

**Phänotypische und molekulare Charakterisierung
neuer potenzieller Inhibitoren der ribosomalen Kinase RPS6KA2**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Von Nathalie Judith Auer
Betreuer: Prof. Dr. med. Patrick Michl, Prof. Dr. rer. nat. Stefan Hüttelmaier
Gutachter*innen: Prof. Dr. med. Monika Hämmerle, Halle (Saale);
apl. Prof. Dr. rer. nat. Malte Buchholz, Marburg
Datum der Verteidigung: 15.01.24

Referat

Aufgrund der trotz intensiver Chemotherapie fatalen Prognose des pankreatischen duktales Adenokarzinoms (PDAC) werden dringend neue Therapieansätze gesucht. In Vorarbeiten konnte die ribosomale Kinase RPS6KA2 (kurz RSK3) als neues potenzielles Zielmolekül identifiziert werden; eine Inhibition der Kinase wirkte in Kombination mit dem EGFR-Inhibitor Erlotinib synthetisch letal auf Pankreaskarzinomzelllinien. Bisher ist die Rolle von RSK3 im PDAC noch weitgehend unerforscht. RSK3 ist eine von vier Isoformen der Kinasen RSK1-4. Die Kinase liegt im MEK-ERK-Signalweg und spielt eine Rolle in Proliferation, Apoptose und Zellüberleben.

Da keine *in vivo* anwendbaren oder isoformspezifischen Inhibitoren der RSK3 bekannt sind, wurde in Vorarbeiten ein Compound-Screen durchgeführt. Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung von 5 vielversprechenden Verbindungen (genannt *Compounds* C1 bis C5) in den Pankreaskarzinomzelllinien PaTu-8988t und BxPC3. Methodisch wurden hierzu Zellzählung, ATP-Assays, Zellzyklus- und Apoptose-Messungen in der Durchflusszytometrie sowie Western Blot herangezogen. Zusätzlich wurde parallel der ausschließlich *in vitro* anwendbare pan-RSK-Inhibitor BI-D1870 untersucht.

In der phänotypischen Charakterisierung hatten vier der fünf *Compounds* antitumorale Eigenschaften. Die molekulare Analyse im Western Blot ergab jedoch, dass von den fünf *Compounds* nur *Compound* C5 RSK3 inhibiert. Die durch Inhibition von RSK3 gezeigten Effekte konnten mit EGFR-Inhibition verstärkt werden. Zusätzlich zur RSK3-Inhibition induzierte C5 zudem die Degradation von RSK3 in BxPC3.

Sowohl *Compound* C5 als auch der nicht-isoformselektive RSK-Inhibitor BI-D1870 zeigten mit einer stark verringerten Zellproliferation und erhöhten Apoptose deutliche antineoplastische Effekte. Somit kann in dieser Arbeit bestätigt werden, dass RSK3 ein attraktives neues therapeutisches Zielmolekül im Pankreaskarzinom darstellt. Jedoch sollte das angewandte Konzept der synthetischen Letalität kritisch verifiziert werden, da in den untersuchten Konditionen kein Synergismus zwischen RSK3- und EGFR-Inhibition gezeigt werden konnte. Noch ausstehend ist eine Spezifitätstestung von C5 sowie die chemische Modifikation zur Optimierung der Bindungseigenschaften und Pharmakokinetik. Für die Zukunft wird eine Validierung von RSK3 als therapeutisches Ziel im genetischen Mausmodell angestrebt.

Auer, Nathalie: Phänotypische und molekulare Charakterisierung neuer potenzieller Inhibitoren der ribosomalen Kinase RPS6KA2, Universität Halle-Wittenberg, Med. Fak.; Diss., 80 Seiten, (Erscheinungsjahr 2024)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Pankreaskarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Klinische Symptome und Therapieoptionen.....	1
1.1.3 Pathologie und Molekularbiologie des pankreatischen Adenokarzinoms	2
1.2 RPS6KA2 als potenziell synthetisch letales Target im Pankreaskarzinom	3
1.3 Die ribosomale Kinase RPS6KA2	4
1.3.1 Die RPS6-Kinasefamilie	4
1.3.2 Struktur und Aktivierung	5
1.3.3 Regulation der Proteinbiosynthese und des Zellzyklus	7
1.3.4 Apoptose und Zellüberleben	8
1.3.5 Weitere Funktionen von RSK	8
1.3.6 Rolle von RSK im Krebs	9
1.4 Screen zur Identifizierung neuer potenzieller RSK3-Inhibitoren	9
2 Zielstellung	11
3 Material und Methodik	12
3.1 Geräte	12
3.2 Verbrauchsmaterialien	13
3.3 Chemikalien	14
3.4 Substanzen, Lösungen und Kits	15
3.5 Pufferherstellung	16
3.5.1 Puffer für die Proteinlysat-Herstellung	16
3.5.2 Puffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	17
3.5.3 Puffer für Western Blot.....	18
3.5.4 Puffer für die durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse	18
3.5.5 Puffer für das Annexin-V-Staining in der Durchflusszytometrie	18
3.6 Methodik der Zellkultur	19
3.6.1 Kultivierung der Zelllinien	19
3.6.2 Zellzahlbestimmung und Aussäen der Zellen.....	19

3.6.3	Proteinernte	20
3.6.4	Stimulation der Zellen mit PMA vor der Proteinernte.....	20
3.7	Methodik der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot	20
3.7.1	Probenaufbereitung	20
3.7.2	Diskontinuierliche SDS-PAGE.....	21
3.7.3	Proteintransfer mittels Western Blot.....	21
3.7.4	Bandendetektion mittels Antikörper (Immunodetektion).....	21
3.7.5	Verwendete Antikörper für die Immunodetektion.....	22
3.8	Methodik des ATP-Assays.....	23
3.9	Methodik der Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie.....	23
3.10	Methodik der durchflusszytometrischen Apoptosedetektion mittels Annexin-V ...	26
3.11	Statistik und Graphiken.....	29
4	Ergebnisse.....	30
4.1	Phänotypische Charakterisierung potenzieller RSK3-Inhibitoren	30
4.1.1	Proliferation mit BI-D1870 und Compound C1-C5	30
4.1.2	Zellviabilität mit Compound C1-5 und BI-D1870.....	32
4.1.3	Zellzyklusanalysen.....	33
4.1.4	Auswirkungen auf Apoptose.....	34
4.2	Molekulare Charakterisierung potenzieller RSK3-Inhibitoren.....	36
4.2.1	Effekte im Western Blot in PaTu-8988t	36
4.2.2	Effekte im Western Blot in BxPC3.....	39
4.3	Weitere Untersuchung von Compound C5	43
4.3.1	Auswirkungen von C5 auf Apoptose im Annexin-V-Staining	43
4.3.2	Phänotypische Effekte von Compound C5 in geringeren Konzentrationen	44
4.3.3	Synergismus zwischen EGFR-Inhibition und Compound C5	45
4.3.4	Untersuchung der verminderten RSK3-Expression nach Behandlung mit C5 in BxPC3	48
5	Diskussion.....	50
5.1	Vielfältige Effekte der Compounds auf den Zellphänotyp	50
5.1.1	Compounds und BI-D1870 verringern Zellproliferation	50
5.1.2	In beiden Zelllinien geringere Viabilität durch Compounds	52
5.1.3	Zellzyklusarrest bei RSK-Inhibition in PaTu-8988t.....	54
5.1.4	Apoptose durch Compounds und BI-D1870.....	55
5.2	Compound C5 inhibiert RSK3	56

5.2.1	RSK3-Inhibition durch C5 in PaTu-8988t.....	56
5.2.2	RSK3-Inhibition und verminderte RSK3-Expression durch C5 in BxPC3-Zellen	59
5.3	Compound C5 als neuer potenter RSK3-Inhibitor.....	60
5.3.1	C5 erhöht Apoptose in BxPC3.....	60
5.3.2	Compound C5 inhibiert bereits in geringen Konzentrationen RSK3	61
5.3.3	Additiver Effekt von EGFR-Inhibition und C5	61
5.3.4	Degradation von RSK3 in BxPC3 durch Compound C5.....	63
5.4	Compound C5 als neuer potenter RSK-Inhibitor.....	64
5.5	Bestätigung von RSK als neues Target im Pankreaskarzinom	67
6	Zusammenfassung	69
7	Literaturverzeichnis	71
8	Thesen	80
	Erklärungen	VI
	Danksagung	VII

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CTKD	C-terminale Kinasedomäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGFR	Epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinases</i>
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FSC	Forward scatter
g	g-Kraft (g= Erdbeschleunigung)
h	Stunden
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazinyl]-Ethansulfonsäure
HSP90	Hitzeschockprotein 90
l	Liter
LKB1	Leberkinase B1
M	Mol
m	Milli-
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-Kinasen
NTKD	N-terminale Kinasedomäne
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDAC	Pankreatisches duktales Adenokarzinom
PFKFB2	6-Phosphofructo-2-kinase
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfleurid
PVDF-Membran	Polyvinylidenfleurid-Membran

RLU	Relative Lichteinheit (relative light unit)
RPS6	Ribosomales Protein S6
RPS6KA2	Ribosomale S6-Proteinkinase alpha-2 (kurz RSK3)
S.	Seite
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumduodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumduodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SSC	Sideward scatter
TBS-T	<i>Trisbuffered saline with Tween®20</i> (dreifach gepufferte Salzlösung mit Polysorbat 20)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS-Puffer	Tris-Aminomethan-Puffer
V	Volt
μ	mikro

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Von allen Krebsarten ist das Pankreaskarzinom eine der tödlichsten. Seit 20 Jahren gibt es kaum eine Verbesserung der Sterberaten (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2018). Probleme sind unter anderem eine hohe intertumorale Heterogenität (Jones et al., 2008) sowie ein hoher Anteil an desmoplastischem Stroma im Karzinom (Erkan et al., 2008) verbunden mit einem immunsuppressiven Tumormikromilieu (Kraman et al., 2010), was zu einer weitgehenden Therapieresistenz führt.

So ergab sich 2018 in Deutschland eine 5-Jahres-Überlebensrate von 10 % bei einer jährlichen Inzidenz von 10 pro 100 000 (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2018). Risikofaktoren sind unter anderem Adipositas, Nikotin- und Alkoholabusus (Maisonneuve, 2019).

Auch wenn das Pankreaskarzinom an allen Krebsneuerkrankungen nur 3,9 % bei Frauen und 3,7 % bei Männern ausmacht, ist das Pankreaskarzinom die vierthäufigste Krebstodesursache in Deutschland (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2018). Es wird unter anderem aufgrund des demographischen Wandels ein Anstieg der Inzidenz bis 2040 um 28 % geschätzt (Maisonneuve, 2019). Daher stellt das Pankreaskarzinom eine große medizinische Herausforderung dar, für das dringend neue Therapiemöglichkeiten gefunden werden müssen.

1.1.2 Klinische Symptome und Therapieoptionen

Die meisten Pankreaskarzinome verursachen im frühen Stadium nur selten Symptome, weshalb die Diagnosestellung meist erst im fortgeschrittenen Stadium erfolgt (Gillen et al., 2010). Mögliche frühe Symptome sind unter anderem Gewichtsverlust, neu aufgetretener Diabetes, Lethargie, Übelkeit und Erbrechen sowie Rückenschmerzen und Bauchschmerzen (Keane et al., 2014). Bei Verdacht auf ein Pankreaskarzinom können zur Diagnostik verschiedene bildgebende Verfahren eingesetzt werden. Sensitive Verfahren sind die CT und MRT, wenn erforderlich in Kombination mit MRT/MRCP oder einer ERCP (Seufferlein et al., 2013).

Für eine kurative Therapie wird eine R0-Resektion mit anschließender Chemotherapie angestrebt. Die einzige Heilungsmöglichkeit des Pankreaskarzinoms besteht in einer operativen Entfernung des Tumors (Doi et al., 2008). Da zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jedoch nur 20 % der Karzinome resektabel sind, liegt der therapeutische Schwerpunkt auf der palliativen Chemotherapie (Gillen et al., 2010). Bei einer palliativen Therapie werden unter anderem

Gemcitabin in Kombination mit nab-Paclitaxel, Gemcitabin mit Erlotinib oder Folfirinox als Chemotherapeutika-Regime angewandt (Seufferlein et al., 2013).

Erlotinib ist das erste Chemotherapeutikum, das zur gezielten Therapie (engl. *targeted therapy*) des Pankreaskarzinoms zugelassen wurde (Amanam und Chung, 2018). In der gezielten Therapie werden, in Abgrenzung zur klassischen Chemotherapie mit Zytostatika, gezielt molekulare Eigenschaften des Tumors angegriffen. Erlotinib ist ein EGFR-Inhibitor, der den EGF-Rezeptor-Untertyp HER1 inhibiert (Hidalgo, 2003). In Kombination mit Gemcitabin verlängert sich das durchschnittliche Gesamtüberleben allerdings nur marginal von 5,9 auf 6,2 Monate (Moore et al., 2007). Aufgrund der hohen Kosten von Erlotinib und der nur geringen Verbesserung des Therapieergebnisses hat sich eine standardmäßige Therapie mit Gemcitabin und Erlotinib nicht durchgesetzt.

Folfirinox (eine Kombination aus 5-Floururacil, Folinsäure, Oxaliplatin und Irinotecan) zeigt verglichen mit Gemcitabin ein verbessertes Therapieergebnis. Das krankheitsfreie Überleben konnte von 6 Monate mit Gemcitabin auf 11 Monate mit einem Folfirinox-Therapieschema verlängert werden (Conroy et al., 2011).

1.1.3 Pathologie und Molekularbiologie des pankreatischen Adenokarzinoms

Die Pathogenese des PDAC ist noch nicht vollständig verstanden. Krebs an sich ist eine auf genetischen Veränderungen des Tumors basierende Erkrankung, die sich über Jahre oder Jahrzehnte durch die Ansammlung von Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen entwickelt (Vogelstein et al., 2013). In der Tumorbilogie unterscheidet man zwischen Driver-Mutationen, die der Zelle einen selektiven Wachstumsvorteil bringt und die Tumorentstehung vorantreibt, und Passenger-Mutationen, die keinen Wachstumsvorteil verursachen (Vogelstein et al., 2013). Im Pankreaskarzinom sind vier Driver-Gene am häufigsten mutiert: *KRAS*, *CDKN2A* (Genprodukte sind p14 und p16), *TP53* und *SMAD4* (Biankin et al., 2012; Cicas et al., 2017). Das G-Protein *KRAS* ist in etwa 90 % der PDACs mutiert (Smit et al., 1988). *KRAS* spielt unter anderem eine Rolle bei der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren. Eine aktivierende Mutation in *KRAS* löst daher durch ständige Stimulation des MAPK-ERK-Signalwegs verschiedene Mechanismen aus, die für die Tumorgenese wichtig sind (Mann et al., 2016). *KRAS* spielt in der Tumorentstehung des PDAC eine zentrale Rolle. Im Mausmodell löst mutiertes *KRAS* die Entwicklung von PanIN-Läsionen aus. *KRAS* ist in den meisten *low-grade* PanINs mutiert, weswegen vermutet wird, dass die Mutation von *KRAS* schon sehr früh in der Tumorgenese auftritt (Kanda et al., 2012).

Ebenso früh wie bei *KRAS* treten inaktivierende Mutationen im Tumorsuppressorgen *CDKN2A* in der Karzinomentwicklung auf, dessen Proteinprodukte p14 und p16 eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation haben (Moore et al., 2001; R. Zhao et al., 2016). *SMAD4* ist ein

Tumorsuppressor, welcher für die inhibierende Regulation des Zellwachstums wichtig ist (Grau et al., 1997).

Das Genprodukt von *TP53*, P53, wird auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet. P53 hat eine Schlüsselrolle in der Verhinderung der Entstehung von Krebs. P53 verhindert, dass eine Zelle mit beschädigter DNA sich weiter teilt. Wenn die DNA so stark beschädigt ist, dass sie nicht repariert werden kann, akkumuliert P53 in der Zelle und löst die Apoptose der Zelle aus (Whibley et al., 2009).

Insbesondere sogenannte *Targeted Therapies* des PDAC als Alternative zur klassischen Chemotherapie sind in den Fokus der Forschung gerückt, da das 5-Jahresüberleben selbst bei aggressiver Chemotherapie etwa mit Folfirinox sehr begrenzt ist (Robert Koch-Institut (Hrsg.) und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.(Hrsg.), 2017). Bis jetzt bringen die verwendeten Ansätze für eine spezifische Therapie nur ein gering verbessertes Therapieergebnis im Vergleich zur Standardtherapie. Auch fehlen Ansatzpunkte für eine spezifische Therapie, die breiter eingesetzt werden kann, und nicht nur bei Karzinomen mit einer seltenen spezifischen Mutation. So zeigte sich etwa bei Mutationen von PDACs innerhalb des *BRCA*-Pathways, dass das progressionsfreie Überleben mit PARP-Inhibitoren verlängert werden konnte, nicht aber das Gesamtüberleben (Golan et al., 2019). Zudem haben nur etwa 5 % aller PDAC eine *BRCA*-Mutation (Singhi et al., 2019).

Potenzielle breitere Ansatzpunkte wären die Haupt-Driver-Mutationen des Pankreaskarzinoms. Jedoch ist aus verschiedenen Gründen bis heute keine gezielte Therapie gegen die Driver *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53* und *SMAD4* etabliert.

Die *Targeted Therapies* könnten künftig eine Möglichkeit auf Therapieverbesserung darstellen, auch wenn sich mit den bis jetzt bekannten Therapeutika das Gesamtüberleben höchstens um einige Monate verlängert. Da es für viele PDACs noch keine spezifische Therapie gibt, und sich das Therapieergebnis mit den bisher verwendeten spezifischen Therapien nicht zufriedenstellend verbessert, ist weitere Forschung nötig, um neue Therapieansätze zu finden.

1.2 RPS6KA2 als potenziell synthetisch letales Target im Pankreaskarzinom

Bezüglich der Identifizierung neuer Ansätze hat die Mutationsanalyse im Pankreaskarzinom bislang nicht zu klinisch einsetzbaren Ansätzen geführt. Insbesondere lassen sich die identifizierten Driver-Mutationen momentan therapeutisch nicht angreifen.

Ein noch nicht ausgeschöpfter Ansatz ist das Konzept der *Synthetic Lethality*. Dieses Konzept beschreibt den Effekt, wenn die mangelnde Expression von zwei Genen zum Zelltod führt,

während der Mangel von nur einem dieser Genprodukte dies nicht bewirkt (Dobzhansky, 1946). Ein klinisches Beispiel für *Synthetic Lethality* ist die Krebstherapie mit PARP-Inhibitoren bei *BRCA*-Mutation (Fong et al., 2009). Um Kinasen zu identifizieren, deren Hemmung synergistisch mit Erlotinib auf PDAC- Zellen wirkt, wurde in der Arbeitsgruppe ein small-interfering RNA (siRNA)-basierter *Synthetic Lethality* Screen in Kombination mit Erlotinib durchgeführt (Milosevic et al., 2013). Ziel dieses Screens war die Ermittlung einer neuen gezielten Therapie aus zwei spezifisch wirkenden Substanzen, Erlotinib und einem Kinase-Inhibitor.

Im *Synthetic-Lethality*-Screen erfolgte der Knockdown von insgesamt 779 Kinasen in der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC3 im 96-well Format. Dabei wurde pro Well jeweils eine spezifische Kinase mittels 4 gepoolter siRNAs herunterreguliert. Anschließend wurden die Zellen mit Erlotinib behandelt, die Zellviabilität pro Well gemessen und auf die mittlere Viabilität aller transfizierten Wells normalisiert. Die beiden Kinasen mit der größten Auswirkung auf die Viabilität in Kombination mit Erlotinib waren MAPK3K (MEK-Kinase 3) sowie die ribosomale Kinase RPS6KA2 (kurz RSK3). Da über die Rolle von RSK3 im Krebs wenig bekannt ist, fokussierte sich die weitere Forschung auf diese Kinase.

Es erfolgte eine weitergehende Validierung von RSK3 in den Pankreaskarzinomzelllinien PaTu-8988t und BxPC3 (Milosevic et al., 2013). Hier konnte gezeigt werden, dass eine pharmakologische RSK-Inhibition mit dem RSK-Inhibitor BI-D1870 synergistische Effekte mit einer EGFR-Inhibition durch Erlotinib hat. Zudem konnte gezeigt werden, dass RSK im PDAC vermehrt in der aktiven Form vorliegt.

Die Validierung des Screens in den PDAC-Zelllinien bestätigt, dass RSK3 ein neues vielversprechendes therapeutisches Ziel im Pankreaskarzinom darstellt.

RSK3 liegt im MEK-ERK-Signalweg. Dieser Signalweg spielt eine zentrale Rolle im Pankreaskarzinom (Collisson et al., 2012). Aus diesem Grund scheint der MAPK-ERK-Signalweg derzeit ein vielversprechendes therapeutisches Target zu sein. In Tumorzellen und in Mausversuchen gab es bereits positive Ergebnisse mit MEK-Inhibitoren (Diep et al., 2011; Corcoran et al., 2013). In klinischen Studien zeigten sich erste Ergebnisse, die jedoch noch in größeren Studien validiert werden müssen (Ko et al., 2016).

1.3 Die ribosomale Kinase RPS6KA2

1.3.1 Die RPS6-Kinasefamilie

Die Kinase RPS6KA2 (kurz RSK3) gehört zur RSK-Familie der Kinasen, die aus den vier Isoformen RSK1 bis RSK4 sowie den strukturell verwandten Kinasen MSK1 und MSK2 besteht. RSK liegt *downstream* von ERK im MEK-ERK-Signalweg (siehe Abb. 1) und wird durch

sequentielle Phosphorylierung von ERK und PDK1 sowie durch Autophosphorylierung aktiviert (Sturgill et al., 1988; Sutherland et al., 1993; Bjorbaek et al., 1995; Jensen et al., 1999).

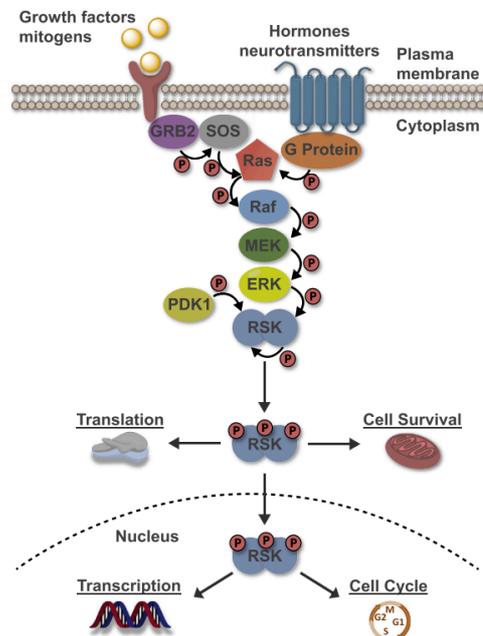


Abbildung 1: Signalweg von RSK3. RSK3 liegt downstream von RAS, MEK und ERK und wird durch ERK, PDK1 sowie Autophosphorylierung aktiviert. Die Kinase beeinflusst Transkription, Translation, Zellzyklus und Zellüberleben. Bildquelle: Casalvieri et al., 2017.

Die Isoformen 1 und 2 sind am besten charakterisiert. Die Entdeckung der spezifischen RSK-Inhibitoren BI-D1870 und SL0101 haben die Erforschung der RSK-Familie weiter vorangetrieben (Smith et al., 2005; Sapkota et al., 2006). Bis heute sind jedoch keine isoform-spezifischen Inhibitoren bekannt, wodurch eine Abgrenzung zwischen den zellulären Funktionen der vier Isoformen schwierig ist.

Die verschiedenen Expressionsmuster der Isoformen weisen auf unterschiedliche Funktionen hin. So wird RSK3 vor allem in Herz, Skelettmuskel und Pankreas exprimiert (Zeniou, 2002). RSK spielt eine Rolle in Proliferation, Translation, Transkription, Zellzyklus, Apoptose und Zellüberleben (Anjum und Blenis, 2008).

1.3.2 Struktur und Aktivierung

Eine strukturelle Besonderheit der RSK sind die zwei Kinasedomänen, eine C-terminale Kinasedomäne (CTKD) und eine N-terminale Kinasedomäne (NTKD). Die CTKD, welche zur Familie der AGC-Kinasen gezählt wird, ist zuständig für die Autophosphorylierung von RSK. Die NTKD, welche zur Gruppe der CAMK-Kinasen (Calcium-/Calmodulin-abhängige

Proteinkinasen) gehört, phosphoryliert die Enzymsubstrate (Jones et al., 1988; Bjorbaek et al., 1995; Fisher und Blenis, 1996).

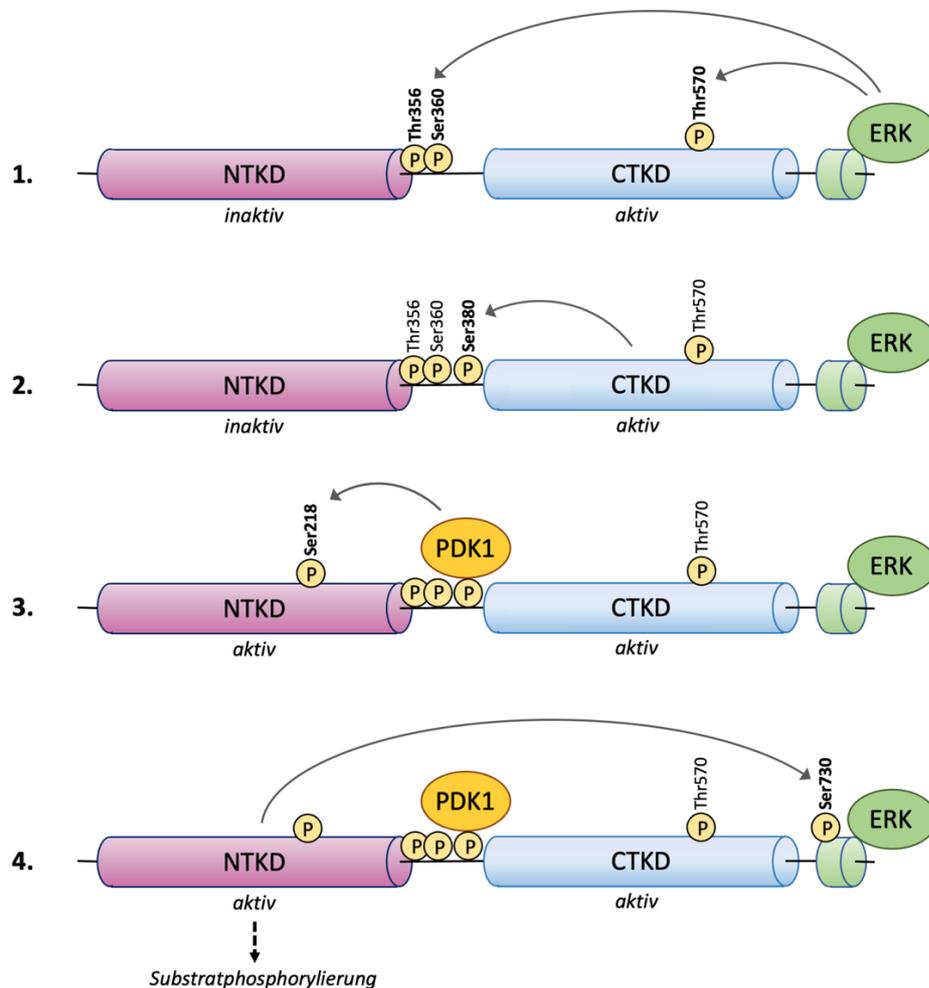


Abbildung 2: Aktivierungsmechanismus von RSK3. Durch verschiedene Faktoren, etwa Wachstumsfaktoren, bindet ERK an RSK3 und aktiviert die CTKD (Schritt 1). Die CTKD phosphoryliert RSK3 zwischen NTKD und CTKD, sodass eine Bindungsdomäne für PDK1 entsteht (Schritt 2). PDK1 bindet an RSK3 und aktiviert die NTKD (Schritt 3). Die NTKD phosphoryliert RSK3 an Ser730, wodurch ERK sich von RSK3 löst (Schritt 4). Die NTKD ist nun vollständig aktiv und kann Substrate phosphorylieren.

RSK hat sechs Phosphorylierungsstellen. Relevant für die Aktivierung sind vier davon: Ser218, Ser360, Ser377 und Thr570 (in humanem RSK3) (Dalby et al., 1998).

Im inaktiven Zustand liegt RSK primär gebunden an ERK im Zytosol vor. Folgend ist der Aktivierungsmechanismus von RSK beschrieben, die Nummerierung der Aminosäuren ist die von humanem RSK3 (Abb. 2 S. 6).

Bei Aktivierung des MEK-ERK-Signalwegs etwa durch Wachstumsfaktoren bindet ERK an RSK3. In Schritt 1 wird RSK3 von ERK an Thr570 (im Aktivierungsloop der CTKD), Ser360

und Thr356 phosphoryliert (Dalby et al., 1998) (Abb. 2 S.6). Durch die Phosphorylierung von Thr570 wird die CTKD aktiviert, welche in Schritt 2 RSK3 an Ser380 im hydrophoben Motiv zwischen CTKD und NTKD phosphoryliert (Vik und Ryder, 1997).

Dadurch entsteht eine „*docking domain*“ für PDK1, welche nach der Bindung am hydrophoben Motiv in Schritt 3 die NTKD an Ser218 phosphoryliert und dadurch aktiviert (Frodin et al., 2000). Die NTKD phosphoryliert in Schritt 4 RSK3 an Ser730. Dadurch löst sich bei RSK1 und 2 ERK von RSK; bei RSK3 scheint ERK nicht zu dissoziieren (Roux et al., 2003). RSK ist nun aktiv, die NTKD kann Substrate von RSK phosphorylieren (Jensen et al., 1999). Es ist beschrieben, dass nach der Aktivierung ein Teil der RSK-Enzyme von RSK1-3 im Zellkern akkumuliert (Chen et al., 1992). Der genaue Mechanismus der Translokation in den Kern ist noch unbekannt. RSK4 scheint nicht in den Nukleus zu translozieren und liegt vor allem zytoplasmatisch vor. Zudem ist RSK4 konstitutiv aktiv und benötigt für die volle Kinaseaktivität keine Phosphorylierung von PDK1 (Dümmeler et al., 2005). Außerdem scheinen für die volle Aktivierung von RSK zusätzlich zu ERK und PDK1 Effekte von der Zellmembran benötigt zu werden (Richards et al., 2001). Diese benötigten Effekte sind noch nicht bekannt.

Nach Aktivierung löst RSK durch die Phosphorylierung von Substraten in Zytosol und Zellkern vielfältige Effekte in der Zelle aus. Das minimale Konsensus-Phosphorylierungsmotiv eines Substrats von RSK ist Arg-X-Arg-X-X-pSer/Thr. Dieses oder ein ganz ähnliches Motiv wird auch von anderen Kinasen der Gruppe der AGC-Kinasen benötigt, unter anderem von AKT, S6K1/2 und MSK (Flotow und Thomas, 1992; Deak et al., 1998; Obata et al., 2000; Yang et al., 2002). Aus diesem Grund lassen sich überschneidende Aufgaben in der Zelle zwischen RSK und den genannten Kinasen vermuten.

1.3.3 Regulation der Proteinbiosynthese und des Zellzyklus

RSK beeinflusst die Transkription über verschiedene Mechanismen, unter anderem über Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und *immediate-early gene products*. Transkriptionsfaktoren sind wichtig für die Regulation diverser Prozessen in der Zelle, darunter Zellproliferation, Zellpolarität und Induktion von *immediate-early genes* (Rivera et al., 1993; Wu et al., 2000; Zhao et al., 2003). RSK beeinflusst zudem indirekt die Transkription über die verstärkte Aktivierung des mTOR-Signalwegs (Roux et al., 2004; Carriere et al., 2008).

RSK beeinflusst direkt die Ribosomenfunktion. Es wurde schon früh beschrieben, dass RSK zu Polyribosomen transloziert. Dort phosphoryliert RSK ribosomale Proteine, unter anderem das ribosomale Protein S6 (RPS6) und stimuliert die *cap-dependent translation* (Angenstein et al., 1998; Roux et al., 2007). Die RSK-Familie (ribosomales-Protein-S6-Kinase) ist nach RPS6 benannt. Ein weiterer Mechanismus der Translationsregulation durch RSK ist die direkte Regulation von Translationsfaktoren (Welsh und Proud, 1993).

Die Tumorsuppressor-Kinase LKB1, welche eine Rolle bei Zellpolarität und Wachstum hat, wird ebenfalls nach Zellstimulation durch mitogene Signale mittels RSK phosphoryliert. Dadurch wird LKB1 verstärkt aktiv und unterdrückt unter anderem indirekt über Regulation der Transkription die Zellproliferation (Yoo et al., 2002; Boudeau et al., 2003).

RSK spielt zudem eine Rolle in der Zellzyklusregulation. RSK phosphoryliert den CDK-Inhibitor p27^{kip1} und inhibiert ihn dadurch. Dadurch wird der G1-Checkpoint vorangetrieben (Fujita et al., 2003). Auch MYT1 wird von RSK phosphoryliert und dadurch inhibiert. MYT1 inhibiert normalerweise CDK1, dieses ist essentiell für die Zellzyklusprogression am G2/M-Checkpoint (Palmer et al., 1998). Dadurch fällt die Inhibition des G2/M-Checkpoints weg. So wirkt RSK am G1- und G2/M-Checkpoint. Im Pankreaskarzinom spielt jedoch aufgrund der P53-Mutation der G1-Checkpoint in der Regel keine Rolle mehr (Kojima et al., 2018).

Zudem phosphoryliert und aktiviert RSK auch CDC25C. CDC25C kann unter anderem Mitose induzieren (Millar und Russell, 1992; Wang et al., 2010).

1.3.4 Apoptose und Zellüberleben

RSK hat über verschiedene Mechanismen positive Effekte auf das Zellüberleben. Eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellüberlebens durch RSK spielt das Protein BAD. Dieses Protein inhibiert das antiapoptotische Protein BCL-2. Durch die Phosphorylierung von BAD durch RSK wird BAD vermehrt an die 14-3-3-Proteine gebunden und inhibiert. So wird der BAD-vermittelte Zelltod durch RSK inhibiert (Tan et al., 1999; Shimamura et al., 2000).

Außerdem steuert RSK das Zellüberleben auch durch die Beeinflussung der DNA-Reparaturantwort (*DNA damage response*). RSK unterdrückt durch die Inhibition der Proteine MRE11 und CHK1 den G2-Arrest bei DNA-Schädigung (Chen et al., 2013; Ray-David et al., 2013).

1.3.5 Weitere Funktionen von RSK

RSK beeinflusst unter Anderem den Metabolismus und die Motilität der Zelle.

Im Melanom fördert RSK die metabolische Reprogrammierung (*metabolic rewiring*), die in verschiedenen Tumorentitäten wie auch dem Pankreaskarzinom während der Tumorentwicklung stattfindet. Dies geschieht, indem RSK die Kinase PFKFB2 phosphoryliert, die die Entstehung von Fructose-2,6-Bisphosphat während der Glykolyse katalysiert (Halbrook und Lyssiotis, 2017; Houles et al., 2018). Zudem konnte gezeigt werden, dass RSK eine wichtige Rolle in der Ras/MEK/ERK-vermittelten epithelial-mesenchymalen Transition spielt (Doehn et al., 2009; Ma et al., 2011).

Es wird vermutet, dass RSK zudem über einen negativen Feedback-Loop die Aktivität des MEK-ERK-Pathways reguliert. RSK phosphoryliert in vitro den Guaninnukleotid-Austauschfaktor

SOS. Durch die Phosphorylierung dissoziiert SOS vom Rezeptor und die MEK-Signaltransduktion wird herunterreguliert (Douville und Downward, 1997).

Mutationen in RSK2 sind assoziiert mit dem Coffin-Lowry-Syndrom, das durch psychomotorische Retardierung, Skelettdeformitäten und faziale Dysmorphien charakterisiert ist (Trivier et al., 1996). Aus diesem Grund wird vermutet, dass RSK zudem in der Entwicklung des Gehirns eine Rolle spielt.

1.3.6 Rolle von RSK im Krebs

Generell wird vermutet, dass RSK1 und RSK2 sich pro-tumoral verhalten. RSK1 und RSK2 sind in vielen Tumoren überexprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass RSK1/2 eine Rolle bei Proliferation und/oder Metastasierung spielen, unter anderem in Zelllinien des Brustkrebs, Prostata-, Lungenkrebs, Glioblastoms, Melanoms und in Leukämien (Clark et al., 2005; Elf et al., 2011; Lara et al., 2011; Cuesta und Holz, 2016; Sulzmaier et al., 2016; Meant et al., 2019). Aufgrund der fehlenden Isoformspezifität von RSK-Inhibitoren konnten die beschriebenen Effekte bisher jedoch nur durch siRNA-vermittelten isotypspezifischen RSK-Knockdown eindeutig auf RSK1 und RSK2 zurückgeführt werden.

Bei den Isoformen RSK3 und RSK4 ist die Rolle im Tumor weniger erforscht. Im Ovarialkarzinom wird RSK3 eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben (Bignone et al., 2007). Im Brustkrebs vermittelt RSK3/4 möglicherweise die Resistenz gegenüber PI3K-Inhibitoren (Serra et al., 2014). RSK3 konnte in Brustkrebs-Zelllinien mit Tumorprogression in Zusammenhang gebracht werden (H. Zhao et al., 2016). Eine niedrige Expression von RSK4 im Kolonkarzinom stand in Zusammenhang mit einer schlechten Prognose, was eine tumorsuppressive Rolle von RSK4 impliziert (Cai et al., 2014).

Im Pankreaskarzinom ist die Rolle von RSK nahezu unerforscht. Milosevic et al. konnte immunhistochemisch eine erhöhte Aktivität von RSK3 in PDAC zeigen (Milosevic et al., 2013). In Pankreaskarzinomzellen mit Wildtyp-*KRAS* wirkte RSK1 inhibierend auf *KRAS* (Cheng et al., 2021). Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von RPS6, einem Substrat von RSK, und einer verstärkten Pankreaskarzinomentwicklung gefunden werden (Khalailah et al., 2013). RSK2 konnte als Effektor der epithelial-mesenchymalen Transition in Pankreaskarzinomzellen identifiziert werden (Ma et al., 2011).

1.4 Screen zur Identifizierung neuer potenzieller RSK3-Inhibitoren

Mit dem RSK-Inhibitor BI-D1870 steht ein Inhibitor zur Verfügung, der alle Isoformen der RSK inhibiert. Aufgrund der Löslichkeitscharakteristika ist BI-D1870 jedoch nicht für Experimente *in*

in vivo geeignet (Houles und Roux, 2018). Auch ist ein Isoform-spezifischer Inhibitor, der ausschließlich RSK3 inhibiert, nicht bekannt.

Um neue Kinaseinhibitoren zu identifizieren, werden üblicherweise zu Beginn viele verschiedene chemische Verbindungen (im Folgenden *Compounds* genannt) mittels Hochdurchsatzverfahren getestet. Anschließend erfolgt die Validierung mittels Zellkultur, sowie die chemische Modifizierung etwa zur Verbesserung der Bindungseigenschaften an die Kinase (Zhang et al., 2009).

Um den Ansatz von RSK3 als potenzielles neues therapeutisches Ziel im Pankreaskarzinom weiter zu verfolgen und weitere RSK-Inhibitoren zu identifizieren, wurde ein Compound-Screen durch das Leibniz-Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie Berlin (FMP) durchgeführt. Die Ergebnisse des Screens sind noch unveröffentlicht. Der Screen umfasste insgesamt 40.000 Compounds. Untersucht wurde der Effekt der Compounds in 10 μ M Konzentration auf die Aktivität von synthetisch hergestelltem RSK3. Die Enzymaktivität wurde mithilfe von kommerziellem Fluoreszenz-markiertem RSK3-Peptid-Substrat gemessen.

Nach diesem Screen wurden von den 40.000 Substanzen zur weiteren Validierung 100 Substanzen ausgewählt. Nach weiteren Untersuchungen wurden 10 Substanzen unter anderem nach den günstigsten IC_{50} -Werten (mittlere inhibitorische Konzentration) sowie nach vorläufigen Spezifitätsmessungen für die detaillierte Charakterisierung ausgewählt.

In der Validierung des Screens und weiteren Vorarbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass auch eine RSK-Inhibition allein antitumoral auf PDAC-Zelllinien wirkt (Milosevic et al., 2013).

Ziel dieser Promotionsarbeit ist die phänotypische und molekulare Charakterisierung von 5 dieser Substanzen. Die Charakterisierung ist grundlegend für die weitere Erforschung der Compounds.

2 Zielstellung

Da an einem Pankreaskarzinom erkrankte Patientinnen und Patienten immer noch eine sehr schlechte Prognose haben und mit einer steigenden Inzidenz des Pankreaskarzinoms gerechnet wird, müssen dringend neue Therapiemöglichkeiten gefunden werden (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2018; Maisonneuve, 2019). Da die klassische Chemotherapie nahezu ausgeschöpft ist, rückt zunehmend die spezifische Therapie (*targeted therapy*) in den Fokus der Forschung. In Vorarbeiten konnte in einem Synthetic-Lethality-Screen in Kombination mit Erlotinib die ribosomale Kinase RPS6KA2 (kurz RSK3) identifiziert werden. Zudem zeigte auch der RSK-Inhibitor BI-D1870 antitumorale Effekte auf PDAC-Zellen (Milosevic et al., 2013). Da jedoch keine isoformspezifischen, *in vivo* anwendbaren RSK3-Inhibitoren existieren, wurde ein Compound-Screen durchgeführt. Hierbei konnten 10 vielversprechende Compounds als potenzielle RSK3-Inhibitoren identifiziert werden.

Die Auswirkungen einer RSK-Inhibition im Pankreaskarzinom sind noch kaum erforscht. Zudem ist die Validierung der Compounds mittels Zellkultur unerlässlich für die weitere Erforschung von RSK3 als neuem therapeutischen Ziel. Aus diesem Grund ist das Ziel dieser Arbeit die phänotypische und molekulare Charakterisierung von 5 ausgewählten Compounds.

Durch die phänotypische Charakterisierung soll insbesondere die Frage beantwortet werden, ob eine RSK-Inhibition antitumorale Effekte hat. Zudem lassen sich durch die phänotypischen Effekte erste Aussagen darüber machen, inwieweit die Compounds die theoretisch erwarteten Effekte bei einer RSK3-Inhibition hervorrufen. Es sollte ebenfalls gezeigt werden, ab welcher Konzentration die Compounds phänotypische Effekte etwa auf die Zellviabilität haben.

Mit der molekularen Charakterisierung sollen mittels Western Blot Aussagen darüber getroffen werden, inwieweit die Compounds (als RSK3-Inhibitoren im Enzymaktivitätsassay) RSK3 auch in der Zellkultur inhibieren. Zudem sollten unspezifische „off-target“ Effekte der Compounds auf andere Kinasen, wie z.B. MEK und ERK, ausgeschlossen werden. Zusätzlich sollte ein möglicher Synergismus zwischen EGFR-Inhibition und einer RSK3-Inhibition durch eines oder mehrere Compounds untersucht werden.

3 Material und Methodik

3.1 Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Name	Hersteller
Abzugshaube	GeneChip® Fluidics Station 400	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)
Autoklav	V-95	Systec GmbH (Linden, DE)
Brutschrank	HERA cell150	Thermo Fisher Scientific
Drucker	ECOSYS P2135dn	Kyocera (Kyōto, JP)
Durchflusszytometer	BD LSRFortessa™	BD Biosciences (Franklin Lakes, US)
Elektrophorese-Netzgerät	PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, US)
Flockeneisbereiter	AF 100	Scotsman (Vernon Hills, US)
Gefrierschrank	Mediline	Liebherr (Bulle, CH)
Gelkammer (SDS-PAGE)	Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Imager (Detektor)	Advanced Fluorescence Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen, DE)
Kreisschüttler	3015	LAUDA-GFL (Burgwedel, DE)
Kühlschrank	Profiline	Liebherr
Luminometer	Luminoskan ascent	Thermo Fisher Scientific
Mehrkanalpipette	Eppendorf Research plus	Eppendorf (Hamburg, DE)
Metallblockheizer	QBD1	Grant Instruments Ltd (Shepreth, GB)
Mikroskop	Axiovert 40C	Carl Zeiss AG (Oberkochen, DE)
Multistep-Pipette	Multipipette M4	Eppendorf
pH-Messgerät	Inolab pH740	Xylem Inc. (New York, US)
Photometer	Multiscan FC	Thermo Fisher Scientific
PipetBoy	Pipetboy 2	INTEGRA Biosciences AG (Zizers, CH)
Pipetten	Eppendorf Research	Eppendorf

Rührgerät	MR3001	Heidolph Instruments GmbH & KG (Schwabach, DE)
Sicherheitswerkbank	HERAsafe	Heraeus (Hanau, DE)
Trockenschrank	Kelvitron® t	Heraeus
Vortexer	Digital Vortex Mixer	VWR International (Radnor, US)
Waage	CPA22025	Sartorius (Göttingen, DE)
Wasserdestillationsgerät	Synergy® UV	Merck Millipore (Burlington, US)
Zentrifuge	Centrifuge 5804R	Eppendorf
Zentrifuge	Microfuge 16	Beckman Coulter (Brea, US)
Zentrifuge	Heraus Fresco21 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Heraus Megafuge 40R Centrifuge	Thermo Fisher Scientific

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Name	Hersteller
96-Well-Platte	96-well, PS, F-Boden, weiß	Greiner Bio-One (Kremsmünster, AT)
Blot-Spannapparat	Gel holder	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Einmalhandschuhe	Vasco® Nitril blue	Braun BmbH (Kronberg, DE)
Eppendorfgefäß (0,5 ml/ 1,5 ml/ 2 ml)	Reagiergefäß 0,5 ml/ 1,5 ml/ 2 ml PP	Sarstedt, Inc. (Newton, US)
Falkon 15 ml	Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One
Falkon 5 ml	Sicherheitsreaktionsgefäß 5 ml PP	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, DE)
Falkon 50 ml	Zentrifugenröhrchen 50 ml, PP	Sarstedt, Inc.
Filter (zur sterilen Filtration)	0,2 µM Nalgene Syringe Filter, sterile	Thermo Fisher Scientific
Glasplatte für Gelgießen	Glass Plates Mini Protean 3 System	Bio-Rad Laboratories, Inc.

Glasplatte für Gelgießen mit Abstandhalter	Glasplatte mit 1mm Spacer	Biostep® GmbH (Burkhardtsdorf, DE)
Laborglasflasche (100 ml; 250 ml; 500 ml)	DURAN® Laborglasflasche GL45 100 ml; 250 ml; 500 ml	Duran (Mainz, DE)
Microtest-Zellkulturplatte 96-well	Microtestplatte 96 Well, F	Sarstedt, Inc.
PVDF-Membran	Amersham™ Hybond™ P0.45 PVDF	GE Healthcare (Chicago, US)
Pasteurpipetten	Pasteurpipetten Glas 230 mm, o. Stopfen	A. Hartenstein GmbH (Würzburg, DE)
Pipettenspitzen 50/ 200/ 1000 µl	Pipette tip 50/ 200/ 1000 µl	Sarstedt, Inc.
Pipettenspitzen für Multistep-Pipette	Combitips plus 10 ml	Eppendorf
Pipettenspitzen zur Gelbeladung	Multiflex® Tips	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, DE)
Schwamm (für Blotting)	Mini Trans-Blot® Foam Pads	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Serologische Pipette 2/ 5/ 10 ml	Serologische Pipette 2/ 5/ 10 ml, wattiert	Greiner Bio-One
Sicherheitsreaktionsgefäß 5 ml	Sicherheitsreaktionsgefäß 5 ml	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Whatman-Paper	Blottingpapier BP002	Hahnemühle FineArt GmbH (Dassel, DE)
Zellkulturplatte 12-/ 24-/ 96-well	TC-Platte 12/ 24/ 96 well Standard F	Sarstedt, Inc.
Zellkulturschale 10 cm	TC-Schale 100, Standard	Sarstedt, Inc.
Zellkulturschale 6 cm	TC-Schale 60, Standard	Sarstedt, Inc.
Zellschaber	Zellschaber (2- Positionenklinge)	Sarstedt, Inc.

3.3 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific

Acrylamid (0,8 % Bisacrylamid)	Carl Roth GmbH & Co KG
APS	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Aqua dest	Filtrierung im Labor
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
BSA	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich
DMSO	Carl Roth GmbH & Co KG
Ethanol 70% vergällt	Walter-CMP GmbH & Co KG (Kiel, DE)
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co KG
Glycin	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, DE)
HEPES	Carl Roth GmbH & Co KG
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Methanol	Sigma-Aldrich
Natrium-Desoxycholsäure	Merck
Natriumchlorid	AppliChem GmbH (Darmstadt, DE)
PMA	Sigma-Aldrich
PMSF	Serva Electrophoresis GmbH
SDS	AppliChem GmbH
TEMED	Sigma-Aldrich
Tris-HCL	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co KG

3.4 Substanzen, Lösungen und Kits

Tabelle 5: Substanzen, Lösungen, Puffer und Kits

Bezeichnung	Hersteller
Annexin V (90 µg/ml)	BioLegend (San Diego, US)
ATP-Assay-Kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega (Madison, US)
Calcein	BioLegend
Complete Protease-Inhibitor-Cocktail	F. Hoffmann-La Roche AG (Basel, CH)
Coomassie Plus™ Protein Reagent Assay	Thermo Fisher Scientific

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco (Thermo Fisher Scientific)
Erlotinib	F. Hoffmann-La Roche AG
FCS (fetales Kälberserum)	PAA
Größenmarker "Triple Color Protein Standard III"	Serva Electrophoresis GmbH
Hoechst (DAPI)	Invitrogen
Milchpulver (blotting grade, low fat)	Carl Roth GmbH & Co KG
PBS	Gibco
Phosphataseinhibitor Mix I	Serva Electrophoresis GmbH
PI staining solution (FxCycle™PI/RNase Staining Solution)	Invitrogen
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Proteasom-Inhibitor MG132	Calbiochem (San Diego, US)
RNase A	AppliChem GmbH
RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium)	Gibco
Tris-Base	Serva Electrophoresis GmbH
TRIS-Puffer	Sigma-Aldrich
TrypLE™ select	Thermo Fisher
Trypsin 0,5% EDTA 10x	Thermo Fisher
Tween® 20	Sigma-Aldrich
WesternBright Sirius (ECL)	Advansta, Inc. (Menlo Park, US)

3.5 Pufferherstellung

3.5.1 Puffer für die Proteinlysate-Herstellung

Tabelle 6: Herstellung des RIPA-Puffers

Puffer	Konzentration	Chemikalie
RIPA-Puffer (steril filtriert)	50 mM	Tris-HCL pH 7,5
	150 mM	Natriumchlorid
	0,1 %	SDS
	1 %	Natrium-Desoxycholsäure
	1 %	Triton X-100

Tabelle 7: Herstellung des RIPA-Lysepuffers

Puffer	Menge	Chemikalie
RIPA-Lysepuffer	2 ml	RIPA-Puffer
	80 µl	Complete Protease-Inhibitor-Cocktail
	20 µl	Phosphataseinhibitor Mix I
	10 µl	200 mM PMSF

3.5.2 Puffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Tabelle 8: Puffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Puffer	Konzentration	Chemikalie
10x SDS-Laufpuffer	0,25 M	Tris-Base
	1,92 M	Glycin
	1 %	SDS
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M	Tris-Base, steril filtriert
	0,4 %	SDS, steril filtriert
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M	Tris-Base, steril filtriert
	0,4 %	SDS, steril filtriert
3x Lämmli-Puffer	62 mM	Tris-Puffer pH 6,8
	2 %	SDS
	10 %	Glycerol
	5 %	2-Mercaptoethanol
	0,001 %	Bromphenolblau

Tabelle 9: Herstellung der Trenngele für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Gelprozentigkeit	Trenngelpuffer	Aqua dest	Acrylamid	50 % Glycerol	TEMED	10 % APS
7,5 %	1,25 ml	2,00 ml	1,25 ml	0,50 ml	10 µl	10 µl
9,0 %	1,25 ml	1,75 ml	1,50 ml	0,50 ml	10 µl	10 µl
10,0 %	1,25 ml	1,59 ml	1,67 ml	0,50 ml	10 µl	10 µl

Tabelle 10: Herstellung des Sammelgels für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Gel	Menge	Chemikalie
Sammelgel	0,50 ml	Sammelgelpuffer
	1,18 ml	Aqua dest

	0,32 ml	Acrylamid
	5,00 µl	TEMED
	5,00 µl	10 % APS

3.5.3 Puffer für Western Blot

Tabelle 11: Puffer für Western Blot

Puffer	Konzentration	Chemikalie
TBS-T	99,9 %	Dreifach gepufferte Salzlösung
	0,1 %	Tween®20
10x Transferpuffer methanol-frei	0,25 M	Tris-Base
	1,92 M	Glycin
1x Transferpuffer	10 %	10x Transferpuffer methanolfrei
	20 %	Methanol
	70 %	Aqua bidest

3.5.4 Puffer für die durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse

Tabelle 12: Puffer für Zellzyklusanalyse

Puffer	Konzentration	Chemikalie
Durchflusszytometrie-Puffer	1x	PBS
	1 %	FCS
	1 mM	EDTA pH 8,0

3.5.5 Puffer für das Annexin-V-Staining in der Durchflusszytometrie

Tabelle 13: Puffer für Annexin-V-Staining

Puffer	Konzentration	Chemikalie
10x Binding Buffer	0,1 M	HEPES pH 7,5
	1,4 M	Natriumchlorid
	25 mM	Calciumchlorid

3.6 Methodik der Zellkultur

3.6.1 Kultivierung der Zelllinien

PaTu-8988t stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig. PaTu-8988t wurden 1985 aus der Lebermetastase des PDAC einer 64-jährigen Patientin etabliert (Elsässer et al., 1992).

BxPC-3 stammen aus der *American Type Culture Collection*, Rockville, USA. Ursprünglich wurde die Zelllinie 1980 aus dem primären nicht metastasierten Pankreasadenokarzinom einer 61-jährigen Patientin etabliert (Tan et al., 1986).

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in Zellkulturschalen mit 21 cm² Wachstumsfläche in DMEM- bzw. RPMI-Medium, welches 10 % fetales Kälberserum (FCS) enthält. Die Zellkulturschalen wurden im Inkubator bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei maximaler Luftfeuchtigkeit gelagert. Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Bei einer Konfluenz von 70 bis 80 % wurden die Zelllinien passagiert. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die enzymatische Ablösung der Zellen mit 1 ml Trypsin, welches für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert wurde. Die Reaktion wurde mit Medium abgestoppt und die Lösung resuspendiert, um die Zellen zu vereinzeln. In einer neuen Zellkulturschale wurde 4,5 ml frisches Medium vorgelegt und 0,5 ml der Zellsuspension dazugegeben, sodass das Verhältnis der Zelllösung zu frischem Medium 1 zu 10 betrug.

Nach der vierzigsten Passage wurden die Zellen verworfen und neue Zellen aus einem auf – 80° C gekühlten Stickstofftank aufgetaut.

3.6.2 Zellzahlbestimmung und Aussäen der Zellen

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden die Zellsuspension mit den abtrypsinierten, durch Resuspendierung vereinzelt Zellen zunächst bei 310 g für 3 Minuten zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl Zellsuspension in die Neubauerkammer gegeben und unter dem Lichtmikroskop 4 Großquadrate ausgezählt. In einem Großquadrat befinden sich 0,1 µl Zellsuspension. Somit wurde die Zellzahl in 0,4 µl bestimmt. Für die Umrechnung auf Zellzahl pro Milliliter wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{X}{4} * 10^4 = \text{Zellzahl pro Milliliter}$$

Hierbei steht X für die Anzahl der ausgezählten Zellen in 4 Großquadraten (Absher, 1973).

Um eine bestimmte Zellzahl auszusäen, wurde die benötigte Menge Zellsuspension zu frischem Medium gegeben.

3.6.3 Proteinernte

Die Zellen wurden in definierter Zellzahl pro Milliliter in 6-Zentimeter-Zellkulturschalen ausgesät. Bei der Zelllinie PaTu-8988t waren dies 5×10^5 Zellen, von den BxPC-3 wurden 7×10^5 Zellen pro Zellkulturschale ausgesät. 24 Stunden nach Aussäen der Zellen wurden die Zellen mit den in DMSO gelösten Substanzen behandelt. Weitere 24 bzw. 48 Stunden nach Behandlung wurden die Zellen geerntet. Hierbei wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt sowie die Zentrifugen auf $4\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Zunächst wurden die Zellen mit einem Zellschaber in das Medium geschabt. Die Zellen wurden bei 1000 g herunterzentrifugiert, in einem Milliliter PBS resuspendiert, und bei 430 g für 3 Minuten erneut herunterzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in RIPA-Lysepuffer resuspendiert, wobei die Menge an Puffer an die Größe des Zellpellets angepasst wurde.

Für die vollständige Lyse wurden die Proben mithilfe von 10 Ultraschallstößen je Probe behandelt. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 14.800 g für 10 Minuten zentrifugiert. Die löslichen Proteine im Überstand wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Proteinproben erfolgte bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976).

3.6.4 Stimulation der Zellen mit PMA vor der Proteinernte

Die Zellen wurden in definierter Zellzahl pro Zellkulturschale (6×10^5 bei PaTu-8988t; 8×10^5 bei BxPC3) in 6-cm-Schalen in 10 % FCS ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um FCS-Rückstände zu entfernen, und anschließend mit in serumfreiem Medium gelöstem Compound behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit PMA stimuliert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und mit 100 ng/ml PMA gelöst in serumfreiem Medium für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Protein aus den Zellen wie oben beschrieben geerntet.

3.7 Methodik der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

3.7.1 Probenaufbereitung

Die Proben für den Western Blot wurden mit 4x Laemmli-Puffer und RIPA-Puffer auf eine Proteinkonzentration von $1\text{ }\mu\text{g}$ pro ml verdünnt (Laemmli, 1970). Für jede Tasche wurden 25 μl Probe vorbereitet. Zur Proteindenaturierung wurden die Proben anschließend im Heizblock für 5 Minuten auf $95\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt und bis zum Beladen des Gels bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.7.2 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht eignet sich die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Bei Anlegung eines Spannungsfeldes wandern die Proteine zum Plus-Pol. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Laemmli werden die Proteine zuerst in einem Sammelgel konzentriert, sodass die in der Probe enthaltenen Proteine auf einer Höhe wandern, und anschließend im Trenngel ihrer Größe nach aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Zusammensetzung der Sammel- bzw. Trenngele wird in Tabelle 9 bzw. 10 gelistet.

Vor der Beladung des Gels wurden alle Geltaschen mit SDS-Puffer gespült, um mögliche Gelreste aus den Taschen zu entfernen. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut, gevortext und herunterzentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert, sodass sich in jeder Tasche insgesamt 20 µg Protein befanden. Zusätzlich wurde 1 µl eines Größenstandards in zwei Taschen gegeben. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte, bis die Lauffront in das Trenngel eingewandert war, bei 100 V; darauffolgend bei 120 V bis zur gewünschten Auftrennung der Proben.

3.7.3 Proteintransfer mittels Western Blot

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Dies erfolgte mittels *Tank-Blot*-System bei 0,35 A für zwei Stunden unter ständiger Kühlung. Hierzu wurden insgesamt 4 Whatman-Filterpapiere sowie zwei Schwammtücher, eine PVDF-Membran sowie das Trenngel mit den aufgetrennten Proteinen in Transferpuffer equilibriert und in folgender Reihenfolge in die Blot-Apparatur gespannt: ein Schwammtuch, zwei Filterpapiere, die Membran, Trenngel, zwei Filterpapiere und ein Schwammtuch. Mögliche Luftblasen zwischen Membran und Trenngel wurden durch Überrollen mit einer Handwalze entfernt.

3.7.4 Bandendetektion mittels Antikörper (Immunodetektion)

Nach erfolgreichem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurden unspezifische Bindungen durch eine einstündige Inkubation der Membran in 5 % Milch bzw. bei Phospho-Blots in 5 % BSA/TBS-T abgesättigt. Anschließend wurde die Membran kurz in TBS-T gewaschen, geschnitten und über Nacht bei 4 °C in der Primärantikörperlösung nach Herstellerangaben inkubiert.

Nach dem Waschen der Membran am zweiten Tag in TBS-T (für dreimal 10 Minuten) erfolgte die Inkubation der Membran in Sekundärantikörperlösung, bei der der Sekundärantikörper im

Verhältnis 1:10.000 im selben Lösungsmittel wie der Primärantikörper (5 % BSA oder 5 % Milch) gelöst wurde.

Um überschüssige Sekundärantikörper von der Membran zu entfernen, wurde die Membran nochmals dreimal für jeweils zehn Minuten gewaschen. Zur Immunodetektion wurde die PVDF-Membran mit ECL-Detektionsreagenz benetzt und für 2 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Chemolumineszenzreaktion wurde mithilfe eines Imagers detektiert und mit der Software „Intas Chemostar“ visualisiert.

Die relative Quantifizierung der Western Blots wurde mit dem Programm „ImageJ“ Version 1.53 durchgeführt, hierbei wurde ein Protokoll der Universität York verwendet (Davarinejad, 2015). Hierbei wurde zunächst die relative Stärke der Proteinbande im Vergleich zur Kontrollbande errechnet, unter Berücksichtigung der Ladekontrolle und des Hintergrunds. Bei Blots mit Zellstimulation wurde die stimulierte Kontrolle herangezogen. Anschließend wurde der Quotient Phospho-Protein/Gesamtprotein errechnet und als Dezimalzahl unter das Phospho-Protein geschrieben.

3.7.5 Verwendete Antikörper für die Immunodetektion

Tabelle 14: Primärantikörper

Name	Serum	Hersteller	Nummer	Verdünnung
Aktin	Mouse	Sigma-Aldrich	A1978	1:20 000
HSP90	Rabbit	Cell Signaling	4877	1:1000
LKB1	Rabbit	Cell Signaling		1:1000
P44/42 MAPK	Rabbit	Cell Signaling	9102	1:1000
PARP	Rabbit	Cell Signaling	9542	1:1000
PFKFB2	Rabbit	Cell Signaling	13045	1:1000
Phospho-RSK3 (Thr356/Ser360)	Rabbit	Cell signaling	9348	1:1000
Phospho-LKB1 (Ser428)	Rabbit	Cell Signaling	3482	1:1000
Phospho-P44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Rabbit	Cell Signaling	4370	1:1000
Phospho-PFKFB2 (Ser483)	Rabbit	Cell Signaling	13064	1:1000
Phospho-RPS6 (Ser235/236)	Rabbit	Cell Signaling	2211S	1:2000
Phospho-RSK3 (Ser218)	Rabbit	R&D Systems	AF893	1:1000
RPS6	Rabbit	Cell Signaling	2217	1:2000
RSK3	Mouse	Santa Cruz	sc-517283	1:1000

Tabelle 15: Sekundärantikörper

Name	Hersteller	Nummer	Verdünnung
Anti-Mouse (horseradish peroxidase-linked)	GE Healthcare	NA931V	1:10 000
Anti-Rabbit (horseradish peroxidase-linked)	GE Healthcare	NA934V	1:10 000

3.8 Methodik des ATP-Assays

Mithilfe des ATP-Assays lässt sich die intrazelluläre ATP-Konzentration messen. Somit wird die Zahl der viablen Zellen bestimmt (Crouch et al., 1993).

Für den ATP-Assay wurde eine bestimmte Zellzahl pro Well in eine weiße 96-Well-Platte (für die Messung des Assays) und in eine durchsichtige 96-Well-Platte (zur Kontrolle unter dem Lichtmikroskop) gesät. Die Zellzahl entsprach bei den PaTu-8988t 6000 Zellen pro Well, bei den BxPC3 7000 Zellen pro Well. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit der jeweiligen in Medium gelösten Substanz behandelt.

Je nach Versuchsansatz erfolgte nach weiteren 24 oder 48 Stunden die ATP-Messung. Hierzu wurde zunächst die weiße 96-Well-Platte eine halbe Stunde außerhalb des Brutschranks auf Raumtemperatur equilibriert. Die Reaktion zur Messung des ATP-Assays wurde gestartet, indem 100 µl CellTiterGlo-Reagenz zu dem Medium in die Wells pipettiert wurde. Das Reagenz lysiert die Zellen und generiert durch die ATP-abhängige Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin ein Lumineszenz-Signal, das proportional zum ATP-Gehalt ist (Promega, 2009). Anschließend wurde die Platte in das Luminometer gestellt. In diesem wurde die Platte für zwei Minuten geschüttelt, um die Zellyse zu unterstützen. Danach wurde die Platte für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lichtmessung erfolgte mit einer Integrationszeit von einer Sekunde pro Well mit einer Photomultiplier-Spannung von 1200 V.

3.9 Methodik der Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie wird die Eigenschaft einer Zelle gemessen, das Licht zu streuen. Die Menge des Vorwärtsstreulichts (FSC; forward scatter) hängt von der Zellgröße ab, die Menge des Seitwärtsstreulichts (SSC; sideward scatter) von der Granularität. Je größer die Zelle, desto größer das Vorwärtsstreulichtsignal; je granulierter die Zelle, desto größer das Seitwärtsstreulicht. Zusätzlich kann das Durchflusszytometrie-Gerät mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Zellen, etwa mit Propidiumiodid oder fluoreszenzfarbstoff-gebundenes Annexin V, messen.

Für die Analyse des Zellzyklus wurden die Zellen mit *PI staining solution* permeabilisiert, mittels Propidiumiodid (PI) markiert und in der Durchflusszytometrie gemessen. Das PI interkaliert in die DNA und kann im Durchflusszytometer mit einem Laser angeregt werden, sodass das PI fluoresziert. Aus dem indirekt über die Fluoreszenz gemessenen DNA-Gehalt lassen sich Rückschlüsse auf die Zellzyklusphase ziehen.

Die Proben für Zellzyklusanalysen wurden während der Proteinernte gewonnen, die Zellen wurden vorher nicht synchronisiert. Die Aufarbeitungsschritte wurden auf Eis durchgeführt, die Zentrifugationsschritte bei 4 °C durchgeführt. Alle Proben und Pufferlösungen wurden auf Eis gelagert. Vor der Abzentrifugation der Zellen wurde 1 ml Zellsuspension abgenommen und 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal in 5 ml Durchflusszytometrie-Puffer gewaschen und wieder für 10 Minuten bei 300 g herunterzentrifugiert. Nach Absaugen des Puffers wurde das Pellet in 500 µl Durchflusszytometrie-Puffer resuspendiert. Unter Vortexen der Probe wurde tröpfchenweise auf -20 °C gekühlter 70 %iger Ethanol dazugegeben. Die Proben wurden bis zur durchflusszytometrischen Messung bei 4 °C gelagert.

Um die Proben für die Durchflusszytometrie aufzubereiten, wurde die Probe für 10 Minuten bei 800 g und 4 °C zentrifugiert und zweimal in 1 ml Durchflusszytometrie-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 500 µl *PI staining solution* resuspendiert und die Probe für 30 Minuten im Dunkeln gelagert.

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte mit dem Gerät LSRFortessa™ und der Software „BD FACSDiva Software“ bzw. „BD Coherent Connection“ für die Laserbedienung. Es wurden vor Beginn aller Messungen Standardeinstellungen in der Software für eine bestimmte Zelllinie festgelegt und für jede weitere Messung übernommen.

Die Auswertung erfolgte mithilfe des Programms „FlowJo Version 7.6.5“.

Die Messungen der Durchflusszytometrie lassen sich in einem Diagramm darstellen, hierbei steht je ein Punkt für eine Messung. Pro Probe werden mindestens 1000 Messungen vorgenommen. Um die Gatingstrategie darzustellen, ist in Abbildung 3 beispielhaft das Gating einer Probe gezeigt.

Nach abgeschlossenem Gating ergibt sich die graphische Darstellung der Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen. Vor der G1-Spitze befinden sich ebenfalls einige Zellen. Diese Fraktion bezeichnet man als Sub-G1-Fraktion. Die gemessenen Zellen in dieser Fraktion haben weniger als einen haploiden Chromosomensatz. Zellen mit so geringem DNA-Gehalt sind in der Regel apoptotisch. Die Sub-G1-Fraktion ist also ein indirekter Marker für die Menge an apoptotischen Zellen.

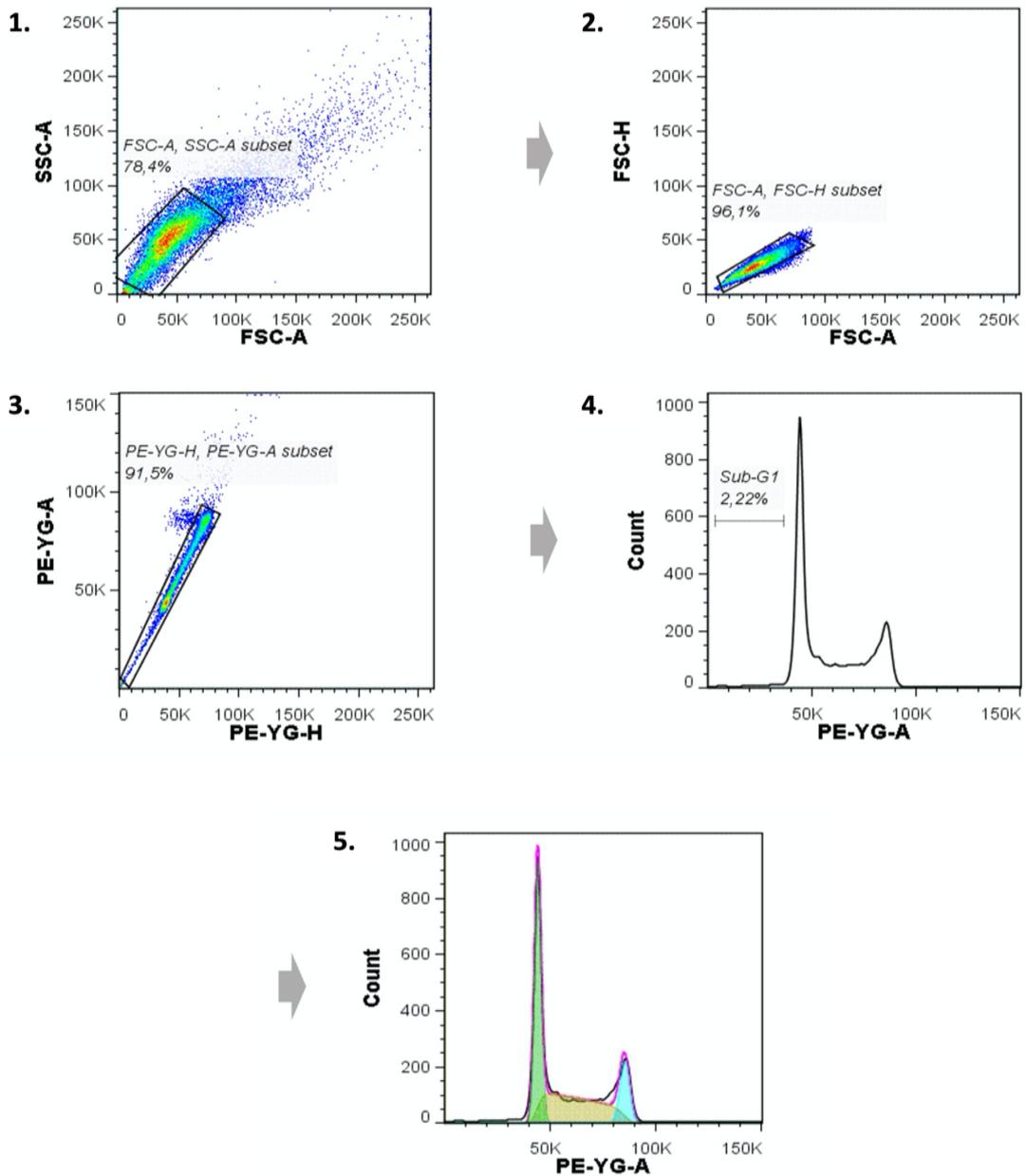


Abbildung 3: Gatingstrategie der Zellzyklusanalyse. In den Schritten 1 bis 3 wird zunächst die gewünschte Zellpopulation selektiert. Zelltrümmer sowie nicht vereinzelt Zellen (Dubletten) werden mittels Gating aus der Analyse ausgeschlossen. SSC steht für Vorwärtsstreulicht, FSC für Seitwärtsstreulicht, PE-YG für den Fluoreszenzlasers. Die angehängten Buchstaben A bzw. H stehen für Area (Fläche) und height (Höhe) der Zellen. In Schritt 4 erfolgt die Messung der Sub-G1-Fraktion (hier 2,22 %). In Schritt 5 werden die Zellzyklusfraktionen mittels Dean-Jett-Fox-Algorithmus errechnet. Hierbei ist die G0/G1-Fraktion grün, die S-Fraktion gelb und die G2/M-Fraktion blau hinterlegt.

3.10 Methodik der durchflusszytometrischen Apoptosedetektion mittels Annexin-V

Für die Apoptosedetektion in der Durchflusszytometrie wird Propidiumiodid (PI) und Annexin V, ein Protein, das an Phosphatidylserin bindet, verwendet. Annexin V markiert apoptotische Zellen, da bei diesen das Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran transloziert ist. Nekrotische Zellen haben eine durchlässige Zellmembran, durch die das Annexin V in die Zellen eintritt und an das Phosphatidylserin auf der Innenseite der nekrotischen Zellen bindet. Zudem werden die Zellen mit PI behandelt. Es kann nur durch beschädigte Zellmembranen etwa bei nekrotischen Zellen dringen, nicht jedoch bei vitalen und apoptotischen Zellen. Das PI färbt dann die DNA der nekrotischen Zellen an. Durch die Doppelbehandlung mit PI und Annexin V ist somit eine Differenzierung der Zellen in vital (PI-negativ, Annexin-negativ), frühapoptotisch (PI-negativ, Annexin-positiv), spätapoptotisch (PI-positiv, Annexin-positiv) und nekrotisch (PI-positiv, Annexin-negativ) möglich (Vermees et al., 1995).

Für die durchflusszytometrische Apoptosedetektion wurden die Zellen in definierter Zellzahl ($1,5 \times 10^5$ bei PaTu-8988t; 2×10^5 bei BxPC3) auf 6-Well-Platten ausgesät und für 24 Stunden behandelt. 16 Stunden vor geplanter durchflusszytometrischer Messung wurden in den Zellen, welche als Positivkontrolle dienen sollten, mittels UV-Licht Apoptose induziert.

Kurz vor der Messung mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und vereinzelt, und dann für eine Minute bei 600 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und bei 3000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Das PBS wurde abgesaugt und das Pellet in 400 μ l Binding Buffer resuspendiert. Bei den Proben wurde ggf. 10 μ l Annexin V dazugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dann wurden ggf. 10 μ l Propidiumiodid-Lösung sowie 1 μ l RNaseA zugegeben und für 15 Minuten bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Die PI-Lösung wurde vorher durch Verdünnung des 1 mg/ml Stocks auf 100 mg/ml in 1x Binding Buffer hergestellt.

Die Zugabe von fluoreszenzmarkiertem Annexin V und Propidiumiodid erfolgte nicht bei allen Proben, sodass man für die Messung eine ungefärbte Kontrolle, eine Kontrolle mit Annexin V und eine Kontrolle mit Propidiumiodid hatte. Eine Kontrolle und die behandelten Zellen wurden sowohl mit Annexin V als auch mit Propidiumiodid gefärbt.

Beispielhaft wird die Gating-Strategie zur Messung einer mit PI- und Annexin-V-gefärbten, lediglich mit DMSO behandelten Kontrolle beschrieben. Analog zum Gating der Zellzyklusanalyse (siehe Seite 25) wird in Schritt 1 und 2 zunächst die Zellpopulation in der ungefärbten Kontrolle selektiert (vgl. Abb. 4).

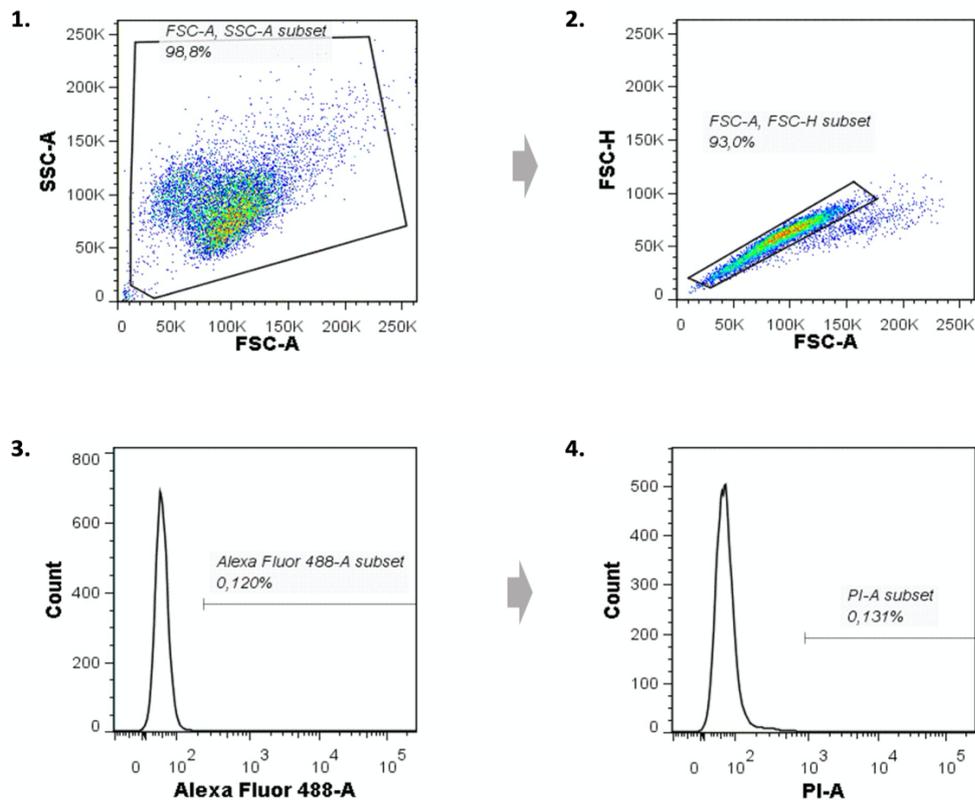


Abbildung 4: Gating der Annexin-V-Analyse. In Schritt 1 und 2 wird mittels Gating die gewünschte Zellpopulation selektiert. In Schritt 3 wurde in der ungefärbten Kontrolle das Gate gesetzt, in dem bei einer gefärbten Kontrolle die Annexin-V-positiven Zellen wären; in Schritt 4 das Gate gesetzt, in dem bei einer gefärbten Kontrolle die Propidiumiodid-positiven Zellen wären. Für die weiteren Schritte siehe nächste Abbildung.

In Schritt 3 und 4 werden die Messungen der ungefärbten Kontrolle in der Y-Achse als absolute Zahl (*count*) dargestellt. In Schritt 3 wird die Fläche der Annexin-V-Fluoreszenz (Alexa Fluor 488-A) als X-Achse eingestellt.

Da in der ungefärbten Kontrolle keine mit Annexin V gefärbten Zellen sein können, wird der Bereich rechts der Messungen als Annexin-positiv markiert. In Schritt 4 wird bei Einstellung auf die Fläche der Propidiumiodid-Fluoreszenz der PI-positive Bereich markiert (vgl. Abb. 5).

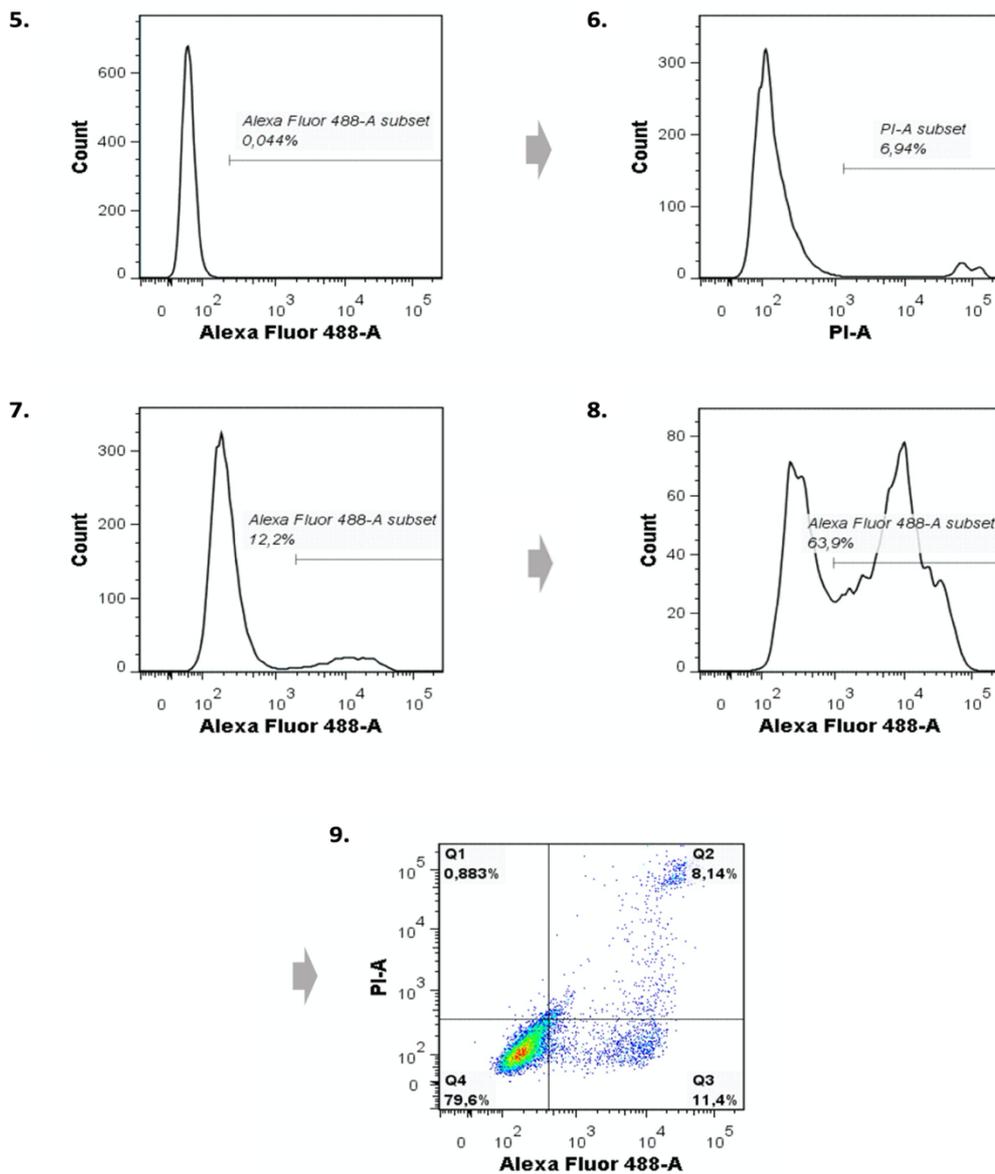


Abbildung 5: Schritte 5 bis 9 der Analyse der Annexin-V-Durchflusszytometrie-Messung. In Schritt 5 sind die gesetzten Gates auf die Propidiumiodid-gefärbte Kontrollprobe übertragen und die Markierung der Annexin-V-positiven Zellen wurde korrigiert. In Schritt 6 wurde die Markierung der Propidiumiodid-positiven Zellen korrigiert. In Schritt 7 wurden alle Gates auf die Annexin-V-gefärbte Kontrollprobe übertragen und die Markierung für die Annexin-V-positiven Zellen korrigiert. In Schritt 8 wurden alle Gates auf die mit UV-Licht behandelte, mit Annexin und Propidiumiodid gefärbte Kontrollprobe übertragen und ggf. angepasst. In Schritt 8 wurden die Gates auf die gefärbte Kontrolle übertragen und nach Einstellung der Achsen nach Annexin- und Propidiumiodid-Signal ein 4-Quadrantenraster über die Population gelegt.

In Schritt 5 werden die gesetzten Gates auf die mit Propidiumiodid gefärbte Kontrollprobe übertragen (Abb. 5). In Schritt 5 und 6 werden dann die gesetzten Markierungen für Annexin-V- und Propidiumiodid-positiven Zellen gegebenenfalls korrigiert. In Schritt 7 werden die Gates auf

die mit Annexin V gefärbte Kontrollprobe übertragen und die Markierung für Annexin-V-positive Zellen korrigiert. In Schritt 8 wurden die Gates auf die mit PI- und Annexin-gefärbte und mit UV-Licht behandelte Kontrolle übertragen und ggf. angepasst. In Schritt 9 wurden die Gates auf die gefärbte, unbehandelte Kontrolle übertragen. Auf der X-Achse wird die Annexin-V-Fluoreszenz, auf der Y-Achse die Propidiumiodid-Fluoreszenz eingestellt. Nun wird manuell ein Gitter über den Graphen gelegt, der diesen in vier Quadranten einteilt (vgl. Abb. 5 Schritt 9). Obwohl die Zellen unbehandelt waren, sind einige Zellen in der Probe abgestorben. Diese liegen vor allem im Quadranten 2 (Q2) und Quadranten 3 (Q3) und sind somit apoptotisch oder nekrotisch.

In Q4 befinden sich die vitalen Zellen (PI-negativ, Annexin-negativ), in Q3 die apoptotischen (PI-negativ, Annexin-positiv), und in Q2 die nekrotischen Zellen (PI-positiv, Annexin-positiv). Alle für die gefärbte UV-Kontrolle vorgenommenen Einstellungen wurden für alle weiteren Proben übernommen und der relative Anteil der Zellen in den jeweiligen Quadranten als Diagramm dargestellt.

3.11 Statistik und Graphiken

Alle Experimente wurden mit mindestens 3 voneinander unabhängigen biologischen Ansätzen wiederholt. Für die graphische Darstellung wurde der biologische Mittelwert verwendet. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Experimente erfolgte mithilfe des Programms „GraphPad Prism 5“. Die Ergebnisse sind angegeben als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei Experimenten.

Die Errechnung des Signifikanzniveaus erfolgte unter Verwendung des einseitigen Student's t-Test. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde ein signifikanter Unterschied angenommen. Errechnete Signifikanzen wurden mit $p < 0,05$ mit * gekennzeichnet, $p < 0,01$ mit ** und $p < 0,001$ mit ***.

Schaubilder wie in Abbildung 2 wurden mit Microsoft Powerpoint[®] erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Phänotypische Charakterisierung potenzieller RSK3-Inhibitoren

4.1.1 Proliferation mit BI-D1870 und Compound C1-C5

Die Substanz BI-D1870 ist als spezifischer RSK-Inhibitor beschrieben, der alle Isoformen von RSK inhibiert (Sapkota et al., 2006). Um das Verhalten der untersuchten Zelllinien bei RSK-Inhibition zu untersuchen, wurde zunächst die Auswirkung von BI-D1870 in verschiedenen Konzentrationen auf die Zellzahl bestimmt. Hierfür wurden die Zellen der Zelllinien PaTu-8988t und BxPC3 mit BI-D1870 in 1, 5 und 10 μM für 24 und 48 Stunden behandelt (Abb. 6). Die Kontrolle wurde mit DMSO behandelt, da die Compounds in DMSO gelöst sind. Die Verwendung der Konzentration von BI-D1870 in 10 μM ist beschrieben und etabliert (Houles et al., 2018).

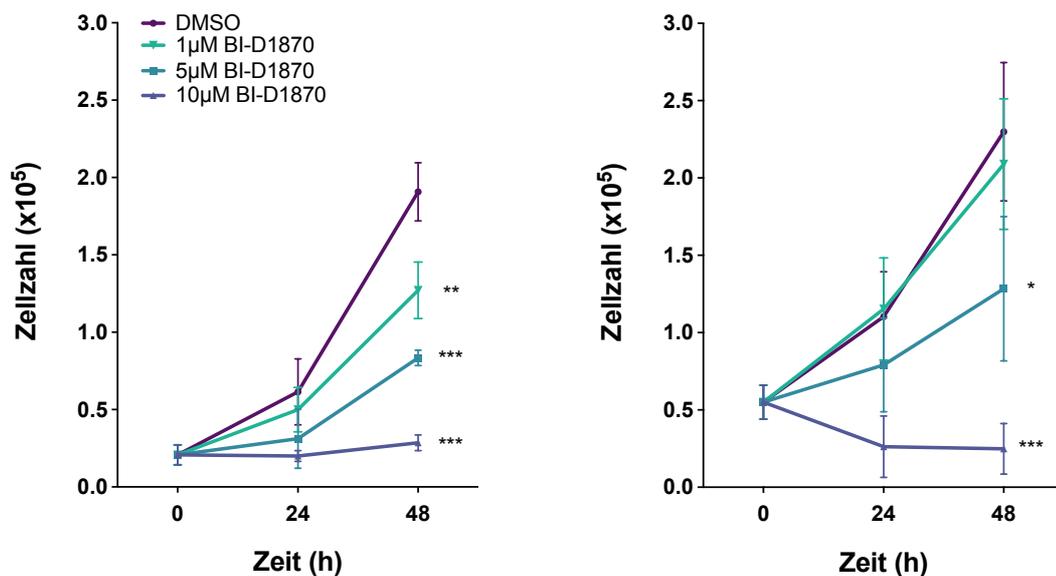


Abbildung 6: Proliferation der Zelllinien PaTu-8988t und BxPC3 nach Behandlung mit dem RSK-Inhibitor BI-D1870. 24 Stunden nach dem Aussäen der Zellen wurden diese mit BI-D1870 in den Konzentrationen 1, 5 und 10 μM behandelt. Nach weiteren 24 bzw. 48 Stunden wurde die Zellzahl pro Well mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es erfolgte pro Behandlung und Zeitpunkt eine Doppelbestimmung. Die Graphiken enthalten die Ergebnisse von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten, dies gilt auch für alle folgenden Zellzählungen. Es wurde jeweils der Mittelwert der Doppelbestimmung verwendet. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die 48-Stunden-Werte und wurden gegen den 48-Stunden-Wert der DMSO-Kontrolle berechnet.

Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger antiproliferativer Effekt von BI-D1870 auf die Zellen beider Zelllinien. In PaTu-8988t stagniert die Zellzahl bei der höchsten Konzentration 10 μM nahezu, während in BxPC3 die Zellzahl absinkt. So fand in PaTu-8988t bei 10 μM nach 48 Stunden eine Zunahme der Zellzahl um 27 % verglichen mit dem Ausgangswert t_0 statt. Bei BxPC3 nahm die Zellzahl verglichen mit dem Ausgangswert um 55 % ab.

In der geringsten Konzentration 1 μM hatte BI-D1870 in PaTu-8988t geringe statistisch signifikante Effekte auf die Proliferation; in BxPC3 zeigt sich ebenfalls ein Effekt, der jedoch nicht signifikant ist.

Es wurden zudem die Auswirkungen der Compounds C1-C5 in 10 μM auf die Proliferation gemessen. Die Compounds wurden im Compound-Screen und der Validierung des Screens in 10 μM verwendet, weswegen zunächst diese Konzentration beibehalten wurde.

Zunächst wurden die Zellen analog zum Proliferationsversuch mit BI-D1870 ausgesät und nach 24 Stunden mit 10 μM Compound behandelt. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurde die Zellzahl bestimmt (Abb. 7).

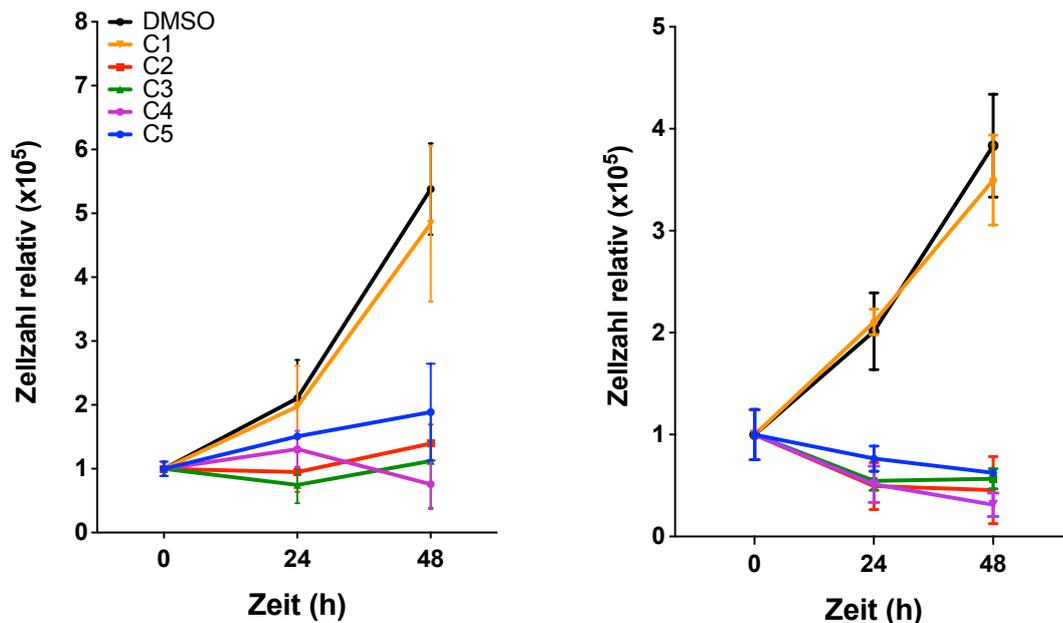


Abbildung 7: Zellproliferation bei Behandlung mit 10 μM Compound für 24h bzw. 48h in PaTu-8988t und BxPC3. Links ist die Proliferation in PaTu-8898t abgebildet, rechts in BxPC3. Jede Kondition wurde dreimal je als Doppelbestimmung durchgeführt, es ist jeweils der Mittelwert der beiden Werte verwendet worden.

Alle Compounds zeigen in beiden Zelllinien einen negativen Effekt auf die Proliferation. Dieser ist in BxPC3 ausgeprägter als in PaTu-8988t, die Zellzahl sinkt unter den Wert zu Beginn t_0 des Experiments. In PaTu-8988t stagniert bei Behandlung mit C2- C5 die Zellzahl über 48 Stunden oder steigt leicht. Compound C1 hatte in beiden Zelllinien keinen eindeutigen Effekt auf die

Proliferation der Zellen. Compound C2-5 zeigten mit BI-D1870 vergleichbar starke Effekte auf die Proliferation.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Compounds C2-C5 und BI-D1870 einen negativen Effekt auf die Proliferation beider Zelllinien haben.

4.1.2 Zellviabilität mit Compound C1-5 und BI-D1870

Mithilfe von Zellviabilitätsassays lässt sich die Zelllebensfähigkeit (Viabilität) nach einer Behandlung messen. Die gemessene Viabilität bildet hierbei die Zahl der viablen, metabolisch aktiven Zellen ab (Crouch et al., 1993).

Um die Auswirkungen der Compounds auf die Zellviabilität zu bestimmen, wurde der ATP-Gehalt der Zellen nach 48 Stunden Behandlung mit 1 und 10 μM Compound gemessen (Abb. 8).

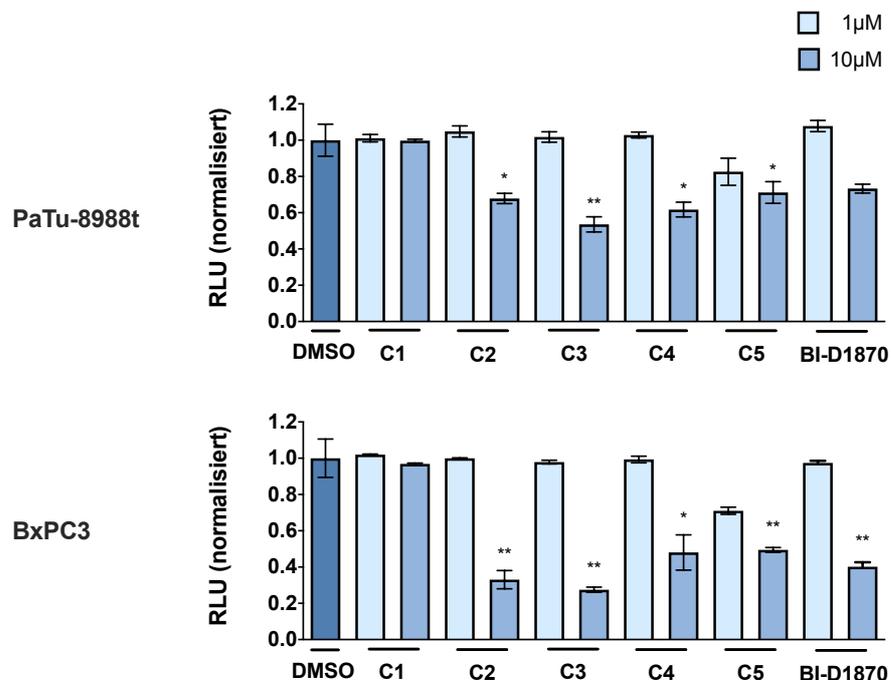


Abbildung 8: Viability-Messung nach 48h mit Compounds bzw. BI-D1870 in 1 und 10 μM Konzentration. Zellen der respektiven Zelllinie wurden ausgesät und nach 24h behandelt. Nach weiteren 48h wurde der ATP-Gehalt der Zellen mittels ATP-Assay bestimmt. Die gemessene Lumineszenz ist in RLU (relative Lichteinheit) angegeben und auf die Kontrolle normalisiert. Die angegebenen Signifikanzen wurden gegen die Kontrolle berechnet.

Bis auf Compound C5 zeigen die Compounds in 1 μM keine Effekte auf die Viabilität. C5 wirkt auch in 1 μM auf die Viabilität, dieser Effekt ist jedoch nicht statistisch signifikant.

In 10 μM verringern die Compounds C2-5 die Viabilität. Hierbei verringert Compound C3 die Viabilität am stärksten. Compound C1 zeigt auch in 10 μM keine Effekte.

Die Compounds C2-C5 erniedrigen in 10 μM die Viabilität um etwa 50 % im Vergleich zur Kontrolle. Aus diesem Grund wurden die Compounds für alle weiteren Experimente in 10 μM verwendet. Da die Compounds im Compound-Screen ebenfalls in 10 μM verwendet worden sind, ist zudem eine Vergleichbarkeit der Daten gegeben.

4.1.3 Zellzyklusanalysen

RSK3 ist unter anderem in der Zellzyklusregulation beteiligt (Palmer et al., 1998). Um Effekte einer möglichen RSK3-Inhibition durch die Compounds zu untersuchen, wurden Zellzyklusanalysen in der Durchflusszytometrie durchgeführt. Zu beachten ist hierbei, dass in Pankreaskarzinomzellen der G1-Checkpoint aufgrund der vorliegenden P53-Mutationen funktionell in der Regel keine Rolle mehr spielt (Kojima et al., 2018). Somit würde sich eine Zellzyklusbeeinträchtigung in einer G2-Akkumulation darstellen.

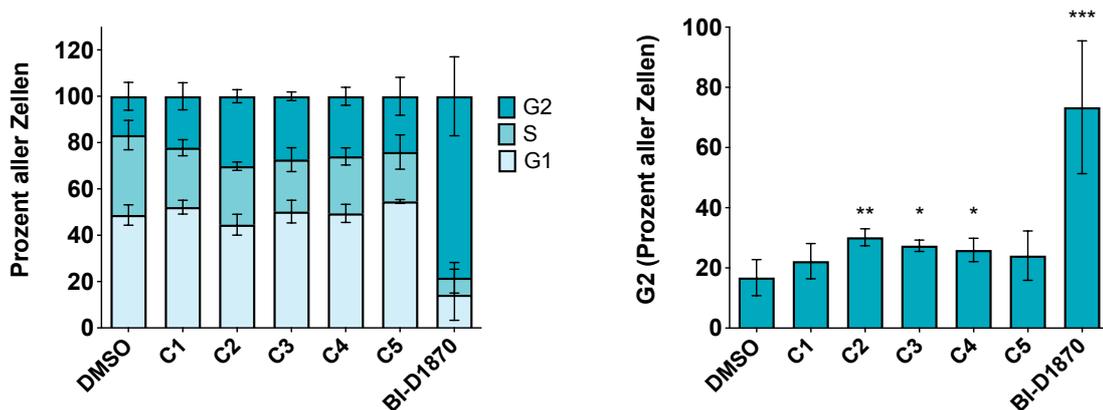


Abbildung 9: Zellzyklusanalyse von PaTu-8988t nach Behandlung mit 10 μM Compound bzw. BI-D1870 für 24h. Die Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden mit 10 μM Compound behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Messung in der Durchflusszytometrie durchgeführt. In der rechten Graphik ist zur Übersicht ausschließlich die G2-Fraktion aus dem linken Graphen abgebildet. Die angegebenen Signifikanzen wurden gegen die Kontrolle berechnet.

Die Zellen wurden zunächst für 24 Stunden mit 10 μM Compound behandelt, und anschließend mit Propidiumiodid inkubiert (Abb. 9).

In PaTu-8988t bewirkten alle Compounds eine Erhöhung der G2-Fraktion, die jedoch bei C1 und C5 nicht signifikant ist. Hierbei hat Compound C2 von den fünf Compounds die größten Effekte auf die G2-Fraktion. Eine Behandlung der Zellen mit BI-D1870 bewirkte die stärkste G2-Erhöhung der Zellen von 17 % auf 78 %.

In BxPC3 wurde analog zu PaTu-8988t ebenfalls der Zellzyklus untersucht (Abb. 10).

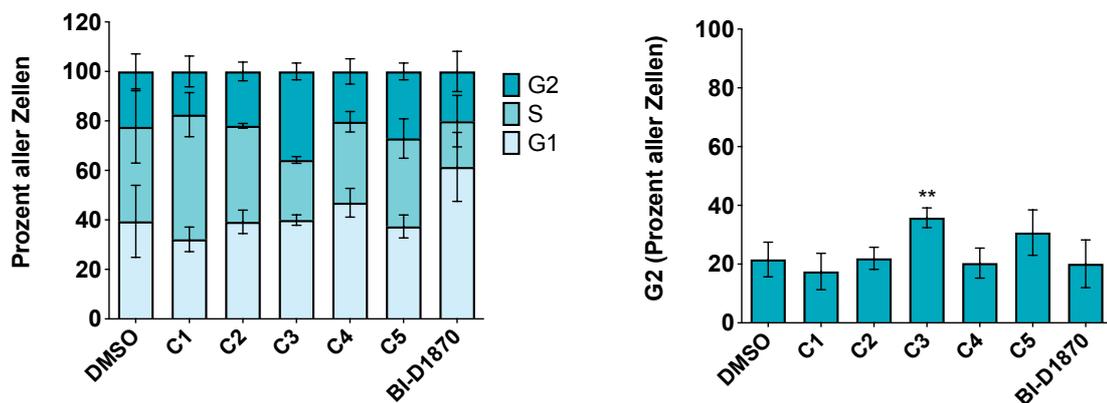


Abbildung 10: Zellzyklusanalyse von BxPC3 nach Behandlung mit 10µM Compound bzw. BI-D1870 für 24h. Die Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden mit 10 µM Compound behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Messung in der Durchflusszytometrie durchgeführt. In der rechten Graphik ist zur Übersicht ausschließlich die G2-Fraktion abgebildet. Alle Signifikanzen sind gekennzeichnet. Die Signifikanz wurde gegen die Kontrolle berechnet.

In BxPC3 zeigt sich bei Compound C3 und C5 eine leichte nur zum Teil signifikante G2-Erhöhung. Anders als in PaTu-8988t erhöht sich bei Compound C2 die G2-Fraktion nicht. Somit unterscheiden sich die Effekte der Compounds und von BI-D1870 zwischen den Zelllinien deutlich. So bleibt die G2-Akkumulation in PaTu-8988t durch BI-D1870 in BxPC3 aus; ebenfalls erhöhen in BxPC3 nur die Compounds C3 und C5 die G2-Fraktion.

4.1.4 Auswirkungen auf Apoptose

Aus der Zellzählung und den Viabilitätsmessungen hat sich eine verminderte Zellzahl nach Behandlung mit den Compounds C2-5 und BI-D1870 ergeben (vgl. Abbildung 5 und 6 S. 30f). Aus den Daten lassen sich jedoch keine Rückschlüsse ziehen, ob die Zellzahl durch langsamere Proliferation oder verstärkte Apoptose verringert ist. Um die Apoptose zu untersuchen, wurde die PARP-Spaltung als Apoptosemarker herangezogen.

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, wird unter anderem durch die Effektorcaspasen ausgeführt. PARP-Proteine (Poly-ADP-ribose-Polymerase) sind eine Gruppe von Enzymen, die durch die Effektorcaspasen gespalten werden (Nicholson et al., 1995). Hierbei wird das 116 kDa große PARP-1 in zwei 89 kDa und 24 kDa große Spaltprodukte gespalten (Lazebnik et al., 1994). Gespaltenes PARP-1 im Western Blot dient somit als Apoptoseindikator (Kaufmann et al., 1993). Um gespaltenes PARP-1 im Western Blot darzustellen, wurden die Zellen für 24 Stunden mit 10 µM Compound behandelt und das Protein im Western Blot dargestellt (Abb. 11).

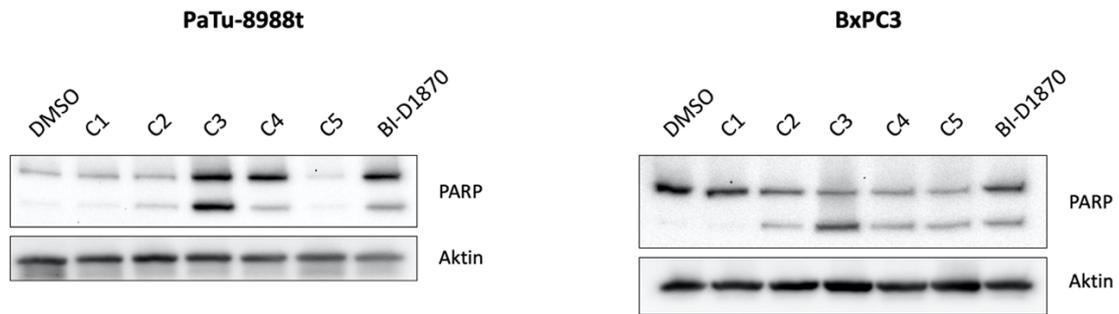


Abbildung 11: PARP-Spaltung im Western Blot nach Behandlung mit 10 μ M Compound bzw. BI-D1870 für 24 Stunden. Die Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden mit 10 μ M Compound behandelt. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Proteinernte. Das Protein wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot dargestellt. Der verwendete PARP-1 Antikörper detektiert spezifisch die Banden bei 116 und 89 kDa. Die obere Bande stellt das nicht-gespaltene PARP dar, die untere Bande eines der beiden Spaltprodukte von PARP. Aktin dient als Ladekontrolle.

Im Western Blot ist die PARP-Spaltung bei den Compounds C2-4 in beiden Zelllinien erhöht, hierbei haben Compound C3 und BI-D1870 den stärksten Effekt. Compound C5 zeigt nur in BxPC3 eine erhöhte PARP-Spaltung. Zudem ist in PaTu-8988t bei C3, C4 und BI-D1870 das PARP überexprimiert.

Bei durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen wie in Kapitel 4.1.3 (S. 33f) lässt sich zusätzlich zu den Zellzyklusphasen die Sub-G1-Fraktion analysieren. Eine erhöhte Sub-G1-Fraktion ist ebenfalls ein Apoptoseindikator (Nicoletti et al., 1991). Aus diesem Grund wurde die Sub-G1 aus den Zellzyklusanalysen bestimmt (Abb. 12).

In PaTu-8988t ist die Sub-G1-Fraktion bei Compound C3 und BI-D1870 am höchsten. Diese Ergebnisse decken sich mit der erhöhten PARP-Spaltung bei denselben Compounds.

In BxPC3 ist die Sub-G1-Fraktion insbesondere bei Compound C2, C4 und BI-D1870 erhöht. Dies deckt sich nur zum Teil mit der PARP-Spaltung; hier war die PARP-Spaltung bei C3 und BI-D1870 erhöht.

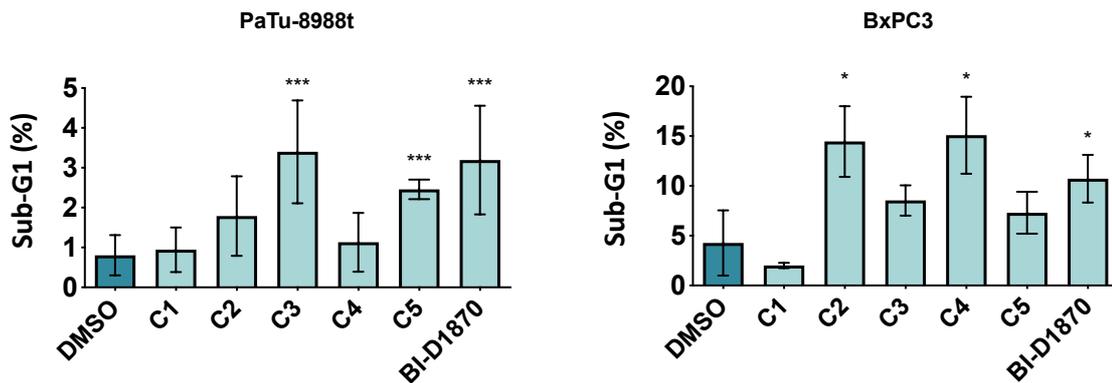


Abbildung 12: Sub-G1-Fraktion in Prozent aus den Daten der Zellzyklusanalyse (vgl. Abb. 9 und 10) in PaTu-8988t und BxPC3. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 10 μ M Compound bzw. BI-D1870 behandelt. Anschließend erfolgte die Zellzyklusanalyse. Die Signifikanzen wurden im Vergleich zur Kontrolle berechnet.

4.2 Molekulare Charakterisierung potenzieller RSK3-Inhibitoren

4.2.1 Effekte im Western Blot in PaTu-8988t

Um zu untersuchen, inwiefern RSK3 durch die Compounds und BI-D1870 inhibiert wird, sind Untersuchungen auf molekularer Ebene sehr relevant. Hierzu eignet sich als Methode der Western Blot. Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, hat RSK verschiedene Phosphorylierungsstellen, die für die Enzymaktivität relevant sind, wie exemplarisch an RSK1 gezeigt wurde (Dalby et al., 1998). Um die RSK3-Aktivität zu analysieren, wurden davon zwei Stellen untersucht: Threonin 356/Serin 360 sowie Serin 218. Eine verminderte Phosphorylierung an einer dieser Phosphorylierungsstellen im Western Blot lässt somit auf eine verminderte Aktivität von RSK3 schließen.

Aus einer nicht beeinträchtigten Phosphorylierung lässt sich jedoch nicht schließen, dass das Enzym auf normalem Niveau aktiv ist. Auch phosphorylierte Enzyme können inaktiv sein, etwa indem ein Stoff die Substrattasche des Enzyms direkt blockiert. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die Phosphorylierung von den RSK3-Substraten LKB1, RPS6 und PFPFB2 dargestellt. Zusätzlich lässt sich durch die Betrachtung von RSK-Substraten bestätigen, dass eine möglicherweise verringerte RSK-Phosphorylierung die Enzymaktivität auch funktionell beeinträchtigt. Die Western Blots wurden mittels ImageJ quantifiziert, um eine objektive Beurteilung der Phosphorylierung zu erleichtern (siehe Kapitel 3.7.4 S. 22). Der Quotient von

Phospho-Protein zu Gesamtprotein wurde, nach Normalisierung auf die DMSO-Kontrolle und unter Berücksichtigung der Ladekontrolle, als Dezimalzahl unter die Banden gestellt.

Um auszuschließen, dass eine mögliche verminderte Phosphorylierung von RSK3 auf eine Beeinträchtigung der Aktivität von Enzymen *upstream* von RSK zurückzuführen sind, wird zusätzlich die Phosphorylierung von ERK untersucht. ERK ist das letzte Enzym, das im MEK-EERK-Signalweg vor RSK3 liegt, und aktiviert RSK3 direkt (Sutherland et al., 1993).

Da sich die molekularen Effekte im Western Blot zwischen den untersuchten Zelllinien PaTu-8988t und BxPC3 unterscheiden, wurden die Ergebnisse nach Zelllinie getrennt in zwei verschiedenen Unterkapiteln dargestellt. Die in einer Abbildung dargestellten Western-Blot-Ergebnisse stammen von einem Western Blot, der mit dem Protein einer einzigen Proteinernte durchgeführt worden ist, und sind damit in sich vergleichbar.

Um mögliche direkte oder indirekte Einflüsse anderer Signalwege auf die RSK-Signaltransduktion zu unterdrücken, wurden die Zellen in serumfreiem Medium behandelt und vor der Proteinernte für eine halbe Stunde mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-Acetat) stimuliert. Die PMA-Stimulation für eine Untersuchung der RSK-Aktivität ist bereits in der Literatur beschrieben (Roux et al., 2007). Die synthetische Substanz PMA aktiviert gezielt die Proteinkinase C, wodurch dann über einen *Crosstalk* zum MEK-ERK-Signalweg RSK aktiviert wird (Castagna et al., 1982; Schönwasser et al., 1998). Andere aktivierende Einflüsse auf RSK können in der Zellkultur unterdrückt werden, indem die Zellen in serumfreiem Medium kultiviert werden, da im zugesetzten Serum verschiedenste Faktoren enthalten sind, die weitere Signalwege aktivieren können (Klip et al., 1984).

Zunächst wurden PaTu-8988t für 24 Stunden mit 10 μ M Compound behandelt, dann die Zellen stimuliert und das Protein geerntet. Das Protein wurde im Western Blot dargestellt (Abb. 13).

Bei Vergleich der stimulierten zur unstimulierten Kontrolle fällt auf, dass die Phosphorylierung von RSK3, RPS6, PFPFB2 und ERK in der stimulierten Kontrolle verstärkt ist. Somit ist die PMA-Stimulation effektiv gewesen.

In PaTu-8988t zeigten sich nach Zellstimulation bei Behandlung mit C1-4 keine deutlichen negativen Effekte auf die Phosphorylierung von RSK3, RSK3-Substrate oder ERK. Bei C2 und C4 sinkt die Phosphorylierung von RPS6 auf 49 bzw. 46 % der Kontrolle, die Phosphorylierung von RSK3 ist nicht wesentlich reduziert. Bei C5 nahm die Phosphorylierung der RSK-Substrate LKB1 und RPS6 deutlich ab. Die Phosphorylierung von ERK war bei C5 nicht wesentlich vermindert.

Bei Behandlung mit BI-D1870 nahmen die Phosphorylierung von RSK3 insbesondere an der Phosphorylierungsstelle Thr356/Ser360 (4 % der Kontrolle) sowie LKB1 und RPS6 im Vergleich zur stimulierten Kontrolle ab. Die Phosphorylierung von ERK nahm mit 135 % der Kontrolle leicht zu.

Bisher wurden die Effekte der Compounds im Western Blot mit vorheriger Zellstimulation untersucht. Hierbei haben C5 und BI-D1870 Effekte auf die Phosphorylierung von RSK3 und RSK3-Substraten. Um die RSK3-Aktivität im physiologischen Zellmilieu zu untersuchen, wurde das vorherige Experiment ohne eine zusätzliche Stimulation der Zellen durchgeführt. Mit zusätzlicher Zellstimulation würde optimalerweise eine RSK3-Inhibition aufgedeckt werden, indem störende Zelleinflüsse durch Kultivierung in serumfreiem Medium verringert werden.

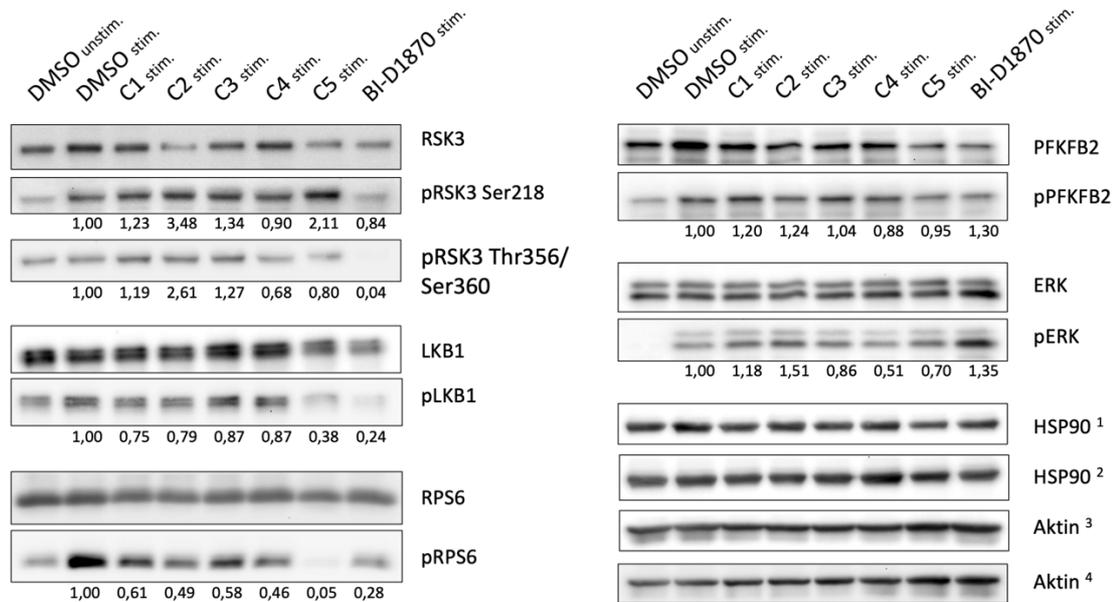


Abbildung 13: Western Blot von PaTu-8988t nach 24 Stunden Behandlung mit 10 μ M Compound mit anschließender Zellstimulation. Die Zellen wurden ausgesät, nach 24 Stunden für weitere 24 Stunden in serumfreiem Medium mit DMSO/Compound/BI-D1870 behandelt und anschließend (bis auf DMSO unstim.) mit PMA stimuliert. Die Ladekontrollen HSP90 bzw. Aktin gehören zu ¹RSK3, ERK, PFKFB2; ²pRSK3 Ser218, pERK, pPFKFB2; ³pRSK3 Thr356/Ser360, LKB1, RPS6 und ⁴pLKB1, pRPS6. Alle gezeigten Blots sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. Unter den Phospho-Banden ist in diesem und den folgenden Western Blots zudem mittels Quantifizierung der Banden der relative phosphorylierte Anteil am Gesamtprotein normiert auf die DMSO-Kontrolle als Dezimalzahl abgebildet.

Es ist jedoch wichtig, die RSK3-Aktivität und RSK-Substrate auch in physiologischen Umständen zu untersuchen, da hieraus Rückschluss gezogen werden kann, ob eine mögliche RSK3-Inhibition in den Pankreaskarzinomzelllinien durch andere Signalwege kompensiert werden kann.

Um die Auswirkungen der Compounds auf molekularer Ebene ohne zusätzliche Zellstimulation darzustellen, wurden die Zellen nach 24 Stunden Behandlung mit 10 μ M Compound geerntet und das Zelllysate im Western Blot analysiert (Abb. 14). In PaTu-8988t zeigten die Compounds C1, C2, C3 und C4 leichte negative Effekte auf die Phosphorylierung von RSK3. Die Phosphorylierung der RSK-Substrate war nicht reduziert.

Compound C5 zeigte eine im Vergleich zur Kontrolle deutlich verminderte Phosphorylierung von RSK3 an den Phosphorylierungsstellen Ser218 und Thr356/Ser360. Außerdem war die absolute Menge an phosphoryliertem LKB1 und RPS6 vermindert, die relative auf die Kontrolle normierte Phosphorylierung der RSK3-Substrate war aufgrund einer verminderten Expression von LKB1 und RPS6 nicht reduziert.

Die Behandlung der Zellen mit BI-D1870 bewirkte eine verminderte Phosphorylierung von RSK3 an Thr356/Ser360. Die Phosphorylierung von LKB1 und RPS6 war verstärkt. Zudem war die Expression und Phosphorylierung von ERK verstärkt.

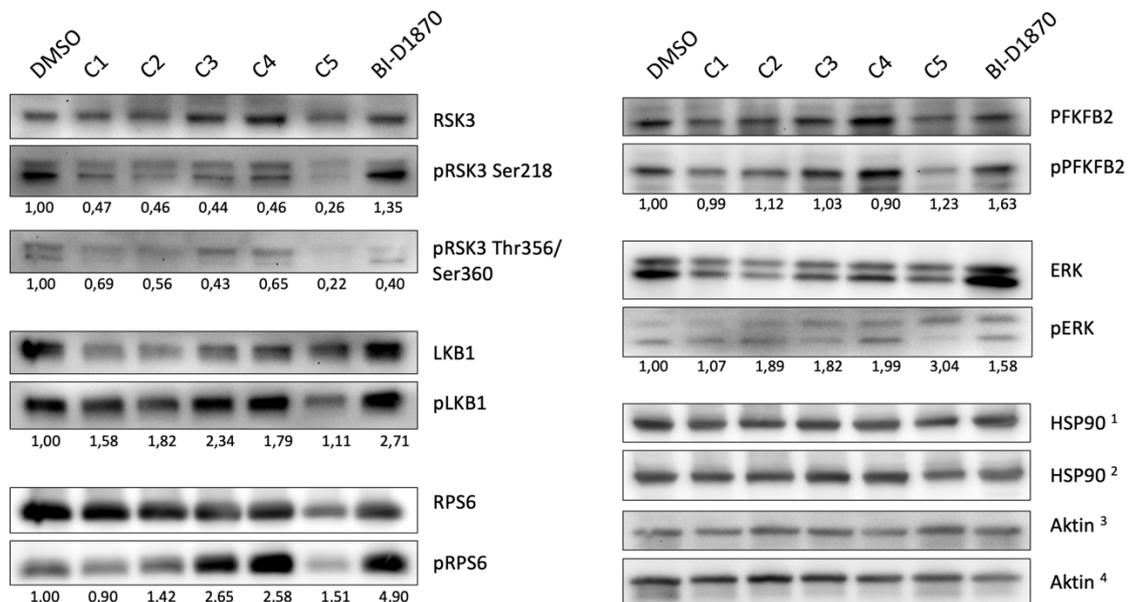


Abbildung 14: Western Blot von PaTu-898t nach 24 Stunden Behandlung mit 10 μ M Compound. Die Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden mit 10 μ M Compound behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Protein aus den Zellen geerntet, und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt sowie im Western Blot dargestellt. Die Ladekontrollen HSP90 bzw. Aktin gehören zu ¹RSK3, ERK, PFKFB2; ²pRSK3 Ser218, pERK, pPFKFB2; ³pRSK3 Thr356/Ser360, LKB1, RPS6 und ⁴pLKB1, pRPS6. Mittels Quantifizierung ist der relative phosphorylierte Anteil am Gesamtprotein normiert auf die DMSO-Kontrolle als Dezimalzahl unter der jeweiligen Bande abgebildet.

4.2.2 Effekte im Western Blot in BxPC3

Auch BxPC3 wurden analog zu PaTu-898t 24 Stunden behandelt, stimuliert, und das Protein im Western Blot aufgetragen (Abb. 15).

Bei Vergleich der stimulierten und unstimulierten Kontrolle zeigte sich in der stimulierten Kontrolle eine stärkere Phosphorylierung von RSK3, RPS6, PFKFB2 und ERK. Dies zeigt, dass die Stimulation der Zellen mit PMA effektiv war.

Nach Zellstimulation zeigten sich bei C1-C4 keine wesentlichen Effekte auf die Phosphorylierung von RSK3 oder den untersuchten RSK-Substraten. Bei Compound C5 war die Phosphorylierung von RSK3 an beiden untersuchten Phosphorylierungsstellen deutlich vermindert. Die Phosphorylierung von RPS6 und PFKFB2 war deutlich vermindert. Die Phosphorylierung von ERK war ebenfalls auf 31% der Kontrolle reduziert.

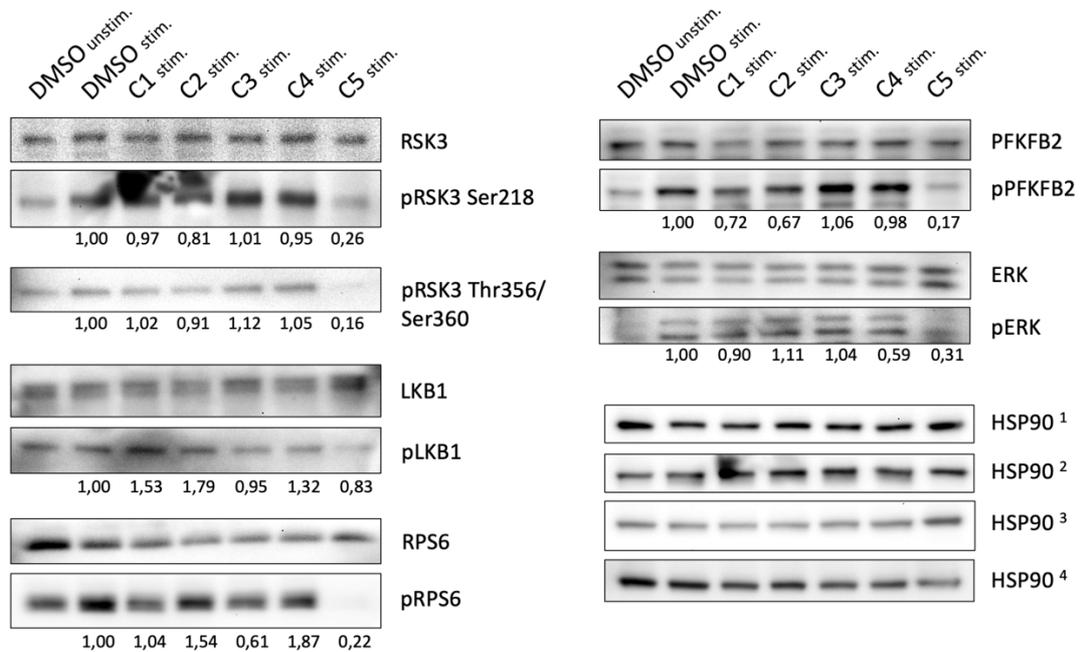


Abbildung 15: Western Blot von BxPC3 nach 24 Stunden Behandlung mit 10 μ M Compound mit anschließender Zellstimulation. Die Zellen wurden ausgesät, nach 24 Stunden für weitere 24 Stunden in serumfreiem Medium mit DMSO/Compound/BI-D1870 behandelt und anschließend (bis auf DMSO unstim.) mit PMA stimuliert. Die Ladekontrolle HSP90 gehört zu ¹RSK3, ERK, PFKFB2; ²pRSK3 Ser218, pERK, pPFKFB2; ³pRSK3 Thr356/Ser360, LKB1, RPS6 und ⁴pLKB1, pRPS6. Die Ergebnisse für BI-D1870 in BxPC3 folgen in der nächsten Abbildung, da diese aus einem anderen Western Blot stammen. Mittels Quantifizierung ist der relative phosphorylierte Anteil am Gesamtprotein normiert auf die stimulierte DMSO-Kontrolle als Dezimalzahl unter der jeweiligen Bande abgebildet.

Vergleichend wurden die Zellen mit BI-D1870 behandelt und das Protein im Western Blot analysiert (Abb. 16). Auch hier zeigte die verstärkte Phosphorylierung der Proteine in der stimulierten im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, dass die Zellstimulation effektiv war. In BxPC3 zeigte sich anders als in PaTu-8988t bei Behandlung mit BI-D1870 im Vergleich zur Kontrolle keine wesentliche Veränderung der Phosphorylierung von RSK3 oder den untersuchten Substraten. Die Reduktion der Phosphorylierung von RSK3 an den beiden untersuchten Phosphorylierungsstellen auf 79 bzw. 77 % der Kontrolle wurde als nicht relevant gewertet.

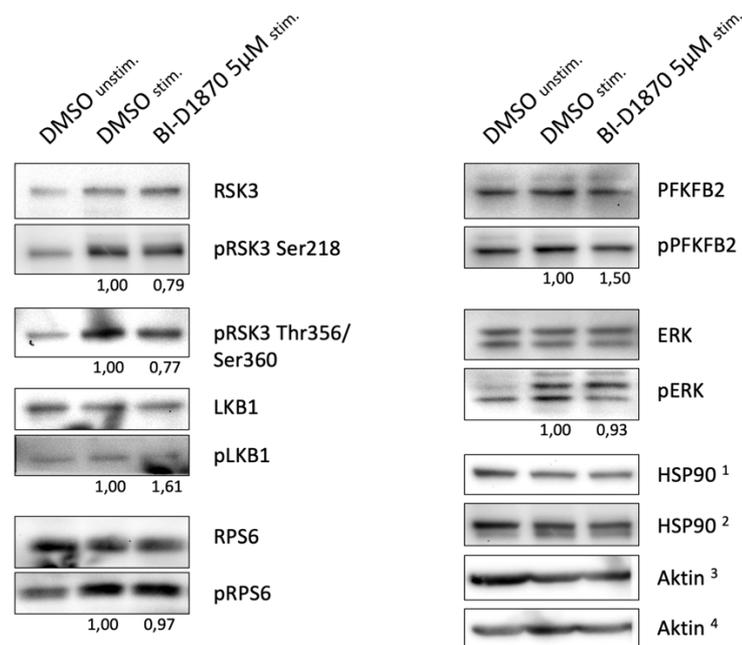


Abbildung 16: Western Blot von BxPC3 nach 24 Stunden Behandlung mit 5 μ M BI-D1870 mit anschließender Zellstimulation. Die Zellen wurden ausgesät, nach 24 Stunden für weitere 24 Stunden in serumfreiem Medium mit DMSO/BI-D1870 behandelt und anschließend (bis auf DMSO unstim.) mit PMA stimuliert. Für die Zellstimulation wurden die Zellen in serumfreiem Medium kultiviert, was Zellstress hervorruft. Eine Behandlung mit 10 μ M BI-D1870 war aufgrund der Zelltoxizität nicht möglich, sodass nur eine Konzentration von 5 μ M BI-D1870 verwendet worden ist. Die Ladekontrollen HSP90 bzw. Aktin gehören zu ¹RSK3, ERK, PFKFB2, RPS6; ²pRSK3 Ser218, pERK, pPFKFB2, pRPS6; ³pRSK3 Thr356/Ser360, LKB1 und ⁴pLKB1. Mittels Quantifizierung ist der relative phosphorylierte Anteil am Gesamtprotein normiert auf die stimulierte DMSO-Kontrolle als Dezimalzahl unter der jeweiligen Bande abgebildet.

In den Western Blots in BxPC3 mit Zellstimulation zeigte C5 als einziges Compound eine reduzierte Phosphorylierung von RSK3 und RSK3-Substraten. Der durchgeführte Western Blot wurde analog zu PaTu-8988t ebenfalls ohne Zellstimulation durchgeführt. Zellen der Zelllinie BxPC3 wurden für 24 Stunden mit 10 μ M Compound behandelt, geerntet und das Proteinlysate im Western Blot aufgetragen (Abb. 17).

In BxPC3 zeigten die Compounds C1-C4 keine negativen Effekte auf die Phosphorylierung von RSK3, bei einigen Compounds stieg die Phosphorylierung von RSK3. Bei Compound C2 und C3 war pLKB1 deutlich vermindert. Bei C4 war die Phosphorylierung von LKB1 und PFKFB2 vermindert.

Die Expression von RSK3 war bei C5 stark verringert, dementsprechend war das phosphorylierte RSK3 an Ser218 und Thr356/Ser280 im Vergleich zur Kontrolle deutlich geringer. Bei C5 war die Phosphorylierung der RSK3-Substrate LKB1, RPS6 und PFKFB2 deutlich vermindert.

Der Inhibitor BI-D1870 hatte in BxPC3 keine relevanten Effekte auf die Phosphorylierung von RSK3. Die Phosphorylierung von LKB1 und PFKFB2 war vermindert.

Im Western Blot zeigt somit C5 in beiden Zelllinien eine verminderte Phosphorylierung von RSK3 und RSK3-Substraten. Die Phosphorylierung von ERK wird von C5 insgesamt nicht wesentlich beeinträchtigt. Die errechnete relative Quantifizierung von Phospho-RSK3 an beiden Phosphorylierungsstellen liegt rein rechnerisch bei dem 202- bzw. 205-Fachen der Kontrolle; diese hohen Zahlen kommen zustande durch die sehr niedrige Expression von RSK3 und Phospho-RSK3, sodass diese Werte nicht berücksichtigt werden sollten. Zur Vollständigkeit wurden sie dennoch aufgeführt. BI-D1870 hingegen zeigt in PaTu-8988t eindeutige Effekte auf RSK3 oder RSK-Substrate, nicht jedoch in BxPC3.

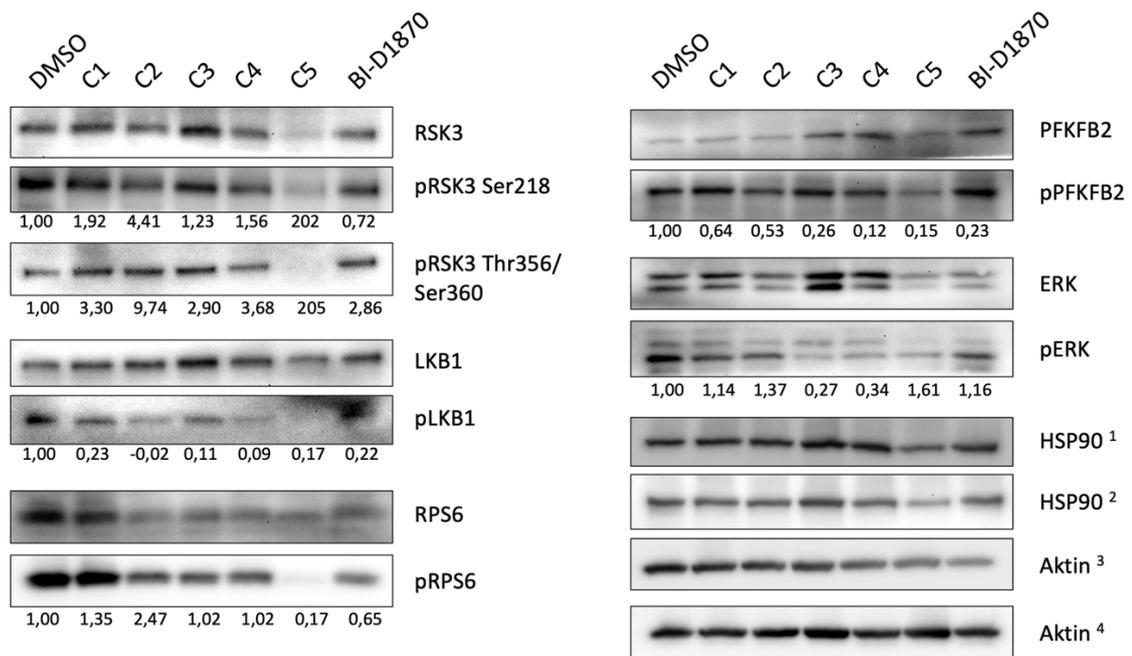


Abbildung 17: Western Blot von BxPC3 nach 24 Stunden Behandlung mit 10 μ M Compound. Die Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden mit 10 μ M Compound behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Protein aus den Zellen geerntet, und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt sowie im Western Blot dargestellt. Die Ladekontrollen HSP90 bzw. Aktin gehören zu ¹RSK3, ERK, PFKFB2; ²pRSK3 Ser218, pERK, pPFKFB2; ³pRSK3 Thr356/Ser360, LKB1, RPS6 und ⁴pLKB1, pRPS6. Mittels Quantifizierung ist der relative phosphorylierte Anteil am Gesamtprotein normiert auf die DMSO-Kontrolle als Dezimalzahl unter der jeweiligen Bande abgebildet.

4.3 Weitere Untersuchung von Compound C5

4.3.1 Auswirkungen von C5 auf Apoptose im Annexin-V-Staining

Compound C5 zeigte als einziges der untersuchten Compounds eine verminderte Phosphorylierung von RSK3 und RSK-Substraten im Western Blot in beiden Zelllinien. Aus diesem Grund wurden die Compounds C1-C4 verworfen, da davon ausgegangen werden muss, dass diese Compounds RSK3 im Zellkulturkontext nicht inhibieren. Für eine detailliertere Untersuchung von C5 wurden verschiedene in diesem Kapitel dargestellte Experimente durchgeführt.

Für die Analyse der Auswirkungen auf Apoptose wurde die PARP-Spaltung sowie die Sub-G1-Fraktion herangezogen. Hierbei handelt es sich jedoch lediglich um Apoptoseindikatoren. Für eine direkte Messung der apoptotischen Zellen bietet sich die durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen nach Annexin-V-Markierung an (Vermes et al., 1995).

Bei der Annexin-V-Markierung werden die Zellen mit Annexin V zur Markierung apoptotischer Zellen, sowie mit Propidiumiodid zur Markierung nekrotischer Zellen gefärbt. Anschließend werden die markierten Zellen in der Durchflusszytometrie gemessen (Vermes et al., 1995).

Vor der Messung wurden die Zellen zunächst für 24 Stunden mit Compound oder BI-D1870 behandelt.

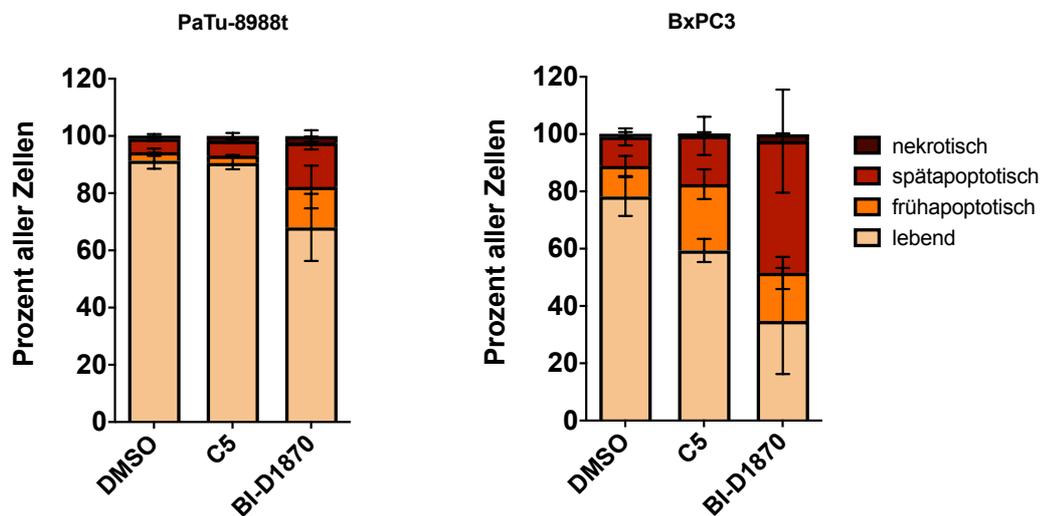


Abbildung 18: Messung der apoptotischen Zellen mittels Annexin V in PaTu-8988t und BxPC3 nach 24 Stunden Behandlung. Die Zellen wurden mit 10 μ M C5 oder 10 μ M BI-D1870 behandelt, nach 24 Stunden erfolgte die durchflusszytometrische Messung.

BI-D1870 verstärkte in beiden Zelllinien die Apoptose, dies ist in BxPC3 ausgeprägter (Abb. 18 S. 43). Im PARP-Blot (Abb. 11 S. 35) war bei BI-D1870 in beiden Zelllinien eine verstärkte PARP-Spaltung zu sehen; die Annexin-V-Messung deckt sich damit mit dem Blot.

Compound C5 zeigte nur in BxPC3 eine Zunahme der Apoptose. In PaTu-8988t zeigten sich keine Effekte.

Somit erhöht BI-1870 in beiden Zelllinien die Apoptose, Compound C5 jedoch nur in BxCP3.

4.3.2 Phänotypische Effekte von Compound C5 in geringeren Konzentrationen

Bei *in vivo* verwendeten Inhibitoren wird die Wirksamkeit eines Inhibitors an der minimalen wirksamen Konzentration gemessen. Bei C5 stellt sich die Frage, ab welcher Konzentration das Compound innerhalb eines zellulären Systems Effekte auf den zellulären Phänotyp hat. Bisher wurde C5 nur in einer Konzentration von 10 μ M verwendet; diese Konzentration ist in *in-vivo*-Experimenten nur schwer erreichbar, weswegen eine geringere wirksame Konzentration angestrebt wird. In der Viabilitätsmessung (Abb. 8 S. 32) ist die Viabilität der Zellen ab einer Konzentration von 1 μ M vermindert, was eine Wirksamkeit von C5 in geringeren Konzentrationen impliziert.

Um zu untersuchen, ab welcher Konzentration C5 phänotypische Effekte auf RSK3 hat, wurden PaTu-8988t mit C5 in den Konzentrationen 10; 5; 1; 0,1 sowie 0,01 μ M behandelt und die Zellviabilität gemessen (Abb. 19).

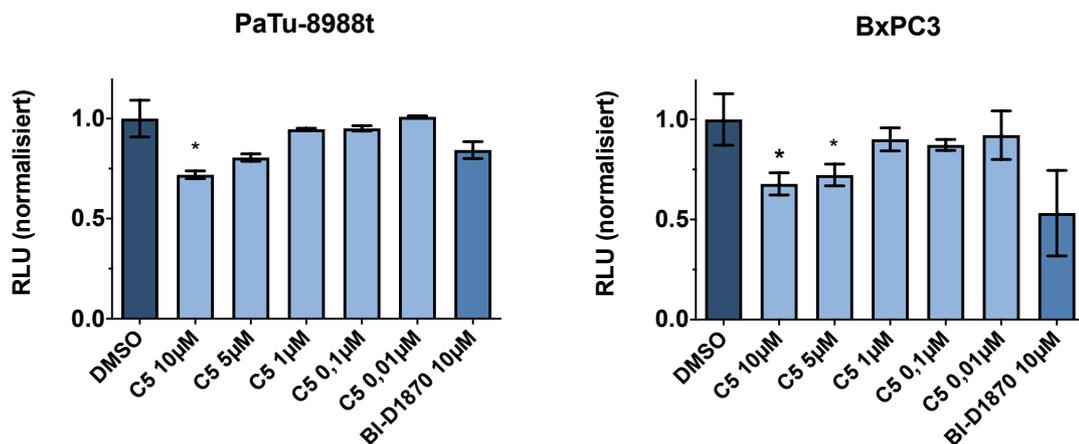


Abbildung 19: Viability-Assay in PaTu-8988t und BxPC3 nach 24 Stunden Behandlung mit C5 bzw. BI-D1870. Die Zellen wurden für 24 Stunden μ M behandelt und die Viabilität gemessen. Die abgebildeten Signifikanzen wurden gegen die DMSO-Kontrolle gemessen.

In PaTu-8988t zeigte Compound C5 eine konzentrationsabhängige Verringerung der Viabilität, die jedoch aufgrund der großen Standardabweichung der Kontrolle erst ab 10 μ M statistisch

signifikant ist. In der Viabilitätsmessung nach 48 Stunden hatten sich stärkere Effekte von C5 in beiden Zelllinien gezeigt (vgl. Abb. 8 S. 32).

In BxPC3 zeigte sich ebenfalls ein konzentrationsabhängiger Effekt von C5 auf die Zellviabilität. Signifikanz zeigt sich ab einer Konzentration von 5 μM .

4.3.3 Synergismus zwischen EGFR-Inhibition und Compound C5

RSK3 wurde ursprünglich in einem Synthetic-lethality-Screen als potenziell synthetisch letales Ziel in Kombination mit dem EGFR-Inhibitor Erlotinib identifiziert (Milosevic et al., 2013). Der Hintergrund hierbei war, dass sich mit einer Kombination aus zwei Therapeutika aufgrund eines ergänzenden Effekts in der Krebstherapie bessere Ergebnisse erzielen lassen (DeVita et al., 1975). Das Ziel des Screens war, im Pankreaskarzinom ein Zielmolekül zu finden, dessen Hemmung einen synergistischen Effekt in Kombination mit einer EGFR-Inhibition hat. Ein Synergismus zwischen zwei Substanzen liegt vor, wenn der Gesamteffekt der beiden Substanzen zusammen größer ist als die Summe der Einzeleffekte (National Cancer Institute, o. J.). Milosevic et al. konnte in der Validierung des Synthetic-lethality-Screens einen Synergismus zwischen dem *Knockdown* von RSK3 und einer EGFR-Inhibition mittels Erlotinib zeigen (Milosevic et al., 2013).

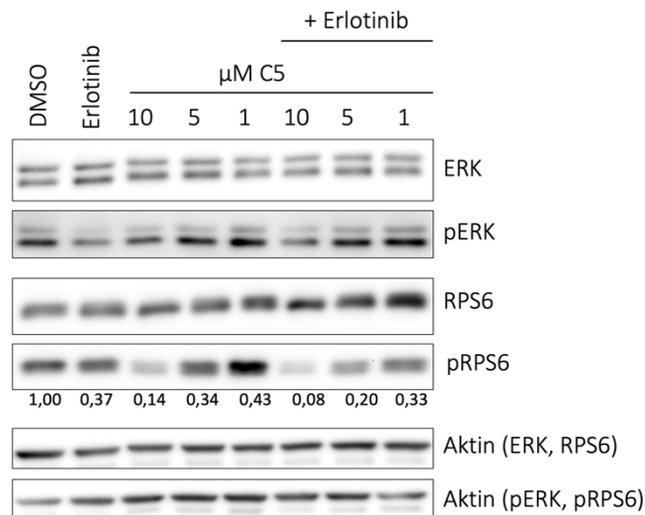


Abbildung 20: Western Blot in PaTu-8988t nach 6 Stunden Behandlung mit Compound C5 (in den Konzentrationen 10, 5 und 1 μM) sowie Erlotinib (in der Konzentration 10 μM). Dargestellt sind ERK und RPS6 sowie jeweils die phosphorylierte Form. Aktin dient als Ladekontrolle. Mittels Quantifizierung ist der relative phosphorylierte Anteil am Gesamtprotein normiert auf die DMSO-Kontrolle als Dezimalzahl unter der jeweiligen Bande abgebildet.

Um zu überprüfen, ob sich ein Synergismus von Erlotinib und C5 auf molekularer Ebene zeigt, wurden PaTu-8988t mit verschiedenen Konzentrationen von C5, mit Erlotinib oder einer Kombination aus beiden Substanzen behandelt und das Protein im Western Blot dargestellt (Abb. 20 S. 45). Hierbei wurde die Phosphorylierung von RPS6 betrachtet, da sich bei phosphoryliertem RSP6 die molekularen Effekte von C5 am stärksten gezeigt haben (vgl. Abb. 13 S. 38). Zudem wurde Phospho-ERK untersucht, um mögliche Effekte der EGFR-Inhibition durch Erlotinib auf den MEK-ERK-Signalweg darzustellen. Der EGFR-Inhibitor Erlotinib verminderte leicht die Phosphorylierung von ERK. Bei Behandlung mit C5 war die Phosphorylierung von RPS6 in allen verwendeten Konzentrationen deutlich vermindert. Dieser Effekt stieg mit zunehmender Konzentration von C5.

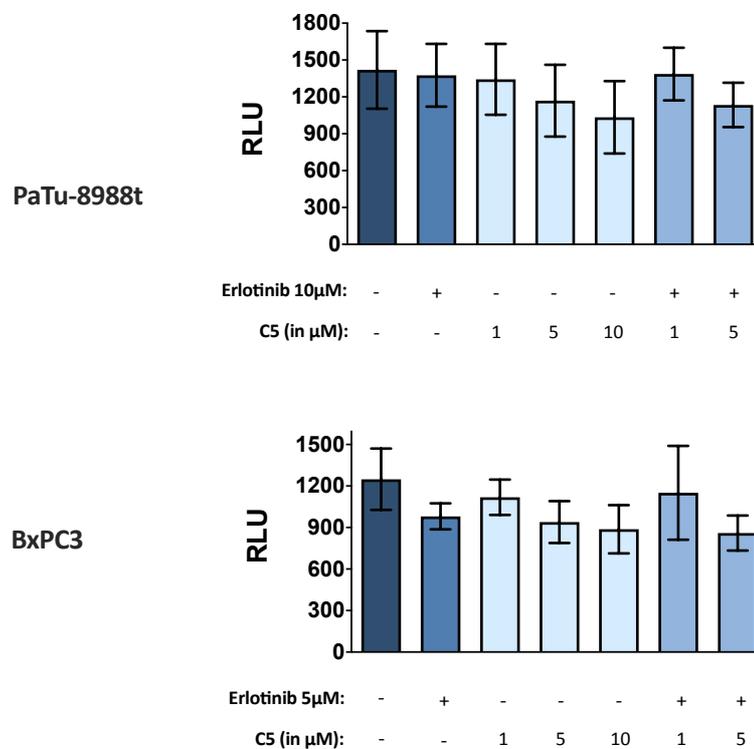


Abbildung 21: Viability-Assay in PaTu-8988t und BxPC3 nach 24 Stunden Behandlung mit C5 und/oder Erlotinib. Die Behandlung mit Erlotinib oder C5 ist schematisch dargestellt. Das Plus steht für eine Behandlung mit Erlot., das Minus steht für keine Behandlung mit dem jeweiligen Stoff. Es wurde der biologische Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten sowie die Standardabweichung angegeben. Erlotinib wurde in BxPC3 in 5 μ M verwendet, da die Viabilität bei 10 μ M zu stark sank. Mögliche synergistische Effekte wären bei 10 μ M Erlotinib deswegen möglicherweise nicht mehr zu sehen.

Die verminderte Phosphorylierung von RPS6 durch C5 wurde bei zusätzlicher Behandlung mit Erlotinib noch geringer. Compound C5 und die EGFR-Inhibition zeigten somit einen additiven negativen Effekt auf die Phosphorylierung von RPS6. Da der Gesamteffekt bei kombinierter

Behandlung mit C5 und Erlotinib jedoch nicht größer war als die Summe der Einzeleffekte, konnte hier kein Synergismus dargestellt werden (Abb. 20 S. 45).

Um zu überprüfen, ob sich ein möglicher Synergismus im Phänotyp zeigt, wurden zusätzlich die Auswirkungen von C5 und Erlotinib auf die Zellviabilität nach 24 Stunden gemessen (Abb. 21 S. 46).

Erlotinib wurde in BxPC3 in 5 μM verwendet, da die Viabilität bei 10 μM zu stark sank. Mögliche synergistische Effekte wären bei 10 μM Erlotinib deswegen möglicherweise nicht mehr zu sehen gewesen. Die Gabe von C5 und Erlotinib verringerte im Vergleich zur Behandlung nur mit C5 nicht die Zellviabilität. In beiden Zelllinien zeigte sich somit kein synergistischer Effekt zwischen C5 und Erlotinib auf die Zellviabilität nach 24 Stunden.

Aus nicht dargestellten Versuchsansätzen mit anderen Compounds aus dem Compound-Screen konnte gezeigt werden, dass mögliche synergistische Effekte mit Erlotinib bei Kultivierung der Zellen in Medium mit 1 % FCS verstärkt sind. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind nicht publiziert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Zellviabilität bei Kultivierung in Medium mit 1 % FCS gemessen. Die Messung erfolgte nach 48 Stunden, um auch mögliche längerfristige Effekte zu erfassen (Abb. 22).

Nach 48 Stunden zeigte sich in den angewendeten Konditionen in beiden Zelllinien ein leichter statistisch signifikanter additiver Effekt mit Erlotinib, jedoch kein Synergismus.

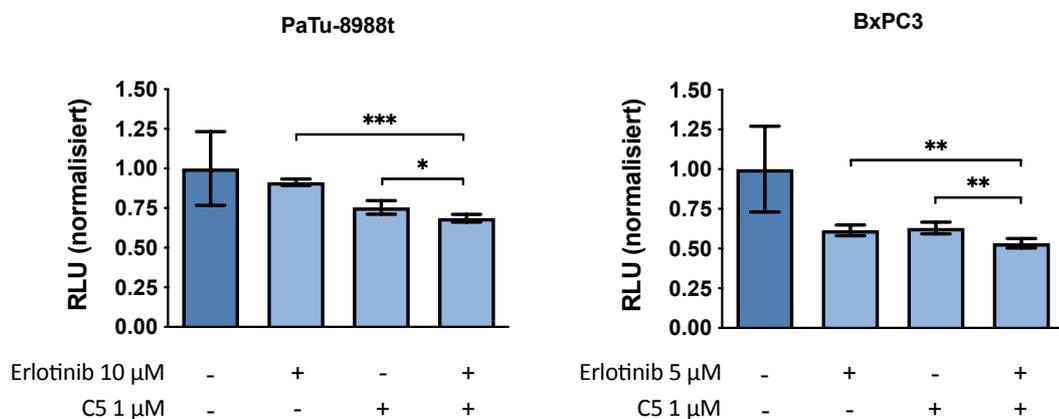


Abbildung 22: Viability-Assay in PaTu-8988t und BxPC3 nach 48 Stunden Behandlung mit C5 und/oder Erlotinib in Medium mit 1 % FCS. Die Behandlung ist schematisch dargestellt: das Plus steht für die Behandlung mit der jeweiligen Substanz, das Minus steht für keine Behandlung. Es wurde der biologische Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten sowie die Standardabweichung angegeben. Signifikanzen wurden mittels einseitigem t-Test berechnet.

4.3.4 Untersuchung der verminderten RSK3-Expression nach Behandlung mit C5 in BxPC3

In vorherigen Experimenten (vgl. Abb. 17 S. 42) zeigte sich, dass in BxPC3 bei Behandlung mit C5 RSK3 vermindert exprimiert wird. In PaTu-8988t zeigte sich dieser Effekt nicht (vgl. Abb. 14 S. 39).

Um zu prüfen, ob die verminderte RSK3-Expression auch bei geringeren Konzentrationen von C5 auftritt, wurden BxPC3 mit verschiedenen Konzentrationen von C5 (10; 5; 1; 0,1; 0,01 μM) behandelt und das Protein im Western Blot dargestellt (Abb. 23).

Es zeigte sich, dass bei Behandlung mit 10, 5 und 1 μM C5 die Expression von RSK3 im Vergleich zur Kontrolle deutlich geringer war. Dementsprechend war auch weniger Phospho-RSK3 vorhanden. Zudem war Phospho-RSK3 auch bei den Konzentrationen 0,1 μM und 0,01 μM C5 im Vergleich zur Kontrolle noch vermindert.

Für die weitere Untersuchung der verminderten RSK3-Expression wurde die Hypothese aufgestellt, dass C5 in BxPC3 den proteasomalen Abbau von RSK3 induziert. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde in BxPC3 das Proteasom mithilfe des Proteasominhibitors MG132 inhibiert und die Expression von RSK3 im Western Blot betrachtet.

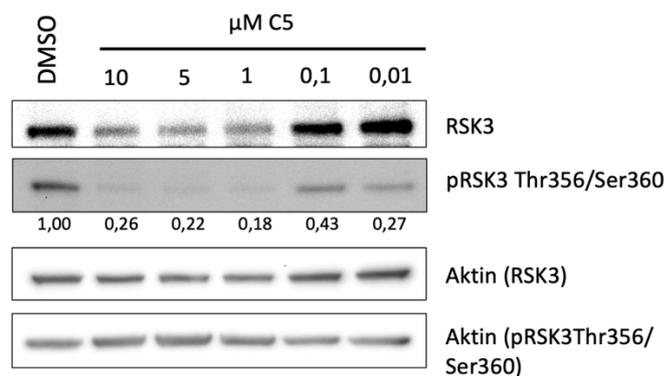


Abbildung 23: Western Blot von BxPC3 nach 24 Stunden Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Compound C5. Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden mit C5 in verschiedenen Konzentrationen von 10 μM bis 0,01 μM behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Protein geerntet und im Western Blot dargestellt. Aktin dient als Ladekontrolle. Mittels Quantifizierung ist der relative phosphorylierte Anteil am Gesamtprotein normiert auf die DMSO-Kontrolle als Dezimalzahl unter der jeweiligen Bande abgebildet.

Zunächst wurden BxPC3 mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 und/oder mit C5 für 16 Stunden behandelt und das Protein im Western Blot dargestellt (Abb. 24).

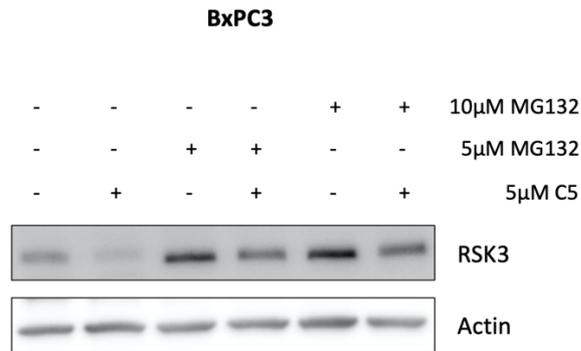


Abbildung 24: Western Blot von BxPC3 nach Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 und/oder C5. Die Zellen wurden für 16 Stunden mit 5 µM C5 und/ oder 5 bzw. 10 µM MG132 behandelt. Um unspezifische Effekte durch eine zu hohe Zellschädigung zu vermeiden, wurden die Zellen mit 5 µM C5 statt 10 µM C5 behandelt und das Protein bereits nach 16 Stunden geerntet. Da für die Behandlung von BxPC3 mit MG132 verschiedene Konzentrationen von MG132 publiziert sind, wurde MG132 in 5 und 10 µM verwendet (Arlt et al., 2003; Le Clorennec et al., 2016). Anschließend erfolgte die Darstellung des Proteins im Western Blot.

Es zeigt sich bei der reinen Behandlung der Zellen mit dem Proteasominhibitor eine erhöhte Expression von RSK3 im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Spur 1 mit Spur 3/ Spur 5). Dies legt den Schuss nahe, dass RSK3 in BxPC3 laufend proteasomal abgebaut wird.

Die Expression von RSK3 ist bei Behandlung mit C5 und MG132 höher, als wenn die Zellen nur mit C5 behandelt werden. Compound C5 löst also eine verminderte RSK3-Expression aus; dieser Effekt kann durch eine Proteasominhibition fast vollständig aufgehoben werden.

5 Diskussion

5.1 Vielfältige Effekte der Compounds auf den Zellphänotyp

5.1.1 Compounds und BI-D1870 verringern Zellproliferation

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von fünf potenziellen RSK3-Inhibitoren hinsichtlich phänotypischer und molekularer Effekte auf zwei Pankreaskarzinomzelllinien. Die phänotypischen Effekte sind insbesondere deswegen relevant, weil die Rolle von RSK3 und Auswirkungen einer RSK-Inhibition in Pankreaskarzinomzelllinien noch unerforscht sind. Somit kann die RSK3-Inhibition als neuer therapeutischer Ansatz im PDAC überprüft werden. Mithilfe der molekularen Charakterisierung soll primär eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Compounds RSK3 auch in Zellkulturbedingungen inhibieren. Beabsichtigt ist die Identifikation eines RSK3-Inhibitors, mit dem in Zukunft der Ansatz der therapeutischen RSK3-Inhibition im genetischen Pankreaskarzinom-Mausmodell überprüft werden soll.

Mit dem RSK-Inhibitor BI-D1870 ist ein verhältnismäßig spezifischer Inhibitor verfügbar, der alle Isoformen von RSK inhibiert. BI-D1870 ist bis jetzt nur im Rahmen des RSK-Projekts in PDAC-Zelllinien verwendet worden, damit sind die Effekte in PDAC-Zellen praktisch nicht erforscht, weswegen in dieser Arbeit vergleichend BI-D1870 herangezogen worden ist.

Unterschiedliche Expressionsmuster sowie zum Teil unterschiedliche Aktivierungsmechanismen der Isoformen lassen auf Unterschiede in der Regulation und Funktion der Isoformen schließen. Da jedoch die einzelnen Funktionen der Isoformen von RSK u.a. mangels isoformspezifischer Inhibitoren noch nicht voneinander differenziert werden konnten, ist nicht klar, welche Effekte von einem spezifischen RSK3-Inhibitor zu erwarten wären. Daher lässt sich nicht sagen, inwieweit die Effekte eines isoformspezifischen Inhibitors mit den durch BI-D1870 hervorgerufenen Effekten vergleichbar sind. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass BI-D1870 verschiedene bekannte *off-target*-Effekte hat, sodass die durch BI-D1870 hervorgerufenen Effekte möglicherweise nicht ausschließlich auf eine fehlende RSK-Aktivität zurückzuführen sind (Sapkota et al., 2006).

Es gibt verschiedene andere pan-RSK-Inhibitoren, darunter den Inhibitor SL0101. Diese Inhibitoren haben ebenfalls verschiedene *off-target*-Effekte. BI-D1870 kann aber aufgrund einer vergleichsweise hohen Spezifität in niedrigeren Konzentrationen als etwa SL0101 in der Zellkultur verwendet werden, weswegen BI-D1870 für dieses Projekt ausgewählt wurde (Bain et al., 2007; Roffé et al., 2015).

Um die Effekte einer fehlenden RSK3-Aktivität direkt charakterisieren zu können, wäre möglicherweise ein *Knockdown* von RSK3 besser geeignet als die Behandlung der Zellen mit dem niedermolekularen Inhibitor BI-D1870. Jedoch ist ein erfolgreicher *Knockdown* in diversen Versuchsansätzen in den beiden Zelllinien nicht gelungen. Ebenfalls bestünde die Möglichkeit eines *Knockouts*, also der gentechnischen Manipulation der Zellen mit einem „Herausschneiden“ von RSK3 mittels CRISPR/Cas-Technologie. Diese Methode ist jedoch sehr aufwendig und teuer, und war im Rahmen dieser Arbeit im Labor nicht durchzuführen. Aus diesen Gründen stellte die Verwendung von BI-D1870 die beste Alternative zur Untersuchung von RSK in Pankreaskarzinomzelllinien dar.

Die Auswahl der zwei verwendeten Zelllinien PaTu-8988t und BxPC3 erfolgte aus verschiedenen Gründen. Der Compound-Screen wurde in diesen Zelllinien durchgeführt, sodass eine Validierung des Screens in denselben Zelllinien naheliegt. PaTu-8988t ist eine gut beschriebene Zelllinie, die häufig für Forschung am PDAC verwendet wird. Die Zelllinie weist Mutationen u.a. in KRAS, SMAD4 und TP53 auf und hat damit für das PDAC typische Driver-Mutationen (Bartsch et al., 1999; Schumacher et al., 1999; Hamidi et al., 2014). BxPC3 ist nicht KRAS-mutiert, weist jedoch Mutationen in SMAD4, TP53, CDKN2A sowie B-RAF auf (Berrozpe et al., 1994; Caldas et al., 1994; Bartsch et al., 1999). Mit den ausgewählten Zelllinien umfassen die Zellen somit Charakteristika eines primären PDAC und einer Metastase, sowie Mutationen in verschiedenen (Driver-)Genen, wie etwa *KRAS*-mutierte und *KRAS*-Wildtyp (nicht mutierte) Zellen. Damit ist ein breiteres zelluläres Spektrum abgedeckt und der Versuchsaufbau kommt der Heterogenität eines PDAC näher.

Um einen ersten Eindruck der grundlegenden Auswirkungen einer RSK-Inhibition durch BI-D1870 auf Pankreaskarzinomzellen zu bekommen, wurden die Zellen mit 10 μ M BI-D1870 für 48 Stunden behandelt und die Zellzahl gemessen. Die Konzentration von BI-D1870 in 10 μ M ist beschrieben und etabliert (Houles et al., 2018). Die aus der Zellzählung resultierende Wachstumskurve (Abb. 6 S. 30) zeigt, dass BI-D1870 konzentrationsabhängig die Proliferation in PaTu-8988t und BxPC3 stark vermindert. Der konzentrationsabhängige Effekt lässt sich dadurch erklären, dass BI-D1870 erst bei einer Konzentration von 10 μ M RSK vollständig inhibiert (Sapkota et al., 2006).

Für BI-D1870 sind verschiedene *off-target*-Effekte beschrieben, weswegen nicht auszuschließen ist, dass die Effekte auf die Proliferation durch unspezifische Effekte statt durch eine RSK-Inhibition hervorgerufen wurden. Unter den bekannten *off-target*-Effekten ist die Inhibition von PLK1, einer Kinase, die eine Rolle in der Mitose spielt. Der pan-RSK-Inhibitor SL0101 inhibiert nicht PLK1, hat jedoch andere *off-target*-Effekte, weswegen eine Validierung der Effekte auf Proliferation und Viabilität mit dem SL0101 nur begrenzt weiterführend wäre (Bain et al., 2007). Zudem wurde die molekulare Wirkung von BI-D1870 auf RSK in den verwendeten

Pankreaskarzinomzelllinien noch nicht validiert, weswegen die Proliferationssenkung nicht mit Sicherheit auf eine RSK-Inhibition zurückgeführt werden kann.

Bei den Proliferationsmessungen mit den Compounds zeigten Compound C2, C3, C4 und C5 eine deutliche Reduktion der Proliferation, vergleichbar mit den Effekten durch BI-D1870. Unklar ist, ob die geringere Proliferation nach Behandlung mit BI-D1870 und den Compounds primär auf eine verringerte Zellteilung oder auf eine erhöhte Apoptose der Zellen zurückzuführen ist. Darüber würde etwa die Messung des Zellzyklus und der Apoptose Aufschluss geben. Da die Zellzahl von BxPC3 im Vergleich zum Ausgangswert t_0 nach Behandlung mit BI-D1870 und den Compounds abnimmt, ist zumindest in dieser Zelllinie auch von Apoptose auszugehen.

Die Zellzählung per Hand ist eine günstige und schnelle Methode, um eine Proliferationskurve zu erstellen. Jedoch ist im Vergleich zu anderen Proliferationsassays wie etwa einem Lumineszenz-basierten Assay der menschliche Fehler größer. Dieser wurde im Versuchsansatz durch drei Wiederholungen mit je einer Doppelbestimmung pro Wert jedoch verkleinert, weswegen die Ergebnisse als valide anzusehen sind.

Obwohl die phänotypischen Auswirkungen einer spezifischen RSK3-Inhibition im Pankreaskarzinom nicht bekannt sind, sind auf Basis der Daten des Synthetic-Lethality-Screens sowie weiteren Vorarbeiten antitumorale bzw. antiproliferative Effekte bei RSK3-Inhibition gezeigt worden (Milosevic et al., 2013). Maximale Effekte wären erst in Kombination mit Erlotinib in Sinne einer synthetischen Letalität zu vermuten. BI-D1870 und vier der fünf Compounds senken die Zellproliferation tatsächlich deutlich. Bezüglich des RSK3-Projekts ist dieses Ergebnis positiv aufzufassen.

5.1.2 In beiden Zelllinien geringere Viabilität durch Compounds

Um das Ergebnis der Proliferationsmessung zu validieren und um eine Wirkung der Compounds in 1 μM Konzentration zu überprüfen, wurde die Viabilität nach 48 Stunden Behandlung mit 1 und 10 μM Compound gemessen (Abb. 8 S. 32).

Der RSK-Inhibitor BI-D1870 senkte in 10 μM die Viabilität in beiden Zelllinien deutlich. Bei 1 μM BI-D1870 zeigte sich kein Effekt; auch in der Proliferationsmessung zeigte sich nur ein geringer Effekt in dieser Konzentration. Die Viabilitätsmessung bestätigt somit das Ergebnis, dass BI-D1870 bei 10 μM die Proliferation vermindert. Dieses Ergebnis deckt sich zudem mit Validierungen des Synthetic-Lethality-Screens durch Milosevic et al., die ebenfalls bei Viabilitätsmessungen mit BI-D1870 in PaTu-8988t und BxPC3 eine Reduktion der Zellviabilität zeigen konnten (Milosevic et al., 2013).

Die Compounds C2 bis C5 zeigten bei 10 μM deutliche Effekte auf die Viabilität; dies stimmt mit den Proliferationsmessungen überein (Abb. 6 und 7 S. 30f). In 1 μM hatte lediglich C5 einen Effekt auf die Viabilität, was eine hohe Potenz dieses Compounds erwarten lässt.

Da die fünf zu untersuchenden Compounds noch unerforscht sind, ist nur ein Vergleich mit Daten aus dem Compound-Screen möglich. Die Ergebnisse von C2-5 stimmen insofern mit dem Screen überein, als dass auch der Compound-Screen eine verringerte metabolische Zell-Aktivität 48 Stunden nach Behandlung mit diesen Compounds im MTT-Assay gemessen hat.

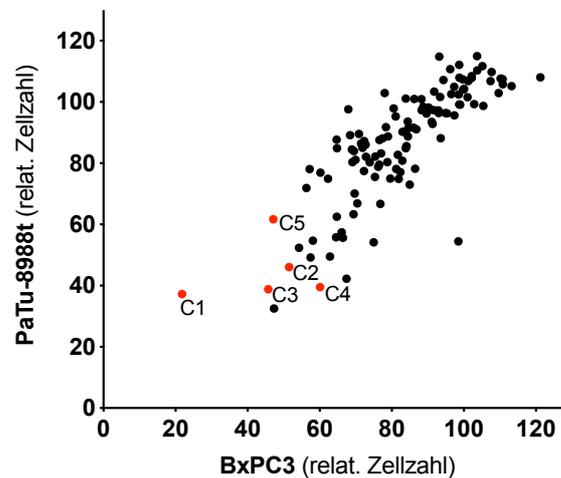


Abbildung 25: MTT-Assay mit 100 aus dem Compound-Screen ausgewählten Compounds nach Behandlung mit 10 µM Compound für 48 Stunden. Auf den Achsen ist der relative Farbstoffumschlag in Prozent des Farbstoffumschlags der Kontrolle von PaTu-8988t bzw. BxPC3 abgebildet. Jeder Punkt im Graphen steht für ein Compound. Die Daten sind nicht publiziert.

Auffallend ist, dass Compound C1 in dieser Arbeit keine Effekte auf Proliferation und Viabilität hat. Dies widerspricht den Ergebnissen des Compound-Screens, die eine deutliche Reduktion der metabolischen Aktivität in beiden Zelllinien gezeigt haben (Abb. 25). Da es sich bei dem Compound-Screen um ein Hochdurchsatzverfahren handelt, welches meist eine relativ hohe Fehlerquote hat, sind die Validierungen in dieser Arbeit mit Zellzählung und Viabilitätsmessung als methodisch valider anzusehen. Deswegen konnten mit den hier gezeigten Ergebnissen aus Zellzählung und Viabilitätsmessung die im Screen gezeigten Effekte von Compound C1 auf die Proliferation nicht bestätigt werden. Unklar bleibt, warum C1 im Compound-Screen die oben dargestellten Effekte gezeigt hat.

Bei Betrachtung der Zellproliferation und der Viabilitätsmessung fällt auf, dass BxPC3 insgesamt empfindlicher auf die Compounds und BI-D1870 reagieren als PaTu-8988t. So stagniert nicht nur die Zahl proliferierender Zellen wie bei PaTu-8988t, sondern sinkt am ehesten aufgrund von Apoptose ab. Zudem nimmt die Viabilität im Vergleich zu PaTu-8988t stärker ab. Über die höhere Sensitivität von BxPC3 kann nur spekuliert werden. Es wurde bereits beschrieben, dass die KRAS-Mutation im PDAC eine wesentliche Rolle bei der Resistenz gegen MEK-Inhibition spielt

(Hamidi et al., 2014). Es lässt sich vermuten, dass unter anderem deswegen die KRAS-mutierten PaTu-8988t-Zellen resistenter gegen RSK-Inhibition sind als die nicht-KRAS-mutierten BxPC3.

5.1.3 Zellzyklusarrest bei RSK-Inhibition in PaTu-8988t

Bisher wurde gezeigt, dass die Compounds C2-5 die Proliferation inhibieren. Unklar ist, ob dies durch eine verringerte Zellteilung oder durch Apoptose zustande kommt. Aus diesem Grund, und weil RSK die Zellproliferation über verschiedene Regulatoren des Zellzyklus steuert, wurden Zellzyklusanalysen und Apoptosemessungen vorgenommen (Palmer et al., 1998; Fujita et al., 2003).

Bei Compound C1 bis C5 zeigt sich ein leichter Anstieg der G2-Fraktion in PaTu-8988t, in BxPC3 verursachen nur C3 und C5 diesen Effekt. Der Inhibitor BI-D1870 verursacht eine starke G2-Akkumulation in PaTu-8988t, nicht jedoch in BxPC3 (Abb. 9 bzw. 10 S. 33f).

Der G2-Arrest in BI-D1870 in PaTu-8988t wird durch die Literatur gestützt. Es ist beschrieben, dass RSKs die G2/M-Transition fördern (Wu et al., 2014). Ein durch BI-D1870 ausgelöster G2-Arrest ist in Zelllinien mehrerer anderer Tumorentitäten beschrieben, darunter im oralen Plattenepithelkarzinom, Melanom, akuter lymphatischer Leukämie und Darmkrebs (Neise et al., 2013; Chiu et al., 2014; Chae et al., 2017; Kosnopfel et al., 2017).

Unklar ist, warum die untersuchten Compounds in PaTu-8988t anders als BI-D1870 lediglich eine leichte Erhöhung der G2-Fraktion auslösen. Möglicherweise inhibieren die Compounds nicht spezifisch RSK. Eine andere Theorie wäre, dass die von den Compounds potenziell inhibierte RSK3 eine geringere Rolle im G2-Arrest spielt als etwa RSK1 und RSK2. Überexpressionsstudien mit RSK1-4 in Zelllinien des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms stützen diese These (Chatterjee et al., 2017). Hierbei hatte die Überexpression von RSK1 und RSK2 einen deutlich größeren Einfluss auf den Zellzyklus als die Überexpression von RSK3.

Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Effekte von BI-D1870 und den Compounds in PaTu-8988t wäre, dass der G2-Arrest durch *off-target*-Effekte des BI-D1870 ausgelöst werden. Durch BI-D1870 wurde eine RSK-unabhängige p21-Akkumulation gezeigt, die möglicherweise den G2-Arrest ausgelöst hat (Neise et al., 2013). BI-D1870 inhibiert auch die Kinase PLK1, die in der Zellteilung eine Rolle spielt. In verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien konnte durch einen PLK1-Knockdown eine verminderte Viabilität sowie ein G2-Arrest ausgelöst werden (Yu et al., 2008). Auch der Knockdown einer anderen durch BI-D1870 inhibierten Kinase, Aurora B, reduzierte in Pankreaskarzinomzellen die Proliferation (Warner et al., 2006).

Es konnte jedoch in Kolon- und Mammakarzinomzelllinien mittels RSK1-Knockdown und vergleichend BI-D1870 gezeigt werden, dass bei beiden Methoden ein G2-Arrest induziert wurde (Neise, 2011). Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass der G2-Arrest in PaTu-8988t durch

BI-D1870 durch eine RSK-Inhibition, und nicht durch *off-target*-Effekte ausgelöst wird. Diese These ließe sich mit Knockdown- oder Knockout-Untersuchungen bestätigen.

Bei Vergleich der Zellzyklusanalysen in beiden Zelllinien stellt sich die Frage, warum BI-D1870 in PaTu-8988t einen G2-Arrest auslöst, in BxPC3 jedoch nicht. Hinsichtlich der Zellzyklusregulation ist der größte bekannte Unterschied zwischen den beiden Zelllinien eine Mutation des *CDKN2A*-Gens in BxPC3 (Caldas et al., 1994). Bei einer *CDKN2A*-Mutation wie in BxPC3 wäre also möglicherweise ein G2-Arrest nicht oder nur noch eingeschränkt möglich. Letztlich kann der Unterschied zum momentanen Zeitpunkt nicht ausreichend erklärt werden.

Die hierbei verwendete Methode zur Zellzyklusanalyse ist die Propidiumiodid-Durchflusszytometrie. Hierbei handelt es sich um eine verlässliche Messmethode (van Engeland et al., 1998). Die geringe Standardabweichung zeigt an, dass sich bei den drei Wiederholungen der Messung nur geringe Schwankungen der Messwerte ergeben haben. Die abgebildeten Ergebnisse sind daher als valide einzuschätzen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wirkungen der Compounds und BI-D1870 auf den Zellzyklus inhomogen sind und die Differenzen aktuell nicht zu erklären sind.

5.1.4 Apoptose durch Compounds und BI-D1870

RSK wirkt sich über verschiedene Mechanismen positiv auf das Zellüberleben aus, unter anderem durch die Unterdrückung pro-apoptotischer Signalwege (Shimamura et al., 2000). Somit könnte die Apoptoserate Aufschluss auf die Aktivität von RSK geben. Zur Untersuchung der Apoptose wurde die PARP-Spaltung sowie die Sub-G1-Fraktion aus den Zellzyklusanalysen als Biomarker für Apoptose analysiert.

Die Compounds C2, C3, C4 und BI-D1870 erhöhten die PARP-Spaltung in beiden Zelllinien. Die stärkste Spaltung zeigte sich in beiden Zelllinien bei Behandlung mit Compound C3 und bei BI-D1870. Compound C5 erhöhte die PARP-Spaltung nur in BxPC3.

Die analysierte Sub-G1-Fraktion unterstützt in PaTu-8988t die PARP-Spaltung; in BxPC3 gibt es jedoch Unterschiede, die mit den vorhandenen Daten nicht erklärt werden können.

Somit sind mit zwei Methoden Hinweise auf verstärkte Apoptose durch Behandlung mit den Compounds, insbesondere mit C3 und BI-D1870 dargestellt worden. Hinsichtlich der These, dass die Compounds spezifische RSK-Inhibitoren sind, ist zu beachten, dass sich bei einem Vergleich der Effekte der Compounds auf Apoptose große Unterschiede zeigen. Falls alle Compounds RSK-Inhibitoren sein sollten, ist demnach von sehr unterschiedlichen *off-target*-Effekten oder Wirkstärken auszugehen.

Die dargestellten Hinweise auf Apoptose lassen sich mithilfe der Literatur unterstützen. Verstärkte Apoptose durch Behandlung mit BI-D1870 zeigen sich in Zelllinien vieler

Tumorentitäten, darunter Zelllinien des oralen Plattenepithelkarzinoms, chronischer und akuter lymphatischer Leukämie, des multiplen Myeloms, Medulloblastoms sowie des Brustkrebses (Steele et al., 2011; Shimura et al., 2012; Stratford et al., 2012; Chiu et al., 2014; Pambid et al., 2014; Chae et al., 2017).

Es wurden die Effekte der Compounds und BI-D1870 auf Viabilität, Zellzyklus und Apoptose untersucht. Mit diesen Daten lassen sich Rückschlüsse auf die Hintergründe der verminderten Proliferation durch die Compounds und BI-D1870 ziehen.

Die in Abb. 6 und 7 (siehe S. 30f) gezeigte Verminderung der Proliferation durch die Compounds und BI-D1870 kann durch eine verringerte Zellteilung oder höhere Apoptoserate bzw. einer Kombination aus den genannten Faktoren verursacht worden sein. Die Zellteilung konnte mithilfe der Zellzyklusanalysen untersucht werden, und die Apoptose wurde hier mit der Untersuchung der PARP-Spaltung und der Sub-G1-Fraktion analysiert. Die Untersuchung der Mechanismen der verringerten Proliferation ist auch hinsichtlich der Therapie von Interesse. Eine verringerte Proliferation durch eine erhöhte Apoptoserate könnte die Wahrscheinlichkeit einer Tumorregression erhöhen.

Compound C1 zeigt kaum Effekte auf die Zellproliferation. Dies lässt sich durch geringe Effekte auf Zellzyklus, Viabilität und Apoptose erklären. Compound C2 bis C5 zeigen moderate Effekte auf den Zellzyklus und Apoptose. Somit kommt die verminderte Proliferation vermutlich durch eine Kombination aus verringerter Zellteilung und erhöhter Apoptoserate zustande.

Der RSK-Inhibitor BI-D1870 löst einen starken G2-Arrest sowie deutliche Apoptose aus. Dies erklärt die deutlich verringerte Proliferationsrate. Insbesondere die Apoptose ist in BxPC3 durch Compound C2-5 und BI-D1870 deutlich erhöht (vgl. Abb. 11 S. 35), was eine Abnahme der Zellzahl nach 24 und 48 Stunden erklärt (siehe Abb. 6 S. 30).

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass die verringerte Zellproliferation bei den Compounds C2-C5 und BI-D1870 durch eine unterschiedlich gewichtete Kombination aus verringerter Zellteilung und erhöhter Apoptose zustande kommt.

5.2 Compound C5 inhibiert RSK3

5.2.1 RSK3-Inhibition durch C5 in PaTu-8988t

Hinsichtlich der Frage, ob die zu untersuchenden Compounds RSK3 inhibieren, ist es grundlegend, die Aktivität von RSK3 zu untersuchen. RSK3 wird durch Phosphorylierung an verschiedenen Stellen aktiviert, somit gibt die Untersuchung der Phosphorylierung Aufschluss darüber, ob RSK3 aktiv ist. Es wurde die Phosphorylierung an zwei für die Aktivität von RSK3

relevanten Phosphorylierungsstellen untersucht. Um zu überprüfen, ob eine mögliche verminderte Phosphorylierung auch Folgen auf molekularer Ebene hat, wurde zusätzlich die Phosphorylierung von drei RSK3-Substraten analysiert.

Zur Erleichterung der Auswertung wurde die Phosphorylierung quantifiziert und auf die DMSO-Kontrolle normalisiert. Der Hintergrund der Membran wurde vorher abgezogen und die Proteinmenge durch die jeweilige Ladekontrolle gerechnet. Es wurde also die relative Phosphorylierung des Gesamtproteins errechnet. Somit kann z.B. auch bei schwankender Expression des Gesamtproteins eine Aussage über eine mögliche Veränderung des phosphorylierten Anteils am Gesamtprotein getroffen werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass durch die Berücksichtigung der Ladekontrolle mögliche Verfälschungen der Ergebnisse durch Beladungsschwankungen herausgerechnet wurden. Durch Abzug des Hintergrundes konnten ebenfalls Verfälschungen durch Schatten auf der Membran, etwa durch eine unspezifische Bindung des Antikörpers oder eine ungleiche Verteilung des ECL-Detektionsreagenzes, herausgerechnet werden.

Die erste untersuchte Phosphorylierungsstelle an Thr356/Ser360 liegt in der Linker-Region zwischen der N-terminalen (NTKD) und der C-terminalen Kinasedomäne (CTKD). Während der konsekutiven Phosphorylierungskaskade (siehe Kapitel 1.3.2) werden diese Aminosäuren von ERK phosphoryliert. Die Untersuchung der Phosphorylierungsstelle Thr356/Ser360 gibt damit darüber Aufschluss, ob ERK noch an RSK3 binden kann und die CTKD aktiviert (Dalby et al., 1998).

Die zweite untersuchte Phosphorylierungsstelle Ser218 in der NTKD wird nach Bindung von PDK1 durch selbige phosphoryliert. Dadurch wird die NTKD aktiviert, die dann die Substrate von RSK3 phosphorylieren kann. Die Phosphorylierungsstelle Ser218 zeigt damit an, ob PDK1 an RSK3 binden kann und die NTKD aktiviert ist (Bjørbaek et al., 1995; Jensen et al., 1999). Zudem wurden drei voneinander unabhängige Substrate von RSK3 (LKB1, RPS6 und PFKFB2) untersucht.

Um den Einfluss der Compounds auf die Aktivierung von RSK3 zu untersuchen, wurde das Protein von PaTu-8988t mit und ohne vorherige Zellstimulation im Western Blot analysiert. Compound C5 und BI-D1870 zeigen als einzige Behandlungen Effekte auf die Phosphorylierung von RSK3 und den RSK-Substraten. Bei Compound C5 ist die Phosphorylierung von RSK3 an Thr356/Ser360 und Ser218 im Vergleich zur Kontrolle deutlich vermindert. Bei LKB1, RPS6 und PFKFB2 ist die Phosphorylierung ebenfalls geringer als in der Kontrolle. Diese Effekte zeigen sich nicht in jedem Blot alle gleichzeitig, jedoch zeigt sich in jedem Blot mindestens einer dieser Effekte bei Behandlung mit C5 in 10 µM.

Die Phosphorylierung von ERK wurde ebenfalls untersucht. Im Western Blot von BxPC3 mit Zellstimulation (Abb. 15 S. 40) zeigt sich eine relevante Reduktion der Phosphorylierung auf 31 % der DMSO-Kontrolle. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine ERK-Inhibition durch

C5 kann in diesem Western Blot nicht ausgeschlossen werden. Da sich jedoch in allen anderen Western Blots keine relevante verminderte ERK-Phosphorylierung zeigt und C5 dennoch eine verminderte Phosphorylierung von RSK3 und RSK3-Substraten zeigt, kann geschlossen werden, dass C5 ERK nicht relevant beeinträchtigt. Daraus lässt sich ableiten, dass der MEK/ERK-Signalweg über RAS, MEK und ERK vermutlich nicht durch Compound C5 inhibiert wird. Auch durch BI-D1870 wird die Phosphorylierung von ERK nicht beeinflusst. Dies bestätigt, dass das BI-D1870 selektiv wirkt, schließt andere Off-Targets jedoch nicht aus.

Es lässt sich schlussfolgern, dass Compound C5 die Aktivierung von RSK3 inhibiert. Bei den übrigen Compounds sieht man keine verminderte Phosphorylierung von RSK3 oder den Substraten. Somit ist C5 als einziges der untersuchten Compounds ein in der Zellkultur wirksamer RSK3-Inhibitor.

Die gleichzeitige Reduktion der Phosphorylierung von RSK3 und RSK-Substraten ist nur schlüssig mit einer RSK3-Inhibition zu erklären. Eine gleichzeitige Reduktion der Phosphorylierung von LKB1, RPS6 und PFKFB2 durch andere Mechanismen ist denkbar, jedoch sehr unwahrscheinlich, da die Substrate in unterschiedlichen Signalwegen liegen. Eine Inhibition *upstream* von RSK3 durch C5 hätte die verminderte Phosphorylierung von RSK3 erklären können. Da die Phosphorylierung von ERK nahezu unbeeinträchtigt ist, kann eine mögliche *off-target*-Inhibition dieses Signalwegs durch C5 ausgeschlossen werden.

Im Western Blot mit stimulierten Zellen fällt auf, dass bei C5 die Phosphorylierung von RPS6 deutlich geringer als bei BI-D1870 ist. Ursachen bleiben spekulativ; möglich wären etwa *off-target*-Effekte von C5 oder BI-D1870.

Da durch C5 die Phosphorylierung an beiden untersuchten Phosphorylierungsstellen vermindert ist, lässt sich die Hypothese ableiten, dass die Phosphorylierungskaskade der RSK3-Aktivierung sehr weit zu Beginn inhibiert wird. Für die genaue Untersuchung des Wirkmechanismus von C5 wären jedoch weitere Untersuchungen etwa mit Phosphomutanten von RSK3 nötig.

Bei Behandlung von PaTu-8988t mit BI-D1870 ist die Phosphorylierung von RSK3 an Thr356/Ser360 verringert, nicht jedoch die Phosphorylierung von Ser218. Die Phosphorylierung von RSK3 an Thr356/Ser360 zeigt an, ob die CTKD durch ERK phosphoryliert und aktiviert worden ist. Die Aktivierung der CTKD ist zwingend notwendig, damit PDK1 an RSK3 binden kann und die NTKD an Ser218 aktivieren kann (vgl. Abb. 2 S. 6). Obwohl in PaTu-8988t die Phosphorylierung von Thr356/Ser360 durch BI-D1870 inhibiert ist, ist RSK3 an Ser218 phosphoryliert. Dieses Phosphorylierungsmuster widerspricht direkt dem aktuellen Aktivierungsmodell von RSK3. Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie dies zustande kommen könnte.

BI-D1870 inhibiert die NTKD von RSK durch die Blockade der ATP-Binderegion (Sapkota et al., 2006). Somit sollte die Aktivierung der CTKD durch ERK nicht vermindert sein, obwohl die

Western Blots in PaTu-8988t dies implizieren. Möglicherweise verändert die Bindung von BI-D1870 die räumliche Struktur von RSK3, sodass die Phosphorylierung durch ERK an der untersuchten Phosphorylierungsstelle Thr356/Ser360 nicht mehr möglich ist, jedoch die Aktivierung der CTKD durch ERK. Eine solche Konformationsänderung von RSK durch einen RSK-Inhibitor ist bei SL0101 beschrieben (Utepbergenov et al., 2012).

Eine andere Hypothese für das der Aktivierungstheorie widersprechende Phosphorylierungsmuster in PaTu-8988t wäre ein alternativer Aktivierungsmechanismus im Pankreaskarzinom. Bisher ist RSK im PDAC nahezu unerforscht, die Aktivierung der einzelnen Isoformen ist noch nicht validiert worden. Eine solche alternative RSK-Aktivierung ist in dendritischen Zellen beschrieben worden. Hier ist für die Aktivierung die CTKD entbehrlich (Zaru et al., 2015).

5.2.2 RSK3-Inhibition und verminderte RSK3-Expression durch C5 in BxPC3-Zellen

In PaTu-8988t inhibiert C5 als einziges Compound RSK3. Auch in BxPC3 hat nur C5 Effekte auf RSK3. Im Western Blot mit vorheriger Zellstimulation ist die Phosphorylierung von RSK3 sowie aller untersuchten RSK-Substrate vermindert (Abb. 15 S. 40), analog zu den Ergebnissen in PaTu-8988t. Im Western Blot ohne Zellstimulation in BxPC3 ist zudem die Expression von RSK3 durch C5 deutlich verringert (Abb. 17 S. 42). Möglich wäre eine Beeinflussung der Transkription oder ein verstärkter proteasomaler Abbau von RSK3 nach C5-Bindung. Warum die Expression von RSK3 bei Stimulation der Zellen nicht absinkt, ist unklar. Vor der Zellstimulation wurden die Zellen in serumfreiem Medium kultiviert; möglicherweise spielt dies eine Rolle.

Der RSK-Inhibitor BI-D1870 wurde ebenfalls im Western Blot untersucht. Überraschenderweise hat dieser jedoch in BxPC3 weder bei stimulierten noch unstimulierten Zellen Effekte auf RSK3 oder RSK-Substrate. Aus diesem Grund lässt sich annehmen, dass BI-D1870 in BxPC3 bezüglich der RSK-Inhibition unwirksam ist. In BxPC3 wurden mit BI-D1870 vielfältige phänotypische Effekte auf Proliferation, Zellviabilität und Apoptose beobachtet. Diese Effekte lassen sich nun nicht mehr auf eine RSK-Inhibition zurückführen. Dies wirft die Frage auf, ob die phänotypischen Effekte durch *off-target*-Effekte von BI-D1870 etwa auf die in der Zellteilung relevanten Kinasen PLK1 und Aurora B hervorgerufen wurden. Eine solche Theorie stellt die Spezifität von BI-D1870 infrage und muss daher in kommenden Untersuchungen etwa mittels Knockdown der genannten Kinasen untersucht werden. Der Grund für die Unwirksamkeit von BI-D1870 in BxPC3 ist nicht bekannt.

Da der Synthetic-Lethality-Screen in BxPC3 auf einem Knockdown von RSK3 mittels siRNA und nicht auf einer pharmakologischen Inhibition mit BI-D1870 beruht, ist die Aussagekraft des Screens aufgrund der fehlenden Wirksamkeit von BI-D1870 nicht beeinflusst. Die Validierung

des Screens erfolgte in PaTu-8988t und BxPC3. Die Ergebnisse mit BI-D1870 in BxPC3 sollten kritisch hinterfragt werden.

Umso interessanter ist es, dass Compound C5 anders als der weitverbreitete kommerziell vertriebene BI-D1870 in BxPC3 RSK3 inhibiert. Somit ergibt sich eine bessere Wirksamkeit von C5 im Vergleich zu BI-D1870 in den verwendeten Zelllinien, was eine weitere Erforschung von C5 noch attraktiver macht.

Da etwa in PaTu-8988t die Phosphorylierungsmuster nicht mit der Aktivierungstheorie von RSK3 übereinstimmen, stellt sich die Frage, ob der Western Blot die optimale Methode für eine Aktivitätsmessung von RSK3 darstellt. Für Enzymaktivitätsmessungen im zellulären Kontext gibt es die Möglichkeit, die Enzymaktivität mittels radioaktiv markiertem Peptidsubstrat zu messen. Problematisch bei RSK3 ist aber, dass kein Substrat spezifisch nur von RSK3 phosphoryliert wird. Ein solcher Assay hätte damit keinerlei Aussagekraft. Eine Messung von isoliertem RSK3-Enzym ist bereits im RSK3-Compound-Screen erfolgt, eine erneute Messung von isoliertem Enzym würde keinerlei Aufschluss über die Enzymaktivität im zellulären Kontext geben.

Eine Alternative zum Western Blot wäre die Enzymaktivitätsmessung nach Immunpräzipitation von RSK3 aus mit C5 behandelten Zellen. Diese Methode könnte für die weitere Untersuchung von Compound C5 hilfreich sein. Damit wäre eine genaue Quantifizierung der RSK3-Aktivität möglich.

Mit der Betrachtung der Phosphorylierung von RSK3 und RSK-Substraten im Western Blot lässt sich aber zumindest eine grundlegende Aussage darüber treffen, ob die Aktivität von RSK3 beeinträchtigt wird. Ein weiterer Vorteil des Western Blots ist, dass durch die Untersuchung der Substrate festzustellen ist, ob eine RSK-Inhibition auch funktionelle Auswirkungen auf die Substrate hat. Denn theoretisch wäre ein Ausgleich der fehlenden RSK3-Aktivität durch andere Kinasen denkbar, da RSK das Substrat-Zielmotiv mit den AGC-Kinasen teilt (Flotow und Thomas, 1992). Dies ist mit C5 nicht der Fall, da auch die Phosphorylierung der RSK-Substrate sinkt.

5.3 Compound C5 als neuer potenter RSK3-Inhibitor

5.3.1 C5 erhöht Apoptose in BxPC3

In Kapitel 4.1.4 wurde bereits eine erhöhte PARP-Spaltung bei C5 in BxPC3 nachgewiesen. Bei der PARP-Spaltung handelt es sich lediglich um einen Indikator für Apoptose. Da sich nun diese Arbeit auf C5 konzentriert, ist eine Validierung der Apoptose mittels Annexin-V-Staining

sinnvoll. Im Annexin-V-Staining ist die Apoptose mit C5 in BxPC3 leicht erhöht, nicht jedoch in PaTu-8988t. Dies bestätigt die Ergebnisse der PARP-Spaltung. Die Daten aus der Validierung des Synthetic-Lethality-Screens decken sich damit: es konnte bei Knockdown von RSK3 ebenfalls eine erhöhte Apoptose in BxPC3 festgestellt werden, nicht aber in PaTu-8988t (Milosevic et al., 2013).

5.3.2 Compound C5 inhibiert bereits in geringen Konzentrationen RSK3

Da Konzentrationen von 10 μM im Gewebe bei einer Behandlung mit Chemotherapeutika aufgrund von mangelnder Löslichkeit und zu hoher Nebeneffekte kaum erreicht werden, ist eine Untersuchung von Compound C5 in geringeren Konzentrationen hinsichtlich phänotypischer Effekte wichtig.

Es wurde in beiden Zelllinien die Zellviabilität bei Behandlung mit C5 in Konzentrationen von 0,01 μM bis 10 μM nach 24 Stunden untersucht (Abb. 19 S. 44). Der Effekt auf die Viabilität ist eher gering, jedoch erfolgte die Messung der Viabilität schon nach 24 Stunden. Es ist zu erwarten, dass sich die Effekte von C5 im zeitlichen Verlauf addieren und verstärken, da die Viabilität auch die Proliferation widerspiegelt.

Im Kapitel 4.3.4 wurden zudem BxPC3 mit Compound C5 in Konzentrationen von 10 bis 0,01 μM behandelt (Abb. 23 S. 48). Es zeigte sich eine deutlich verminderte konzentrationsabhängige RSK3-Expression mit konsekutiv verminderter RSK3-Phosphorylierung. Der Western Blot zeigt, dass C5 in BxPC3 noch bei 0,01 μM die RSK3-Phosphorylierung beeinträchtigt. Eine Wirkung im nanomolaren Bereich zeigt damit eine sehr gute Löslichkeit und Spezifität von C5 an. Inwieweit sich die verminderte Expression und Phosphorylierung von RSK3 bei niedrigeren Konzentrationen von C5 auf die Phosphorylierung der RSK-Substrate auswirkt, ist noch zu überprüfen.

In Kapitel 4.3.3 wurde außerdem die Phosphorylierung von RPS6 bei geringeren C5-Konzentrationen in PaTu-8988t untersucht (Abb. 20 S. 45). Hier zeigte sich bei 5 und 1 μM eine verminderte Phosphorylierung von RPS6.

Aus den Ergebnissen ergibt sich die Möglichkeit, Compound C5 in sehr geringen Konzentrationen zu verwenden, die theoretisch auch *in vivo* etwa in Mausversuchen oder einer Chemotherapie erreicht werden könnten. Durch geringere Konzentrationen sinkt zugleich auch das Risiko für *off-target*-Effekte beziehungsweise unerwünschte Nebenwirkungen *in vivo*.

5.3.3 Additiver Effekt von EGFR-Inhibition und C5

Ursprünglich wurde RSK3 erstmals in einem Synthetic-Lethality-Screen als synthetisch letales Zielmolekül in Kombination mit Erlotinib identifiziert. Bei einem Knockdown von RSK3 und

Behandlung mit Erlotinib zeigten sich synergistische Effekte auf Viabilität und Apoptose (Milosevic et al., 2013). Deswegen wären ähnliche synergistische Effekte mit C5 zu erwarten.

Im Western Blot zeigt sich, dass C5 und Erlotinib die Phosphorylierung von RPS6 stärker reduzieren als C5 alleine (Abb. 20 S. 45). Nach 48 Stunden mit reduziertem Serumgehalt konnte im Viabilitätsassay ein additiver Effekt von C5 mit Erlotinib in beiden Zelllinien gezeigt werden (Abb. 22 S. 47). Hingegen konnte kein Synergismus auf molekularer oder phänotypischer Ebene gezeigt werden.

Bei der Behandlung mit Erlotinib wurden in PaTu-8988t höhere Konzentrationen von Erlotinib benötigt als bei BxPC3 (10 μ M in PaTu-8988t versus 5 μ M in BxPC3). PaTu-8988t wurden bereits als sehr resistent gegen Erlotinib beschrieben, während sich in BxPC3 bei einer Konzentration von 10 μ M sehr starke Effekte auf die Zellviabilität zeigten (Collisson et al., 2011; Du et al., 2019). PaTu-8988t waren ebenfalls weniger empfindlich gegenüber C5 als BxPC3; die Apoptose stieg in BxPC3 an, nicht jedoch in PaTu-8988t (Abb. 18 S. 43). Diese Unterschiede in der Sensitivität von PaTu-8988t und BxPC3 sind möglicherweise auf die KRAS-Mutation von PaTu-8988t zurückzuführen (Hamidi et al., 2014).

Unklar bleibt, warum in dieser Arbeit kein Synergismus zwischen EGFR-Inhibition und BI-D1870 bzw. C5 gezeigt werden konnte. Möglicherweise zeigt sich ein Synergismus zwischen RSK3-Inhibition und Erlotinib erst nach einem längeren Zeitraum ab 48 Stunden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich keine klassische *Synthetic Lethality* zwischen C5 und Erlotinib ergibt, sich jedoch ein additiver Effekt auf molekularer und phänotypischer Ebene zeigt. Aus diesem Grund muss der Synthetic-Lethality-Screen kritisch hinterfragt werden. Synthetische Letalität ergibt sich oft nur in einem bestimmten Kontext, der sich womöglich nur zum Teil in einem Zellkultur-Assay wie dem Screen abbilden lässt. Im Screen wurde die Zelllinie BxPC3 verwendet, die einen *KRAS*-Wildtyp hat. Somit besitzt sie nicht die in 90 % der Pankreaskarzinomen vorhandene *KRAS*-Mutation (Smit et al., 1988). Möglicherweise zeigt sich die synthetische Letalität deutlicher bei *KRAS*-Wildtyp-Zellen. Zudem ist die erhöhte Fehlerquote bei Hochdurchsatz-Methoden zu berücksichtigen (Bhinder und Djaballah, 2013).

Bei der verwendeten Methodik des Synthetic-Lethality Screens handelt es sich jedoch um einen sehr ausführlichen mehrfach validierten Screen. So wurden beispielsweise für den Knockdown vier verschiedene siRNA-Sequenzen pro Kinase verwendet.

Da sich eher ein additiver Effekt anstelle einer synthetischen Letalität zwischen RSK-Inhibition und EGFR-Inhibition gezeigt hat, sollte das Konzept der *Synthetic Lethality* mit RSK3 validiert werden. Statt einer *Synthetic Lethality* mit EGFR-Inhibition könnte im Pankreaskarzinom eher das Konzept der nicht-onkogenen Abhängigkeit (*non-oncogene addiction*) für RSK3 dienen. Die nicht-onkogene Abhängigkeit beschreibt, dass Tumorzellen von einem Gen abhängig sind, das kein mutiertes Onkogen ist (Solimini et al., 2007).

5.3.4 Degradation von RSK3 in BxPC3 durch Compound C5

Im Western Blot in BxPC3 nach Behandlung mit 10 μM Compound ohne Zellstimulation zeigte sich eine deutlich geringere Expression von RSK3 (Abb. 17 S. 42).

Für die geringere RSK3-Expression bei Behandlung mit C5 gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Die erste Hypothese wäre eine beeinträchtigte Genexpression etwa durch *off-target*-Effekte von C5. Da jedoch die Expression von anderen Proteinen im Western Blot, wie etwa LKB1, RPS6 und ERK unbeeinträchtigt war, ist diese Hypothese unwahrscheinlich.

Die zweite Hypothese wäre ein proteasomaler Abbau von RSK3 aufgrund der Bindung von C5 an RSK3. In der Zelle fallen physiologisch immer wieder fehlgefaltete oder beschädigte Proteine an. Da diese die Integrität der Zelle gefährden, werden diese Proteine über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut (Wilkinson et al., 1980). Die Hypothese des durch C5 induzierten Abbaus von RSK3 wird auch durch frühere Forschungen gestützt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch das Binden extern zugeführter Chemikalien an ein bestimmtes Protein der Abbau dieses Proteins induziert wird. Beispiele hierfür sind die Östrogenrezeptor-Downregulatoren (*selective estrogen receptor degraders*, SERDs). Das Chemotherapeutikum Fulvestrant aus der Gruppe der SERDs ist im metastasierten östrogenrezeptor-positiven Brustkrebs etabliert. Die Bindung von Fulvestrant an den Östrogenrezeptor bewirkt dessen Abbau (Dauvois et al., 1992).

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das Proteasom in BxPC3 mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 inhibiert und die Expression von RSK3 im Western Blot analysiert. MG132 ist ein spezifischer Inhibitor. Die verwendeten Konzentrationen von 5 und 10 μM in BxPC3 sind in dieser Zelllinie bereits publiziert worden (Arlt et al., 2003; Le Cloennec et al., 2016).

Im Western Blot zeigt sich, dass bei Proteasom-Inhibition die Expression von RSK3 deutlich steigt. Dies spricht für einen ständigen proteasomalen Abbau von RSK3 in BxPC3, bei einer Inhibition des Proteasoms steigt demnach die RSK3-Expression. Eine solche kontinuierliche Degradation von RSK in Pankreaskarzinomzellen ist damit zum ersten Mal gezeigt worden.

Durch C5 sinkt die Expression von RSK3 im Vergleich zur Kontrolle. Bei gleichzeitiger Behandlung von BxPC3 mit C5 und dem Proteasom-Inhibitor steigt die Expression von RSK3 wieder auf das Niveau der Kontrolle. Dies lässt darauf schließen, dass Compound C5 in BxPC3 den proteasomalen Abbau von RSK3 fördert.

Ein großer Vorteil der Degradation von RSK3 durch Compound C5 ist eine nachhaltigere RSK3-Inhibition. Um diesen Effekt auszugleichen, muss die Zelle RSK3 erst neu synthetisieren. Eine verminderte RSK-Expression durch Inhibition ist in einer Zelllinie des Lungenkarzinoms beschrieben: hier bewirkt eine länger andauernde Behandlung über 24 Stunden mit BI-D1870 eine verminderte RSK1-Expression (Abdulrahman et al., 2016).

Im Western Blot von BxPC3 mit dem Proteasom-Inhibitor zeigte sich außerdem, dass C5 trotz Proteasominhibition den Abbau von C5 weiterhin leicht fördert, da die RSK3-Expression bei C5 mit Proteasominhibitor geringer ist als in der reinen Behandlung mit Proteasominhibitor. Hierfür gibt es mehrere Erklärungsansätze. Einerseits wäre es möglich, dass eine komplette Inhibition des Proteasoms durch den Proteasominhibitor MG132 aufgrund eingeschränkter Wirksamkeit nicht möglich ist und RSK3 durch C5 trotzdem zum Teil abgebaut werden kann.

Andererseits wäre die oben diskutierte *off-target*-Inhibition der Genexpression von RSK3 durch C5 zusätzlich zu einer Förderung der RSK3-Degradation möglich. Um dies komplett auszuschließen, wäre eine Messung des mRNA-Gehalts an RSK3 in der Zelle mithilfe einer Realtime-PCR möglich.

Insbesondere da jedoch nur die Expression von RSK3 beeinträchtigt ist, erscheint es wahrscheinlicher, dass die verringerte Expression von RSK3 trotz Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor auf eine insuffiziente Inhibition des Proteasoms zurückzuführen ist. Der Grund, warum BxPC3 RSK3 auch ohne C5 laufend abbaut, ist unklar. Möglicherweise liegt eine Fehlfaltung von RSK3 in BxPC3 vor; dies könnte auch die fehlende Wirksamkeit von BI-D1870 erklären (vgl. Abb. 16 und 17 S. 41f). In diesem Falle müsste trotzdem von einer Restfunktion von RSK3 ausgegangen werden, da C5 in BxPC3 deutliche phänotypische Effekte zeigte.

Aus den diskutierten Ergebnissen in BxPC3 ergibt sich die Schlussfolgerung, dass Compound C5 in BxPC3 die Aktivität von RSK3 über zwei Mechanismen verhindert: durch eine Inhibition der Aktivierung sowie durch eine proteasomale Degradation von RSK3. Zudem wurde erstmalig eine kontinuierliche proteasomale Degradation von RSK3 in einer Pankreaskarzinomzelllinie beschrieben.

5.4 Compound C5 als neuer potenter RSK-Inhibitor

Aus den fünf untersuchten Compounds wurde C5 als einziges Compound identifiziert, das RSK3 inhibiert. Die vielfältigen phänotypischen Effekte der Compounds C1 bis C4 sind damit nicht eindeutig auf eine RSK3-Inhibition zurückzuführen. Stattdessen werden sie vermutlich durch unspezifische Effekte der Compounds hervorgerufen, etwa durch eine Schädigung der Zellmembran, Zellorganellen oder der Inhibition anderer Enzyme. Die beobachtete Überexpression einiger RSK-Substrate (z.B. Abb. 14 S. 39) könnte dementsprechend als eine Reaktion auf die unspezifische Zellschädigung zurückgeführt werden.

Alle fünf Compounds sind in mehreren Validierungsschritten im Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie in Berlin untersucht worden und von den ursprünglich 40 000 gescreenten Substanzen als am vielversprechendsten eingeschätzt worden. Dennoch konnte bei nur einem von fünf Compounds eine RSK3-Inhibition bestätigt werden. Da die Compounds C1

bis C4 nicht weiter molekular untersucht wurden, bleiben Vermutungen über die Gründe der fehlenden RSK3-Inhibition spekulativ. Möglich sind Fehler im Screen, da insbesondere Hochdurchsatzverfahren sehr fehleranfällig sind. Zudem ist die Imitation des Aktivierungsmechanismus von RSK3 im Screen mittels synthetischem RSK3 nicht vollständig erfolgt, da für die Aktivierung von RSK3 die Kinasen ERK und PDK1 sowie nicht näher charakterisierte Effekte von der Zellmembran benötigt werden (Dalby et al., 1998; Frodin et al., 2000; Richards et al., 2001).

Aus diesem Grund kann nicht erwartet werden, dass alle Treffer des Screens korrekt sind. Zudem unterstützen die aufgeführten Schwächen des Compound-Screens, wie wichtig eine phänotypische und molekulare Validierung der Compounds in der Zellkultur ist. Da aus den Compounds ein neuer putativer RSK-Inhibitor identifiziert werden konnte, kann der RSK3-Compound-Screen als Erfolg angesehen werden. Compound-Screens sind ein wichtiges Mittel für die Erforschung neuer Verbindungen. In Kombination mit einer Validierung in Zelllinien stellt das Verfahren ein grundlegendes Werkzeug für die Entwicklung neuer Therapeutika dar (Coussens et al., 2017).

Das RSK3-Projekt zielt auf die Untersuchung eines neuen spezifischen Therapieansatzes mit einem wenn möglich isoformselektiven RSK-Inhibitor im Pankreaskarzinom ab. Es gibt vielfältige Voraussetzungen für einen solchen Inhibitor in der spezifischen Krebstherapie. Zunächst muss er als spezifischer Therapieansatz sein Zielprotein inhibieren und deutliche antitumorale Eigenschaften aufweisen, dabei jedoch gesunden Zellen des Körpers möglichst wenig schaden. Der Inhibitor muss zellpermeabel sein und schon in geringen Konzentrationen an seinem Zielsubstrat wirken, also eine hohe Potenz haben. Die Effekte des Inhibitors sollten möglichst über einen längeren Zeitraum wirken, um einen nachhaltigen therapeutischen Effekt zu erzielen. Zudem sollte das Risiko der Resistenzbildung *in vivo* möglichst gering sein, um eine nachhaltige therapeutische Wirkung des Inhibitors zu garantieren. Der Inhibitor muss außerdem für eine nebenwirkungsarme Wirkung möglichst selektiv und *in vivo* gut löslich sein.

Aus den dargelegten Ergebnissen lassen sich bezüglich des Compound C5 bereits einige dieser Voraussetzungen bestätigen. Es wurde gezeigt, dass Compound C5 RSK3 inhibiert. Aufgrund der molekularen Effekte durch C5 auch bei niedrigeren Konzentrationen lässt sich bereits eine gute Zellpermeabilität ableiten. Der Wirkmechanismus von C5 lässt sich auf eine Inhibition der Aktivierung von RSK3, und in BxPC3 zusätzlich auf die Förderung des proteasomalen Abbaus von RSK3 zurückführen.

Die verringerte Proliferation ist durch eine Kombination aus geringerer Zellteilung und erhöhter Apoptose zu erklären. All diese Effekte wirken antitumoral und rechtfertigen damit eine weitere Untersuchung von Compound C5 hinsichtlich RSK3 als neuen Therapieansatz im Pankreaskarzinom. Insbesondere die Proliferationsmessung mittels Zellzählung zeigt mit einem

deutlichen Effekt auf die Zellzahl über 48 Stunden, dass die Effekte in der Zellkultur nachhaltig sind. Die längerfristigen Effekte von C5 sind ebenfalls durch die RSK3-Degradation in BxPC3 gegeben. Inwieweit eine Resistenzentwicklung gegen die RSK3-Inhibition nach langfristiger Kultivierung der Zellen mit einem RSK-Inhibitor möglich ist, muss noch untersucht werden.

Auch konnte gezeigt werden, dass C5 bereits in sehr geringen Konzentrationen Wirkung auf RSK3 hat, und damit einen potenten Inhibitor darstellt. Die Reduktion der Viabilität durch C5 in diesen geringen Konzentrationen bestätigt die zelluläre Relevanz der Auswirkungen der RSK3-Inhibition.

C5 zeigt in den Western Blots keinerlei Effekte auf den MEK/ERK-Signalweg *upstream* von RSK, was bereits einen ersten Anhaltspunkt für eine Selektivität des Compounds gibt. In weiteren Experimenten sollte im Western Blot untersucht werden, inwieweit die Phosphorylierung der anderen RSK-Isoformen beeinträchtigt ist.

Die grundlegende phänotypische und molekulare Charakterisierung der Compounds und der daraus folgenden Identifizierung von Compound C5 als potenten RSK3-Inhibitor war ein grundlegender Schritt für die Entwicklung eines RSK3-Inhibitors. Die Entwicklung eines solchen Inhibitors würde die Möglichkeit bieten, die genauen Funktionen von RSK3 zu erforschen und den neuen therapeutischen Ansatzpunkt einer RSK3-Inhibition im Pankreaskarzinom zu validieren.

Ausblick:

Die Selektivität eines neuen Inhibitors ist mittels Zellkulturexperimenten nur ansatzweise erforschbar. Für eine genaue Charakterisierung der Selektivität eines neuen Inhibitors müssen jedoch Hochdurchsatzverfahren angewandt werden, in denen untersucht wird, an welche Kinasen Compound C5 bindet (Zhang et al., 2009).

Eine solche Methode wäre ein Kinom-weiter Affinitäts-Screen. Mit diesem Verfahren werden C5 sowie einige andere Compounds aus dem Compound-Screen auf Selektivität voraussichtlich in Zukunft von einer kooperierenden Arbeitsgruppe untersucht werden.

Da die RSK-Isoformen RSK1-4 sich ähneln, jedoch die Aminosäuresequenz nur zu 73 – 80 % homolog ist, wäre durch chemische Modifikationen möglicherweise eine Isoformspezifität erreichbar, falls diese bei C5 noch nicht besteht (Roux und Blenis, 2004). Solche Modifikationen können ebenfalls verwendet werden, um die *in vivo*-Pharmakokinetik des Inhibitors zu verbessern, die bei Compound C5 noch unbekannt ist.

Als Ausblick wäre nach der Bestimmung der Selektivität und chemischer Modifikation die Untersuchung von C5 im Tiermodell möglich.

5.5 Bestätigung von RSK als neues Target im Pankreaskarzinom

Die ribosomale Kinase RSK3 wurde erstmals in einem Synthetic-Lethality-Screen in Kombination mit Erlotinib sowie den folgenden Untersuchungen (siehe Kapitel 1.2 S. 3) als neues potenzielles therapeutisches Ziel im Pankreaskarzinom identifiziert. Die antitumoralen Effekte durch C5 in PaTu-8988t und BxPC3 sowie durch BI-D1870 in PaTu-8988t zeigen, dass Pankreaskarzinomzellen sensibel auf eine RSK-Inhibition reagieren.

Die Qualität eines Chemotherapeutikums misst sich nicht nur daran, ob es Krebszellen tötet, sondern vor allem daran, ob es zwischen Krebszellen und gesunden Zellen differenziert und möglichst wenige gesunde Zellen schädigt. Ein Effekt von RSK-Inhibition auf normale Pankreaszellen ist noch nicht erforscht. Die bisherigen Daten zeigen jedoch, dass eine RSK-Inhibition in Pankreaskarzinomzellen sich vor allem auf die Zellteilung auswirkt, und weniger durch massive Apoptose. Da sich normale Pankreaszellen nur sehr selten teilen, ist davon auszugehen, dass eine RSK-Inhibition normalen Pankreaszellen wenig schadet (Githens, 1988).

Die Effekte einer RSK3-Inhibition sind in Fibroblasten noch nicht erforscht worden. Der pan-RSK-Inhibitor SL0101 inhibiert die Proliferation einer Brustkrebszelllinie, nicht jedoch die Proliferation einer normalen Brustepithelzelllinie (Smith et al., 2005). Der RSK-Inhibitor BI-D1870 zeigt eine starke Inhibition der Proliferation im oralen Plattenepithelkarzinom, während die Proliferation von normalen humanen Keratinozyten kaum beeinträchtigt ist (Chiu et al., 2014). Somit scheinen normale Zellen nicht von RSK abhängig zu sein, während Karzinomzellen im Sinne einer *non-oncogene addiction* empfindlich reagieren.

Ebenfalls muss im Hinblick auf potenzielle Nebenwirkungen untersucht werden, wie sich eine RSK3-Inhibition auf Gewebe auswirkt, in denen RSK3 überexprimiert ist oder die sich schnell teilen, wie etwa Darmepithel. Es ist bekannt, dass RSK3 unter anderem im Myokard verstärkt exprimiert ist. Studien mit RSK3-Knockout-Mäusen zeigen, dass die Mäuse vital sind und zudem eine normale Herzfunktion haben (Passariello et al., 2013). Zudem wurde gezeigt, dass RSK3 eine wichtige Rolle in der Kardiomyozyten-Hypertrophie und in der Induktion der Myokard-Fibrose spielt (Li et al., 2013). Somit lassen sich trotz der RSK3-Überexpression keine gravierenden Nebeneffekte einer RSK3-Inhibition auf das Herz vermuten.

In anderen Geweben, darunter im Ovar, wurde RSK3 als Tumorsuppressor charakterisiert (Bignone et al., 2007). Bezüglich potenzieller Nebenwirkungen ist daher eine mögliche mutagene Wirkung eines RSK3-Inhibitors in diesen Geweben zu berücksichtigen.

Diese Beispiele zeigen, dass RSK3 in den verschiedenen Geweben sehr heterogene Aufgaben hat. Die Entwicklung eines isoformspezifischen RSK-Inhibitors könnte zur Erforschung der Funktionen von RSK3 beitragen, was auch die Exploration potenzieller Nebenwirkungen einer RSK3-Inhibition erleichtert würde.

Das Ziel des Synthetic-Lethality-Screens war, eine Kinase zu identifizieren, dessen Inhibition in Kombination mit Erlotinib einen synthetisch letalen Effekt hat. Als Kinase wurde hier RSK3 identifiziert.

Mit dem RSK-Inhibitor Compound C5 zeigt sich ein additiver Effekt mit Erlotinib, aber keine synthetische Letalität im klassischen Sinne. Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass eine Kombination einer RSK3-Inhibition mit anderen Chemotherapeutika synergistische Effekte haben könnte (Serra et al., 2014; Awasthi et al., 2018). Aus diesem Grund sollten alternative Chemotherapeutika für die Kombination mit Compound C5 in Erwägung gezogen werden.

Auch wenn sich ein additiver Effekt der RSK-Inhibition mit Erlotinib zeigte, sollte das Konzept der Synthetic Lethality zwischen RSK3 und EGFR-Inhibition im PDAC kritisch validiert werden. Dennoch konnte RSK3 als vielversprechendes therapeutisches Ziel im Pankreaskarzinom bestätigt werden.

6 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom hat auch bei intensiver Chemotherapie mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 10 % immer noch eine sehr schlechte Prognose (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2018). Da die Möglichkeiten der Chemotherapie ausgeschöpft scheinen, liegt der Fokus der Forschung auf der gezielten Krebstherapie (*targeted therapy*). Das erste gezielte Krebsmedikament, das für das metastasierte PDAC zugelassen wurde, ist der EGFR-Inhibitor Erlotinib (Amanam und Chung, 2018).

Um neue Therapieansätze im PDAC zu finden, wurde 2013 ein siRNA-basierter Synthetic-Lethality-Screen in Kombination mit Erlotinib in der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC3 durchgeführt. Hier konnte die ribosomale Kinase RPS6KA2 (kurz RSK3) als synthetisch letales Ziel identifiziert werden. Ein antitumoraler Effekt einer RSK3-Inhibition konnte in den Zelllinien PaTu-8988t und BxPC3 auch ohne EGFR-Inhibition gezeigt werden (Milosevic et al., 2013).

RSK3 ist eine der vier Isoformen RSK1-4. Die Kinase liegt im MEK-ERK-Signalweg und wird durch ERK und PDK1 aktiviert (Sturgill et al., 1988; Sutherland et al., 1993; Bjorbaek et al., 1995; Jensen et al., 1999). Es ist bekannt, dass RSK die Zellproliferation und Proteinbiosynthese verstärkt sowie antiapoptotisch wirkt (Rivera et al., 1993; Tan et al., 1999). Die Rolle von RSK3 ist im Pankreaskarzinom nahezu unerforscht, jedoch konnte in verschiedenen Tumorentitäten eine protumorale Funktion nachgewiesen werden (Clark et al., 2005; Lara et al., 2011).

Für RSK existieren verschiedene Inhibitoren wie BI-D1870, jedoch sind diese nicht isoformspezifisch und aufgrund von Löslichkeitscharakteristika nicht *in vivo* anwendbar (Houles und Roux, 2018). Um den Ansatz von RSK3 im PDAC weiterverfolgen zu können, wurde deswegen in Vorarbeiten ein Compound-Screen durchgeführt (Daten noch nicht publiziert). Von ursprünglich 40 000 Substanzen wurden nach mehreren Validierungsschritten 10 zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Das Ziel dieser Arbeit war es, fünf der Substanzen (Compounds C1 bis 5) phänotypisch und molekular zu charakterisieren. Parallel ist der pan-RSK-Inhibitor BI-D1870 untersucht worden. Die weitere Charakterisierung der Compounds war unerlässlich, um eine Aussage darüber zu treffen, ob RSK3 auch unter Zellkulturbedingungen inhibiert wird. Zudem sollte RSK3 als therapeutisches Ziel im Pankreaskarzinom validiert werden. Für die Charakterisierung wurden Proliferationsmessungen, Western Blot, ATP-Assays sowie Zellzyklus- und Apoptosemessungen in der Durchflusszytometrie herangezogen. Folgend sind die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst.

Phänotypisch wirkten Compound C2-5 sowie BI-D1870 stark antiproliferativ. Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse waren inhomogen, mit unterschiedlichen Effekten auf die verwendeten Zelllinien. Zudem gab es Hinweise auf erhöhte Apoptose bei Compound C3 und BI-D1870. Compound C1 zeigte hingegen kaum Effekte auf Proliferation, Zellzyklus und Apoptose.

Insgesamt betrachtet zeigten die Compounds C2-5 sowie BI-D1870 antineoplastische Effekte durch eine verringerte Proliferation, was sich aus einer Kombination aus verminderter Zellteilung und erhöhter Apoptose ergab.

Molekular wurde die Phosphorylierung von RSK3 und drei RSK3-Substraten im Western Blot untersucht. Compound C5 inhibierte als einziges Compound RSK3 in beiden Zelllinien; die anderen Compounds zeigten keinerlei Effekte auf RSK3. Der RSK-Inhibitor BI-D1870 inhibierte RSK3 in PaTu-8988t, überraschenderweise jedoch nicht in BxPC3. Aus diesem Grund müssen die phänotypischen Effekte durch C1-4 in beiden Zelllinien und BI-D1870 in BxPC3 als Reaktion auf eine unspezifische Zellschädigung betrachtet werden. Da einige Validierungen des Synthetic-Lethality-Screens in BxPC3 mit BI-D1870 durchgeführt worden sind, sollten diese kritisch hinterfragt werden (Milosevic et al., 2013).

Zusätzlich zur RSK3-Inhibition verursachte Compound C5 in BxPC3 eine verringerte Expression von RSK3. Durch Untersuchungen mit einem Proteasom-Inhibitor konnte die verringerte Expression auf einen verstärkten Abbau von RSK3 induziert durch Compound C5 zurückgeführt werden. Außerdem konnte erstmals gezeigt werden, dass RSK3 in BxPC3 kontinuierlich proteasomal abgebaut wird. Mutationen von RSK3 in dieser Zelllinie sind nicht bekannt. Möglicherweise liegt jedoch eine Fehlfaltung des Proteins vor. Dies könnte den kontinuierlichen zellulären Abbau sowie die mangelnde Wirksamkeit von BI-D1870 erklären.

Compound C5 hat als RSK3-Inhibitor verschiedene günstige Eigenschaften. Er zeigt auch in geringen Konzentrationen molekulare und phänotypische antitumorale Effekte. Zudem zeigte C5 in ersten Western-Blot-Untersuchungen eine spezifische Inhibierung von RSK3; so wurde der MEK-ERK-Signalweg bis zu RSK nicht relevant beeinträchtigt.

Da RSK3 als synthetisch letales Target in Kombination mit Erlotinib identifiziert worden ist, wurde zusätzlich der Synergismus von C5 mit EGFR-Inhibition untersucht. Es konnte phänotypisch und molekular kein synergistischer Effekt nachgewiesen werden, jedoch zeigten sich additive Effekte. Möglicherweise war das betrachtete Zeitintervall von 24 Stunden zu kurz, um synergistische Effekte zu erhalten.

Abschließend lässt sich sagen, dass durch die Charakterisierung der fünf Compounds ein neuer aussichtsreicher RSK3-Inhibitor identifiziert werden konnte. Zudem wurde erstmals eine kontinuierliche proteasomale Degradation von RSK3 in PDAC-Zellen beschrieben. Geplant sind nun eine Spezifitätstestung von C5 im Hochdurchsatzverfahren und die chemische Modifikation zur Verbesserung von Löslichkeits- und Bindungseigenschaften.

Ebenfalls wurden erstmalig die Effekte einer RSK-Inhibition im PDAC detailliert charakterisiert. Mithilfe der Untersuchung der phänotypischen Effekte von C5 und BI-D1870 konnte RSK3 als vielversprechendes neues therapeutisches Ziel im Pankreaskarzinom bestätigt werden. Für die Zukunft wird die Untersuchung der Rolle von RSK3 im Pankreaskarzinom in *in-vivo*-Versuchen im genetischen Mausmodell angestrebt.

7 Literaturverzeichnis

- Abdulrahman N, Jaballah M, Poomakkoth N, Riaz S, Abdelaziz S, Issa A et al. (2016) Inhibition of p90 ribosomal S6 kinase attenuates cell migration and proliferation of the human lung adenocarcinoma through phospho-GSK-3 β and osteopontin. *Mol. Cell. Biochem.*, 418:21–29.
- Absher M. (1973) CHAPTER 1 - Hemocytometer Counting. In P.F. KRUSE & M.K.B.T.-T.C. PATTERSON (Hrsg.), (S. 395–397). Academic Press.
- Amanam I und Chung V. (2018) Targeted Therapies for Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*., 10.
- Angenstein F, Greenough W T und Weiler I J. (1998) Metabotropic glutamate receptor-initiated translocation of protein kinase p90rsk to polyribosomes: a possible factor regulating synaptic protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95:15078–15083.
- Anjum R und Blenis J. (2008) The RSK family of kinases: Emerging roles in cellular signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9:747–758.
- Arlt A, Gehrz A, Mürköster S, Vorndamm J, Kruse M-L, Fölsch U R et al. (2003) Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene*, 22:3243–3251.
- Awasthi N, Monahan S, Stefaniak A, Schwarz M A und Schwarz R E. (2018) Inhibition of the MEK/ERK pathway augments nab-paclitaxel-based chemotherapy effects in preclinical models of pancreatic cancer. *Oncotarget*, 9:5274–5286.
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie C J, Mclauchlan H et al. (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: A further update. *Biochem. J.*, 408:297–315.
- Bartsch D, Barth P, Bastian D, Ramaswamy A, Gerdes B, Chaloupka B et al. (1999) Higher frequency of DPC4/Smad4 alterations in pancreatic cancer cell lines than in primary pancreatic adenocarcinomas. *Cancer Lett.*, 139:43–49.
- Berrozpe G, Schaeffer J, Peinado M A, Real F X und Perucho M. (1994) Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *Int. J. cancer*, 58:185–191.
- Bhinder B und Djaballah H. (2013) Systematic analysis of RNAi reports identifies dismal commonality at gene-level and reveals an unprecedented enrichment in pooled shRNA screens. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 16:665–681.
- Biankin A V, Waddell N, Kassahn K S, Gingras M-C, Muthuswamy L B, Johns A L et al. (2012) Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*, 491:399–405.
- Bignone P A, Lee K Y, Liu Y, Emilion G, Finch J, Soosay A E R R et al. (2007) RPS6KA2, a putative tumour suppressor gene at 6q27 in sporadic epithelial ovarian cancer. *Oncogene*, 26:683–700.
- Bjorbaek C, Zhao Y und Moller D E. (1995) Divergent functional roles for p90(rsk) kinase domains. *J. Biol. Chem.*
- Bjorbaek C, Zhao Y und Moller D E. (1995) Divergent functional roles for p90rsk kinase domains. *J. Biol. Chem.*, 270:18848–18852.
- Boudeau J, Sapkota G und Alessi D R. (2003) LKB1, a protein kinase regulating cell proliferation and polarity. *FEBS Lett.*, 546:159–165.
- Bradford M M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248–254.
- Cai J, Ma H, Huang F, Zhu D, Zhao L, Yang Y et al. (2014) Low expression of RSK4 predicts poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 7:4959–4970.

- Caldas C, Hahn S A, da Costa L T, Redston M S, Schutte M, Seymour A B et al. (1994) Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat. Genet.*, 8:27–32.
- Carriere A, Cargnello M, Julien L-A, Gao H, Bonneil E, Thibault P et al. (2008) Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. *Curr. Biol.*, 18:1269–1277.
- Casalvieri K A, Matheson C J, Backos D S und Reigan P. (2017, April 1) Selective Targeting of RSK Isoforms in Cancer. *Trends in Cancer*. Cell Press.
- Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U und Nishizuka Y. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, 257:7847–7851.
- Chae H-D, Dutta R, Tiu B, Davis K L, Lacayo N J und Sakamoto K M. (2017) RSK Inhibition Induces Metaphase Arrest and Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Blood*, 130:2530.
- Chatterjee S, Huang E H-B, Christie I und Burns T F. (2017) Reactivation of the p90RSK-CDC25C Pathway Leads to Bypass of the Ganetespib-Induced G(2)-M Arrest and Mediates Acquired Resistance to Ganetespib in KRAS-Mutant NSCLC. *Mol. Cancer Ther.*, 16:1658–1668.
- Chen C, Zhang L, Huang N J, Huang B und Kornbluth S. (2013) Suppression of DNA-damage checkpoint signaling by Rsk-mediated phosphorylation of Mre11. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110:20605–20610.
- Chen R H, Abate C und Blenis J. (1993) Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90:10952–10956.
- Chen R H, Sarnecki C und Blenis J. (1992) Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol. Cell. Biol.*, 12:915–927.
- Cheng D K, Oni T, Thalappillil J, Park Y, Hsiu-Chi T, Alagesan B et al. (2021) Oncogenic KRAS engages an RSK1/NF1 pathway to inhibit wild-type RAS signaling in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 118:e2016904118. Proceedings of the National Academy of Sciences.
- Chiu C-F F, Bai L-Y Y, Kapuriya N, Peng S-Y Y, Wu C-Y Y, Sargeant A M et al. (2014) Antitumor effects of BI-D1870 on human oral squamous cell carcinoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 73:237–247.
- Cicenas J, Kvederaviciute K, Meskinyte I, Meskinyte-Kausiliene E, Skeberdyte A und Cicenas J. (2017) KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*, 9.
- Clark D E, Errington T M, Smith J A, Frierson H F J, Weber M J und Lannigan D A. (2005) The serine/threonine protein kinase, p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation. *Cancer Res.*, 65:3108–3116.
- Le Clorennec C, Lazrek Y, Dubreuil O, Larbouret C, Poul M-A, Mondon P et al. (2016) The anti-HER3 (ErbB3) therapeutic antibody 9F7-F11 induces HER3 ubiquitination and degradation in tumors through JNK1/2- dependent ITCH/AIP4 activation. *Oncotarget*, 7:37013–37029.
- Collisson E A, Sadanandam A, Olson P, Gibb W J, Truitt M, Gu S et al. (2011) Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat. Med.*, 17:500–503.
- Collisson E A, Trejo C L, Silva J M, Gu S, Korkola J E, Heiser L M et al. (2012) A central role for RAF→MEK→ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discov.*, 2:685–693.

- Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y et al. (2011) FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.*, 364:1817–1825.
- Corcoran R B, Cheng K A, Hata A N, Faber A C, Ebi H, Coffee E M et al. (2013) Synthetic lethal interaction of combined BCL-XL and MEK inhibition promotes tumor regressions in KRAS mutant cancer models. *Cancer Cell*, 23:121–128.
- Coussens N P, Braisted J C, Peryea T, Sittampalam G S, Simeonov A und Hall M D. (2017) Small-Molecule Screens: A Gateway to Cancer Therapeutic Agents with Case Studies of Food and Drug Administration-Approved Drugs. *Pharmacol. Rev.*, 69:479–496.
- Crouch S P, Kozlowski R, Slater K J und Fletcher J. (1993) The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods*, 160:81–88.
- Cuesta R und Holz M K. (2016) RSK-mediated down-regulation of PDCD4 is required for proliferation, survival, and migration in a model of triplenegative breast cancer. *Oncotarget*, 7:27567–27583.
- Dalby K N, Morrice N, Caudwell F B, Avruch J und Cohen P. (1998) Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK. *J. Biol. Chem.*, 273:1496–1505.
- Dauvois S, Danielian P S, White R und Parker M G. (1992) Antiestrogen ICI 164,384 reduces cellular estrogen receptor content by increasing its turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89:4037–4041.
- Davarinejad H. (2015) Quantifications of Western Blots with ImageJ. *Univ. York*, 1–4.
- Deak M, Clifton A D, Lucocq L M und Alessi D R. (1998) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.*, 17:4426–4441.
- DeVita V T J, Young R C und Canellos G P. (1975) Combination versus single agent chemotherapy: a review of the basis for selection of drug treatment of cancer. *Cancer*, 35:98–110.
- Diep C H, Munoz R M, Choudhary A, Von Hoff D D und Han H. (2011) Synergistic effect between erlotinib and MEK inhibitors in KRAS wild-type human pancreatic cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 17:2744–2756.
- Dobzhansky T. (1946) Genetics of natural populations; recombination and variability in populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 31:269–290.
- Doehn U, Hauge C, Frank S R, Jensen C J, Duda K, Nielsen J V et al. (2009) RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells. *Mol. Cell*, 35:511–522.
- Doi R, Imamura M, Hosotani R, Imaizumi T, Hatori T, Takasaki K et al. (2008) Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive pancreatic cancer: final results of a randomized multi-institutional trial. *Surg. Today*, 38:1021–1028.
- Douville E und Downward J. (1997) EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2. *Oncogene*, 15:373–383.
- Du J, He Y, Wu W, Li P, Chen Y, Hu Z et al. (2019) Targeting EphA2 with miR-124 mediates Erlotinib resistance in K-RAS mutated pancreatic cancer. *J. Pharm. Pharmacol.*, 71:196–205.
- Dümler B A, Hauge C, Silber J, Yntema H G, Kruse L S, Kofoed B et al. (2005) Functional characterization of human RSK4, a new 90-kDa ribosomal S6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types. *J. Biol. Chem.*, 280:13304–13314.

- Elf S, Blevins D, Jin L, Chung T-W, Williams I R, Lee B H et al. (2011) p90RSK2 is essential for FLT3-ITD- but dispensable for BCR-ABL-induced myeloid leukemia. *Blood*, 117:6885–6894.
- Elsässer H P, Lehr U, Agricola B und Kern H F. (1992) Establishment and characterisation of two cell lines with different grade of differentiation derived from one primary human pancreatic adenocarcinoma. *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, 61:295–306.
- van Engeland M, Nieland L J, Ramaekers F C, Schutte B und Reutelingsperger C P. (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31:1–9.
- Erkan M, Michalski C W, Rieder S, Reiser-Erkan C, Abiatari I, Kolb A et al. (2008) The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.*, 6:1155–1161.
- Fisher T L und Blenis J. (1996) Evidence for two catalytically active kinase domains in pp90rsk. *Mol. Cell. Biol.*, 16:1212–1219.
- Flotow H und Thomas G. (1992) Substrate recognition determinants of the mitogen-activated 70K S6 kinase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 267:3074–3078.
- Fong P C, Boss D S, Yap T A, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M et al. (2009) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N. Engl. J. Med.*, 361:123–134.
- Frödin M und Gammeltoft S. (1999) Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 151:65–77.
- Frodin M, Jensen C J, Merienne K und Gammeltoft S. (2000) A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1. *EMBO J.*, 19:2924–2934.
- Fujita N, Sato S und Tsuruo T. (2003) Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J. Biol. Chem.*, 278:49254–49260.
- Gillen S, Schuster T, Meyer Zum Büschenfelde C, Friess H und Kleeff J. (2010) Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS Med.*, 7:e1000267.
- Githens S. (1988) The pancreatic duct cell: proliferative capabilities, specific characteristics, metaplasia, isolation, and culture. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 7:486–506.
- Golan T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T, Hall M J et al. (2019) Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.*, 381:317–327.
- Grau A M, Zhang L, Wang W, Ruan S, Evans D B, Abbruzzese J L et al. (1997) Induction of p21waf1 expression and growth inhibition by transforming growth factor beta involve the tumor suppressor gene DPC4 in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Cancer Res.*, 57:3929–3934.
- Halbrook C J und Lyssiotis C A. (2017) Employing Metabolism to Improve the Diagnosis and Treatment of Pancreatic Cancer. *Cancer Cell*, 31:5–19.
- Hamidi H, Lu M, Chau K, Anderson L, Fejzo M, Ginther C et al. (2014) KRAS mutational subtype and copy number predict in vitro response of human pancreatic cancer cell lines to MEK inhibition. *Br. J. Cancer*, 111:1788–1801.
- Hidalgo M. (2003) Erlotinib: preclinical investigations. *Oncology (Williston Park)*, 17:11–16.
- Houles T, Gravel S P, Lavoie G, Shin S, Savall M, Meant A et al. (2018) RSK regulates PFK-2 activity to promote metabolic rewiring in melanoma. *Cancer Res.*, 78:2191–2204.

- Houles T und Roux P P. (2018) Defining the role of the RSK isoforms in cancer. *Semin. Cancer Biol.*
- Jensen C J, Buch M B, Krag T O, Hemmings B A, Gammeltoft S und Frödin M. (1999) 90-kDa ribosomal S6 kinase is phosphorylated and activated by 3- phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *J. Biol. Chem.*, 274:27168–27176.
- Jones S W, Erikson E, Blenis J, Maller J L und Erikson R L. (1988) A Xenopus ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85:3377–3381.
- Jones S, Zhang X, Parsons D W, Lin J C, Leary R J, Angenendt P et al. (2008) Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses, 321:1801–1807.
- Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong S-M, Yu J, Borges M et al. (2012) Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*, 142:730-733.e9.
- Kaufman B, Shapira-Frommer R, Schmutzler R K, Audeh M W, Friedlander M, Balmaña J et al. (2015) Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 33:244–250.
- Kaufmann S H, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson N E und Poirier G G. (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.*, 53:3976–3985.
- Keane M G, Horsfall L, Rait G und Pereira S P. (2014) A case-control study comparing the incidence of early symptoms in pancreatic and biliary tract cancer. *BMJ Open*, 4:e005720.
- Khalaileh A, Dreazen A, Khatib A, Apel R, Swisa A, Kidess-Bassir N et al. (2013) Phosphorylation of ribosomal protein S6 attenuates DNA damage and tumor suppression during development of pancreatic cancer. *Cancer Res.*, 73:1811–1820.
- Klip A, Li G und Logan W J. (1984) Induction of sugar uptake response to insulin by serum depletion in fusing L6 myoblasts. *Am. J. Physiol.*, 247:E291-6.
- Ko A H, Bekaii-Saab T, Van Ziffle J, Mirzoeva O M, Joseph N M, Talasaz A et al. (2016) A Multicenter, Open-Label Phase II Clinical Trial of Combined MEK plus EGFR Inhibition for Chemotherapy-Refractory Advanced Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, 22:61–68.
- Kojima Y, Maskey R S und Machida Y J. (2018) Cell Cycle Machinery and Its Alterations in Pancreatic Cancer. In J.P. Neoptolemos, R. Urrutia, J.L. Abbruzzese & M.W. Büchler (Hrsg.), *Pancreat. Cancer* (S. 19–49). New York, NY: Springer New York.
- Kosnopfel C, Sinnberg T, Sauer B, Niessner H, Schmitt A, Makino E et al. (2017) Human melanoma cells resistant to MAPK inhibitors can be effectively targeted by inhibition of the p90 ribosomal S6 kinase. *Oncotarget*, 8:35761–35775.
- Kraman M, Bambrough P J, Arnold J N, Roberts E W, Magiera L, Jones J O et al. (2010) Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha. *Science*, 330:827–830.
- Laemmli U K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685.
- Lara R, Mauri F A, Taylor H, Derua R, Shia A, Gray C et al. (2011) An siRNA screen identifies RSK1 as a key modulator of lung cancer metastasis. *Oncogene*, 30:3513–3521.
- Lazebnik Y A, Kaufmann S H, Desnoyers S, Poirier G G und Earnshaw W C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, 371:346–347.

- Li J, Kritzer M D, Michel J J C, Le A, Thakur H, Gayanilo M et al. (2013) Anchored p90 ribosomal S6 kinase 3 is required for cardiac myocyte hypertrophy. *Circ. Res.*, 112:128–139.
- Ma Q, Guin S, Padhye S S, Zhou Y-Q, Zhang R-W und Wang M-H. (2011) Ribosomal protein S6 kinase (RSK)-2 as a central effector molecule in RON receptor tyrosine kinase mediated epithelial to mesenchymal transition induced by macrophage-stimulating protein. *Mol. Cancer*, 10:66.
- Maisonneuve P. (2019) Epidemiology and burden of pancreatic cancer. *Press. Medicale*, 48:e113–e123.
- Mann K M, Ying H, Juan J, Jenkins N A und Copeland N G. (2016) KRAS-related proteins in pancreatic cancer. *Pharmacol. Ther.*, 168:29–42.
- Meant A, Gao B, Lavoie G, Nourredine S, Jung F, Aubert L et al. (2019) Proteomic analysis reveals a role for RSK in p120-catenin phosphorylation and melanoma cell-cell adhesion. *Mol. Cell. Proteomics*, 19:50–64.
- Millar J B und Russell P. (1992) The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell*, 68:407–410.
- Milosevic N, Kühnemuth B, Mühlberg L, Ripka S, Griesmann H, Lölkes C et al. (2013) Synthetic Lethality Screen Identifies RPS6KA2 as Modifier of Epidermal Growth Factor Receptor Activity in Pancreatic Cancer. *Neoplasia*, 15:1354–1362.
- Moore M J, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht J R, Gallinger S et al. (2007) Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol.*, 25:1960–1966.
- Moore P S, Sipos B, Orlandini S, Sorio C, Real F X, Lemoine N R et al. (2001) Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch.*, 439:798–802.
- National Cancer Institute. (o. J.) Definition of synergistic - NCI Dictionary of Cancer Terms. Zugriff am 27.3.2022. Verfügbar unter: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/synergistic>
- Neise D. (2011) Identifizierung und Charakterisierung neuer Funktions- und Regulationsmechanismen des CDK-Inhibitors p21WAF1/CIP1.
- Neise D, Sohn D, Stefanski A, Goto H, Inagaki M, Wesselborg S et al. (2013) The p90 ribosomal S6 kinase (RSK) inhibitor BI-D1870 prevents gamma irradiation-induced apoptosis and mediates senescence via RSK- and p53-independent accumulation of p21WAF1/CIP1. *Cell Death Dis.*, 4:1–11.
- Nicholson D W, Ali A, Thornberry N A, Vaillancourt J P, Ding C K, Gallant M et al. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376:37–43.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci M C, Grignani F und Riccardi C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 139:271–279.
- Obata T, Yaffe M B, Leparac G G, Piro E T, Maegawa H, Kashiwagi A et al. (2000) Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB. *J. Biol. Chem.*, 275:36108–36115.
- Palmer A, Gavin A C und Nebreda A R. (1998) A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *EMBO J.*, 17:5037–5047.

- Pambid M R, Berns R, Adomat H H, Hu K, Triscott J, Maurer N et al. (2014) Overcoming resistance to Sonic Hedgehog inhibition by targeting p90 ribosomal S6 kinase in pediatric medulloblastoma. *Pediatr. Blood Cancer*, 61:107–115.
- Passariello C L, Gayanilo M, Kritzer M D, Thakur H, Cozacov Z, Rusconi F et al. (2013) p90 ribosomal S6 kinase 3 contributes to cardiac insufficiency in alpha-tropomyosin Glu180Gly transgenic mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 305:H1010-9.
- Promega. (2009) CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. *Tech. Bull.*
- Ray-David H, Romeo Y, Lavoie G, Délérís P, Tcherkezian J, Galan J A et al. (2013) RSK promotes G2 DNA damage checkpoint silencing and participates in melanoma chemoresistance. *Oncogene*, 32:4480–4489.
- Richards S A, Dreisbach V C, Murphy L O und Blenis J. (2001) Characterization of Regulatory Events Associated with Membrane Targeting of p90 Ribosomal S6 Kinase 1. *Mol. Cell. Biol.*, 21:7470–7480.
- Rivera V M, Miranti C K, Misra R P, Ginty D D, Chen R H, Blenis J et al. (1993) A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity. *Mol. Cell. Biol.*, 13:6260–6273.
- Robert Koch-Institut (Hrsg.) und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.(Hrsg.). (2017) Krebs in Deutschland für 2015 / 2016. *Berlin, 11. Ausgab.*
- Roffé M, Lupinacci F C, Soares L C, Hajj G N und Martins V R. (2015) Two widely used RSK inhibitors, BI-D1870 and SL0101, alter mTORC1 signaling in a RSK-independent manner. *Cell. Signal.*, 27:1630–1642.
- Roux P P, Ballif B A, Anjum R, Gygi S P und Blenis J. (2004) Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101:13489–13494.
- Roux P P und Blenis J. (2004) ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68:320–344. American Society for Microbiology.
- Roux P P, Richards S A und Blenis J. (2003) Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity. *Mol. Cell. Biol.*, 23:4796–4804.
- Roux P P, Shahbazian D, Vu H, Holz M K, Cohen M S, Taunton J et al. (2007) RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J. Biol. Chem.*, 282:14056–14064.
- Sapkota G P, Cummings L, Newell F S, Armstrong C, Bain J, Frodin M et al. (2006) BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo. *Biochem. J.*, 401:29–38. Portland Press Ltd.
- Schönwasser D C, Marais R M, Marshall C J und Parker P J. (1998) Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway by Conventional, Novel, and Atypical Protein Kinase C Isotypes. *Mol. Cell. Biol.*, 18:790 LP – 798.
- Schumacher G, Kataoka M, Roth J A und Mukhopadhyay T. (1999) Potent antitumor activity of 2-methoxyestradiol in human pancreatic cancer cell lines. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, 5:493–499.
- Serra V, Kim S Y, Baselga J, Serra V, Eichhorn P J A, García-garcía C et al. (2014) RSK3 / 4 mediate resistance to PI3K pathway inhibitors in breast cancer.
- Seufferlein T, Porzner M, Becker T, Budach V, Ceyhan G, Esposito I et al. (2013) S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom. *Z. Gastroenterol.*, 51:1395–1440.

- Shimamura A, Ballif B A, Richards S A und Blenis J. (2000) Rsk1 mediates a MEK-MAP kinase cell survival signal. *Curr. Biol.*, 10:127–135.
- Shimura Y, Kuroda J, Ri M, Nagoshi H, Yamamoto-Sugitani M, Kobayashi T et al. (2012) RSK2(Ser227) at N-terminal kinase domain is a potential therapeutic target for multiple myeloma. *Mol. Cancer Ther.*, 11:2600–2609.
- Singhi A D, George B, Greenbowe J R, Chung J, Suh J, Maitra A et al. (2019) Real-Time Targeted Genome Profile Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Identifies Genetic Alterations That Might Be Targeted With Existing Drugs or Used as Biomarkers. *Gastroenterology*, 156:2242-2253.e4. Elsevier, Inc.
- Smit V T, Boot A J, Smits A M, Fleuren G J, Cornelisse C J und Bos J L. (1988) KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res.*, 16:7773–7782.
- Smith J A, Poteet-Smith C E, Xu Y, Errington T M, Hecht S M und Lannigan D A. (2005) Identification of the First Specific Inhibitor of p90 Ribosomal S6 Kinase (RSK) Reveals an Unexpected Role for RSK in Cancer Cell Proliferation. *Cancer Res.*, 65:1027–1035.
- Solimini N L, Luo J und Elledge S J. (2007) Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells. *Cell*, 130:986–988.
- Steele A J, Prentice A G, Last V, Hoffbrand A V und Wickremasinghe R G. (2011) The p90RSK Inhibitor BI-D1870 Induces Apoptosis in CLL Cells. *Blood*, 118:2492.
- Stratford A L, Reipas K, Hu K, Fotovati A, Brough R, Frankum J et al. (2012) Targeting p90 ribosomal S6 kinase eliminates tumor-initiating cells by inactivating Y-box binding protein-1 in triple-negative breast cancers. *Stem Cells*, 30:1338–1348.
- Sturgill T W, Ray L B, Erikson E und Maller J L. (1988) Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature*, 334:715–718.
- Sulzmaier F J, Young-Robbins S, Jiang P, Geerts D, Prechtel A M, Matter M L et al. (2016) RSK2 activity mediates glioblastoma invasiveness and is a potential target for new therapeutics. *Oncotarget*, 7:79869–79884.
- Sutherland C, Campbell D G und Cohen P. (1993) Identification of insulin-stimulated protein kinase-1 as the rabbit equivalent of rskmo-2. Identification of two threonines phosphorylated during activation by mitogen-activated protein kinase. *Eur. J. Biochem.*, 212:581–588.
- Tan M H, Nowak N J, Loor R, Ochi H, Sandberg A A, Lopez C et al. (1986) Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest.*, 4:15–23.
- Tan Y, Ruan H, Demeter M R und Comb M J. (1999) p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, 274:34859–34867.
- Trivier E, De Cesare D, Jacquot S, Pannetier S, Zackai E, Young I et al. (1996) Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature*, 384:567–570.
- Utepergenov D, Derewenda U, Olekhovich N, Szukalska G, Banerjee B, Hilinski M K et al. (2012) Insights into the inhibition of the p90 ribosomal S6 kinase (RSK) by the flavonol glycoside SL0101 from the 1.5 Å crystal structure of the N-terminal domain of RSK2 with bound inhibitor. *Biochemistry*, 51:6499–6510.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H und Reutelingsperger C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods*, 184:39–51.
- Vik T A und Ryder J W. (1997) Identification of serine 380 as the major site of autophosphorylation of Xenopus pp90rsk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 235:398–402.

- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu V E, Zhou S, Diaz L A J und Kinzler K W. (2013) Cancer genome landscapes. *Science*, 339:1546–1558.
- Wang R, Jung S Y, Wu C F, Qin J, Kobayashi R, Gallick G E et al. (2010) Direct roles of the signaling kinase RSK2 in Cdc25C activation during *Xenopus* oocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107:19885–19890.
- Warner S L, Munoz R M, Stafford P, Koller E, Hurley L H, Von Hoff D D et al. (2006) Comparing Aurora A and Aurora B as molecular targets for growth inhibition of pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, 5:2450–2458.
- Welsh G I und Proud C G. (1993) Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem. J.*, 294 (Pt 3):625–629.
- Whibley C, Pharoah P D P und Hollstein M. (2009) p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat. Rev. Cancer*, 9:95–107.
- Wilkinson K D, Urban M K und Haas A L. (1980) Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.*, 255:7529–7532.
- Wu C F, Liu S, Lee Y-C, Wang R, Sun S, Yin F et al. (2014) RSK promotes G2/M transition through activating phosphorylation of Cdc25A and Cdc25B. *Oncogene*, 33:2385–2394.
- Wu M, Hemesath T J, Takemoto C M, Horstmann M A, Wells A G, Price E R et al. (2000) c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev.*, 14:301–312.
- Yang J, Cron P, Good V M, Thompson V, Hemmings B A und Barford D. (2002) Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat. Struct. Biol.*, 9:940–944.
- Yoo L I, Chung D C und Yuan J. (2002) LKB1--a master tumour suppressor of the small intestine and beyond. *Nat. Rev. Cancer*, 2:529–535.
- Yu C, Zhang X, Sun G, Guo X, Li H, You Y et al. (2008) RNA interference-mediated silencing of the polo-like kinase 1 gene enhances chemosensitivity to gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma cells. *J. Cell. Mol. Med.*, 12:2334–2349.
- Zaru R, Edgar A J, Hanauer A und Watts C. (2015) Structural and Functional Basis for p38-MK2-Activated Rsk Signaling in Toll-Like Receptor-Stimulated Dendritic Cells. *Mol. Cell. Biol.*, 35:132–140.
- Zeniou M. (2002) Expression analysis of RSK gene family members: the RSK2 gene, mutated in Coffin-Lowry syndrome, is prominently expressed in brain structures essential for cognitive function and learning. *Hum. Mol. Genet.*, 11:2929–2940.
- Zentrum für Krebsregisterdaten R K-I. (2018) Pankreaskarzinom in Deutschland für 2017/2018, 60–63.
- Zhang J, Yang P L und Gray N S. (2009) Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*, 9:28–39.
- Zhao H, Martin T A, Davies E L, Ruge F, Yu H, Zhang Y et al. (2016) The clinical implications of rsk1-3 in human breast cancer. *Anticancer Res.*, 36:1267–1274.
- Zhao J, Yuan X, Frödin M und Grummt I. (2003) ERK-dependent phosphorylation of the transcription initiation factor TIF-IA is required for RNA polymerase I transcription and cell growth. *Mol. Cell*, 11:405–413.
- Zhao R, Choi B Y, Lee M-H, Bode A M und Dong Z. (2016) Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16^{INK4a}) in Cancer. *EBioMedicine*, 8:30–39.

8 Thesen

- I. Compound C5 inhibiert RSK3 in den Pankreaskarzinomzelllinien PaTu-8988t und BxPC3.
- II. Compound C1-C4 inhibieren RSK3 in der Zellkultur unter den verwendeten Bedingungen nicht.
- III. Compound C5 erzielt über die Reduktion der Zellteilung und Erhöhung der Apoptose antitumorale Effekte.
- IV. Eine pharmakologische RSK-Inhibition mit BI-1870 hat antitumorale Effekte in PaTu-8988t.
- V. Compound C5 induziert den proteasomalen Abbau von RSK3 in BxPC3.
- VI. Compound C5 und Erlotinib haben auf molekularer und phänotypischer Ebene additive Effekte.
- VII. Es zeigt sich in den verwendeten Konditionen kein Synergismus zwischen Compound C5 und Erlotinib.

Erklärungen

1. Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.
2. Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.
3. Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Essen, den 18.06.23

Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich auf dem langen Weg bis zur Doktorarbeit begleitet haben.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Patrick Michl für die zuverlässige Betreuung dieser Doktorarbeit vom ersten Projektentwurf bis zur letzten Version der Dissertation bedanken. Mein Dank geht ebenfalls an meinen Zweitbetreuer Prof. Stefan Hüttelmaier, der mir insbesondere bei der Bewerbung für das Hallesche Promotionskolleg half. Besonderer Dank geht auch an Prof. Heike Kielstein, die mir überhaupt erst den Weg zu einer experimentellen Doktorarbeit wies, und mit Ihrer empathischen Art ein großes Vorbild für mich ist.

Tatkräftige Unterstützung kam insbesondere von Dr. Jan Riedel. Er zeigte mir nicht nur, wie man eine Pipette hält, sondern half mir auch, durch zahlreiche Diskussionen wissenschaftliches Denken zu entwickeln.

Ich danke Dr. Stephanie Göllner, die sich, ohne mich vorher kennen gelernt zu haben, intensiv mit dieser Dissertation auseinandergesetzt hat, und mir mit Ihren Korrekturvorschlägen sehr weitergeholfen hat. Ebenfalls danke ich Dr. Julia Weissbach und Katharina Theuerkorn, die ich im Labor jederzeit mit Fragen löchern konnte. Ein großer Dank geht auch an meine Mitdotorandinnen Rosa Schmitz und Carolin Steindorf, sowie an Dr. Nico Hesselbarth, Tom Kaune und Dr. Richard Böhme für den Rückhalt im Labor. Dank geht ebenfalls an meine Freunde Paul Ohlmeier und Selina Rehm für die viele Unterstützung.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, insbesondere meinen Eltern und meinen Geschwistern Miriam und Silas, die mich bei Rückschlägen immer wieder aufgebaut haben, und sich geduldig meine Erläuterungen über Signaltransduktionskaskaden und den Versuchsaufbau einer Gelelektrophorese angehört haben. Ohne euch wäre diese Doktorarbeit nie zustande gekommen.