verändert wird. Der fünfte Blot in Abbildung 4.22 zeigt einen Anstieg der Phosphorylierung von AKT1/2 ab 10 nM mit einem Maximum bei 10 μ M AMG510 (1 nM: 200,4 % $\pm$ 103,5 %; 10 nM: 137,6 % $\pm$ 52,46 %; 100 nM 322,8 % $\pm$ 441 %; 1 μ M: 187,4 % $\pm$ 113 %; 10 μ M 899,4 % $\pm$ 690,4 % (jeweils SD; n = 2), ohne dass sich die Expression von AKT1/2 ändert (sechster Blot Abbildung 4.22). Der siebte Blot der Abbildung 4.22 zeigt den Nachweis von Ras. Bei der kovalenten Bindung des Inhibitors an K-Ras(G12C) kommt es zu einer Zunahme des Molekulargewichts, was sich in einem charakteristischen *shift* der K-Ras Bande im Immunblot äußert. Ein solcher *shift* war ab einer Konzentration von 100 nM AMG510 deutlich zu sehen, und bestätigt die Inhibitorbindung an K-Ras(G12C) in den resistenten Zellen.

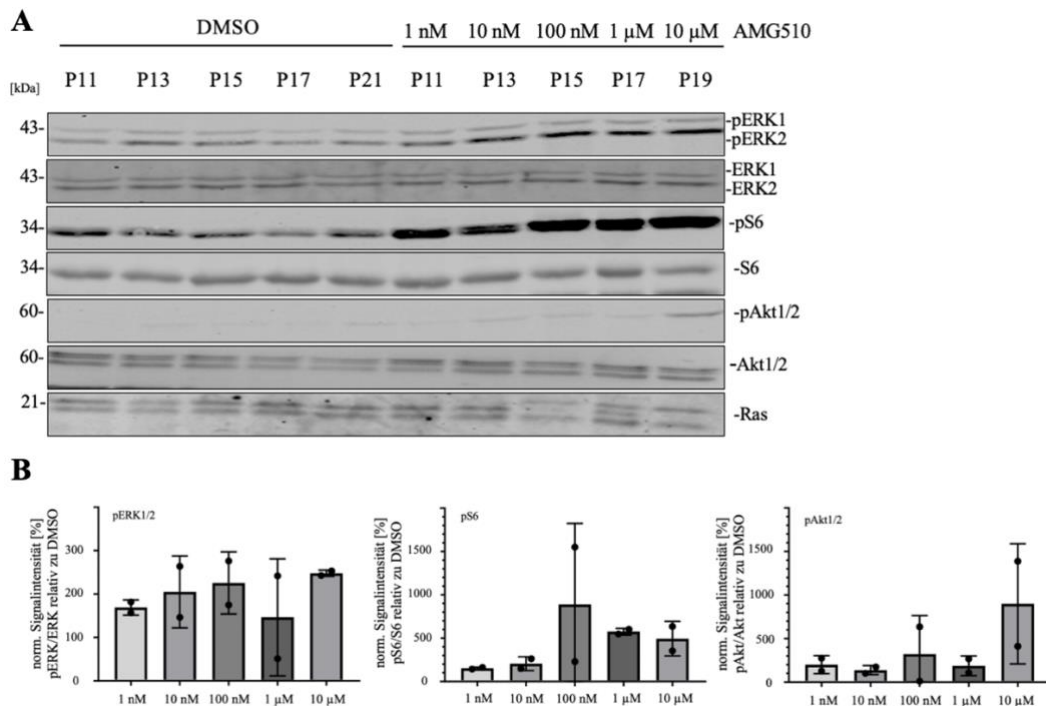


Abbildung 4.22 Einfluss von AMG510 auf die Protein-Phosphorylierung und -Expression ausgewählter Proteine in MiaPaCa-2^{resist}-Zellklonen. AMG510-resistente MiaPaCa-2-Zellklone wurden nach Erreichen eines konfluenten Zelllayers in RIPA-Puffer lysiert. Die Ergebnisse der Zellklone der Reihe B sind in (A) abgebildet. Die Expression von pERK1/2, ERK1/2, pS6, S6, AKT1/2, pAKT1/2 und Ras wurden über spezifische Antikörper im Odyssey-Imaging System nachgewiesen. (n = 1). In (B) sind Balkendiagramme der densitometrische Quantifizierung der relativen Signalintensitäten abgebildet. Die Verhältnisse von pERK zu ERK, pS6 zu S6 bzw. pAKT1/2 zu AKT1/2 wurden berechnet und normalisiert auf die DMSO-Kontrolle der jeweiligen Zelllinie, die gleich 100 % gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Signalintensität $\pm$ SD (n = 2).

Analog zum Vorgehen bei den AMG510-resistenten MiaPaCa-2-Zellklonen wurde auch die MRTX849-resistente Zellklone analysiert. Die Immunblots für die MRTX849-resistenten MiaPaCa-2-Zellklone A sind in Abbildung 4.23 dargestellt (n = 1). Die Ergebnisse aus B zeigen ein vergleichbares Muster und werden gemeinsam mit den Daten der Reihe A in der densitometrischen Analyse ausgewertet.

Auch hier war eine erhöhte Phosphorylierung in den untersuchten Proteinen ERK1/2, S6 und AKT1/2 im Vergleich zu den Kontrollzellen zu beobachten. Die densitometrische Analyse der Signalintensität ergab eine bis zu 3,2-fachen Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle der jeweiligen Passage: 1 nM: 292,5 % $\pm$ 309,2 %, 10 nM: 204,3 % $\pm$ 59,77 %, 100 nM 320,9 % $\pm$ 82,98 %, 1 μ M: 236,4 % $\pm$ 6,78 %, 5 μ M 135,7 $\pm$ 65,84 % (jeweils SD; n = 2). Ebenfalls war die Phosphorylierung des ribosomalen Protein S6 deutlich erhöht, mit einem bis zu 6,8-fachen Anstieg: 1 nM: 218,1 % $\pm$ 17,64 %, 10 nM: 259,9 % $\pm$ 74,43 %, 100 nM 488,2 % $\pm$ 45,55 %, 1 μ M: 681,6

% $\pm$ 338,5 %, 5 μ M 100,4 % $\pm$ 17,31 % (jeweils SD; n = 2). Der Immunblot zeigt außerdem einen Anstieg der Phosphorylierung von AKT1/2 ab 10 nM bis 5 μ M MRTX849, jedoch sind in den DMSO-Kontrollen keine Banden erkennbar. Eine densitometrische Analyse ist nicht interpretierbar, da ein Vergleich zur Kontrolle nicht gezogen werden kann. Durch den Nachweis von Ras (siebter Blot in Abbildung 4.23) kann eine Bindung von MRTX849 an K-Ras(G12C) ab 10 nM nachgewiesen werden, wobei der *shift* im Molekulargewicht von K-Ras geringer ausfällt als bei AMG510.

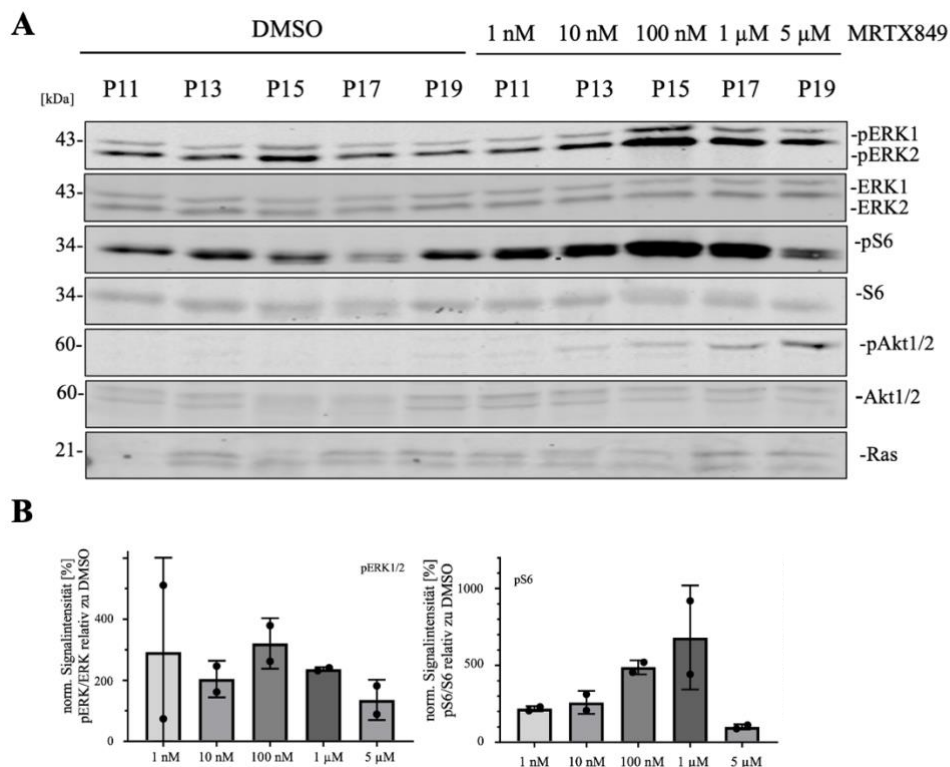


Abbildung 4.23 Einfluss von MRTX849 auf die Protein-Phosphorylierung und -Expression ausgewählter Proteine in von MiaPaCa-2^{resist}-Zellklonen. MRTX849-resistente MiaPaCa-2-Zellklone wurden nach Erreichen eines konfluenten Zelllayers in RIPA-Puffer lysiert. Die Ergebnisse der Zellklone der Reihe A sind in (A) abgebildet. Die Expression von pERK1/2, ERK1/2, pS6, S6, pAKT1/2 und Ras wurden über spezifische Antikörper im Odyssey-Imaging System nachgewiesen. (n = 1). In (B) sind Balkendiagramme der densitometrische Quantifizierung der relativen Signalintensitäten abgebildet. Die Verhältnisse von pERK zu ERK, pS6 zu S6 bzw. pAKT1/2 zu AKT1/2 wurden berechnet und normalisiert auf die DMSO-Kontrolle der jeweiligen Zelllinie, die gleich 100 % gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Signalintensität $\pm$ SD (n = 2).

Die Ergebnisse der AMG510- und MRTX849-resistenten MiaPaCa-2-Zellklone zeigen eine verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2, S6 und AKT1/2. Besonders die stark erhöhte Phosphorylierung von S6 und AKT1/2 unterstreichen die Bedeutung adaptiver Resistenzmechanismen in MiaPaCa-2-Zellklone, bei nachweisbarer Bindung des Inhibitors an K-Ras(G12C).

4.3.4.2 Veränderungen der Aktivität von ERK1/2, S6 und AKT1/2 in den resistenten H358-Zellklone

Analog zum Vorgehen bei den MiaPaCa-2-Zellklonen wurden auch Lysate der AMG510-resistenten H358-Zellen in RIPA-Puffer hergestellt und die Expression und Phosphorylierung der Proteine ERK1/2, S6, AKT1/2 und Ras unter Verwendung spezifischer Antikörper im Immunblot analysiert.

Abbildung 4.24 zeigt den Immunblot der AMG510-resistenten H358-Zellklone der Reihe A ($n = 1$). Die Ergebnisse für die Zellklone B waren vergleichbar und wurden mit den Daten der Reihe A in der densitometrischen Analyse einbezogen ($n = 2$). Da das Lysat der DMSO-Kontrolle aus Passage 15 auffällig niedrige Signalintensitäten aufwies und als nicht repräsentativ eingestuft wurde, wurde ein Mittelwert der DMSO-Kontrollen berechnet und als Vergleichswert auf 1 normiert.

Im ersten Blot von Abbildung 4.24 zeigte sich in den AMG510-resistenten H358-Zellklonen eine deutliche Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 auf bis zu 16 % im Vergleich zur Intensität in der Kontrolle. Die densitometrische Analyse ergab folgende Werte: 1 nM: $26 \% \pm 2,82 \%$, 10 nM: $16 \% \pm 2,82 \%$, 100 nM $62,5 \% \pm 13,44 \%$, 1 μM : $59 \% \pm 11,3 \%$, 10 μM $56 \% \pm 11,3 \%$ (jeweils SD; $n = 2$). Der zweite Blot der Abbildung 4.24 zeigte eine gleichmäßige Expression von ERK1/2 in allen Proben. Die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 im dritten Blot der Abbildung 4.24 zeigte bei niedrigen Konzentrationen eine anfängliche Reduktion, gefolgt von einem leichten Anstieg bei höheren Konzentrationen. Die Signalintensitäten lagen bei 1 nM: $81 \% \pm 2,82 \%$, 10 nM: $66,5 \% \pm 13,44 \%$, 100 nM $122 \% \pm 14,14 \%$, 1 μM : $103 \% \pm 2,8 \%$, 10 μM $98 \% \pm 28,82 \%$ (jeweils SD; $n = 2$). Die Expression von S6 bleibt in allen Proben gleichmäßig (vierter Blot der Abbildung 4.24). Die Phosphorylierung von AKT1/2 zeigte im fünften Blot Abbildung 4.24 zunächst bei 1 nM AMG510 (1 nM: $80,5 \% \pm 17,68 \%$ (SD; $n = 2$)) und 10 nM AMG510 (10 nM: $37 \pm 1,41 \%$ (SD; $n = 2$)) eine Reduktion, gefolgt von einer bis 2,5-fach erhöhten Phosphorylierung: 100 nM $188,5 \% \pm 7,78 \%$, 1 μM : $258 \% \pm 25,5 \%$, 10 μM $220,5 \% \pm 82,73 \%$ (jeweils SD; $n = 2$). Im sechsten Blot der Abbildung 4.24 blieb die Expression von AKT1/2 unverändert.

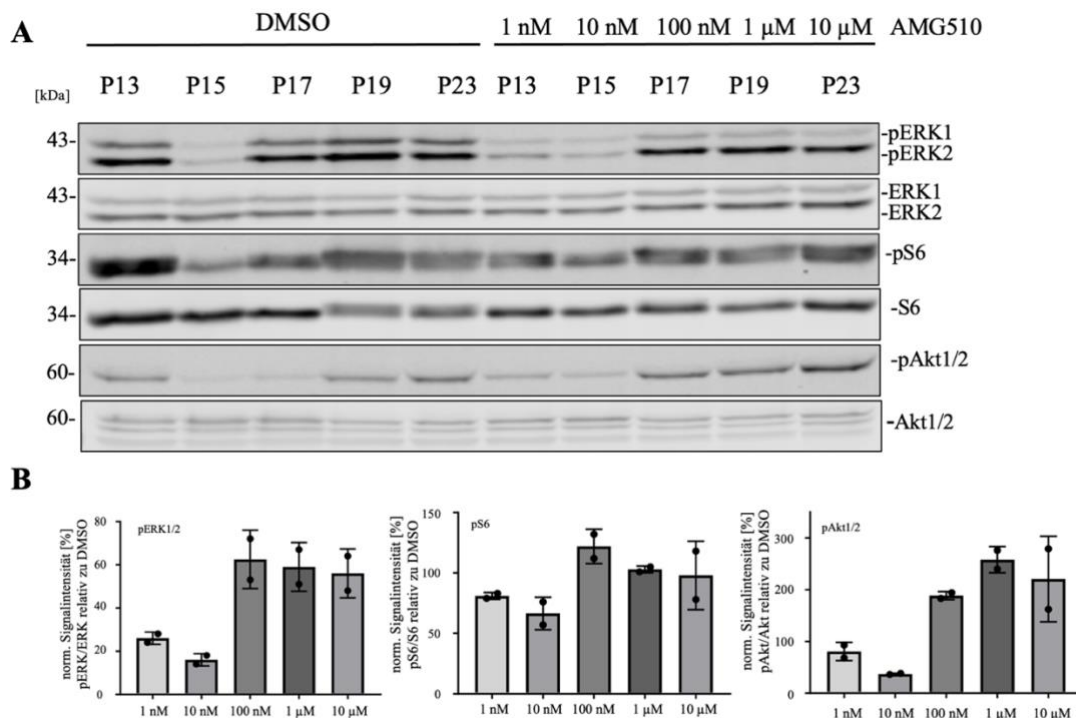


Abbildung 4.24 Einfluss von AMG510 auf die Protein-Phosphorylierung und -Expression ausgewählter Proteine in H358^{resist}-Zellklonen. AMG510-resistente H358-Zellklone wurden nach Erreichen eines konfluenten Zelllayers in RIPA-Puffer lysiert. Die Ergebnisse der Zellklone der Reihe A sind in (A) abgebildet. Die Expression von pERK1/2, ERK1/2, pS6, S6, AKT1/2, pAKT1/2 und Ras wurden über spezifische Antikörper im Odyssey-Imaging System nachgewiesen. (n = 1). In (B) sind Balkendiagramme der densitometrische Quantifizierung der relativen Signalintensitäten abgebildet. Die Verhältnisse von pERK zu ERK, pS6 zu S6 bzw. pAKT1/2 zu AKT1/2 wurden berechnet und normalisiert auf die DMSO-Kontrolle der jeweiligen Zelllinie, die gleich 100 % gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Signalintensität $\pm$ SD (n = 2).

Auch die MRTX849-resistenten H358-Zellklone wurde auf Veränderungen in den Signalwege untersucht. Abbildung 4.25 zeigt den Immunblot Zellklone der Reihe A (n = 1). Die Ergebnisse aus B waren vergleichbar und wurden mit den Daten der Reihe A in der densitometrischen Analyse zusammengefasst. Das Lysat der DMSO-Kontrolle aus Passage 15 zeigte auffällig niedrige Signalintensitäten und wurde als nicht als repräsentativ eingestuft, daher wurde der Mittelwert der DMSO-Kontrollen gebildet und als Vergleichswert auf 1 normiert.

Im ersten Immunblot der Abbildung 4.25 wurden in den MRTX849-resistenten H358-Zellklonen eine Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 festgestellt: 1 nM: 21,5 % $\pm$ 14,85 %, 10 nM: 76,5 % $\pm$ 14,85 %, 100 nM 41 $\pm$ 1,4 % (jeweils SD; n = 2). Die Expression von ERK1/2 war in allen Proben vergleichbar (zweiter Blot der Abbildung 4.25). Der dritte Blot der Abbildung 4.25 zeigte bei der S6-Phosphorylierung einen bis zu 1,5-fachen Anstieg bei 100 nM MRTX849: 1 nM: 77 % $\pm$ 11,3 %, 10 nM: 127 % $\pm$ 46,67 %, 100 nM 155,5 % $\pm$ 12,02 % (jeweils SD; n = 2). Auch hier bleibt die Expression von

S6 konstant (vierter Blot der Abbildung 4.25). Die Phosphorylierung von AKT1/2 war bei 1 nM zunächst reduziert (58 % $\pm$ 14,4 % (SD; n = 2), zeigte bei 10 nM eine der Kontrolle ähnliches Niveau (10 nM: 102 % $\pm$ 77,78 % (SD; n = 2) während sie bei 100 nM deutlich anstieg, mit einer Signalintensität von 721,5 % $\pm$ 340,1 % (SD; n = 2) (fünfter Blot der Abbildung 4.25). Die Expression von AKT1/2 war in allen Proben gleichmäßig (sechster Blot der Abbildung 4.25).

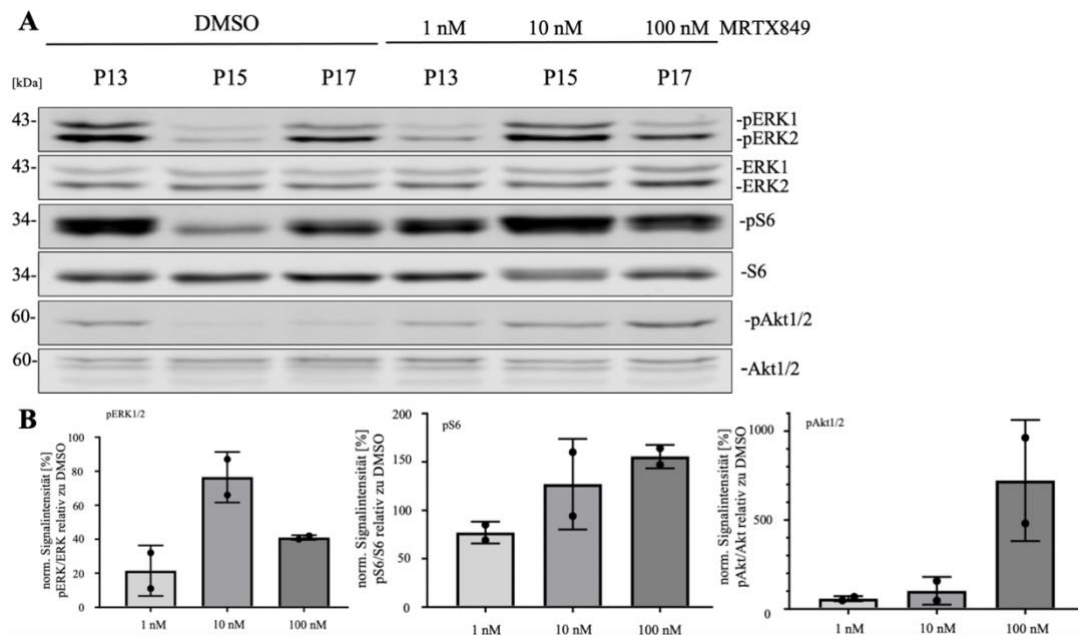


Abbildung 4.25 Einfluss von MRTX849 auf die Protein-Phosphorylierung und -Expression ausgewählter Proteine in H358^{resist}-Zellklonen. MRTX849-resistente H358-Zellklone wurden nach Erreichen eines konfluenten Zellschichtes in RIPA-Puffer lysiert. Die Ergebnisse der Zellklone der Reihe A sind in (A) abgebildet. Die Expression von pERK1/2, ERK1/2, pS6, S6, AKT1/2, pAKT1/2 und Ras wurden über spezifische Antikörper im Odyssey-Imaging System nachgewiesen. (n = 1). In (B) sind Balkendiagramme der densitometrischen Quantifizierung der relativen Signalintensitäten abgebildet. Die Verhältnisse von pERK zu ERK, pS6 zu S6 bzw. pAKT1/2 zu AKT1/2 wurden berechnet und normalisiert auf die DMSO-Kontrolle der jeweiligen Zelllinie, die gleich 100 % gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Signalintensität $\pm$ SD (n = 2).

Die Ergebnisse zeigen, dass in AMG510- und MRTX849-resistenten H358-Zellklonen eine Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 vorliegt, die auch in der kurzzeitigen AMG510-Inhibition gezeigt werden konnten (siehe Abbildung 4.9). In beiden resistenten H358-Zellklonen war die Phosphorylierung von S6 anfänglich reduziert und bei höheren Inhibitorkonzentrationen kam es zu einem leichten Anstieg. Auch die Phosphorylierung von AKT1/2 zeigte eine initiale Suppression und einen anschließenden Anstieg. Insgesamt weisen die resistenten H358-Zellklone Anpassungen der Ras/Raf/MEK/ERK- und PI3-Kinase/AKT/mTORC1/S6K-Signalwege auf, die auf die adaptiven Mechanismen im Rahmen der Resistenzentwicklung hindeuten.

4.4 Reversibilität der K-Ras(G12C)-Inhibitor-induzierten Veränderungen

Bei der Generierung der Inhibitor-resistenten Zellklone mittels „*increasing drug dose method*“ stellte sich die Frage, ob die mit steigender Inhibitorkonzentration beobachteten Veränderungen in der Morphologie, der Proliferationsrate und der Signaltransduktion reversibel sind. Um diese Frage zu beantworten, wurden MiaPaCa-2^{resist}-Zellklone ausgewählt, die über zwei Passagen in Medium mit 10 µM AMG510 kultiviert worden waren. Es wurden zwei parallele Kulturen angelegt: In einer Kultur wurde der Inhibitor durch das Lösungsmittel DMSO ersetzt (MiaPaCa-2^{reversDMSO}), während die zweite Kultur weiterhin mit 10 µM AMG510 behandelt wurde (MiaPaCa-2^{resistAMG510}). Die Zellen wurden dreimal passagiert und alle 24 h fotografiert, um morphologische Veränderungen zu dokumentieren.

4.4.1 Charakterisierung von morphologischen und proliferativen Veränderungen der revertanten Zellen

Die Phasenkontrastaufnahmen in Abbildung 4.26 zeigen die Morphologie der DMSO-Kontrolle, der MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellklone und der nun mit DMSO behandelten MiaPaCa-2-Zellklone (MiaPaCa-2^{reversDMSO}) der Gruppe A zu den Zeitpunkten 24 h und 192 h nach Aussaat. Nach 24 h zeigen die MiaPaCa-2^{reversDMSO} (Abb.B) und die MiaPaCa-2^{resistAMG510} (Abb.C) die für die resistente charakteristische flache, ausgebreitete Morphologie. Nach 192 h Inkubationszeit (Abb.E) zeigen sich in der MiaPaCa-2^{reversDMSO} Kultur neben den Zellen mit der flachen, ausgebreiteten Morphologie auch einzelne kleine, längliche Zellen (rote Pfeile). Diese Veränderungen ähneln dem Phänotyp der DMSO-Kontrollzellen (Abb.A; D). In der Kontrolle mit den MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone der Gruppe B wurden ähnliche Veränderungen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Im weiteren Versuchsverlauf kam es innerhalb einer Inkubationszeit von 17 Tagen (408 h) zu einer vollständigen Reversion des Phänotyps in den MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone. Diese Entwicklung ist in Abbildung 4.27 exemplarisch anhand der Zellklonreihe A dargestellt. Dargestellt sind die phänotypischen Veränderungen bei einer Konfluenz von 95 %. Zum Vergleich dient eine DMSO-Kontrolle von MiaPaCa-2-Zellen bei 95 % Konfluenz (Abbildung 4.27 (A)). Die mit 10 µM AMG510 behandelten MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellklone zeigen nach 120 h, 264 h und 408 h (Abbildung 4.27 (B) B, D, F) ein unverändertes flaches, vergrößertes, spiegelei-ähnliches Erscheinungsbild.

Bei den MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellen sind erste Veränderungen der Morphologie der Zellen zum Zeitpunkt 264 h nach der primären Aussaat deutlich zu erkennen (Abbildung 4.27 (B) C). Es zeigt sich eine Zunahme der kleinen, länglichen Morphologie (rote Pfeile) der MiaPaCa-2-Zellen. Nach 408 h dominiert in den MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellen die kleine, eher längliche Morphologie der unbehandelten MiaPaCa-2-Zellen (rote Pfeile) in den MiaPaCa-2^{reversDMSO} Kolonien (Abbildung 4.27 (B) E). Vergleichbare Befunde wurden in der Versuchsreihe mit den MiaPaCa-2-Zellklonen der Gruppe B erzielt.

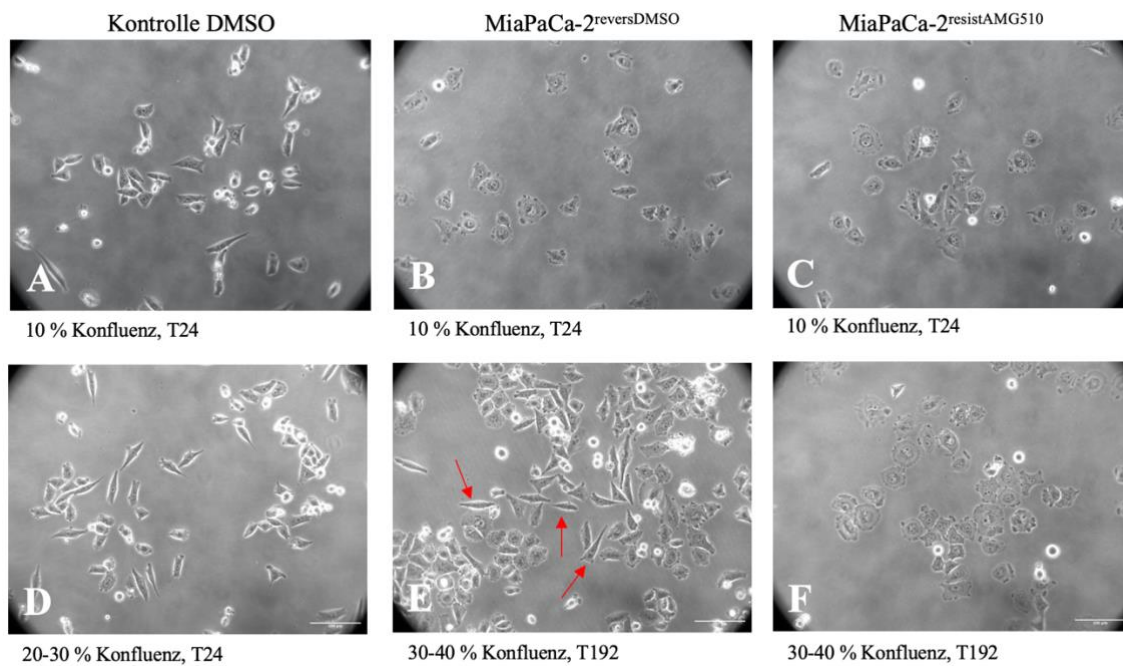


Abbildung 4.26 Morphologische Veränderungen der revertanten MiaPaCa-2-Zellklone nach dem Absetzen von AMG510. Dargestellt sind die Phasenkontrastaufnahmen zu dem Zeitpunkt 24 h und 192 h mit jeweils einer 10 % und 20-40 % Konfluenz der DMSO-Kontrollzellen (A, D), der 10 µM AMG510 MiaPaCa-2^{resist}-Zellklone (C, F) und der DMSO behandelten revertanten MiaPaCa-2-Zellklone (B, E) aus der Reihe A. Ein Maßstab ist unten rechts dargestellt ($\cong 100 \mu\text{m}$). n = 1

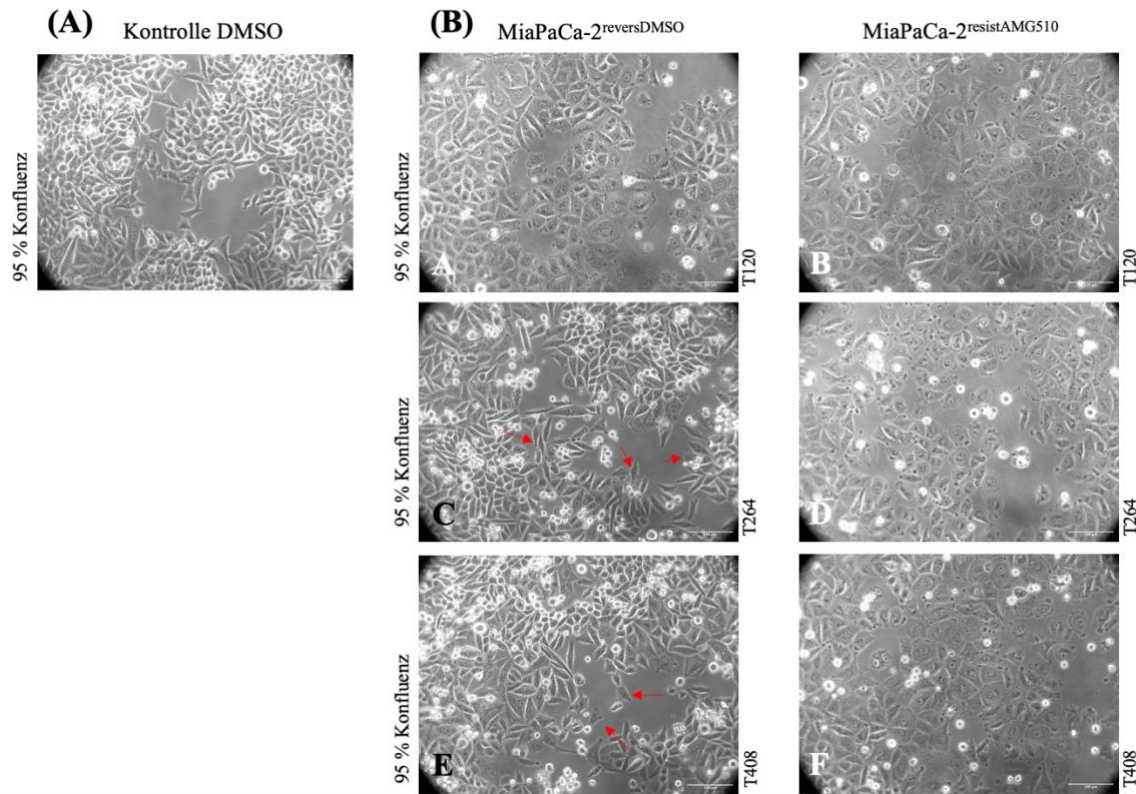


Abbildung 4.27 Morphologische Veränderungen der MiaPaCa-2 Zellklone nach Absetzen von AMG510 bei 95 % Konfluenz. Abbildung (A) zeigt eine exemplarische Phasekontrastaufnahme der MiaPaCa-2 DMSO Kontrollzellen bei Erreichen von 95 % Konfluenz. Abbildung (B) stellt exemplarische Phasekontrastaufnahmen der revertanten MiaPaCa-2^{reversDMSO} Zellklone (A, C, E) und der 10 µM AMG510-resistenten MiaPaCa-2^{resistAMG510} Zellklone (B, D, F) bei einer Konfluenz von 95 % zu den Zeitpunkten 120 h, 264 h und 408 h dar. Die roten Pfeile in C und E markieren Zellen mit dem kleinen, länglichen Phänotyp, ähnlich dem in (A). Ein Maßstab ist unten rechts dargestellt ($\triangleq 100 \mu\text{m}$). $n = 1$

Zur Charakterisierung der Zellproliferation nach Ersatz von 10 µM AMG510 durch DMSO wurde wiederum die Zellzahl der adhären Zellen bei Erreichen der gewünschten Konfluenz gezählt. Die erhaltenen Daten sind in Abbildung 4.28 dargestellt. Für die Auswertung wurden die Daten der Zellkulturen der Gruppen A und B zusammengefasst. Der Mittelwert der Zellzahl der ersten mit DMSO behandelten Passage (erste Passage MiaPaCa-2^{reversDMSO}) beträgt $7,4 \times 10^6$ Zellen (SD: $0,8 \times 10^6$ Zellen; $n = 2$). In der anschließenden zweiten Passage steigt die Zellzahl auf $1,65 \times 10^7$ Zellen (SD: $0,2 \times 10^7$ Zellen; $n = 2$) und beträgt in der letzten untersuchten Passage $1,9 \times 10^7$ Zellen (SD: 0×10^7 Zellen; $n = 2$). Bei den MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellklonen beträgt der Mittelwert der Zellzahlen in der ersten Passage $4,38 \times 10^6$ (SD: $0,375 \times 10^6$ Zellen; $n = 2$), in der zweiten Passage $5,13 \times 10^6$ (SD: $0,125 \times 10^6$ Zellen; $n = 2$) und in der dritten Passage ebenfalls $5,13 \times 10^6$ (SD: $0,125 \times 10^6$ Zellen; $n = 2$). Die MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone zeigen im Vergleich zu den MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellklone eine 2,5-fache Erhöhung der Zellzahl über den untersuchten Zeitraum.

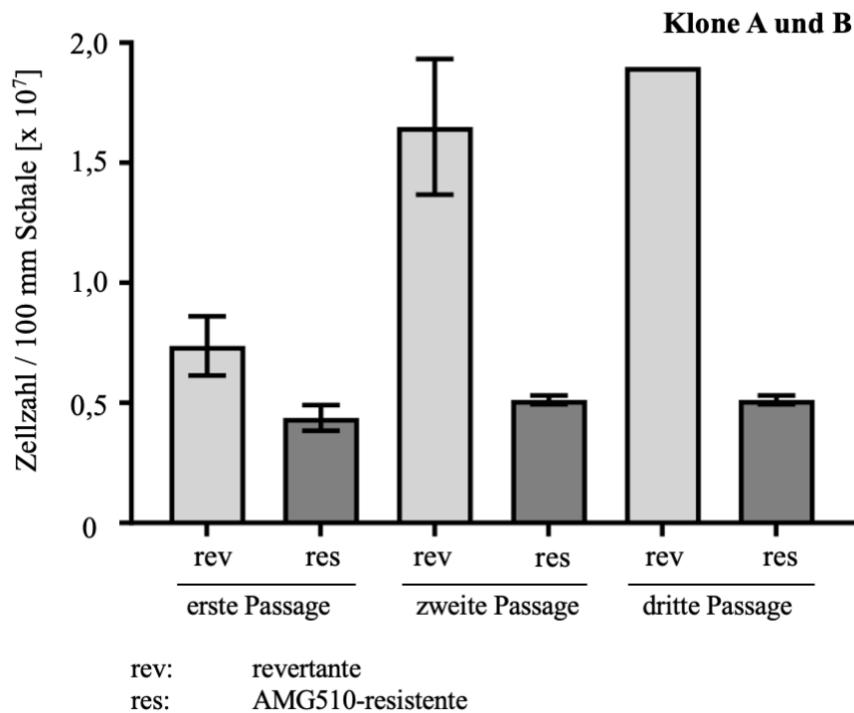


Abbildung 4.28 Bestimmung der Zellzahl der revertanten und AMG510-resistenten MiaPaCa-2-Zellklone. Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte der Zellzählungen der Zellklonen A und B der MiaPaCa-2^{reversDMSO} [rev] und MiaPaCa-2^{resistAMG510} [res] der ersten, zweiten und dritten Passage. Die Zellen einer 100 mm Schale wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 95 % abtrypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Die Werte der Klone A und B wurden gemittelt. n = 2

Die Verdopplungszeiten der MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone und der MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellklone, die weiterhin mit 10 µM AMG510 behandelt wurden, wurden wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben berechnet. In Abbildung 4.29 sind die Ergebnisse für die Gruppen A und B als gemeinsamer Mittelwert dargestellt. Es ist eine Abnahme der Verdopplungszeit der MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone über die untersuchte Kultivierungszeit zu erkennen. In der ersten Passage beträgt die Verdopplungszeit 39,95 h (SD: 7,52 h ; n = 2), sinkt auf 30,95 h (SD: 1,31 h ; n = 2) in der folgenden Passage und beträgt 25,16 h (SD: 2,29 h ; n = 2) in der dritten Passage der MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone. Die MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellklone zeigen im Vergleich zu den MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone eine längere Verdopplungszeit zwischen 49,56 h (SD: 9,56 h ; n=2) bei der ersten Passage und 39,36 h (SD: 3,99 h ; n=2) in der dritten Passage.

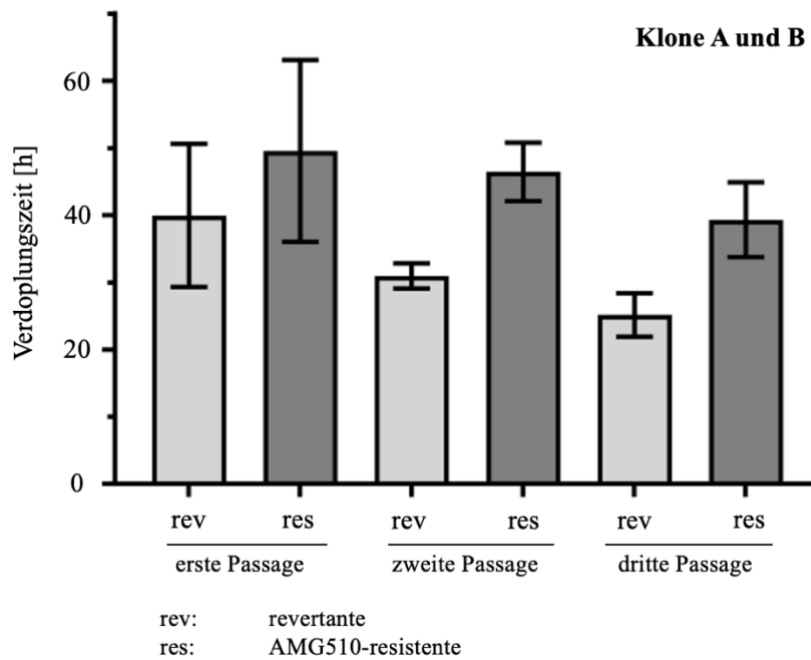


Abbildung 4.29 Verdopplungszeit der revertanten und AMG510-resistenten MiaPaCa-2-Zellklone. Das Säulendiagramm zeigt die Verdopplungszeit der Zellklonen A und B der MiaPaCa-2^{reversDMSO} [rev] und MiaPaCa-2^{resistAMG510} [res] der ersten, zweiten und dritten Passage. Aus den Daten der Zellzählung und Tage bis Konfluenz wurden mit der Formel zum exponentiellen Wachstum ($Y=Y_0 \cdot \exp(k \cdot x)$) die Verdopplungszeit berechnet. $n = 2$

Die bisherigen Ergebnisse zur Charakterisierung der morphologischen und proliferativen Veränderungen nach Absetzen der Inhibitorbehandlung der MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone zeigen, dass eine Reversibilität der K-Ras(G12C)-Inhibitor-induzierten Veränderungen besteht. Die MiaPaCa-2^{revers}-Zellklone veränderten ihre Morphologie von einem flachen, ausgedehnten zu einem kleineren, eher länglichen Phänotyp. Der Phänotyp am Ende der Behandlungsdauer von 480 Stunden ähnelt der Morphologie der konstant mit DMSO behandelten Kontrollzellen (siehe 4.3.1). Hinsichtlich der Proliferation entspricht die Verdopplungszeit der MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone am Ende des Versuches nach 17 Tagen der Verdopplungszeit der DMSO-Kontrollzellen (siehe 4.3.1). Die Veränderungen in der Signaltransduktion werden im folgenden Kapitel dargestellt.

4.4.2 Veränderungen Ras-abhängiger Signalwege nach dem Absetzen von AMG510 in MiaPaCa-2-Zellklone

Zur Untersuchung reversibler Effekte der AMG510-Behandlung auf Proteinebene wurden MiaPaCa-2-Zellklone, die zuvor in 10 μ M AMG510 kultiviert wurden, auf ein DMSO-haltiges Medium umgestellt (MiaPaCa-2^{reversDMSO}). Zum Vergleich dienten weiterhin unter AMG510 kultivierte, resistente Zellklone (MiaPaCa-2^{resistAMG510}).

Zur Analyse der Phosphorylierung der Proteine ERK1/2, AKT1/2, und des ribosomalen Proteins S6 wurden RIPA-Lysate der beiden Zellgruppen hergestellt und anschließend die Proteine unter Verwendung spezifischer Antikörper im Immunblot nachgewiesen. Aufgrund des Versuchsaufbaus gab es pro Passage je ein Lysat der Zellklone A und B (n = 1), die in der anschließenden densitometrischen Analyse zusammengefasst wurden (n = 2). Als Passage wurde das routinemäßige Umsetzen der Zellklone in frisches Medium unter fortlaufender Kultivierung definiert. Die erste Passage entsprach der erneuten Aussaat der 10 μ M AMG510-behandelten MiaPaCa-2^{resist}-Zellklone nach Erreichen einer Konfluenz von 95 %.

Abbildung 4.30 (A) zeigt die Immunblots der MiaPaCa-2^{reversDMSO}- und MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellklone über drei aufeinanderfolgende Passagen. Die Lysate der Gruppe A sind links, jene der Gruppe B rechts dargestellt. Die dazugehörige Quantifizierung wird in Abbildung 4.30 (B) als Balkendiagramm der Mittelwerte der relativen Signalintensität $\pm$ SD dargestellt. Die Phosphorylierungswerte wurden jeweils bezogen auf die AMG510-resistente Kontrolle (=100 %) angegeben. Werte >100 % deuten auf eine erhöhte, Werte <100 % auf eine verringerte Phosphorylierung hin.

Die densitometrische Analyse der Signalintensität zeigte, dass die Phosphorylierung von ERK1/2 in der ersten Passage der MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone um das 1,3-fache erhöht war (130 % $\pm$ 19,09 % (SD; n = 2)), gefolgt von einer Reduktion auf 63 % $\pm$ 6,36 % (SD; n = 2) in der zweiten Passage und 65,5 % $\pm$ 34,65 % (SD; n = 2) in der dritten Passage. Auch die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 nahm über die Passagen hin ab. Die erste Passage zeigte eine Reduktion auf 93,5 % $\pm$ 44,5 % (SD; n = 2), die zweite auf 45 % $\pm$ 11,31 % (SD; n = 2) und die dritte Passage auf 43 % $\pm$ 1,41 % (SD; n = 2). Die stärkste Abnahme zeigte sich in der Phosphorylierung von AKT1/2. Bereits in der ersten Passage lag sie bei 23,5 % $\pm$ 13,44 % (SD; n = 2), in der zweiten bei 15 % $\pm$ 7,07 % (SD; n = 2) und in der dritten Passage bei 20 % $\pm$ 21,21 % (SD; n = 2).

Die Ergebnisse des Immunblots der MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone zeigen, dass der Entzug von AMG510 über drei Passagen hinweg mit einer Abnahme der Phosphorylierung der Signalproteine einhergeht. Die unter AMG510 beobachtete Reaktivierung von ERK1/2, S6 und AKT1/2 wird nach Umstellung auf DMSO wieder reduziert, was auf einen reversiblen Effekt der AMG510-induzierten Signalaktivierung in den MiaPaCa-2-Zellklonen hinweist.

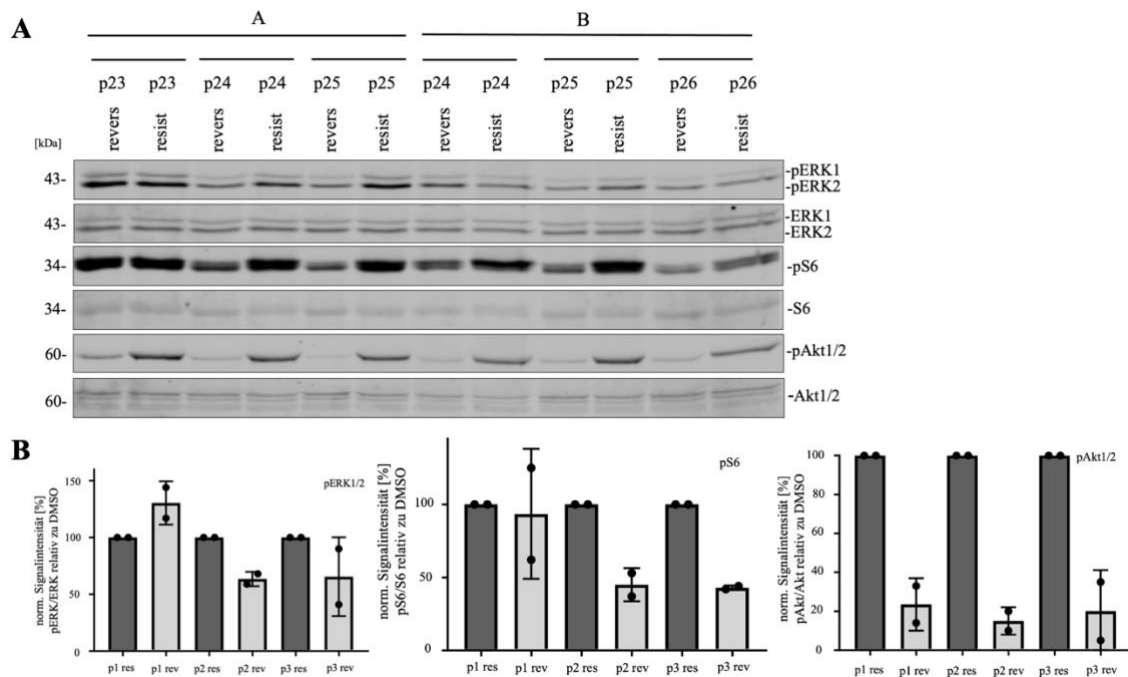


Abbildung 4.30 Veränderung der Proteinexpression und Proteinphosphorylierung von ausgewählten Proteinen nach dem Absetzen AMG510 in MiaPaCa-2-Zellklone. MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellklone [res] (in Medium mit 10 μ M AMG510) und MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone [rev] (in Medium mit DMSO) wurden nach Erreichen eines konfluenten Zelllayers in RIPA-Puffer lysiert und die Proteinexpression im Immunoblotverfahren analysiert. Die Ergebnisse sind in (A) abgebildet. Die Expression von pERK1/2, ERK1/2, pS6, S6, AKT1/2, pAKT1/2 und Ras wurden über spezifische Antikörper im Odyssey-Imaging System nachgewiesen (n = 1) der Reihe A und B. In (B) sind Balkendiagramme der densitometrische Quantifizierung der relativen Signalintensitäten abgebildet. Die Verhältnisse von pERK zu ERK, pS6 zu S6 bzw. pAKT1/2 zu AKT1/2 wurden berechnet und normalisiert auf die resistente Kontrolle der jeweiligen Passage, die gleich 100 % gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Signalintensität $\pm$ SD (n = 2).

4.4.3 Veränderungen der Zytoskelett-Organisation und der Proteinlokalisierung in MiaPaCa-2-Zellklone nach Absetzen von AMG510

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Veränderungen der Morphologie, der Proliferation und der Proteinexpression der MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone beschrieben. Aufgrund dieser Veränderungen stellte sich die Frage, ob es Modifikationen in der Organisation des Zytoskeletts und der Lokalisation einzelner Proteine gibt. Mittels Immunfluoreszenzanalysen sollten Veränderungen des Zytoskeletts der MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone im Vergleich zu den MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellklone untersucht werden. Zusätzlich sollten Veränderungen in der Lokalisation ausgewählter Proteine mit spezifischen Antikörpern analysiert werden.

Die Präparate wurden mit einem Olympus IX81 Fluoreszenzmikroskop untersucht. Anschließend wurden die Bilder mit der Software „Image Studio (Version 5.2)“ (LI-COR Inc., USA) bearbeitet.

4.4.3.1 Veränderungen in der Zytoskelett Organisation

Unter Verwendung der vier primären Antikörper α -Tubulin, Vimentin, Vinculin und Paxillin und dem Toxin Phalloidin zur spezifischen Darstellung von filamentösem Aktin wurden die Veränderungen des Zytoskeletts und der Lokalisation Aktin-bindender Proteine dargestellt.

Die Abbildung 4.31 zeigt die Ergebnisse der Zytoskelettfärbung. Die linke Spalte zeigt die Aufnahmen der 10 μ M AMG510 MiaPaCa-2^{resistAMG510}- und die rechte Spalte die MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone. Zur Darstellung des Aktin-Zytoskeletts und der Aktin-bindenden Proteine wurden zwei Färbungen durchgeführt. Dazu wurden das Phalloidin-Alexa488-Toxin und anti-Vinculin Antikörper mit dem sekundären fluorochromgekoppelten Antikörper anti-Maus-Cy3 verwendet. Mit dem Phalloidin-Alexa488 Toxin wurden die Aktinfilamente angefärbt. Vinculin ist besonders in den fokalen Adhäsionen lokalisiert und verbindet das Aktin-Zytoskelett mit den Integrinen an der Zellmembran. Abbildung 4.31 zeigt repräsentative Aufnahmen für die MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellklone der Gruppe A und MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone der Gruppe A nach 2 Passagen. Die Färbung zeigt bei den MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellklone (A) Aktinfilamente, die häufig die gesamte Zelle umspannen. Zusätzlich ist eine verstärkte Färbung des filamentösen Aktins

entlang der Plasmamembran zu erkennen. Die MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone (B) zeigen im Vergleich zu den MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellklone eine geringe Ausprägung von Aktinfilamenten und eine starke Färbung des Aktins in der Nähe des Zellkerns, jedoch nicht so stark in der Peripherie. In den Abbildungen (C) und (D) ist die Färbung mit einem anti- α -Tubulin Antikörper mit dem anti-Maus-Cy3 Antikörper dargestellt. Die Verteilung von α -Tubulin zeigt keinen Unterschied in der Färbung der resistenten Zellklone (C) und der revertanten MiaPaCa-2-Zellklone in (D). Zur Darstellung der Intermediärfilamente wurde Vimentin mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Hierbei zeigt sich bei den MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellklone in (E) eine Konzentration der Vimentinfilamente im perinukleären Bereich. Die MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone in (F) zeigen ein homogen ausgedehntes Filamentnetz, mit gelegentlichen perinukleären Bündeln. Die Lokalisation von Vinculin ist mit dem anti-Vinculin, anti-Maus-Cy3 System Antikörper in Abbildung 4.31 (G) und (H) dargestellt. Diese repräsentativen Aufnahmen zeigen für die MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellklone eine deutliche Prominenz an den fokalen Kontakten (rote Pfeile). Die MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone (H) zeigt im Vergleich zu (G) keine deutliche Färbung der fokalen Kontakte. Um Veränderungen der fokalen Kontakte weiter zu analysieren wurde die Lokalisation von Paxillin mittels des primären Antikörpers Paxillin und dem sekundären fluorchrom-gekoppelten Antikörper anti-Maus-Cy3 verwendet. In (I) zeigt sich eine Anreicherung von Paxillin in kortikalen Aktinstrukturen und in fokalen Kontakten (rote Pfeile) in MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellklone. Im Vergleich dazu zeigen die MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone (J) eine eher diffuse Verteilung ohne Anreicherung in spezifischen aktin-reichen Strukturen.

Zusammenfassend zeigen sich Unterschiede in der Struktur des Zytoskeletts der untersuchten Zellklone. MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellklone zeigen bei der Färbung des filamentösen Aktins eine Umspannung der gesamten Zelle und eine Zunahme am Kortex. Die Färbungen mit Vinculin und Paxillin zeigen ein starkes Signal in kortikalen Strukturen. Dies deckt sich mit der Verbindung des Aktinskeletts zu den fokalen Kontakten. Die Vimentin-Färbung der MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone zeigen im Vergleich zu den gegen 10 μ M AMG510 resistenten MiaPaCa-2-Zellklone eine schwächere Färbung der kortikalen Strukturen und eher eine stärkere Färbung der perinukleären Region.

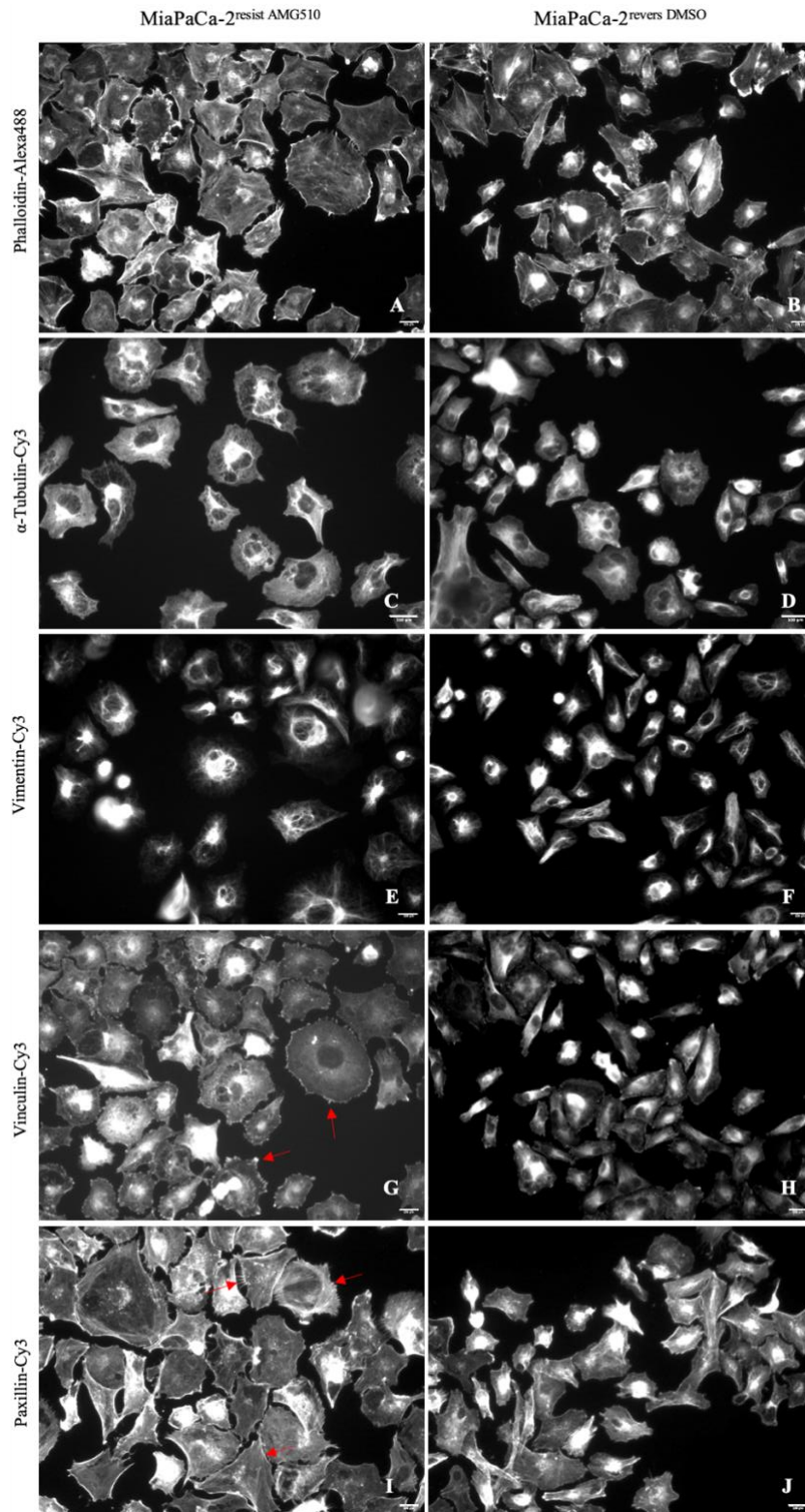


Abbildung 4.31 Veränderungen der Zytoskelett Organisation in MiaPaCa-2-Zellklone nach AMG510 Entzug. Zur Darstellung von Zytoskelettelementen und assoziierten Proteinen in MiaPaCa-2^{reversDMSO}- und MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellklone wurden die Antikörper α -Tubulin (*mouse*, Sigma), Vimentin (*mouse*, Sigma), Vinculin (*mouse*, Sigma), Paxillin (*mouse*, BD Bioscience) sowie anti-Maus Cy3 und das Toxin Phalloidin Alexa488 verwendet. Die roten Pfeile in (G) zeigen die Lokalisation von Vimentin in fokalen Kontakten. In (I) zeigen die roten Pfeile eine Lokalisation von Paxillin am kortikalen Aktin und in den fokalen Kontakten. Ein Maßstab ist unten rechts dargestellt ($\cong 100 \mu\text{m}$). $n = 1$

4.4.3.2 Veränderungen der Lokalisation von Zellzyklus-assoziierten Proteinen

Analog zum Nachweis der Proteine des Zytoskeletts wurden Veränderungen der Zellzyklus-assoziierten ERK1/2, pERK1/2 und Ki67 mittels Immunfluoreszenzanalysen untersucht.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 4.32 dargestellt. Die linke Spalte zeigt die Aufnahmen der 10 μ M AMG510 MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellklone und die rechte Spalte die MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellklone. Die Färbung mit dem primären Antikörper anti-pERK1/2 erfolgte zusammen mit dem sekundären fluorochrom-gekoppelten Antikörper Rabbit Alexa 488 und ist in Abbildung 4.32 (A) und (B) dargestellt. Die Immunfluoreszenz-Abbildungen zeigen für MiaPaCa-2^{resistAMG510}- und MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellen (jeweils Zellklone) eine prominente Färbung des Zellkerns. In (C) und (D) ist die Lokalisation von ERK1/2 dargestellt. Hier zeigt sich sowohl in den MiaPaCa-2^{resistAMG510}- (C) als auch den MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellen (D) eine homogene Färbung des Zytosols. Die Expression und Lokalisation von Ki67 ist in den Abbildungen (E) und (F) dargestellt. Hier zeigt sich eine Lokalisation des Proliferationsmarkers Ki67 im Zellkern. Die Anzahl der Ki67-positiven Zellen bei den MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellen beträgt 95,33 %. Die Anzahl der Ki67-positiven MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellen beträgt 81 %. Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen sind nicht gezeigt.

Zusammenfassend ist die Anzahl der Ki67 positiven Zellen bei den MiaPaCa-2^{reversDMSO}-Zellen im Vergleich zu den MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellen erhöht. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen somit Unterschiede in der Expression und Lokalisation der Proteine des Zellzyklus zwischen den MiaPaCa-2^{reversDMSO}- und MiaPaCa-2^{resistAMG510}-Zellen, die mit den oben dargestellten Ergebnissen der Proliferationsrate übereinstimmen.

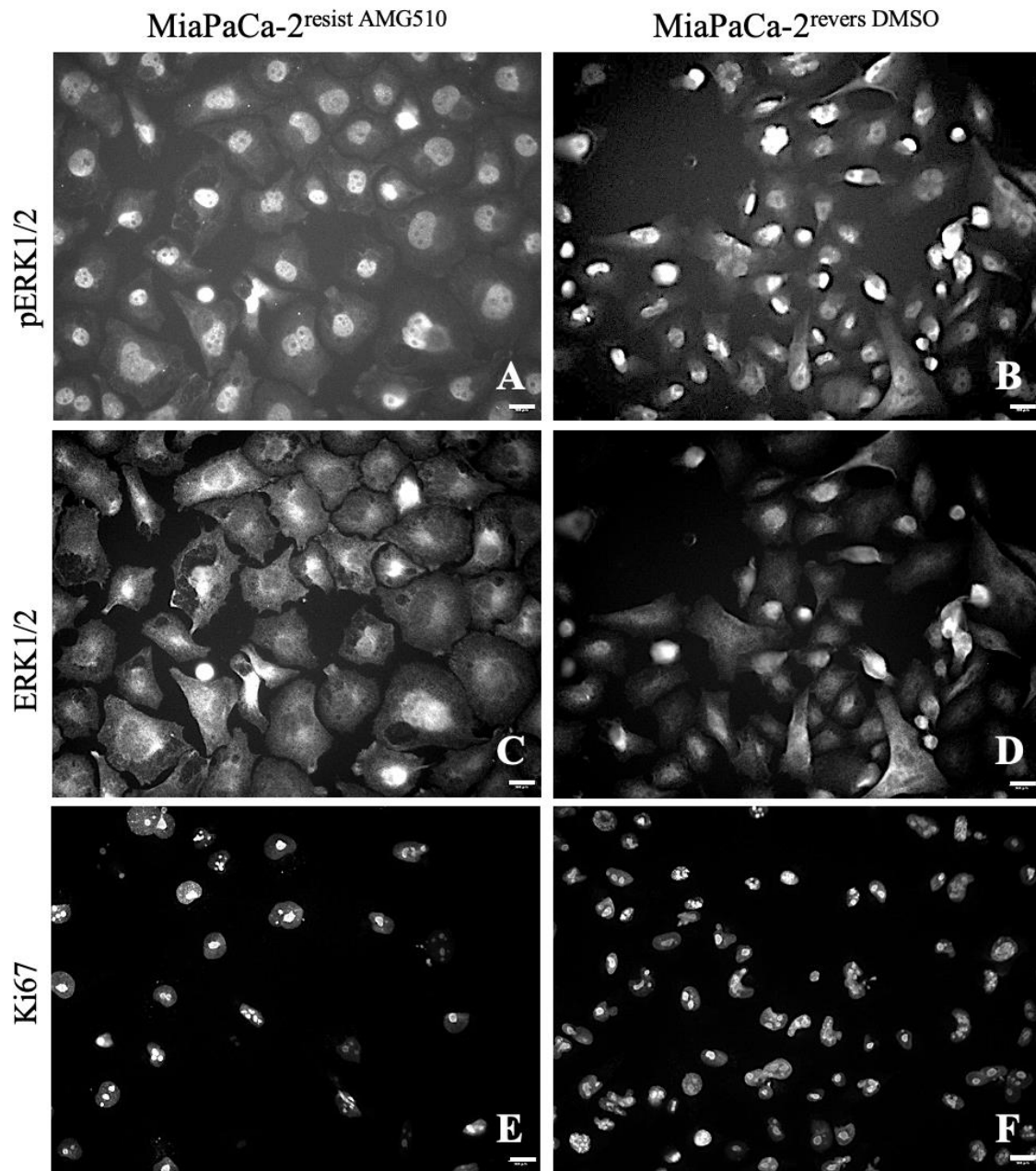


Abbildung 4.32 Veränderungen der Lokalisation und Expression von Proteinen des Zellzyklus in MiaPaCa-2-Zellen nach Entzug von AMG510. Zur Dargestellung der Lokalisation und der Expression von Proteinen des Zellzyklus in MiaPaCa-2^{resist}AMG510 und MiaPaCa-2^{revers}DMSO - Zellklone wurden Antikörper gegen ERK1/2 (*mouse*, Cell Signaling), pERK1/2 (*rabbit*, Cell Signaling) und Ki67 (*mouse*, Dianova) sowie Maus Cy3 und Alexa488 verwendet. Ein Maßstab ist unten rechts dargestellt ($\cong 100 \mu\text{m}$). $n = 1$

5 Diskussion

5.1 Auswirkungen einer transienten Gabe von AMG510 auf die Proliferation, Morphologie und Apoptose in K-Ras(G12C)-exprimierende Zelllinien

In vorangegangenen Studien, welche sich mit der Wirkung des Inhibitors AMG510 auf K-Ras(G12C)-exprimierende Zelllinien beschäftigt haben, zeigten sich Einflüsse auf die Proliferation und die Signaltransduktion [68, 72, 81, 82]. Unsere Arbeitsgruppe untersuchte in den Zelllinien MiaPaCa-2, HCC-44 und H358 die Sensitivität gegenüber AMG510 sowie die damit verbundenen Veränderungen in der Zellmorphologie, in apoptotischen Prozesse und in Signalwegen. Zur Erfassung von Unterschieden in der Sensitivität der Zelllinien und von morphologische Veränderungen wurden die Zellen über 96 h mit steigenden AMG510-Konzentrationen (10 nM bis 100 μ M) behandelt und die Zellen alle 24 Stunden fotografisch dokumentiert.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass die Sensitivität gegenüber dem Inhibitor AMG510 in den K-Ras(G12C)-exprimierende Zelllinien variiert. Die MiaPaCa-2-Zellen zeigten bereits bei einer Konzentration von 10 nM AMG510 eine Verringerung der Proliferation und eine Abnahme der überlebenden Zellen (57,98 % $\pm$ 13,54 %). Im Gegensatz dazu wurde bei den H358- und den HCC-44-Zellen erst bei 100 nM AMG510 eine starke Reduktion der Proliferation und der überlebenden Zellen zu dem Zeitpunkt 96 Stunden beobachtet (H358: 38,78 % $\pm$ 15,19 % und HCC-44: 54,01 % $\pm$ 12,17 %).

Die vorliegende für diese Dissertation ausgewerteten Resultate sind größtenteils mit den Literaturdaten vergleichbar. In den Studien von Adachi et al. [72] wurden die Zelllinien HCC-44 und H358 über 72 Stunden mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors AMG510 bis 10 μ M behandelt. Die H358-Zellen zeigten eine IC₅₀ von weniger als 100 nmol/l und die HCC-44 erwiesen sich als sensitiv, jedoch wurde kein IC₅₀ ermittelt. Die von Adachi et al. beobachteten Sensitivitätsunterschiede stimmen des Weiteren auch mit unseren Ergebnissen überein, die wir bezogen auf die Behandlung für 96 Stunden erweitert hatten. Wu et al. [83] bestätigten in H358-Zellen ebenfalls einen IC₅₀ von weniger als 100 nmol/l gegenüber dem Inhibitor AMG510. Khan et al. [84] bestimmten einen IC₅₀ der MiaPaca-2-Zellen von 66,2 nmol/l und der H358-Zellen von circa 50 nmol/l AMG510.

Die Gruppe um Adachi et al. [72] beobachtete zudem, dass die Hemmung der Proliferation durch AMG510 unter dreidimensionalen (3D) Sphäroid-Bedingungen bei Kultivierung der Zellen in 96-Well-Sphäroid-Platten ausgeprägter auftrat als es unter zweidimensionalen (2D) Zellkulturbedingungen. Ob die Zelllinien heterozygot (H358) oder homozygot (HCC-44) bezüglich der K-Ras-Mutation waren, hatte keinen Einfluss auf den Grad der Sensitivität. Eine ebenfalls verstärkte Empfindlichkeit gegenüber AMG510 zeigen die Resultate von Canon et al. [68]. In ihren 72-stündigen Versuchen wurden H358- und MiaPaCa-2-Zellen bei steigenden AMG510-Konzentrationen bis zu 2 μ M unter 2D- und 3D-Versuchsbedingungen untersucht, wobei ebenfalls eine erhöhte Sensitivität in Form einer verringerten Anzahl der überlebenden Zellen gegenüber dem Inhibitor unter 3D-Versuchsbedingungen auftrat.

Ma et al. [81] untersuchten darüber hinaus die Wirkung von AMG510 auf MiaPaCa-2-Zellen in 2D-adhärenenten Zellkulturen über 72 Stunden mit steigenden Konzentrationen von AMG510 (10 nM bis 10 μ M). Im Zuge dieser Studie zeigte sich bei 10 nM AMG510, dass noch etwa 60 % der MiaPaCa-2-Zellen lebensfähig waren, während es erst beim Überschreiten von 100 nM zu einem Abfall unter 50 % kam.

Eine Kategorisierung in Bezug auf die Sensitivität gegenüber AMG510 wurde von Qi et al. [82] vorgenommen. H358- und MiaPaCa-2-Zellen wurden als sensitiv gegenüber AMG510 eingestuft, da 1 μ M AMG510 für 72 h zu einer Inhibition der Zellproliferation von mehr als 50 % führt. Die HCC-44-Zellen hingegen wurden als moderat sensitiv eingestuft, mit einer Hemmung der Zellproliferation zwischen 20 % und 50 %. Diese Einteilung entspricht ebenfalls unseren Beobachtungen: die MiaPaCa-2-Zellen zeigten eine Reduktion der Zellproliferation bei 10 nM AMG510. Auch wiesen die H358- und HCC-44-Zellen ab 100 nM eine starke Inhibition der Proliferation auf.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die variierende Empfindlichkeit der K-Ras(G12C)-enthaltenden Zelllinien gegenüber dem Inhibitor AMG510 könnte die mono- versus biallelischen Mutation von K-Ras sein. Die Zelllinien HCC-44 und MiaPaCa-2 exprimieren ausschließlich K-Ras(G12C) (biallelisch), während die H358-Zellen sowohl K-Ras(G12C) als auch Wildtyp K-Ras exprimieren (monoallelisch). Die Arbeiten von Misale et al [85] und Adachi et al. [72] legen allerdings nah, dass adaptive, nicht-genetische Mechanismen, insbesondere die Reaktivierung von MAPK- und PI3K/AKT-Signalwege, eine zentralere Rolle einnehmen als die Zygotität. Zusammenfassend zeigen

bisherige Ergebnisse, dass die Sensitivität der K-Ras(G12C)-exprimierende Zelllinien gegenüber AMG510 variiert.

Weitergehend führte die Behandlung mit AMG510 in allen Zelllinien nicht nur zu einer reduzierten Proliferation, sondern auch zu morphologischen Veränderungen und apoptotischen Prozessen. MiaPaCa-2-Zellen wiesen in der hier vorliegenden Dissertation ab 10 nM AMG510 und die HCC-44-Zellen ab 100 nM AMG510 eine Veränderung des Phänotyps hin zu einer runden, vergrößerten und teils spiegelei-ähnlichen Morphologie auf (Abbildung 4.2 und Abbildung 4.6) - eine Beobachtung, die mit den Ergebnissen von Ma et al. [81] übereinstimmt, die ähnliche morphologische Veränderungen bei den MiaPaCa-2-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit 5 nM AMG510 festgestellt haben. Im Zuge der Untersuchung von Ma et al. zeigten die behandelten Zellen neben einer Größenzunahme, eine vermehrte Kernkondensation und Rupturen der Plasmamembran. Ein solcher Fund deutet auf eine erhöhte apoptotische Aktivität hin. Unsere Analysen der H358-Zellen zeigen eine Abnahme der Zellgröße und ein verringertes Bilden von Zell-Clustern ab einer Konzentration von 1 μ M AMG510 (Abbildung 4.4). Neben den Versuchen von Ma et al. existieren keine weiteren Veröffentlichungen, die sich spezifisch mit AMG510-induzierten morphologischen Veränderungen beschäftigen. Dem nachfolgend traten in den von uns untersuchten Zelllinien ab 10 μ M AMG510 ebenfalls apoptotische Prozesse in Form des Zell-*blebbing* auf. Als Nachweis der Apoptose wurde die Spaltung von Caspase 3 im Immunblot nachgewiesen. Ein solches Auftreten von *cleaved* Caspase 3 wurde bei der 3-stündigen Gabe von Staurosporin deutlich in H358- und MiaPaCa-2-Zellen nachgewiesen und diente als Kontrolle für die Induktion einer intrinsischen bzw. mitochondrialen Apoptose. Im Laufe der 24-stündigen sowie der 48-stündigen Gabe von AMG510 waren leichte Banden zu erkennen, die zu späteren Zeitpunkten dann aber nicht mehr nachweisbar waren (Abbildung 4.9). Die Arbeitsgruppe um Adachi [72] zeigte ebenfalls eine Induktion von apoptotischen Prozessen bei H358-Zellen bei 1 μ M AMG510 Gabe über 48 Stunden, durch den Nachweis von *cleaved* PARP (poly-(ADP-ribose)-polymerases), das als Produkt der Caspasen-Aktivität entsteht. Das unterstreicht die Ergebnisse unserer Erhebung an dieser Stelle. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse von Canon und Co-Autoren [68] das Entstehen von *cleaved* Caspase 3 während einer 24-stündigen Gabe von 0,1 μ M AMG510 in H358- und MiaPaCa-2-Zellen. Sowohl unsere Daten als auch bisher publizierte Ergebnisse weisen auf eine durch AMG510 induzierte Apoptose hin. Die fehlende Nachweisbarkeit nach 48 Stunden

könnte auf die Degradierung der *cleaved* Caspase 3, auf eine nicht induzierten Apoptose in den verbleibenden Zellen, Caspase-unabhängige Apoptosevorgänge oder auf methodische Faktoren zurückzuführen sein. Es liegen bislang aber keine Arbeiten vor, die sich mit dem Nachweis von *cleaved* Caspase 3 ab dem Zeitpunkt 72 Stunden nach AMG510-Inhibition beschäftigt haben, sodass hierfür weiterführende Studien notwendig wären.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass die Behandlung mit AMG510 zu morphologischen Veränderungen in allen untersuchten Zellen führt. Veränderungen der Morphologie traten bei den MiaPaCa-2-Zellen ab 10 nM, HCC-44-Zellen bei 100 nM und bei H358-Zellen ab 1 µM AMG510 auf. Zudem konnte die Induktion von apoptotischen Prozessen zum einen mittels der Fotodokumentation und zum anderen im Immunblot nachgewiesen werden. Zukünftige Untersuchungen sind notwendig, um die zellbiologischen und molekularen Mechanismen zu charakterisieren, die zu diesen Veränderungen führen. Hierzu könnten Immunfluoreszenzanalysen sowie Proteom- oder Genomanalysen durchgeführt werden.

5.2 Veränderungen in der Aktivität von Signaltransduktionskaskaden nach K-Ras(G12C)-Inhibition mit AMG510

In unseren Versuchen mit transienter AMG510 Gabe wurden Veränderungen in der Aktivität der Ras/Raf/MEK/ERK- und PI3-Kinase/AKT/mTORC1/S6K-Signalwegen beobachtet. Hierbei ergab sich, dass die Inhibition von K-Ras(G12C) mit AMG510 nicht zu einer dauerhaften Hemmung der untersuchten Signalwege führte. Als eine Erklärung hierfür werden adaptive, nicht-genetische Mechanismen angenommen, die ebenfalls die Unterschiede in der Sensitivität und Veränderungen der Morphologie begründen könnten. Es liegen wie zuvor beschreiben drei Isoformen des Proteins AKT vor (AKT1, AKT2 und AKT3). Im Folgenden wird daher der Begriff „AKT1/2“ verwendet, schließt aber ebenfalls AKT3 mit ein.

Die Analyse des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs zeigte in den H358- und MiaPaCa-2-Zelllinien eine anhaltende reduzierte ERK1/2 Phosphorylierung über 96 Stunden. Der Effekt auf den PI3-Kinase/AKT/mTORC1/S6K-Signalweg offenbart im Gegensatz dazu

einen zeitabhängigen Effekt. In den MiaPaCa-2-Zellen kam es nach 24 Stunden zu einer reduzierten Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6. Die H358-Zellen zeigten zu dem Zeitpunkt 24 und 48 Stunden ebenfalls eine Reduktion der Phosphorylierung von S6. Jedoch kam es bei den MiaPaCa-2-Zellen ab 48 Stunden und bei den H358-Zellen ab 72 Stunden zu einer erhöhten Phosphorylierung der untersuchten Proteine ERK1/2 und S6 (Abbildung 4.9) Die Gruppe um Ryan et al. [73] berichtet für H358- und MiaPaCa-2-Zellen eine starke Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT1/2 bei Verwendung der Inhibitoren ARS-1620 (1 μ M) und AMG510 (100 nM) im Verlauf von 24 Stunden, während es zu einer nur schwachen Reduktion zu den Zeitpunkten 48 und 72 Stunden kommt. Ein ähnliches Ergebnis berichtet Misale et al. [85] im Rahmen der 48-stündigen 1 μ M ARS1620 Gabe bei H358-Zellen. Hierbei kam es zu einer anfänglich starken Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 und anschließenden, deutlich schwächeren Reduktion zu dem Zeitpunkt 48 Stunden.

Ryan et al. [73] führen diese schnelle Reaktivierung der Signalübertragung von ERK1/2 nach der K-Ras(G12C)-Inhibition auf eine adaptive Reaktivierung zurück, welche die Wirksamkeit der Inhibitor-Klasse begrenzt. Diese *feedback reactivation* beschreibt einen Mechanismus, im Zuge dessen Proteine oder Signalwege, die durch eine anfängliche Hemmung unterdrückt wurden, nach einer gewissen Zeit durch alternative oder sekundäre Mechanismen reaktiviert werden [73, 86]. Ryan et al. [73] untersuchte die adaptive Reaktivierung mittels des Nachweises der aktiven K-Ras-GTP-Formen und Wildtyp-Ras Proteine (N-Ras und H-Ras) während einer 48-stündigen Inhibition der Zellen mit ARS-1620 (0,3 - 10 μ M). Anfangs war eine erfolgreiche Hemmung der K-Ras-Aktivität zu beobachten, jedoch kam es ab 48 Stunden nach der Inhibitorgabe zu einer Reaktivierung der nachgeschalteten Signalwege. Diese äußerte sich einerseits in einer erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2 und RSK. Es zeigte sich andererseits, dass die aktiven, GTP-gebundenen Formen der wildtypischen Ras Formen um das vier- bis fünffache erhöht waren, während K-Ras-GTP konstant unterdrückt blieb. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Reaktivierung der Signalwege nach K-Ras(G12C)-Hemmung in H358-Zellen durch eine stärkere Aktivierung der wildtypischen K-Ras, H-Ras und N-Ras Moleküle vermittelt wird.

Die Arbeitsgruppe Qi et al. [82] untersuchte die Mechanismen zur Reaktivierung des PI3K- bzw. MAPK-Signalwegs in resistenten und parenteralen Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit AMG510 (10 nM – 10 μ M). Die Versuche berichteten eine anfängliche

Reduktion der Akt1/2 Phosphorylierung mit anschließender Erhöhung. Eine erhöhte Phosphorylierung der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und *insulin-like growth factor receptor* (IGF-IR) wurde parallel nachgewiesen. Dies spricht dafür, dass unterschiedliche Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) in den resistenten Zellen aktiviert wurden und deutet auf eine adaptive Reaktivierung durch RTKs in resistenten K-Ras(G12C)-mutierten Zellen hin, um die Hemmung von ERK1/2 und AKT1/2 zu umgehen.

Ergänzend hierzu liefert das Paper von Lito et al. [64] Einsichten über mögliche adaptive Mechanismen. In den Versuchen mit H358-Zellen und dem K-Ras(G12C)-Inhibitor ARS853 (10 μ M) über 5 Stunden zeigte sich, dass ARS853 an GDP-gebundenes K-Ras(G12C) bindet und mittels eines *trapping mechanism* zu einem reduzierten K-Ras-GTP-Spiegel führt. Es kam zu einer Hemmung der Signaltransduktion, erkennbar an vermindertem pERK1/2 und pAKT1/2 Gehalt im Immunblot. Zusätzlich konnten in Versuchen mit dem Inhibitor ARS853 über 72 Stunden eine Abnahme der Zellproliferation und apoptotische Prozesse nachgewiesen werden. Die Gruppe um Lito et al. kommen auf das Ergebniss, dass der RTK-vermittelte Nukleotidaustausch die Kinetik und Wirksamkeit der KRASG12C-Hemmung in Krebszellen reguliert [64].

Ähnlich zu den von Lito et al. [64] beschriebenen Mechanismen liefert das Paper von Amodio et al. [87] weitere Hinweise auf die Rolle von RTKs in der adaptiven Reaktivierung nach K-Ras(G12C)-Inhibition. In kolorektalen Karzinomzelllinien (CRC) führte eine Stimulation mit EGF zu einer verstärkten adaptive Reaktivierung von ERK. In den CRC-Zellen führte EGF zu einer verstärkten ERK-Phosphorylierung, während die H358-Zellen keine EGF-vermittelte Aktivierung von ERK, MEK oder AKT1/2 erkennen ließen. Diese Unterschiede legen nahe, dass in den H358-Zellen eine Reaktivierung der Signalwege nicht primär über EGFR erfolgt. Eine Reaktivierung könnte möglicherweise über die Aktivierung von Wildtyp-Ras-Isoformen erfolgen. Die Ergebnisse von Lito [64] et al. und Amodio et al. [87] weisen auf eine zelltypspezifische adaptive Reaktivierung hin, die somit eine dauerhafte Hemmung der ERK1/2- und AKT1/2-Phosphorylierung verhindern. Es gibt bisher keine spezifischen Studien, die sich mit dem Nachweis einer verstärkten Expression von EGF oder IGF in den Zelllinien MiaPaCa-2 und H358 während der Behandlung mit AMG510 beschäftigen. Dies könnte ein wichtiger Aspekt für weitere Untersuchungen sein.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse zur Aktivität der Ras/Raf/MEK/ERK- und PI3-Kinase/AKT1/2/mTORC1/S6K-Signalwege stellten fest, dass AMG510 einen inhibierenden Einfluss auf die Aktivität beider *downstream* Signalwege in den H358- und MiaPaCa-2-Zellen nimmt. Die kurzfristige Reduktion der Phosphorylierung der Proteine ERK1/2 und AKT1/2 hängt mit der Inaktivierung von K-Ras(G12C) zusammen, was in entsprechenden K-Ras-Aktivitätsassays, die in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. K. Giehl durchgeführt worden sind, belegt werden konnte (persönliche Mitteilung K.Giehl). Der darauffolgende Anstieg nach 48 Stunden könnte auf *feedback* Reaktivierungen, z.B. durch Aktivierung von RTKs oder Aktivierung von H-Ras oder N-Ras, zurückzuführen sein.

Unsere Beobachtungen zur transienten AMG510-Gabe werden durch Ergebnisse von Choi et al. [88] ergänzt. Die Autoren zeigten in Versuchen mit der Brustkarzinom-Zelllinie LM2, dass erhöhte K-Ras-Proteinlevel und eine verstärkte Aktivierung des Ras-ERK-Signalwegs zu einer gestörten Organisation des Aktinzytoskeletts führen. Die LM2-Zellen zeigten weniger geordnete Aktin-Stressfasern und defekte fokale Kontakte, was zusätzlich mit einer erhöhten Motilität und Invasivität der Zellen einhergingen. Es wurde festgestellt, dass bei der Hemmung des Ras-ERK-Signalwegs mittels des MEK-Inhibitor U0126 (25 μ M) bis zu 72 Stunden eine Wiederherstellung der Stressfasern und von fokalen Kontakten erfolgt. Die Motilität der Zellen nahm jedoch nicht ab und es kam zu einer Aktivierung des PI3-Kinase/AKT/mTORC1/S6K-Signalwegs. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit unseren Daten, wobei es bei AMG510-Gabe zu einer anfänglichen Inhibition der K-Ras-Aktivität und der nachgeschalteten Signalwege kommt. Zur weiteren Aufklärung dieses Mechanismus könnten Inhibitorstudien sowie Genexpressions- und Proteinexpressionanalysen der einzelnen Signalmoleküle beitragen.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse zur transienten Gabe von AMG510 über 96 Stunden eine initiale Hemmung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs, erkennbar an der reduzierten Phosphorylierung von ERK1/2. Im Gegensatz dazu zeigt die Hemmung des PI3-Kinase/AKT/mTORC1/S6K-Signalwegs eine initiale Reduktion der Phosphorylierung von S6, gefolgt von einem Anstieg ab 48 Stunden. Unsere Ergebnisse korrelieren mit denen von Ryan et al.[73], Misale et al. [85], und Qi et al. [82], die auch adaptive Reaktivierung von Signalwegen bei K-Ras(G12C)-Inhibition beschrieben.

Zusätzlich stellten Lito et al. [64] fest, dass die Hemmung durch einen *trapping mechanism* erfolgt, bei dem der Inhibitor selektiv an die inaktive (GDP-gebundene) Form von K-Ras(G12C) bindet und so die Reaktivierung blockiert, wodurch der Signalweg effektiv unterbrochen wird. Jedoch kann eine konstante Hemmung durch eine adaptive Reaktivierung verhindert werden, verursacht durch etwa Aktivierung von Wildtyp-Ras oder RTKs, sowie die Aktivierung alternativer Signalwege. Insgesamt weisen diese Daten darauf hin, dass die Wirksamkeit von K-Ras(G12C)-Inhibitoren durch adaptive Mechanismen begrenzt werden. Daraus resultiert, dass für eine dauerhafte Hemmung der Signalwege und damit für einen verbesserten Therapieansatz Kombinationen von K-Ras(G12C)-Inhibitoren und die gleichzeitige Blockade von zusätzlichen Signalwegen wie RTKs und des PI3-Kinase/AKT/mTORC1/S6K-Signalweg verwendet werden sollten, wenn die Toxizität dieses erlaubt. Für einen dauerhaften Therapieerfolg könnte ein Kombinationsansatz notwendig sein, um somit die adaptiven Resistenzmechanismen zu überwinden.

5.3 Zelluläre und molekulare Veränderungen bei der Resistenzentwicklung gegen AMG510 und MRTX849

5.3.1 Veränderte Zell-Proliferation nach Resistenzentwicklung

Während der Generierung der AMG510 bzw. MRTX849 resistenten Zellklone wurden Veränderungen in der Proliferation festgestellt. Die Verdopplungszeit wurde anhand der Zellzahl bei Erreichen einer 95 prozentigen Konfluenz und der dafür benötigten Zeit bestimmt. Diese Methode wurde gewählt, da die klassischen Wachstumsassays (z.B.: Ki67 Färbung oder BrdU Assay) aufgrund des experimentellen Designs nicht anwendbar waren.

In MiaPaCa-2^{resist}-Zellklone verlängert sich die Verdopplungszeit unter AMG510- oder MRTX849-Behandlung konzentrationsabhängig. Die Verdopplungszeit bei AMG510-behandelten MiaPaCa-2^{resist} Zellklone A verlängert sich auf 145,8 % (44,9 Stunden) im Vergleich zur Kontrolle (31,16 Stunden) bei 10 µM. Die gegen MRTX849 resistenten MiaPaCa-2-Zellklone wiesen bei einer Konzentration von 5 µM eine Vervierfachung der Verdopplungszeit (153,6 Stunden) gegenüber der Kontrolle auf (Abbildung 4.15 und Abbildung 4.16). Auch die resistenten H358 Zellklone (H358^{resist} A und B) wiesen unter beiden Inhibitoren eine Verlängerung der Verdopplungszeit auf. Bei 10 µM AMG510 verlängert sich die Verdopplungszeit auf 79,08 Stunden, fast das Doppelte der Kontrolle mit 38,66 Stunden. Unter MRTX849 Inhibition (100 nM MRTX849) stieg die Verdopplungszeit auf 348,5 Stunden an, und somit etwa dem Neunfachen der Kontrollgruppe (Abbildung 4.17 und Abbildung 4.18).

Diese Daten zur Proliferation zeigen den hemmenden Einfluss der Inhibitoren während der Resistenzentwicklung, jedoch weisen sie auch auf Limitationen hin. Die anhaltende Proliferation während der Inhibitorbehandlung weist auf die Notwendigkeit hin, dass gezielte Strategien entwickelt werden müssen, um die persistierende Aktivität der Signalwege zu verhindern und damit die Proliferation vollständig zu unterdrücken. Im dem folgenden Unterkapitel werden deswegen Mechanismen der Resistenzbildung und Ansätze für die Umsetzung einer verbesserten Therapie diskutiert.

5.3.2 Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen AMG510 und MRTX849 in MiaPaCa-2- und H358-Zelllinien

Im Rahmen der Generierung von AMG510 und MRTX849 resistenten MiaPaCa-2- und H358-Zellklonen wurden Veränderungen in der Expression und Aktivität der Proteine des Ras/Raf/MEK/ERK- und PI3-Kinase/AKT1/2/mTORC1/S6K-Signalwegs analysiert.

Unsere Analysen der resistenten MiaPaCa-2-Zellklone zeigten diesbezüglich eine anhaltend erhöhte Phosphorylierung der Proteine ERK1/2, AKT1/2 und S6 bereits ab 1 nM des Inhibitors. AMG510 und MRTX849 im Vergleich zu den DMSO Kontrollzellen (Abbildung 4.22 und Abbildung 4.23) Die erhöhte Aktivität der Signalwege könnte als Fortsetzung des Anstiegs bei transienter Inhibitorgabe gedeutet werden. Dies deutet darauf hin, dass in den resistenten MiaPaCa-2-Zellklone adaptive Resistenzmechanismen existieren, die über kurzfristige Reaktivierung hinausgehen und somit stabile Veränderungen aufweisen.

Die verstärkte Signalwege-Aktivierung könnte durch die Reaktivierung von Wildtyp-Ras (H-Ras, N-Ras) durch Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) verursacht sein. Ryan et al. [73] beschrieben in ihrer Arbeit, dass es durch eine K-Ras(G12C)-Inhibition zu einer Reaktivierung von Wildtyp-Ras durch RTKs (z. B. EGFR) kommen kann. Diese Reaktivierung führt dazu, dass der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg aktiviert wird [73]. Dies würde einen Erklärungsansatz für die verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 in den resistenten MiaPaCa-2-Zellklone darstellen.

Gleichzeitig weist die erhöhte Phosphorylierung von AKT1/2 und S6 auch auf mögliche alternative Resistenzmechanismen hin. Die Aktivierung von RTKs könnte zu einer verstärkten Aktivität des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs führen. Qi et al. [82] beschrieben, dass es in resistenten K-Ras(G12C)-exprimierende Zellen es mittels einer Hochregulation von EGFR und IGF-IR zu einer erhöhten Aktivität des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs kommt [82]. Unsere Ergebnisse der Aktivität der Signalwege stehen insgesamt im Einklang mit den Studien von Canon et al. [68] und Adachi et al. [72]. Canon et al. [68] und Adachi et al. [72] zeigen, dass die RTK-Signalaktivierung eine zentrale Rolle in der Resistenzentwicklung gegen K-Ras(G12C)-Inhibitoren spielt. Hierbei könnten zukünftige Analysen der MiaPaCa-2^{resist}-Zellklone

untersuchen, ob eine verstärkte Aktivität von RTKs und Wildtyp-Ras vorhanden ist. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die Resistenzmechanismen der MiaPaCa-2^{resist}-Zellklone durch eine Kombinationstherapie aus K-Ras(G12C) und RTK-Inhibitoren verhindert werden können.

Im Gegensatz zu den einheitlichen Veränderungen in den MiaPaCa-2^{resist}-Zellklonen zeigten die Analysen der Signalwege der H358^{resist}-Zellklone eine heterogene Phosphorylierung der untersuchten Proteine ERK1/2, S6 und AKT1/2. Es zeigte sich im Laufe der Behandlung mit AMG510 eine verringerte Phosphorylierung des Proteins ERK1/2. Die Phosphorylierung des ribosomalen Protein S6 war initial reduziert, stieg jedoch im weiteren Verlauf leicht an und näherte sich schließlich dem Niveau der DMSO-Kontrolle an. Das Protein Akt1/2 wies eine erhöhte Phosphorylierung ab 100 nM auf (Abbildung 4.24). Die MRTX849 H358^{resist}-Zellklone zeigten ebenfalls eine verringerte Phosphorylierung von ERK1/2. Es war jedoch eine erhöhte Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 und von Akt1/2 ab einer Konzentration von 10 nM erkennbar (Abbildung 4.25). Als möglicher Mechanismus der Resistenz in den H358^{resist}-Zellklonen ist die adaptive Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs als Reaktion auf die selektive K-Ras(G12C)-Inhibition zu benennen. Blaquier et al. [89] beschreiben Resistenzmechanismen in NSCLC-Zelllinien, darunter H358, während der Behandlung mit AMG510 über einen Zeitraum von zwölf Wochen. Die genomischen und proteomischen Analysen zeigten, dass es bei K-Ras(G12C)-Inhibition auch in NSCLC-Zelllinien häufig zu einer Reaktivierung von RTKs und der nachgeschalteten Signalwege wie des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs kommt. Diese Rückkopplung könnte die erhöhte Phosphorylierung von AKT1/2 in den resistenten H358-Zellen erklären.

Ein weiterer möglicher Resistenzmechanismus ist die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), die häufig mit einer erhöhten Zellmigration, Invasivität sowie einer Resistenz gegenüber Therapeutika einher geht [72]. Adachi et al. [72] zeigten in resistenten H358-Zellen, dass es zu einer erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2 und S6 kommt, nachdem eine epithelial-mesenchymale Transition vollzogen wurde. In unseren Experimenten zeigt sich aber eine Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2. Ein solcher Fund deutet darauf hin, dass es unterschiedliche Subpopulationen innerhalb der resistenten H358-Zellen verschiedene Resistenzmechanismen nutzen. Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Phosphorylierungsmuster könnte dementsprechend

die Selektion von Subpopulationen während der Resistenzentwicklung sein. Blaquier et al. [89] beschrieben, dass es unter Selektionsdruck mit K-Ras(G12C)-Inhibitoren zur Entstehung von verschiedenen Zellklonen mit unterschiedlichen Resistenzmechanismen kommen kann. Somit könnte es sein, dass die von uns beobachteten Veränderungen in den H358^{resist} durch sowohl EMT als auch Aktivierung des adaptiven PI3-Kinase/AKT1/2/mTORC1/S6K-Signalwegs verursacht wurden. Zudem könnte die „increasing drug dose method“ zur Generierung der resistenten Zellklone vermutlich die Selektion von spezifischen Subpopulationen mit unterschiedlichen Signalweg-Adaptionen begünstigt haben.

Nachfolgend ist hier noch zu erwähnen, dass es das Ziel einer zukünftigen Studie bzw. Forschungsarbeit ist, mithilfe genomischer und proteomischer Analysen mehr Erkenntnisse über die heterogenen Mechanismen der H358^{resist}-Zellklone zu gewinnen.

5.3.3 Veränderungen in der Zellmorphologie im Verlauf der Resistenzentwicklung

Im Rahmen der Generierung der resistenten H358- und MiaPaCa-2-Zellklone wurden deutliche morphologische Veränderungen beobachtet.

Die MiaPaCa-2^{resist}-Zellklone weisen bei 50 nM AMG510 eine beginnende Zunahme der Zellgröße auf, die in den folgenden Passagen und erhöhter AMG510-Konzentration zu einer flachen, ausgedehnten Zellform führt und konstant bleibt (Abbildung 4.11). Die MRTX849 MiaPaCa-2^{resist}-Zellklone weisen ab 50 nM MRTX849 ebenfalls eine flache, ausgebreitete Zellform auf, die sich jedoch bei 5 µM MRTX849 zu einer länglichen, spindelförmigen Zellform mit verstärkter Motilität verändert (persönliche Kommunikation mit K. Giehl) (Abbildung 4.13). Immunfluoreszenzaufnahmen der 10 µM AMG510-resistenten MiaPaCa-2-Zellklone zeigen ein ausgebreitetes Aktinzytoskelett mit einer dominanten Lokalisation von Stressfasern und kortikalen Filamenten entlang der Plasmamembran. Im Kontext des Nachweises der Lokalisation von Vimentin und Paxillin war eine vermehrte Ausbildung von fokalen Kontakten entlang der Zellperipherie erkennbar. Das lässt auf eine Umstrukturierung von Adhäsionskontakten schließen (Abbildung 4.31).

Die morphologischen Veränderungen stehen mit den zuvor beschriebenen Veränderungen der Signalwege im Zusammenhang. Hierbei steht insbesondere die verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 im Fokus, da die ERK-Signaltransduktion einen entscheidenden Einfluss auf das Zytoskelett und die Zelladhäsion nimmt. Unsere Daten werden durch Daten von Choi et al. [88] gestützt, die zeigen, dass eine verstärkte Aktivierung des ERK-Signalwegs in MDA-MB-231 LM2-Zellen zu einer Dissoziation von Stressfasern und fokalen Kontakten führt. In den Zellen war die Aktivität von K-Ras-ERK erhöht, was mit einer reduzierten RhoA-Aktivität und Phosphorylierung von Myosin-Leichtketten-Phosphorylierung einhergeht. Ähnliche Ergebnisse hat auch die Arbeitsgruppe von K. Giehl nach Überexpression von K-Ras(G12V) in PANC-1 Pankreaskarzinomzellen gezeigt. Hier führte die erhöhte K-Ras-Aktivität zu einer Reduktion von aktivem RhoA und Rac1 und einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts [90]. Diese Veränderung führt zu einer erhöhten Zellmotilität und einer spindelförmigen Morphologie, welche sich mit den beobachteten Veränderungen in von uns generierten 5 μ M MRTX849 resistenten Zellklonen vergleichen lässt.

Interessanterweise wurden ähnliche morphologische Veränderungen bei CHO-Zellen nach der Behandlung mit dem MAPK-Inhibitor KT5720 und U-98017 beschrieben [91]. Die Inhibition führte in den CHO-Zellen zu einer reduzierten Phosphorylierung von ERK1/2 – im Verbund mit einer veränderten Organisation der Adhäsionskontakte, einer Umstrukturierung des Mikrotubuli-Netzwerks sowie einer flachen, vergrößerten Zellmorphologie. Diese Beobachtung zeigt, dass die Regulation der Zelladhäsion durch ERK1/2 zelltyp-spezifisch ist und dementsprechend zu unterschiedlichen morphologischen Veränderungen führen kann. Die Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 in CHO-Zellen bewirkt eine verstärkte Adhäsion und eine flachere Morphologie. Im Vergleich zeigen die von uns untersuchten MiaPaCa-2^{resist}-Zellklone bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen (50 nM) eine verstärkte Ausbildung der Stressfasern, von kortikalen Filamente sowie Adhäsionskontakten, trotz einer erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2. In beiden Zelllinien führt die Veränderung der Aktivität von ERK1/2 zu einer flachen Morphologie, jedoch erfolgt dies über verschiedene Mechanismen.

Choi et al. [88] und unsere Arbeitsgruppe [80, 92] zeigen außerdem zum einen, dass eine alleinige Hemmung des ERK-Signalwegs nicht ausreicht, um die Motilität vollständig zu unterdrücken, und zum anderen, dass eine Aktivierung des PI3K-Signalwegs eine Kompensation bewirken kann. Die morphologischen Veränderungen der resistenten

Zellklone könnte durch diese wechselseitige Regulation in Abhängigkeit der InhibitorKonzentration erklärt werden. Somit wäre es in niedrigen Konzentrationen möglich, dass eine Verstärkung der Adhäsionskontakte durch ERK1/2 überwiegt, während bei höheren InhibitorKonzentrationen es zu einer spindelförmigen Zellform und verstärkter Motilität durch Aktivierung des AKT-Signalweges kommt. Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass die anhaltende Phosphorylierung von ERK1/2 in den MiaPaCa-2^{resist}-Zellklone sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Modulation des Zytoskeletts und in den Adhäsionskontakten einnimmt.

Auch die resistenten H358-Zellklone weisen morphologische Anpassungen auf. Die AMG510-resistenten H358-Zellen zeigen ab einer Konzentration von 50 nM vereinzelt einen länglichen, spindelförmigen Phänotyp auf, der bei steigenden Konzentrationen schließlich in allen AMG510-resistenten Zellen sichtbar ist (Abbildung 4.19). Die MRTX849-resistenten H358-Zellen weisen bei 50 nM eine veränderte Morphologie, in Form von ungeordneten Clustern aus runden, deutlich größeren H358-Zellen auf. Diese Veränderungen des Phänotyps sind bei 100 nM MRTX849 noch ausgeprägter (Abbildung 4.20). Als bemerkenswert ist dabei das Auftreten von drei distinkten Phänotypen parallel zueinander in der Kultur, die als runder, eckiger bzw. spindelförmiger Phänotyp bezeichnet werden können (Abbildung 4.21). Diese Existenz der verschiedenen Phänotypen könnte heterogenen EMT in unterschiedliche Stadien der EMT widerspiegeln. Die runden Zellen zeigen ein stärkeres epitheliales Erscheinungsbild, während die spindelförmigen Zellen einen mesenchymalen Phänotyp aufweisen. Weitergehend könnten die eckigen Zellen eine intermediäre Phase darstellen, welche eine Mischung aus epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften beinhaltet [93].

Wie weiter oben bereits dargestellt, können EMT-assoziierte Prozesse ein wichtiger Mechanismus der erworbenen Resistenz gegen K-Ras(G12C)-Inhibitoren von Nicht-kleinzelligen Lungenkrebs mit K-Ras(G12C)-Mutation sein [72]. Die veröffentlichten Untersuchungen zeigten, dass gegen 1 µM AMG510 resistente H358-Zellen eine große, flache Morphologie und keine Zell-Cluster aufwiesen. Die resistenten Zellen zeigten eine Herunterregulation von epithelialen Markern (z.B. E-Cadherin) und eine Hochregulation von mesenchymalen Markern (z.B. Vimentin) sowie einen Anstieg der ERK1/2 Phosphorylierung auf. Zusätzlich kam aufgrund der Aktivierung von IGFR es zu einer Reaktivierung des nachgeschalteten PI3K/AKT-Signalwegs, der die Resistenz gegenüber

AMG510 förderte [72]. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die hier erhobenen Ergebnisse in Teilen mit denen der Gruppe um Adachi [72] übereinstimmen. Jedoch weisen die von uns generierten H358^{resist}-Zellklone bei 1 μ M AMG510 eine längliche, spindelförmige Zellform und eine Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 auf. Neben den Beobachtungen von Adachi et al. [72] zeigte Megid et al. [94] in Versuchen mit resistenten H358-Zellen ebenfalls Prozesse einer EMT. Diese war auch durch Herunterregulation von epithelialen Markern (z.B. E-Cadherin), eine Hochregulation von mesenchymalen Markern (z.B. Vimentin und Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1) zu erkennen, sowie einer reduzierten Zelladhäsion. Interessanterweise zeigen unsere Ergebnisse eine dynamische Anpassungsreaktion des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs je nach der Inhibitorkonzentration. Dies deutet darauf hin, dass eine Resistenzentwicklung nicht nur über ERK1/2, sondern ebenfalls durch adaptive Reaktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs erfolgen kann. Ob Unterschiede in den Zellkulturbedingungen, der Passagenzahl oder der Dauer der Inhibitorexposition zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben und welche molekularen Mechanismen diesen Prozessen zugrunde liegen, sollten in weiteren Versuchen untersucht werden. Hierzu könnten der Nachweis von spezifischen EMT-Markern wie N-Cadherin, E-Cadherin oder ZO-1, Vimentin oder Snail1 und 2, oder auch die Aktivität der Rho-GTPasen Hinweise liefern.

5.4 Reversible Mechanismen in den resistenten AMG510-behandelten MiaPaCa-2-Zellen

Nach Abschluss der Generierung der AMG510 resistenten MiaPaCa-2 Zellklone wurde untersucht, ob die Veränderungen der Proliferation, der Proteinaktivitäten und der Zellmorphologie reversibel sind. Ein Wiedererlangen der ursprünglichen Morphologie nach Absetzen des Inhibitors würde auf streng Inhibitor-abhängige Mechanismen, eine Irreversibilität dem gegenüber aber auf genetische oder epigenetische Veränderungen hinweisen. Diese Fragestellung hat eine klinische Relevanz, da sie Hinweise darauf geben könnte wie die Gestaltung von Therapiepausen und alternative Behandlungsstrategien in Therapie-resistenten Tumoren zu gestalten ist.

Unsere Analysen der Proteinexpression zeigen, dass 11 Tage nach dem Absetzen von AMG510 die Phosphorylierung der Proteine ERK1/2, S6 und AKT1/2 in MiaPaCa-2^{revers} abnimmt (Abbildung 4.30). Die erhaltenen Werte ähneln dabei denen der DMSO-Kontrollzellen. Eine solche Beobachtung deutet darauf hin, dass die Effekte auf die Ras/Raf/MEK/ERK- und PI3-Kinase/AKT/mTORC1/S6K-Signalwege abhängig von der Anwesenheit des Inhibitors sind. Parallel dazu zeigt sich, dass die MiaPaCa-2^{revers}-Zellklone eine sukzessive Veränderung der Morphologie erfahren. Die MiaPaCa-2^{revers} entwickeln vereinzelt eine kleine, teils längliche Morphologie, die sich mit fortschreitender Zeit des Inhibitorentzugs verstärkt (Abbildung 4.27). Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts und der fokalen Kontakte, die eher der Organisation in den parentalen MiaPaCa-2-Zellen entspricht (Abbildung 4.31). Es kommt zu einer Zunahme der Proliferation der MiaPaCa-2^{revert} nach Absetzen des Inhibitors, dies ist erkennbar an dem erhöhten Nachweis der Ki67-Expression (Abbildung 4.32) sowie der verkürzten Verdopplungszeit (Abbildung 4.29). Es zeigt sich eine Rückkehr zu der ursprünglichen Verdopplungszeit der parentalen Zellen nach elf Tagen. Die Ergebnisse deuten deswegen darauf hin, dass die durch AMG510 induzierten Veränderungen reversibel sind.

Bisher existieren noch keine Studien, die sich explizit mit den Veränderungen während des Absetzens des Inhibitors AMG510 beschäftigt haben. In dem Übersichtsartikel von Qin et al. [95] werden Studien aufgeführt, in denen Tumorzellen nach Therapieabbruch zu ihrem ursprünglichen Phänotyp zurückkehren können, wenn die Resistenz auf

adaptiven Mechanismen beruht. Dies entspricht dem Konzept der „*drug-tolerant persisters*“, die eine transiente Resistenz aufweisen und nach einer Therapiepause sensibel auf eine erneute Behandlung reagieren können. Jenes Phänomen wurde auch im Zuge der Beobachtung anderer Krebsarten und Therapieregime beschrieben - beispielsweise in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, welche nach Ablauf einer Therapiepause eine erneute Sensitivität gegenüber EGFR-Inhibitoren offenbarten. Shi et al. [96] dokumentieren in einer weiteren Übersichtsarbeit, dass die zelluläre Plastizität eine zentrale Rolle während der Anpassung von Tumorzellen gegenüber einer Therapie spielen. Hierbei tragen insbesondere nicht-genetische Mechanismen wie epigenetische Modifikationen, Veränderungen der Transkriptionsfaktorregulation und EMT-ähnliche Übergänge zu einer reversiblen Anpassung der Tumorzellen bei. In diesem Kontext könnte die Rückkehr der resistenten MiaPaCa-2-Zellen zu dem ursprünglichen Phänotyp nach Absetzen der AMG510-Behandlung durch eine Reversibilität der plastischen Anpassung erklärbar sein.

Zusätzlich weisen die revertanten MiaPaCa-2-Zellklone nach Absetzen des Inhibitors eine verringerte Phosphorylierung der Proteine ERK1/2, S6 und AKT1/2 auf, im Vergleich zu den AMG510 resistenten MiaPaCa-2-Zellklone. Dieser Befund deutet auf eine adaptiv regulierte Anpassung der revertanten Zellen hin, die nach dem Entfernen des Selektionsdrucks rückläufig sind.

Zusammenfassend lässt sich anhand unsere hier vorliegenden Auswertungen sagen, dass die AMG510 induzierten Veränderungen der Signaltransduktion, Zellmorphologie und Proliferation ganz oder teilweise reversibel sind. Der Resistenzmechanismus scheint somit nicht auf stabilen genetischen oder epigenetischen Modifikationen zu beruhen, sondern durch adaptive Mechanismen bedingt zu werden. Die erhöhte Aktivierung der zentralen Signalwege könnte einen intermediären Zellzustand darstellen, der unter anhaltendem Selektionsdruck langfristig zu genetischen Modifikationen übergehen kann. Zukünftig relevant ist sicherlich die Frage, ob ein Absetzen des Inhibitors während der Therapiepause vorteilhaft sein kann. Dies könnte die Entstehung von therapieresistenten Zellen verhindern und somit eine Rückkehr in einen sensitiven Zustand zu fördern. Zur Untersuchung der Fragestellung sollten entsprechende klinische Studien durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung

Mit der Entwicklung der K-Ras(G12C)-spezifischen Inhibitoren AMG510 und MRTX849 ist es gelungen, die Zielstruktur des mutierten K-Ras zu inhibieren. Dies stellt eine vielversprechende Strategie zur Behandlung mit mutierten K-Ras Proteinen Tumoren dar. Allerdings zeigte sich bislang nur ein temporärer therapeutischer Effekt, da es zu Resistenzbildung im Verlauf der Behandlung kommt und somit die langfristige Wirksamkeit der Therapie limitiert wird. Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung von AMG510- und MRTX849-resistenten Zellklone der Lungenkarzinom-Zelllinie H358 und der Pankreaskarzinom-Zelllinie MiaPaCa-2 mittels der Anwendung der „*increasing drug dose method*“.

Zur Untersuchung möglicher Resistenzmechanismen wurden im Prozess der Resistenzentwicklung eine Charakterisierung der Proliferation mittels der Dokumentation der Änderungen der Proliferationszeiten, der Zellzahl und der Verdopplungszeit durchgeführt. Zusätzlich wurde auf der Grundlage von Western Blot-Analysen Veränderungen in der Phosphorylierung zentraler Signalproteine der Ras/Raf/MEK/ERK- und PI3-Kinase/AKT1/2/mTORC1/S6K-Signalwege untersucht. Darüber hinaus erfolgte eine Dokumentation der Veränderungen der Zellmorphologie während der Generierung mittels Fotodokumentation und Immunfluoreszenzanalysen.

Die Daten unserer Untersuchung zeigen, dass die Resistenzentwicklung in den MiaPaCa-2-Zellklone zu einer anhaltend erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2, AKT1/2 und S6 führt, wobei sich als mögliche Ursache eine erhöhte Aktivität von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) andeutet. Die Resistenzentwicklung der H358-Zellklone zeigte ein heterogenes Phosphorylierungsmuster der zentralen Signalproteine mit einer möglichen Beteiligung von RTKs. Die beobachteten morphologischen Veränderungen korrelieren mit epithelial-mesenchymalen Transition (EMT)-assoziierten Prozessen.

Nach dem Absetzen des Inhibitors AMG510 in den resistenten MiaPaCa-2-Zellklonen zeigte sich eine reduzierte Aktivität der Signalwege, eine morphologische Veränderung hin zum ursprünglichen Phänotyp und die Proliferation stieg erneut an. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Resistenz in den MiaPaCa-2-Zellklonen auf adaptive, reversible Mechanismen basiert und nicht durch irreversible Veränderungen verursacht wird. Die Reversibilität der Resistenzmechanismen legt nahe, dass gezielte Therapiepausen eine potenzielle Strategie zur Überwindung der Resistenzmechanismen darstellen könnten.

7 Summary

With the development of the K-Ras(G12C)-specific inhibitors AMG510 and MRTX849, it has been possible to inhibit the target structure of the mutated K-Ras. This represents a promising strategy for the treatment of mutated K-Ras protein tumors. However, so far only a temporary therapeutic effect has been shown, as resistance develops during the course of treatment, thus limiting the long-term effectiveness of the therapy. The main aim of this study was to generate AMG510- and MRTX849-resistant cell clones of the lung carcinoma cell line H358 and the pancreatic carcinoma cell line MiaPaCa-2 using the “increasing drug dose method”.

To investigate possible resistance mechanisms, proliferation was characterized during the process of resistance development by documenting changes in proliferation times, cell number and doubling time. In addition, changes in the phosphorylation of central signaling proteins of the Ras/Raf/MEK/ERK and PI3 kinase/AKT1/2/mTORC1/S6K signaling pathways were investigated on the basis of Western blot analyses. In addition, the changes in cell morphology during generation were documented by means of photo documentation and immunofluorescence analyses.

The data from our study show that the development of resistance in the MiaPaCa-2 cell clones leads to a persistently increased phosphorylation of ERK1/2, AKT1/2 and S6, with increased activity of receptor tyrosine kinases (RTKs) as a possible cause. The development of resistance in the H358 cell clones showed a heterogeneous phosphorylation pattern of the central signaling proteins with a possible involvement of RTKs. The observed morphological changes correlate with epithelial-mesenchymal transition (EMT)-associated processes.

After discontinuation of the inhibitor AMG510 in the resistant MiaPaCa-2 cell clones, there was a reduced activity of the signaling pathways, a morphological change towards the original phenotype and proliferation increased again. These findings indicate that the resistance in the MiaPaCa-2 cell clones is based on adaptive, reversible mechanisms and is not caused by irreversible changes. The reversibility of the resistance mechanisms suggests that targeted therapy pauses could be a potential strategy to overcome the resistance mechanisms.

8 Literaturverzeichnis

1. Hahn, W.C. and R.A. Weinberg, *Modelling the molecular circuitry of cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(5): p. 331-41.
2. Giehl, K., *Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis*. 2005. 386(3): p. 193-205.
3. Meinohl, C., et al., *Galectin-8 binds to the Farnesylated C-terminus of K-Ras4B and Modifies Ras/ERK Signaling and Migration in Pancreatic and Lung Carcinoma Cells*. Cancers (Basel), 2019. 12(1).
4. Hobbs, G.A., C.J. Der, and K.L. Rossman, *RAS isoforms and mutations in cancer at a glance*. J Cell Sci, 2016. 129(7): p. 1287-92.
5. Wennerberg, K., K.L. Rossman, and C.J. Der, *The Ras superfamily at a glance*. J Cell Sci, 2005. 118(Pt 5): p. 843-6.
6. Vetter, I.R., *The Structure of the G Domain of the Ras Superfamily*, in *Ras Superfamily Small G Proteins: Biology and Mechanisms 1: General Features, Signaling*, A. Wittinghofer, Editor. 2014, Springer Vienna: Vienna. p. 25-50.
7. Cox, A.D., et al., *Drugging the undruggable RAS: Mission possible?* Nat Rev Drug Discov, 2014. 13(11): p. 828-51.
8. Schuller, H.M., *Mechanisms of smoking-related lung and pancreatic adenocarcinoma development*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(6): p. 455-63.
9. Prior, I.A., P.D. Lewis, and C. Mattos, *A comprehensive survey of Ras mutations in cancer*. Cancer Res, 2012. 72(10): p. 2457-67.
10. Huang, L., et al., *KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer*. Signal Transduct Target Ther, 2021. 6(1): p. 386.
11. Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki, *Small GTP-binding proteins*. Physiol Rev, 2001. 81(1): p. 153-208.
12. Barbacid, M., *ras genes*. Annu Rev Biochem, 1987. 56: p. 779-827.
13. Ahearn, I.M., et al., *Regulating the regulator: post-translational modification of RAS*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. 13(1): p. 39-51.
14. Mendoza, M.C., E.E. Er, and J. Blenis, *The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation*. Trends Biochem Sci, 2011. 36(6): p. 320-8.
15. Prior, I.A. and J.F. Hancock, *Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling*. Semin Cell Dev Biol, 2012. 23(2): p. 145-53.
16. McKay, M.M. and D.K. Morrison, *Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK*. Oncogene, 2007. 26(22): p. 3113-21.
17. Rozengurt, E., *Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors*. J Cell Physiol, 2007. 213(3): p. 589-602.
18. Preis, M. and M. Korc, *Kinase signaling pathways as targets for intervention in pancreatic cancer*. Cancer Biol Ther, 2010. 9(10): p. 754-63.
19. Downward, J., *Control of ras activation*. Cancer Surv, 1996. 27: p. 87-100.
20. Alessi, D.R., et al., *Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1*. Embo j, 1994. 13(7): p. 1610-9.
21. McCubrey, J.A., et al., *Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance*. Biochim Biophys Acta, 2007. 1773(8): p. 1263-84.
22. Song, J., M. Takeda, and R.I. Morimoto, *Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth*. Nat Cell Biol, 2001. 3(3): p. 276-82.
23. Neuzillet, C., et al., *Targeting the Ras-ERK pathway in pancreatic adenocarcinoma*. Cancer Metastasis Rev, 2013. 32(1-2): p. 147-62.

24. Fehrenbacher, N., D. Bar-Sagi, and M. Philips, *Ras/MAPK signaling from endomembranes*. Mol Oncol, 2009. 3(4): p. 297-307.
25. Woods, D., et al., *Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1*. Mol Cell Biol, 1997. 17(9): p. 5598-611.
26. Sahu, R.P., et al., *The role of K-ras gene mutation in TRAIL-induced apoptosis in pancreatic and lung cancer cell lines*. Cancer Chemother Pharmacol, 2011. 67(2): p. 481-7.
27. Maurer, G., B. Tarkowski, and M. Baccarini, *Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities*. Oncogene, 2011. 30(32): p. 3477-88.
28. Mirza, A.M., et al., *Cooperative regulation of the cell division cycle by the protein kinases RAF and AKT*. Mol Cell Biol, 2004. 24(24): p. 10868-81.
29. Anversa, P., et al., *Myocyte cell death and ventricular remodeling*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 1997. 6(2): p. 169-76.
30. Allan, L.A., et al., *Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK*. Nat Cell Biol, 2003. 5(7): p. 647-54.
31. Chinnaiyan, A.M., et al., *FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1996. 271(9): p. 4961-5.
32. Holtz, J. and H. Heinrich, *[Apoptosis--what is it? Significance in coronary heart disease and myocardial infarct]*. Herz, 1999. 24(3): p. 196-210.
33. Pankuweit, S., et al., *[Cell death in inflammatory heart muscle diseases--apoptosis or necrosis?]*. Herz, 1999. 24(3): p. 211-8.
34. Wymann, M.P., M. Zvelebil, and M. Laffargue, *Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target?* Trends Pharmacol Sci, 2003. 24(7): p. 366-76.
35. Downward, J., *PI 3-kinase, Akt and cell survival*. Semin Cell Dev Biol, 2004. 15(2): p. 177-82.
36. Rodriguez-Viciana, P., et al., *Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras*. Nature, 1994. 370(6490): p. 527-32.
37. Downward, J., *Role of phosphoinositide-3-OH kinase in Ras signaling*. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, 1997. 31: p. 1-10.
38. Cardone, M.H., et al., *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation*. Science, 1998. 282(5392): p. 1318-21.
39. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell, 1999. 96(6): p. 857-68.
40. Datta, S.R., A. Brunet, and M.E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Akts*. Genes Dev, 1999. 13(22): p. 2905-27.
41. Luo, J., B.D. Manning, and L.C. Cantley, *Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise*. Cancer Cell, 2003. 4(4): p. 257-62.
42. Wells, A., *Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility*. Adv Cancer Res, 2000. 78: p. 31-101.
43. Meyuhas, O., *Ribosomal Protein S6 Phosphorylation: Four Decades of Research*. Int Rev Cell Mol Biol, 2015. 320: p. 41-73.
44. Zhou, X., et al., *Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome*. J Mol Cell Biol, 2015. 7(2): p. 92-104.
45. Xu, X., X. Xiong, and Y. Sun, *The role of ribosomal proteins in the regulation of cell proliferation, tumorigenesis, and genomic integrity*. Sci China Life Sci, 2016. 59(7): p. 656-72.
46. Barna, M., et al., *Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency*. Nature, 2008. 456(7224): p. 971-5.

47. Yi, Y.W., et al., *Ribosomal Protein S6: A Potential Therapeutic Target against Cancer?* Int J Mol Sci, 2021. 23(1).
48. Vladimirov, S.N., et al., *Characterization of the human small-ribosomal-subunit proteins by N-terminal and internal sequencing, and mass spectrometry.* Eur J Biochem, 1996. 239(1): p. 144-9.
49. Meyuhas, O., *Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind.* Int Rev Cell Mol Biol, 2008. 268: p. 1-37.
50. Heinze, H., et al., *The primary structure of the human ribosomal protein S6 derived from a cloned cDNA.* J Biol Chem, 1988. 263(9): p. 4139-44.
51. Antoine, M. and M. Fried, *The organization of the intron-containing human S6 ribosomal protein (rpS6) gene and determination of its location at chromosome 9p21.* Hum Mol Genet, 1992. 1(8): p. 565-70.
52. Ruvinsky, I. and O. Meyuhas, *Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size.* Trends Biochem Sci, 2006. 31(6): p. 342-8.
53. Warner, J.R. and K.B. McIntosh, *How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins?* Mol Cell, 2009. 34(1): p. 3-11.
54. Hirashita, T., et al., *S6 ribosomal protein phosphorylation is associated with malignancy of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas.* Ann Gastroenterol Surg, 2020. 4(5): p. 571-579.
55. Khalaileh, A., et al., *Phosphorylation of ribosomal protein S6 attenuates DNA damage and tumor suppression during development of pancreatic cancer.* Cancer Res, 2013. 73(6): p. 1811-20.
56. Kozma, S.C., S. Ferrari, and G. Thomas, *Unmasking a growth factor/oncogene-activated S6 phosphorylation cascade.* Cell Signal, 1989. 1(3): p. 219-25.
57. Chow, S., M.D. Minden, and D.W. Hedley, *Constitutive phosphorylation of the S6 ribosomal protein via mTOR and ERK signaling in the peripheral blasts of acute leukemia patients.* Exp Hematol, 2006. 34(9): p. 1183-91.
58. Dieterlen, M.T., et al., *Assay validation of phosphorylated S6 ribosomal protein for a pharmacodynamic monitoring of mTOR-inhibitors in peripheral human blood.* Cytometry B Clin Cytom, 2012. 82(3): p. 151-7.
59. Perl, A.E., et al., *Single-cell pharmacodynamic monitoring of S6 ribosomal protein phosphorylation in AML blasts during a clinical trial combining the mTOR inhibitor sirolimus and intensive chemotherapy.* Clin Cancer Res, 2012. 18(6): p. 1716-25.
60. Mukhopadhyay, N.K., et al., *An array of insulin-activated, proline-directed serine/threonine protein kinases phosphorylate the p70 S6 kinase.* J Biol Chem, 1992. 267(5): p. 3325-35.
61. Papke, B. and C.J. Der, *Drugging RAS: Know the enemy.* Science, 2017. 355(6330): p. 1158-1163.
62. Moore, A.R., et al., *RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged?* Nat Rev Drug Discov, 2020. 19(8): p. 533-552.
63. Ostrem, J.M., et al., *K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions.* Nature, 2013. 503(7477): p. 548-51.
64. Lito, P., et al., *Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism.* Science, 2016. 351(6273): p. 604-8.
65. Janes, M.R., et al., *Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor.* Cell, 2018. 172(3): p. 578-589.e17.
66. Hallin, J., et al., *The KRAS(G12C) Inhibitor MRTX849 Provides Insight toward Therapeutic Susceptibility of KRAS-Mutant Cancers in Mouse Models and Patients.* Cancer Discov, 2020. 10(1): p. 54-71.

67. Awad, M.M., et al., *Acquired Resistance to KRAS(G12C) Inhibition in Cancer*. N Engl J Med, 2021. 384(25): p. 2382-2393.
68. Canon, J., et al., *The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity*. Nature, 2019. 575(7781): p. 217-223.
69. Pantsar, T., *KRAS(G12C)-AMG 510 interaction dynamics revealed by all-atom molecular dynamics simulations*. Sci Rep, 2020. 10(1): p. 11992.
70. Jänne, P.A., et al., *KRYSTAL-1: Activity and Safety of Adagrasib (MRTX849) in Advanced/ Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) Harboring KRAS G12C Mutation*. European Journal of Cancer, 2020. 138: p. S1-S2.
71. Hong, D.S., et al., *KRAS(G12C) Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors*. N Engl J Med, 2020. 383(13): p. 1207-1217.
72. Adachi, Y., et al., *Epithelial-to-Mesenchymal Transition is a Cause of Both Intrinsic and Acquired Resistance to KRAS G12C Inhibitor in KRAS G12C-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer*. Clin Cancer Res, 2020. 26(22): p. 5962-5973.
73. Ryan, M.B., et al., *Vertical Pathway Inhibition Overcomes Adaptive Feedback Resistance to KRAS(G12C) Inhibition*. Clin Cancer Res, 2020. 26(7): p. 1633-1643.
74. Fedele, C., et al., *SHP2 inhibition diminishes KRASG12C cycling and promotes tumor microenvironment remodeling*. J Exp Med, 2021. 218(1).
75. Almendro, V., A. Marusyk, and K. Polyak, *Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer*. Annu Rev Pathol, 2013. 8: p. 277-302.
76. Vogelstein, B., et al., *Cancer genome landscapes*. Science, 2013. 339(6127): p. 1546-58.
77. Burrell, R.A. and C. Swanton, *Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance*. Mol Oncol, 2014. 8(6): p. 1095-111.
78. Hata, A.N., et al., *Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition*. Nat Med, 2016. 22(3): p. 262-9.
79. Ahronian, L.G. and R.B. Corcoran, *Strategies for monitoring and combating resistance to combination kinase inhibitors for cancer therapy*. Genome Med, 2017. 9(1): p. 37.
80. Geißert, R., et al., *K-Ras(V12) differentially affects the three Akt isoforms in lung and pancreatic carcinoma cells and upregulates E-cadherin and NCAM via Akt3*. Cell Communication and Signaling, 2024. 22(1): p. 85.
81. Ma, Y., et al., *Inhibition of KRAS, MEK and PI3K Demonstrate Synergistic Anti-Tumor Effects in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Lines*. Cancers (Basel), 2022. 14(18).
82. Qi, W.L., et al., *Targeting PI3Kα overcomes resistance to KRas(G12C) inhibitors mediated by activation of EGFR and/or IGF1R*. Acta Pharmacol Sin, 2023. 44(5): p. 1083-1094.
83. Wu, L.L., et al., *AMG-510 and cisplatin combination increases antitumor effect in lung adenocarcinoma with mutation of KRAS G12C: a preclinical and translational research*. Discov Oncol, 2023. 14(1): p. 91.
84. Khan, H.Y., et al., *Anticancer Efficacy of KRASG12C Inhibitors Is Potentiated by PAK4 Inhibitor KPT9274 in Preclinical Models of KRASG12C-Mutant Pancreatic and Lung Cancers*. Mol Cancer Ther, 2023. 22(12): p. 1422-1433.

85. Misale, S., et al., *KRAS G12C NSCLC Models Are Sensitive to Direct Targeting of KRAS in Combination with PI3K Inhibition*. Clin Cancer Res, 2019. 25(2): p. 796-807.
86. Tanaka, N., et al., *Clinical Acquired Resistance to KRAS(G12C) Inhibition through a Novel KRAS Switch-II Pocket Mutation and Polyclonal Alterations Converging on RAS-MAPK Reactivation*. Cancer Discov, 2021. 11(8): p. 1913-1922.
87. Amodio, V., et al., *EGFR Blockade Reverts Resistance to KRAS(G12C) Inhibition in Colorectal Cancer*. Cancer Discov, 2020. 10(8): p. 1129-1139.
88. Choi, C. and D.M. Helfman, *The Ras-ERK pathway modulates cytoskeleton organization, cell motility and lung metastasis signature genes in MDA-MB-231 LM2*. Oncogene, 2014. 33(28): p. 3668-76.
89. Blaquier, J.B., A.F. Cardona, and G. Recondo, *Resistance to KRAS(G12C) Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer*. Front Oncol, 2021. 11: p. 787585.
90. Dreissigacker, U., et al., *Oncogenic K-Ras down-regulates Rac1 and RhoA activity and enhances migration and invasion of pancreatic carcinoma cells through activation of p38*. Cellular Signalling, 2006. 18(8): p. 1156-1168.
91. Olsen, M.K., A.A. Reszka, and I. Abraham, *KT5720 and U-98017 inhibit MAPK and alter the cytoskeleton and cell morphology*. J Cell Physiol, 1998. 176(3): p. 525-36.
92. Stähle, M., et al., *Mechanisms in LPA-induced tumor cell migration: critical role of phosphorylated ERK*. J Cell Sci, 2003. 116(Pt 18): p. 3835-46.
93. Yang, J., et al., *Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. 21(6): p. 341-352.
94. Megid, R.A., et al., *Sotorasib resistance triggers epithelial-mesenchymal transition and activates AKT and P38-mediated signaling*. Front Mol Biosci, 2025. 12: p. 1537523.
95. Qin, S., et al., *Emerging role of tumor cell plasticity in modifying therapeutic response*. Signal Transduct Target Ther, 2020. 5(1): p. 228.
96. Shi, Z.-D., et al., *Tumor cell plasticity in targeted therapy-induced resistance: mechanisms and new strategies*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2023. 8(1): p. 113.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Verlust der Wirksamkeit der GAPs	2
Abbildung 1.2: Ras-Aktivierungszyklus	5
Abbildung 1.3 Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg	7
Abbildung 4.1: Zellzahl von MiaPaCa-2-Zellen nach 96 h Behandlung mit AMG510	42
Abbildung 4.2: Einfluss von AMG510 auf die Morphologie von MiaPaCa-2 Zellen.	43
Abbildung 4.3: Zellzahl von H358-Zellen nach 96 h Behandlung mit AMG510.....	44
Abbildung 4.4: Einfluss von AMG510 auf die Morphologie von H358 Zellen.	45
Abbildung 4.5: Zellzahl von HCC-44-Zellen nach 96 h Behandlung mit AMG510	46
Abbildung 4.6: Einfluss von AMG510 auf die Morphologie von HCC-44 Zellen.....	47
Abbildung 4.7: Vergleichende Darstellung des prozentualen Anteils der lebenden Zellen	48
Abbildung 4.8: Morphologische Unterschiede bei einer Behandlung mit 10 µM AMG510 für 96 h.....	50
Abbildung 4.9: Beeinflussung der Proteinphosphorylierung und Proteinexpression durch AMG510 in MiaPaCa-2 und H358-Zellen.....	53
Abbildung 4.10 Abnahme der Zellzahl der MiaPaCa-2 ^{resist} Zellklone mit steigender AMG510 Konzentration.....	55
Abbildung 4.11 Morphologische Veränderungen der gegen AMG510 resistenten MiaPaCa-2 Zellklone	56
Abbildung 4.12: Abnahme der Zellzahl der MiaPaCa-2 ^{resist} -Zellklone mit steigender MRTX849 Konzentration	57
Abbildung 4.13 Morphologische Veränderungen der gegen MRTX849 resistenten MiaPaCa-2 Zellklone	59
Abbildung 4.14: Proliferationsrate der resistenten MiaPaCa-2 Zellklone	61
Abbildung 4.15 Verdopplungszeit der gegen AMG510-resistenten MiaPaCa-2 Zellklone	62
Abbildung 4.16 Verdopplungszeit der gegen MRTX849-resistenten MiaPaCa-2 Zellklone.....	63
Abbildung 4.17 Charakterisierung Proliferation der gegen AMG510 resistenten H358-Zellklone.....	65
Abbildung 4.18 Charakterisierung Proliferation gegen MRTX849 resistenten H358-Zellklone.....	67
Abbildung 4.19 Morphologische Veränderungen der gegen AMG510 resistente H358-Zellklone.....	69
Abbildung 4.20 Morphologische Veränderungen der gegen MRTX849 resistente H358-Zellklone.....	70
Abbildung 4.21 Morphologische Unterschiede der H358 ^{resist} -Zellklone bei 100 nM MRTX849	71
Abbildung 4.22 Einfluss von AMG510 auf die Protein-Phosphorylierung und -Expression von MiaPaCa-2 ^{resist} -Zellklone.....	74
Abbildung 4.23 Einfluss von MRTX849 auf die Protein-Phosphorylierung und -Expression von MiaPaCa-2 ^{resist} -Zellklone.....	75
Abbildung 4.24 Einfluss von AMG510 auf die Protein-Phosphorylierung und -Expression von H358 ^{resist} -Zellklone	77
Abbildung 4.25 Einfluss von MRTX849 auf die Protein-Phosphorylierung und -Expression von H358 ^{resist} -Zellklone	78
Abbildung 4.26 Morphologische Veränderungen der revertanten MiaPaCa-2-Zellklone nach dem Absetzen von AMG510	80

Abbildung 4.27 Morphologische Veränderungen der revertanten MiaPaCa-2 Zellklone bei 95 % Konfluenz.....	81
Abbildung 4.28 Bestimmung der Zellzahl der revertanten und resistenten MiaPaCa-2-Zellklone.....	82
Abbildung 4.29 Verdopplungszeit der revertanten und resistenten MiaPaCa-2-Zellklone	83
Abbildung 4.30 Einfluss des Wechsels von 10 μ M AMG510 zu DMSO auf die Proteinexpression und Proteinphosphorylierung von MiaPaCa-2 ^{resist} -Zellklone	85
Abbildung 4.31 Veränderungen des Zytoskeletts in MiaPaCa-2 ^{revers} DMSO-Zellklone	88
Abbildung 4.32 Veränderungen der Lokalisation und Expression von Proteinen des Zellzyklus in MiaPaCa-2 ^{revers} DMSO-Zellklone	90
Abbildung 11.1 Konfluenz Lysate DMSO Kontrolle H358	120

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Die Ras Superfamilie mit ihren sechs Subfamilien.....	3
Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien	14
Tabelle 2.2: Verwendete Lösungen und Puffer.....	15
Tabelle 2.3: Verwendete Inhibitoren.....	17
Tabelle 2.4: Verwendete eukaryotische Zelllinien.....	17
Tabelle 2.5: Verwendete primäre Antikörper	18
Tabelle 2.6: Verwendete sekundäre Antikörper.....	19
Tabelle 2.7: Verwendete primäre Antikörper und Toxine für die Immunfluoreszenz....	19
Tabelle 2.8: Verwendete sekundäre Antikörper und Toxine für die Immunfluoreszenz	20
Tabelle 2.9: Verwendete Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 2.10: Verwendete Geräte.....	21
Tabelle 2.11: Verwendete Software	22
Tabelle 3.1: Tris-Glycin-SDS-PAGE.....	30
Tabelle 4.1 Prozentuale Angabe abgehefteter Zellen.....	49

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

12 Danksagung

Mit diesen Zeilen möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die die Anfertigung meiner Dissertation ermöglicht haben. Vor allem möchte ich mich bedanken bei ...

- ... meiner Doktormutter und Betreuerin Frau Prof. Dr. Giehl für die Möglichkeit meine Dissertation in ihrer AG anzufertigen, für ihre gute Betreuung und die hilfreichen Diskussionen sowie die stete Unterstützung in der Planung der Versuche und Vollendung dieser Arbeit.
- ... meinen lieben Kollegen. Ihr wart einfach ein tolles Team, habt stets für gute Laune gesorgt, hilfreich zur Seite gestanden und mich damit immer toll unterstützt. Ein herzliches Dankeschön an jeden Einzelnen von euch!
- ... meiner ganzen Familie und meiner besten Freunde, die während der Zeit meiner Promotion stets für mich da waren, meine Sorgen und Probleme teilten und mich in den schönen, aber auch den schwierigen Zeiten immer unterstützten. Damit habt ihr mir die Kraft und das Durchhaltevermögen gegeben, diese Arbeit zu vollenden und die Grundlage für meinen weiteren Weg geebnet. Vielen Dank dafür, ihr Lieben!

13 Supplement

Konfluenz DMSO-Kontrolle H358-Zellklone

Bei der Auswertung der Immunblots der resistenten H358-Zellklone (Abbildung 4.24 und Abbildung 4.25) ist aufgefallen, dass die DMSO-Kontrolle der Passage p13 eine erhöhte Phosphorylierung von ERK und S6 aufweist. Anhand der in Abbildung 13.1 abgebildeten Fotodokumentation kann man die überkonfluente Schale der Lysate der 100 mm Zellkultur-Schale erkennen. Es wird vermutet, dass durch die gesteigerte Konfluenz es zu einer Stressreaktion der Zellen kommt und somit es zu einem erhöhten Gehalt von pERK und pS6 kommt.

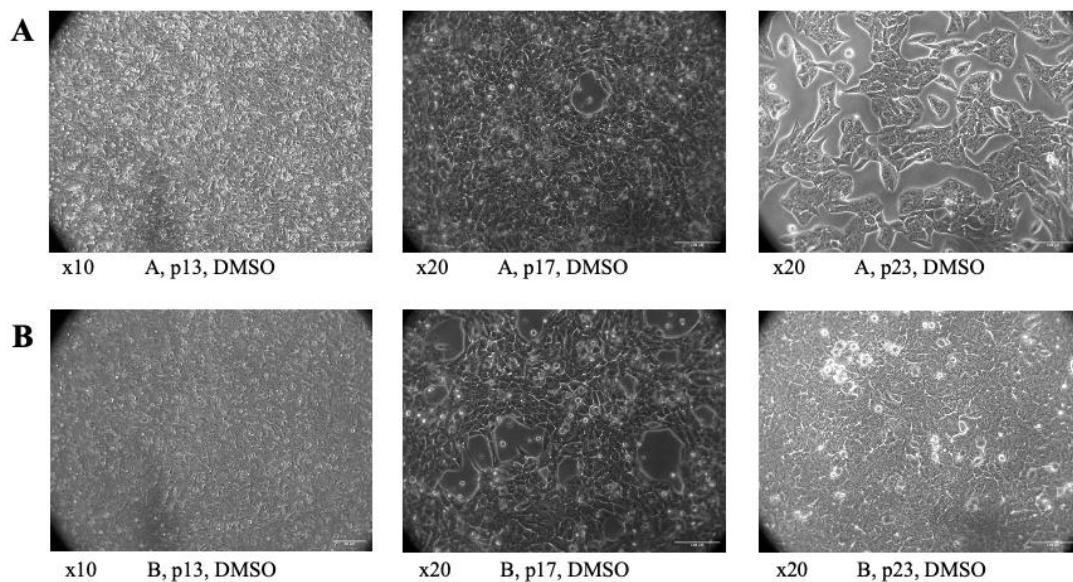


Abbildung 13.1 Konfluenz für die Lysatherstellung der DMSO-Kontrolle H358. Die Abbildung zeigt die Konfluenz der 100 mm Schalen der Lysate von der H358 DMSO-Kontrolle bei x20 Vergrößerung. Die Passagen p13 zeigen eine Konfluenz über den zu erzielenden 95 %, und die Passagen p17 und p19 zeigen einen Ausschnitt der zu erzielenden Konfluenz. Vergrößerung p13: x10, p17 und p19: x20. Maßstab unten rechts: p13: 50 µm, p17 und p23 100 µm.