

**Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Achim Rody**

**Inhibitoren von PD-1/PD-L1 und ERK1/2 inhibieren
das Wachstum rezeptorexprimierender und triple-
negativer Mammakarzinom-Zelllinien**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Zoewend-Soango Elodie Kabore-Wolff, geb. Kabore
aus Fada N’Gourma, Burkina Faso

Lübeck, 2020

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Frank Köster

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Thorns

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2021

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 14.01.2021

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1. Das Mammakarzinom.....	1
1.1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2. Klassifikation.....	2
1.1.3. Prädiktion und Prognose des Mammakarzinoms	3
1.2. Der MAP-Kinase/ERK-Signalweg.....	5
1.3. Der Programmed-Cell-Death-Protein-1 (PD-1)-Rezeptor Signalweg.....	8
1.4. Der Einsatz von PD-1- und PD-L1-Inhibitoren in der Krebstherapie.....	10
1.4.1. Die PD-1-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab	11
1.4.2. Die PD-L1-Inhibitoren Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab.....	12
1.4.3. PD-1/PD-L1-Inhibitoren im Brustkrebs.....	12
1.5. Fragestellung.....	13
2. Material und Methoden.....	14
2.1. Material.....	14
2.1.1. Zelllinien	14
2.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	14
2.1.3. Laborgeräte	14
2.1.4. Chemikalien und Lösungen	15
2.1.5. Substanzen für die Zellkultur	16
2.1.6. Zellkulturmedien	16
2.1.7. Lösungen und Puffer zur Proteinisolierung.....	16
2.1.8. Lösungen und Puffer für Westernblots	16
2.1.9. Zubehör für Westernblots	17
2.1.10. Zubehör zur RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.....	17
2.1.11. Verwendete Primer für die quantitative Real-Time-PCR.....	17
2.1.12. Software	18
2.2. Methoden.....	19
2.2.1. Zellkultur	19
2.2.1.1. Wachstum.....	19

2.2.1.2. Subkultivierung	19
2.2.1.3. Bestimmung der Zellzahl	19
2.2.1.4. Kryokonservierung und Auftauen	19
2.2.1.5. Ansetzen der Wirksubstanzen	20
2.2.2. Proliferationsassay	20
2.2.2.1. Behandlung der Zellen.....	20
2.2.2.2. Durchführung des MTS-Proliferationsassays	21
2.2.2.3. Auswertung des MTS-Proliferationsassays	21
2.2.3. Einfluss der Inhibitoren auf die Genexpression	22
2.2.3.1. RNA-Isolierung	22
2.2.3.2. Messung der RNA-Konzentration	23
2.2.3.4. QPCR	23
2.2.3.5. Auswertung der qPCR	24
2.2.4. Immunchemischer Proteinnachweis	25
2.2.4.1. Behandlung der Zellen.....	25
2.2.4.2. Proteinisolierung	25
2.2.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration und Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese	25
2.2.4.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	26
2.2.4.5. Proteintransfer	26
2.2.4.6. Immunchemische Detektion	26
2.2.4.7. Quantitative Auswertung.....	28
2.2.5. Statistik	28
3. Ergebnisse.....	29
3.1. Einfluss eines PD-1/PD-L1-Inhibitors und eines kompetitiven, selektiven ERK1/2-Inhibitors auf die Zellviabilität der TNBC-Zelllinien und der NTNBC-Zelllinie MCF7 .	29
3.1.1. Der PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 hemmt die Zellviabilität stärker in TNBC-Zelllinien MDA-MB-231, HCC1937, HCC1806 als in der NTNBC-Zelllinie MCF7.....	29
3.1.2. Der ERK-Inhibitor SCH772984 hemmt die Zellviabilität stärker in TNBC-Zelllinien MDA-MB-231, HCC1937, HCC1806 als in der NTNBC-Zelllinie MCF7.....	30
3.1.3. Bestimmung der IC50-Werte für die Inhibitoren bei TNBC-Zelllinien und der NTNBC Zelllinie MCF7	31

3.1.4. Die Kombination beider Inhibitoren hemmte die Proliferation der TNBC-Zelllinien MDA-MB-231, HCC1937 und HCC1806 sowie der NTNBC-Zelllinie MCF7 verstärkt gegenüber den Einzelgaben.....	31
3.2. Einfluss des PD-1/PD-L1-Inhibitors 1 und des ERK-Inhibitors SCH772984 auf die Expression immunmodulatorischer und wachstumsregulierender Gene	33
3.2.1. Einfluss von PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und SCH772984 auf die Expression immunmodulatorischer Gene.....	33
3.2.2. Einfluss von PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und ERK-Inhibitor SCH772984 auf die Expression wachstumsregulierender Gene	37
3.3. Einfluss des PD-1/PD-L1-Inhibitors 1 und des ERK1/2-Inhibitors SCH772984 auf die Phosphorylierung von ERK, S6 und Stat3	40
3.4. Einfluss der Interferon (IFN)- γ -Behandlung auf die Phosphorylierung der Proteine ERK, S6, Stat3 und auf die Genexpression.....	42
4. Diskussion	44
5. Zusammenfassung	57
6. Literaturverzeichnis	59
7. Anhänge	69
8. Danksagungen	73
9. Lebenslauf.....	74

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure, engl.: <i>bicinchoninic acid</i>
BL	basaler Zelltyp-ähnlich, engl.: <i>basal-like</i>
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DPBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung, engl.: <i>Dulbecco´s phosphate-buffered saline</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	engl.: <i>enhanced chemiluminescence</i>
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor, engl.: <i>epidermal growth factor receptor</i>
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur, engl.: <i>European Medicines Agency</i>
ER	Östrogenrezeptor
FCS	fötale Kälberserum, engl.: <i>fetal calf serum</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GnRH	engl.: <i>gonadotropin-releasing hormone</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2	humaner epithelialer Wachstumsfaktor Rezeptor Typ-2, engl.: <i>human epithelial growth factor receptor-2</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase, engl.: <i>horseradish peroxidase</i>
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
LAR	luminaler Androgenrezeptor, engl.: <i>luminal androgen receptor</i>
MTS	engl.: <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt.</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, engl.: <i>major histocompatibility complex</i>
MMP	Magermilchpulver
MSL	mesenchymaler Zelltyp-ähnlich, engl.: <i>mesenchymal-like</i>
NCBI	engl.: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	natürliche Killerzellen
NSCLC	Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom, engl.: <i>non-small-cell lung carcinoma</i>
NTNBC	Nicht triple-negativer Brustkrebs, engl.: <i>non triple-negative breast cancer</i>
ORR	objektive Ansprechrage, engl.: <i>objective overall response rate</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PES	Phenazinethosulfat
PFS	Progressionsfreies Überleben, engl.: <i>progression free survival</i>
PR	Progesteronzezeptor

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCC	Nierenzellkarzinom, engl.: <i>renal cell carcinoma</i>
RIPA	engl.: <i>radio immunoprecipitation assay</i>
RPMI	engl.: <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RNA	Ribonukleinsäure
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, engl.: <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RT	reverse Transkriptase
SCCHN	Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses, engl.: <i>squamous cell cancer of head and neck</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>
TBS-T	engl.: <i>tris-buffered saline with tween 20</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor, engl.: <i>T-cell receptor</i>
TIL	tumorinfiltrierender Lymphozyt, engl.: <i>tumor infiltrating lymphocyte</i>
TNBC	triple-negativer Brustkrebs, engl.: <i>triple negative breast cancer</i>
TNM	Tumorgröße, Lymphknotenstatus (Nodus), Metastasen; Tumorklassifikation
T _{Reg}	regulatorischer T-Lymphozyt

1. Einleitung

1.1. Das Mammakarzinom

1.1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Mammakarzinom ist mit jährlich 2,1 Millionen Neuerkrankungen die häufigste Krebserkrankung der Frau weltweit [1]. Laut Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) betrug im Jahr 2018 der Anteil von Mammakarzinomen an krebisbedingten Todesfällen bei Frauen ca. 15 % [1]. In Deutschland ist theoretisch jede 8. Frau im Laufe ihres Lebens von Brustkrebs betroffen [2].

Normale Brustdrüsenzellen exprimieren Hormon- und Wachstumsfaktor-Rezeptoren in normaler Menge. Das Wachstum der Brustdrüsen unterliegt während der Pubertät, Schwangerschaften und Stillzeiten dem Einfluss von Hormonen und Wachstumsfaktoren [3] über die entsprechenden Rezeptoren. Bei vielen Brusttumoren werden der Östrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR) exprimiert sowie der humane epitheliale Wachstumsfaktor Rezeptor Typ-2 (*human epithelial growth factor receptor-2*, HER2) überexprimiert. Daraus resultieren prognostische und prädiktive Vorhersagen, die für die Strategie der Therapie von wichtiger Bedeutung sind. Wenn ER und PR nicht exprimiert sind und HER2 nicht überexprimiert ist, wird ein Mammakarzinom als triple-negativ bezeichnet [4]. 10 – 20 % der Brustkrebserkrankungen sind triple-negativ [5, 6]. Der triple-negative Brustkrebs (*triple negative breast cancer*, TNBC) hat eine hohe Inzidenz bei jungen Frauen [7] und Frauen mit afrikanischen Wurzeln in den USA [8].

Zu den Risikofaktoren für eine Brustkrebserkrankung zählen ein hohes Alter, eine frühe Menarche, eine späte Telarche, Nulliparität, der Lebensstil und genetische Faktoren [3, 9]. Studien belegen, dass u. a. Übergewicht nach den Wechseljahren und Alkoholkonsum das Risiko für Brustkrebs erhöhen [9]. Stillen scheint protektiv zu sein gegen die Entwicklung von Brustkrebs allgemein [10] und von TNBC insbesondere [11].

In 5 – 10 % aller Brustkrebserkrankungen liegt eine Mutation der Gene BRCA (*BR*east *C*ancer *g*ene) 1 oder 2 vor [4]. Frauen mit Mutationen in diesen Genen haben ein erhöhtes Lebensrisiko, an Brustkrebs und an Ovarialkarzinom zu erkranken [12-14]. BRCA 1 und 2 spielen eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur von DNA-

Doppelstrangbrüchen und sind bei Patientinnen mit positiver Familien-anamnese häufig mutiert [7].

1.1.2. Klassifikation

Brustkrebs wird in verschiedene Subtypen unterteilt. Rezeptorpositive und rezeptornegative Mammakarzinome (TNBC) werden unterschieden. Außerdem können Mammakarzinome in vier klinische Subtypen mit verschiedenen molekularen Eigenschaften eingeteilt werden (Tab. 1). Die Luminal A- und Luminal B-Subtypen sind über die Expression von Genen, die normalerweise aus luminalen Epithelzellen der Brustdrüse bekannt sind, definiert [15]. Tumoren vom Basalzell-ähnlichen Subtyp (*basal-like*, BL1 und BL2) besitzen Moleküle, die typischerweise in basalen Epithelzellen der Brustdrüse zu finden sind, wie Zytokeratine (z. B. CK5/7 und 17), Cadherine und der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) [16]. Die BL-Zellen weisen zu 80 % eine Mutation des Tumorsuppressors p53 und eine erhöhte Inzidenz bei BRCA1-Mutation auf [15]. HER2, der von dem Gen ERBB2 (*erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*) kodiert wird, ist in 20 – 30 % aller Brusttumoren überexprimiert [17]. Dies resultiert aus einer DNA-Amplifikation des chromosomalen Abschnitts mit dem Gen ERBB2 und charakterisiert den HER2-angereicherten-Subtyp [15].

Tab. 1: Rezeptorexpression der Tumore und klinisch definierte Brustkrebs-Subtypen. Tumore mit besonderen Rezeptorexpressionen verteilen sich auf verschiedene klinische Brustkrebssubtypen nach Angaben in The Cancer Genome Atlas Network, 2012 [15]. Die Kollaboration hat 466 Tumorgewebe von Brustkrebspatientinnen untersucht.

Rezeptorexpression	Subtypen			
	Luminal A	Luminal B	Basal like	HER2E
ER+/HER2-	87 %	82 %	10 %	20 %
HER2+	7 %	15 %	2 %	68 %
TNBC	2 %	1 %	80 %	9 %

rezeptorpositiv (+), rezeptornegativ (-), HER2E: *HER2-enriched*

Auch beim TNBC handelt es sich um eine heterogene Gruppe, die erstmals 2011 durch die Arbeitsgruppe von Lehmann in sechs molekulare Subtypen eingeteilt wurde [18]. Dieselbe Arbeitsgruppe nahm 2016 die Reklassifizierung der sechs Subtypen vor und

definierte vier Subtypen: zwei BL-Subtypen (BL1, BL2), ein mesenchymaler Subtyp (M) und ein Luminal-Androgenrezeptor (LAR)-Subtyp [19]. Tumorzellen vom BL1-Subtyp exprimieren verstärkt Gene, die an Zellproliferation und DNA-Reparatur beteiligt sind und sind sensibel gegenüber DNA-interkalierenden Chemotherapeutika wie Platin-haltigen Substanzen [4]. In BL2-Tumorzellen sind im Gegensatz nur Gene von Signalwegproteinen überexprimiert, die durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden können [4]. Beide Subtypen sind aggressiv wachsend mit hohem Proliferationsindex, gemessen anhand der Ki-67-Expression [18]. Die Namensgebung des mesenchymalen Subtyps (M) beruht auf dem Nachweis von Genen, die für die Umwandlung von epithelialen in mesenchymale Zellen verantwortlich sind [19]. Diese epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ermöglicht die Metastasierung [20]. Die neunfache Überexpression von Androgen-rezeptoren im Vergleich zu anderen TNBC ist charakteristisch für den LAR-Subtyp und prädiktiv für eine endokrine Therapie mit Androgenrezeptorhemmern [18].

1.1.3. Prädiktion und Prognose des Mammakarzinoms

Eine chirurgische Therapie, Chemotherapie (adjuvant oder neoadjuvant), Bestrahlung sowie Hormon- und Antikörpertherapien stellen die wichtigsten Säulen der Behandlung des Mammakarzinoms dar. Bei der Therapieplanung wird das vom Pathologen bestimmte TNM-Stadium, das Tumorgroße, Lymphknotenstatus und Metastasierung beschreibt, berücksichtigt. Zusätzlich ist die histologische Differenzierung der Zellen im Vergleich zum gesunden Ursprungsgewebe (Grading), der Hormonrezeptor- und der HER2-Status entscheidend. Einfluss haben ebenfalls der Menopausenstatus, die Familienanamnese, der Allgemeinzustand der Patientin und nicht zuletzt ihr Therapiewunsch.

Bei einer lokal begrenzten Primärerkrankung steht ein kurativer Therapieansatz mit einer operativen Brust-erhaltenden Therapie mit Bestrahlung oder einer Mastektomie bei Bestrahlungs-Kontraindikationen im Vordergrund. Dabei werden histopathologisch resektionsfreie Tumorränder angestrebt. Für inflammatorische, lokal fortgeschrittene oder primär inoperable Tumoren ist die primäre (neoadjuvante) Chemotherapie mit Anthrazyklin und Taxan die Therapie der ersten Wahl. Eine zusätzliche Antikörpertherapie mit einem monoklonalen Antikörper gegen HER2 (Trastuzumab) für ein Jahr ist bei HER2-positiven Tumoren empfohlen [21]. In der

Regel erfolgt eine adjuvante Östrogenrezeptor-gerichtete Therapie bei ER-positiven Mammakarzinomen. Hier wird bei der Auswahl der Präparate der Menopausenstatus der Patientinnen berücksichtigt. Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Analoga werden zur Suppression der Hormonproduktion in den Ovarien bei prämenopausalen Frauen verordnet und Aromatase-Inhibitoren bevorzugt postmenopausal eingesetzt [21]. Der selektive Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen kann sowohl prä- als auch postmenopausal eingesetzt werden.

Zahlreiche Mammakarzinome zeigen einen signifikanten und klinisch relevanten Hormonrezeptorstatuswechsel zwischen Primärtumor und Rezidiven oder Metastasen [22, 23]. Beispielsweise zeigten Liedtke und Mitarbeiter in einer Studie an Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom, dass in 24 % der Fälle die Metastasen einen anderen Rezeptorstatus hatten als der Primärtumor: 10 % wechselten von triple-negativ zu nicht triple-negativ und 14 % umgekehrt [22]. Außerdem beobachteten die Autoren bei Patientinnen mit wechselndem Rezeptorstatus eine vergleichbar schlechtere Überlebensrate nach Rezidiv gegenüber Patientinnen mit unverändertem TNBC. Es ist also entscheidend, bei Rezidiven oder metastatischen Absiedlungen den Tumorphänotyp (Rezeptorstatus) neu zu bestimmen [24]. Aufgrund der Möglichkeit eines wechselnden Rezeptorstatus müssen Rezidive oder Metastasen als systemische Primärerkrankung gewertet werden und bedürfen oft systemischer Therapieansätze. Diese setzen sich aus Chemotherapie, Bestrahlung und ggf. Antikörper- oder hormoneller Therapie zusammen. Beim Rezidiv und je nach Lokalisation und Anzahl der Metastasen wird außerdem eine Resektion der Herde angestrebt.

Das TNBC ist mit erhöhten Rezidiv-Raten und bei Metastasierung mit einem verringerten Gesamtüberleben assoziiert [25]. Aktuell ist eine systemische Chemotherapie die wichtigste kurative Therapieoption beim frühen TNBC. Eine systemische neoadjuvante Chemotherapie hat sich als sinnvoll bei Patientinnen mit TNBC erwiesen und eine Verbesserung der Überlebensrate auf das Niveau von anderen Brustkrebssubtypen erbracht [4, 21, 26]. Trotzdem kommt es bei TNBC zu einer signifikant höheren Rezidivrate innerhalb der ersten drei Jahre nach der Behandlung [27]. Die Behandlung mit Platinsalzen erhöht unabhängig vom BRCA-Status die Komplettremission, allerdings ohne nachgewiesenem Überlebensvorteil [21]. Der humanisierte monoklonale Antikörper Bevacizumab richtet sich gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF)

und hemmt die Angiogenese. Er kommt bei einer fortgeschrittenen und metastasierten Brustkrebserkrankung zum Einsatz [4, 21].

Patientinnen mit TNBC haben im Vergleich zu NTNBC-Patientinnen eine schlechtere Gesamt- und krankheitsspezifische Überlebenszeit [28]. Während die Hormonrezeptorpositiven und HER2-positiven Entitäten weitere therapeutische Möglichkeiten durch die medikamentöse Ansteuerung dieser Rezeptoren bieten, sind derzeit für das TNBC keine Therapieansätze in Ergänzung zur Chemotherapie vorhanden. Dies trägt zum geringeren Gesamtüberleben bei TNBC-Patientinnen bei.

1.2. Der MAP-Kinase/ERK-Signalweg

Die Mitogen-aktivierte Protein (MAP, *mitogen-activated protein*)-Kinase-Signalwege sind intrazelluläre Signalkaskaden, die über konsekutive Phosphorylierungen von Signaltransduktionsproteinen viele Prozesse in der Zelle beeinflussen. Es kommen hauptsächlich drei Signalkaskaden vor, wobei der klassische Signalweg über die MAP-Kinase (MAPK) zur extrazellulären Signal-regulierten Kinase (ERK, *extracellular-signal-regulated-kinase*) geleitet wird und beim Brustkrebs im Vordergrund steht [29]. Dieser RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg, der auch MAPK/ERK-Signalweg heisst, wird durch die Bindung von Wachstumsfaktoren, Integrinen und Zytokinen an ihre entsprechenden Rezeptoren [30], aber auch von Steroiden (Estradiol, Progesteron und Testosteron) über membranäre Reaktionen [29] aktiviert. Der MAPK/ERK-Signalweg reguliert die Zellproliferation und -migration sowie die Angiogenese [31]. Die in Abbildung 1 beschriebene Kaskade besteht aus dem Guanosin-Triphosphat (GTP)-bindenden Protein Ras, der MAPK-Kinase-Kinase Raf (MAPKKK, eine Seronin/Threonin-Kinase mit 3 Isoformen: A-Raf, B-Raf und Raf-1), der MAPK-Kinase-Kinase (MAPKK, MEK1/2), sowohl Tyrosin als auch Seronin/Threonin-Kinase und den MAPK ERK1/2 [30, 32]. Der MAPK/ERK-Signalweg wird typischerweise durch einen Liganden auf der Zelloberfläche initiiert und durch eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase am intrazellulären Teil des Rezeptors weitergeleitet. Wichtige Vertreter dieser Rezeptoren sind der EGFR und der VEGF-Rezeptor (VEGFR) [31]. Mit epidermale Wachstumfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) aktivierte EGFR Monomere dimerisieren und autophosphorylieren sich an den C-terminalen Enden des Rezeptormoleküls [33]. Anschließend bindet sich GRB2, ein Adaptorprotein, über seine Src-Homologie 2 (*Src homology 2*, SH2)-Domäne an den Phosphotyrosinrest

des EGFR und beginnt über seine beiden Src-Homologie 3-Domänen eine Wechselwirkung mit Sos [33]. Sos bindet wiederum an das an der Zellmembran verankerte G-Protein Ras und bewirkt dessen Aktivierung durch Austausch von Guanosin-Diphosphat (GDP) mit Guanosin-Triphosphat (GTP) [31, 33]. Ras ändert dabei seine Konformation und bindet die Proteinkinase Raf [33]. Dieser Ras-Raf-Komplex führt zu einer Strukturänderung und Aktivierung von Raf [31]. Dabei bindet Raf ein GTP-Molekül [33]. Über weitere Phosphorylierungs-vorgänge aktiviert Raf-GTP MEK1/2 und Phospho-MEK1/2 dann ERK1/2. Phosphoryliertes ERK1/2 transloziert in den Zellkern und aktiviert c-Fos, c-Jun und c-Myc. Diese Transkriptionsfaktoren binden chromosomale Promotoren und bewirken die Transkription von Genen, die unter anderem zur Proliferation und zum Überleben der Zielzelle führen können. ERK1/2 aktiviert außerdem die ribosomale S6-Kinase und dadurch den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element binding protein*, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat). Indirekt kann auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B (nukleärer Faktor κ B) von ERK1/2 aktiviert werden [30]. Die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalweges ist in der Tumorgenese in mehr als 30 % der Fälle involviert [34].

Nur wenige Literaturhinweise finden sich über den Einfluss eines spezifischen ERK-Inhibitors auf Brustkrebszellen. Chen und Mitarbeiter zeigten, dass ein dualer Inhibitor spezifisch gegen Raf/ERK eine zytotoxische und apoptotische Wirkung auf TNBC-Zellen ausüben konnte, wenn das Hitzeschockprotein HSP90 als Mediator fungierte [35]. In der Arbeit von Liu und Mitarbeitern wurde BL-EI001, ein ERK-Inhibitor mit einer antiproliferativen und proapoptischen Wirkung auf Brustkrebszelllinien als vielversprechendes „small molecule drug“-Therapeutikum beschrieben [36].

Deutlich häufiger sind Inhibitoren erwähnt, die in der MAPK/ERK-Signalkaskade oberhalb von ERK die Proliferation von Brustkrebszellen hemmen. Die Hemmung von MEK1/2 zeigt z. B. gute Ergebnisse in verschiedenen Krebsarten, aber oft eine Resistenzentwicklung nach Therapie [37]. Diese Resistenz wird u. a. auf die Wechselwirkung mehrerer Signalwege zurückgeführt. Die Annahme wird dadurch bestätigt, dass resistente Zellen unter einer ERK-Blockade wieder auf MEK-Inhibitoren ansprechen [34, 38].

SCH772984 ist ein selektiver, mit ATP (Adenosintriphosphat) konkurrierender ERK-Inhibitor, der ebenfalls die Phosphorylierung der ribosomalen S6-Kinase p90 dosisabhängig hemmt. P90 phosphoryliert das ribosomale Protein S6. S6 ist Teil der

kleinen 40S-Untereinheit in Ribosomen und reguliert im aktiven Zustand die Proteinbiosynthese und die Zellproliferation [39].

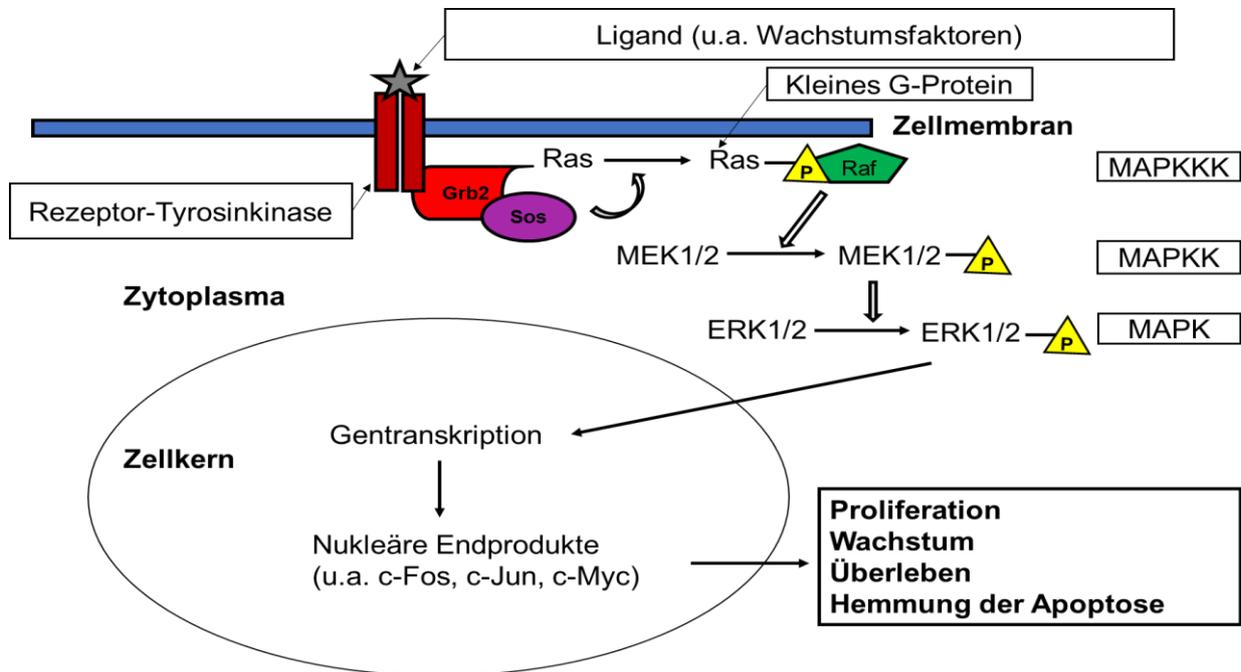


Abb. 1: Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade. Wachstumsfaktoren initiieren die Aktivierung von Ras und die konsekutive Phosphorylierung der Kinasen Raf, MEK1/2 und ERK1/2. Phospho-ERK1/2 reguliert die Transkription von Genen wie c-Fos, c-Jun, c-Myc. Daraus resultiert die Synthese von Proteinen, die Proliferation, Wachstum und Überleben von Zellen fördern sowie Apoptose hemmen.

Abk. und Gennamen: Grb2: engl.: *growth factor receptor-bound protein 2*, Sos: engl.: *son of sevenless*, Ras: engl.: *rat sarcoma*; Raf: engl.: *rapidly accelared fibrosarcoma*, p: phospho-, GTP: Guanosin-Triphosphat, MAPKKK: engl.: *mitogen-activated-protein-Kinase-Kinase-Kinase*, MAPKK: engl.: *mitogen-activated-protein-kinase-kinase*, MAPK: engl.: *mitogen-activated-protein*, ERK: engl.: *extracellular-signal-regulated-kinase*. Abb. erstellt nach McCubrey und Kollegen und Friday und Adjei [30, 31].

Studien von Chen, Liu und Kollegen zeigten die zytotoxische bzw. wachstumshemmende Wirkung einer MAPK/ERK-Signalweg-Blockade beim Brustkrebs [34-36, 38]. Insbesondere in TNBC wurde der Einfluss von ERK-Inhibitoren auf wachstumsspezifische Gene sowie assoziierte Proteine anderer an der Tumorgenese beteiligten Signalwege bisher nicht untersucht.

1.3. Der Programmed-Cell-Death-Protein-1 (PD-1)-Rezeptor Signalweg

PD-1 ist ein transmembranärer Rezeptor, auch als Immuncheckpoint bekannt und wird auf Immunzellen wie T-, B- und natürlichen Killer-Zellen (NK) exprimiert [40]. Der Rezeptor hat zwei Liganden: PD-L1 (*programmed cell death protein ligand 1*) und PD-L2. PD-L2 wurde nur auf aktivierten dendritischen Zellen, Makrophagen, Knochenmark-Mastzellen und in mehr als 50 % der peritonealen B1-Zellen nachgewiesen [41]. PD-L1 wird in Plazenta-Zellen, Endothelzellen von Blutgefäßen, mesenchymalen Stammzellen, Epithel- und Immunzellen exprimiert [42]. Auch Antigen-präsentierende Zellen (*antigen presenting cell*, APC) exprimieren PD-L1 [41]. PD-L1 ist verstärkt in zahlreichen Tumorzellen nachzuweisen und wird als Reaktion auf proinflammatorische Signale exprimiert [43]. Auch beim Brustkrebs wird PD-L1 verstärkt exprimiert, vor allem, wenn eine schlechte Prognose mit großem Tumor, hoher histologischer Entdifferenzierung (Tumor-Grading), hoher Proliferationsrate, ER-Negativität und HER2-Positivität oder ein TNBC vorliegt [44, 45]. PD-L1 wird bei ca. 20 - 30 % aller TNBC nachgewiesen [43].

PD-L1 ist an der Hemmung der Immunantwort beteiligt. Normalerweise wird durch die Überexpression von PD-L1 in der Mukosa im Rahmen einer chronischen Infektion das gesunde Gewebe vor Autoimmunreaktionen geschützt [42]. Der PD-1/PD-L1-Signalweg spielt ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und dem Erhalt von allogenen Transplantaten [41].

Die PD-L1-Expression wird je nach Krebsart durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen. In einigen Lymphomen und gelegentlich im Lungenkrebs z. B. wird der ALK (*anaplastic lymphoma kinase*)-Signalweg über die Aktivierung des Stat3 (*signal transducer and activator of transcription 3*)-Signalweges für die Überexpression von PD-L1 verantwortlich gemacht, während Glioblastome PD-L1 aufgrund aberranter genetischer Signalwege oder Onkogene exprimieren [46]. Die Überexpression von PD-L1 ist mit tumorinfiltrierenden Lymphozyten (*tumor infiltrating lymphocytes*, TILs) in der Tumorumgebung assoziiert und korreliert mit dem Tumor-Grading [47]. Nach dem Modell der adaptiven Immunität wird PD-L1 erst in Anwesenheit von TILs exprimiert [48]. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 2 gezeigt. TILs exprimieren PD-1 und den T-Zell-Rezeptor (TCR) auf ihrer Zelloberfläche. Durch die Entzündung in der Tumorumgebung werden TILs angelockt und erkennen über den TCR die Tumorantigene, die vom MHC (*major histocompatibility complex*) präsentiert

werden. Als Folge wird das Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) sezerniert, das zur Expression von PD-L1 durch die Tumorzellen führt. PD-L1 bindet dann den Rezeptor PD-1 und hemmt die Aktivität der T-Lymphozyten. Dies führt zu einer Proliferation von regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}), die den Tumor infiltrieren und die Immunantwort unterdrücken [49]. So können die Tumorzellen dem Immunsystem entkommen (Tumor-Escape-Mechanismus).

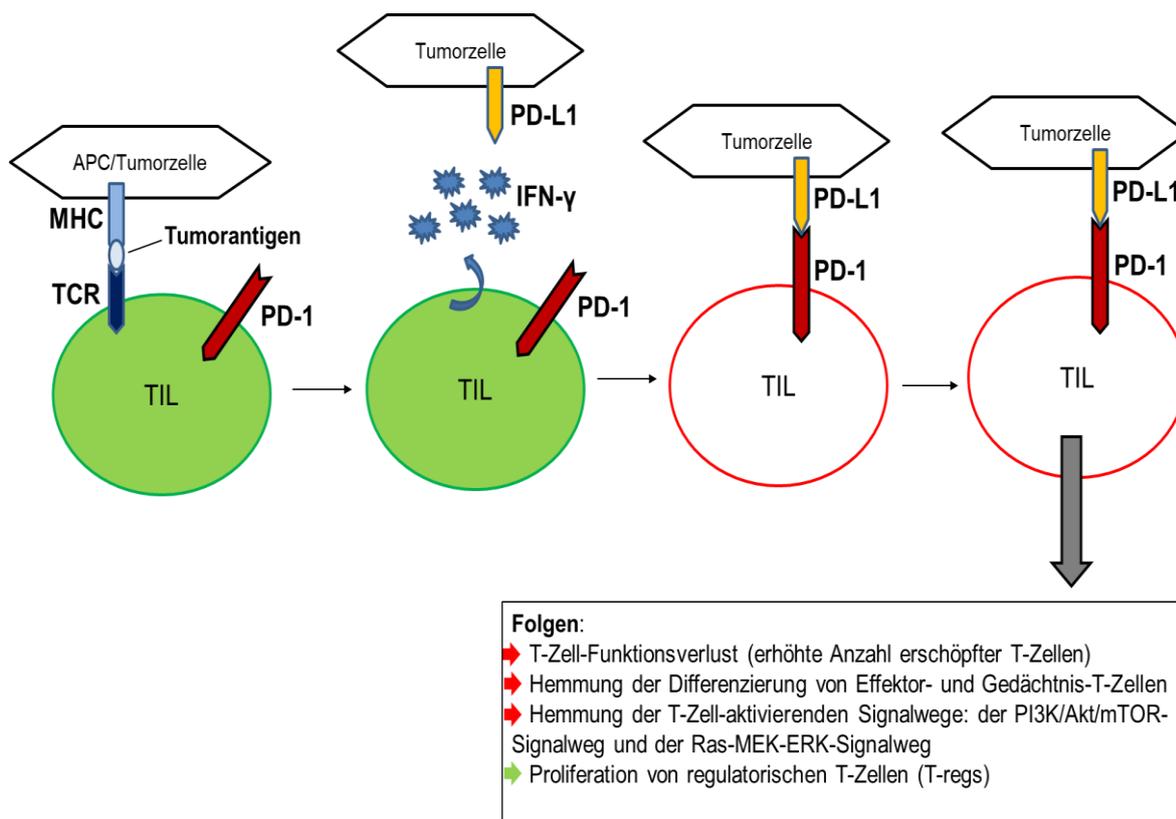


Abb. 2: Modell der adaptiven Immunität von Tumorzellen über den PD-1/PD-L1-Signalweg und die Folgen der PD-1/PD-L1-Interaktion auf T-Zell-aktivierende Signalwege. Bei gleichzeitiger PD-L1-Bindung an PD-1 und Antigenpräsentation durch den MHC auf APCs oder Tumorzellen wird IFN- γ durch die TILs sezerniert und bewirkt die Expression von PD-L1 in Tumorzellen. Die Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 führt zur Hemmung der T-Zellfunktionen und der TCR-vermittelten PI3K/Akt- und Ras/MEK/ERK-Signalkaskade. Abk.: APC: Antigen-präsentierende Zellen; IFN- γ : Interferon- γ ; MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex; TILs: Tumor-infiltrierende Lymphozyten; T_{Reg} : regulatorische T-Zellen Vereinfachte und modifizierte Darstellung nach Bardhan und Mitarbeitern (2016) [41] und Chen und Han (2015) [48].

Wenn PD-L1 von Tumorzellen oder APCs den PD-1-Rezeptor auf T-Lymphozyten binden, werden Signalwege beeinflusst, die Interaktionen über den MHC zum T-Zell-Rezeptor übermitteln. Der Phosphatidylinositol 3-kinase/Protein Kinase B (PI3K/Akt)-Signalweg reguliert unter anderem den Zellzyklus. Der aktivierte PD-1-Rezeptor aktiviert die Phosphatasefunktion des Enzyms PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), bewirkt die Dephosphorylierung vom Signalmolekül PI3K und in Folge dessen werden Akt und ihre Substrate mTOR und S6 dephosphoryliert [50]. Zusätzlich unterdrückt der aktivierte PD-1-Rezeptor die Kalzium- und DAG (*Diacalglycerol*)-vermittelte Aktivierung des Ras/MEK/ERK-Signalweges [41]. Die Konsequenz ist eine schlechte Stoffwechsellage in den T-Zellen. Daraus resultiert die Beeinträchtigung der Differenzierung von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen bei erhöhter Anzahl von T_{Reg} sowie ein vermehrter T-Zell-Funktionsverlust (erschöpfte T-Zellen), da beide Signalwege für die Aktivierung von T-Lymphozyten erforderlich sind [41].

Der Immuncheckpoint PD-1 wird durch die Bindung seines Liganden PD-L1 vermehrt aktiviert und kann über seine antiinflammatorische Wirkung die Tumorgenese fördern. Sowohl die verstärkte Expression von PD-L1 in Tumoren als auch der antitumoröse Effekt von Inhibitoren des PD-1/PD-L1-Signalweges wurden in zahlreichen klinischen Studien belegt. Mittlerweile kommen die Immuncheckpointinhibitoren in der leitliniengerechten Therapie einiger Krebserkrankungen wie z. B. beim malignen Melanom und beim kleinzelligen Lungenkarzinom zum Einsatz.

1.4. Der Einsatz von PD-1- und PD-L1-Inhibitoren in der Krebstherapie

PD-1 wurde 1992 von der Arbeitsgruppe um Tasuku Honjo [51] erstmals beschrieben und seitdem wurde das Protein und der assoziierte Signalweg untersucht. Dies führte zur Entwicklung von Hemmstoffen sowohl von PD-1 als auch vom Liganden PD-L1. Sowohl die verstärkte Expression von PD-L1 in Tumoren als auch der antitumorale Effekt von Inhibitoren des PD-1/PD-L1-Signalweges wurden in zahlreichen klinischen Studien belegt. Bereits 2010 zeigte eine Phase I-Studie die antitumoralen Effekte vom monoklonalen PD-1-Antikörper Nivolumab (humaner Immunoglobulin IgG4) auf einer Anzahl verschiedener therapierefraktären Tumorerkrankungen, wie beispielsweise dem nichtkleinzelligen Lungenkarzinom (*non-small-cell lung carcinoma*, NSCLC) oder dem Nierenzellkarzinom (*renal cell carcinoma*, RCC) [52]. Mittlerweile haben sich PD-1-/PD-L1-Inhibitoren in der Therapie verschiedener Krebsarten bei fortgeschrittener

Erkrankung und Metastasierung etabliert. Für seine Entdeckung von PD-1 und PD-L1 und die Erkenntnisse seiner Forschung wurde Prof. Honjo 2018 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

1.4.1. Die PD-1-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab

Als erster Antikörper gegen den PD-1/PD-L1-Signalweg wurde in den USA 2014 der gegen humanes Immunglobulin G4 gerichtete, monoklonale Anti-PD-1-Antikörper Nivolumab zur Therapie des nicht resektablen, metastasierten malignen Melanoms zugelassen. Eine weitere Zulassung erfolgte für einen weiteren Immuncheckpoint-inhibitor Ipilimumab (zytotoxisches T-Lymphozytenantigen-4, CTLA4-Inhibitor) bei Tumorprogress [52]. Die Entwicklung von Ipilimumab basiert auf der Arbeit von James P. Allison, der die Aktivitätshemmung von zytotoxischen T-Zellen durch den T-Zell-Rezeptor CTLA-4 feststellte [53] sowie eine ausgeprägte Immunantwort bei Patienten mit malignem Melanom durch ein CTLA-4-Antikörper [54]. Damit legte auch Prof. Allison einen wichtigen Meilenstein einer neuen Herangehensweise bei der Bekämpfung von Krebserkrankungen: Krebstherapie durch die Verbesserung des Immunsystems. Dafür wurde auch ihm der Nobelpreis für Medizin 2018 verliehen.

Die Indikation für Nivolumab wurde 2017 auf Patienten mit einer BRAF-V600-Mutation, die 90 % der Mutationen des Protoonkogens B-Raf ausmacht [55], erweitert [56]. Patienten mit NSCLC und Krankheitsprogress trotz Platin-basierter Chemotherapie zeigten in einer Studie ein Gesamtüberlebensvorteil von mehr als 3,2 Monaten unter Nivolumab im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie mit Docetaxel [57], sodass basierend auf diesen Daten Nivolumab für das lokal fortgeschrittene oder metastasierte NSCLC nach vorheriger Chemotherapie zugelassen wurde. Es folgten weitere Empfehlungen für den Einsatz von Nivolumab beim Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich (*squamous cell cancer of head and neck*, SCCHN), beim lokal fortgeschrittenen, nicht resezierbaren oder metastasierten RCC sowie beim Urothelkarzinom [57]. Pembrolizumab, ein weiterer humanisierter monoklonaler Antikörper gegen PD-1, ist bei der Erstlinientherapie von Melanomen seit 2015 im nicht resezierbaren oder metastasierten Zustand [52] angezeigt. Der Antikörper wird ferner bei NSCLC auf PD-L1-exprimierenden Tumoren, beim nicht-squamösen NSCLC in Kombination mit dem Folsäureanalogon Pemetrexed und Platinderivaten sowie bei SCCHN und Urothelkarzinom eingesetzt [59].

Mittlerweile sind Nivolumab und Pembrolizumab auch beim klassischen Hodgkin-Lymphom zugelassen [59].

1.4.2. Die PD-L1-Inhibitoren Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab

Atezolizumab ist ein humanisierter Antikörper (IgG1k) gegen PD-L1, der erstmals 2016 in den USA für die Behandlung des lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Urothelkarzinoms und NSCLC zugelassen wurde. Durvalumab (humaner IgG1-Antikörper) kommt ebenfalls beim Urothelkarzinom und beim NSCLC zum Einsatz. 2017 erfolgte die Zulassung von Avelumab (humaner IgG1-Antikörper) zur Therapie des Merkelzellkarzinoms, einem aggressiven Hauttumor.

1.4.3. PD-1/PD-L1-Inhibitoren im Brustkrebs

Klinische Studien zu den Effekten verschiedener PD-1/PD-L1-Inhibitoren einzeln und in Kombination werden bei Brustkrebs und insbesondere im TNBC aktuell durchgeführt [60]. Nanda und Kollegen konnten beispielsweise bei Patientinnen mit TNBC, die PD-L1 im Stroma oder in mindestens 1 % der Tumorzellen aufwiesen, eine Gesamtansprechrate von 18,5 % unter Pembrolizumab nachweisen [43]. Des Weiteren zeigte Pembrolizumab bei kombinierter Gabe mit Trastuzumab eine antitumorale Wirkung und klinisch dauerhaften Nutzen bei Patienten mit PD-L1- und HER2-positivem, Trastuzumab-resistentem Brustkrebs im fortgeschrittenen Stadium [61]. Auch für Atezolizumab wurde eine Ansprechrate von 10 % bei TNBC-Patienten in einer Phase Ia-Studie festgestellt [62]. In einer Studie an 902 Patientinnen mit TNBC zeigten Schmidt und Kollegen einen Überlebensvorteil durch eine simultane Therapie mit Atezolizumab und nab (*nanoparticle albumin bound*, Nanopartikel-Albumin-gebundenes)-Paclitaxel gegenüber einer alleinigen nab-Paclitaxel-Therapie [63]. Das mediane Gesamtüberleben betrug bei einer Atezolizumab-nab-Paclitaxel-Therapie 25 Monate gegen 18 Monate in der Placebo-Gruppe und das progressionsfreie Überleben war analog 7,4 vs. 4,8 Monate [63]. Basierend auf den Ergebnissen dieser internationalen Studie wurde 2019 in den USA und in der europäischen Union Atezolizumab für die Therapie von nicht resektablem, lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem TNBC und zwar bei PD-L1-positiven Tumoren (Nachweis einer PD-L1-Expression $\geq 1\%$ auf den Immunzellen in der Tumorprobe [64]) zugelassen.

Aus zahlreichen klinischen Studien berichten Solinas und Kollegen über das Ansprechen, auch wenn unterschiedlich gut, von Patienten auf eine Therapie mit PD-1/PD-L1-Antikörpern allein oder in Kombination mit anderen bereits erprobten Therapeutika in Brustkrebs und insbesondere TNBC [65]. Es stellt sich jedoch die Frage, wie diese Antikörper in den Tumorzellen wirken und ob die Wirkunterschiede zwischen TNBC und NTNBC auf unterschiedliche Proteinaktivierung und/oder Genexpression durch die PD-1/PD-L1-Blockade zurückzuführen sind.

1.5. Fragestellung

Die Hemmung vom PD-1/PD-L1- und dem MAPK/ERK-Signalweg bei Brustkrebs wurde in zahlreichen Studien einzeln erforscht, aber die Kombination beider Inhibitoren noch nicht. PD-L1 ist auf Brustkrebszellen und besonders häufig auf TNBC-Zellen exprimiert [43, 44]. Die Interaktion zwischen dem auf Tumorzelloberflächen exprimierten PD-L1 und dem PD-1 auf T-Lymphozyten aktiviert viele Signalkaskaden, die zur Hemmung der T-Zell-vermittelten Immunreaktion führen. Ein wichtiger Signalweg, der dabei gehemmt wird, ist der klassische MAPK/ERK-Signalweg. Dieser ist in Wachstum, Differenzierung und Überleben involviert. Eine duale Blockade der PD-1/PD-L1-Interaktion und der Signalmoleküle ERK1/2 könnte zu einer Wachstumshemmung der Tumorzellen bei gleichzeitig verbesserter Immunantwort durch die Aktivierung von T-Lymphozyten führen. Die hier beschriebenen Untersuchungen sollen zu der Einschätzung beitragen, ob die gleichzeitige Blockierung von Immuncheckpoint und MAPK-Kinasen ein neuer möglicher Therapieansatz für das TNBC sein könnte.

Im experimentellen Teil dieser Arbeit sollten folgende Punkte untersucht werden:

- Wirken die Behandlungen mit PD-1/PD-L1- oder ERK1/2-Inhibitoren unterschiedlich auf TNBC- und NTNBC-Zelllinien?
- Führt eine kombinierte Behandlung mit beiden Inhibitoren zu synergistischen Effekten in den verschiedenen Zelllinien?
- Interagieren die Inhibitoren bei der Regulation der MAPK/ERK und PD-1/PD-L1-Signalwege?
- Wird die Expression wachstumsspezifischer und immunmodulatorischer Gene durch beide Inhibitoren beeinflusst und gibt es dabei Unterschiede zwischen TNBC- und NTNBC-Zelllinien?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien

Name der Zelllinie	Charakteristika	Bezugsquelle
MDA-MB-231	TNBC, MSL	LGC Standards, Wesel
HCC1937	TNBC, BL-1	
HCC1806	TNBC, BL-2	
MCF7	NTNBC, ER+, PR-, HER2+	

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Zellkulturflaschen (T-25, T-75, T-175)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturpipetten (5, 10, 25 ml), Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Glaspipetten	Assistent, Sondheim
Zentrifugenröhrchen (Plastik, 50 ml, 15 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zweifach-Zellzählkammer	Biorad, München
Gewebekulturplatte 6, 96-well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Biochrom AG, Berlin
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Filtertips/Tips für Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (Safe Lock Tubes) (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Kryogefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3. Laborgeräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
Kühlzentrifuge Biofuge Fresco Heraeus	Thermofisher Scientific, Schwerte
Mikrozentrifuge Rotilabo®	Roth, Karlsruhe
Zentrifuge für Zellkultur Universal 32	Hettich, Tuttlingen
Absaugpumpe Gel Pump GP110	Savant, New York, USA
CO ₂ -Inkubator NUAIRE US-Autoflow NU440-400E	Integra Biosciences, Fernwald
Sterile Sicherheitswerkbank NUAIRE NU440-400E	Integra Biosciences, Fernwald
Wasserbad	Memmert, Lübeck
Mikroskop (Wilovert A)	Hund, Wetzlar

Elektronische Pipette Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg
Variable Einkanalpipetten Eppendorf Research (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1.000 µl)	Eppendorf, Hamburg
TC20™ automatisierter Zellzähler	Biorad, München
Mikrotiterplatten Spektralphotometer Epoch	Biotek Instruments, Bad Friedrichshall
Laborwaage Sartorius basic BA310S	Sartorius AG, Göttingen
Magnetrührer MR82	Heidolph Instruments, Schwabach
Stromgeber PowerPac 200	Biorad, München
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Biorad, München
Wippschüttler Mini-Rocker-Shaker (MR-1)	Kisker Biotech, Steinfurt
Schüttler Titramax 100	Heidolph, Schwabach
Spektralphotometer NanoDrop 2000C	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Vortex-Genie2	Roth, Karlsruhe
PCR-Maschine Biometra Thermocycler TPersonal 48	Biometra, Göttingen
Realtime-PCR-Maschine: DNA Engine Opticon 2	Biorad, München
Chemidoc Imaging System	Biorad, München

2.1.4. Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Bezugsquelle
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (0,05 %)	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Trypan Blau Lösung (0,4 % w/v)	Sigma-Aldrich, München
CellTiter-96®-Aqueous-One-Solution-Reagent für MTS-Assay	Promega, Mannheim
2-Mercaptoethanol	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Entionisiertes Wasser	Universität zu Lübeck
Methanol	Baker Chemikalien, Groß-Gerau
Tween 20	Merck, Darmstadt
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	
Milchpulver (Blotting Grade)	
Bovine Serum Albumine (BSA)	Serva Electrophoresis, Heidelberg

2.1.5. Substanzen für die Zellkultur

Bezeichnung	Bezugsquelle
PD-1/PD-L1-Inhibitor 1	Selleckchem, München
ERK1/2-Inhibitor (SCH772984)	Selleckchem, München
Interferon- γ	Sigma-Aldrich, München

2.1.6. Zellkulturmedien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Medium RPMI 1640, 25 mM HEPES, L-Glutamin	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Dulbecco's phosphate buffered saline) (DPBS)	
Penicillin/Streptomycin (P/S) Konzentration: 10.000 U/ml/10 mg/ml in 0,9 % NaCl	

2.1.7. Lösungen und Puffer zur Proteinisolierung

Bezeichnung	Bezugsquelle
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich, München
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, München

Bezeichnung	Zusammensetzung
RIPA Puffer	PBS (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) 0,1 % SDS (Roth, Karlsruhe) 1 % Igepal, 0,5 % Natrium Deoxycholat (Sigma-Aldrich, München)

2.1.8. Lösungen und Puffer für Westernblots

Bezeichnung	Zusammensetzung
4x Laemmli Puffer (Biorad, München)	277,8 mM Tris-HCl, pH 6,8, 44,4 % Glycerol, 4,4 % Lithiumdodecylsulfat, 0,02 % Bromphenolblau, 355 mM 2-Mercaptoethanol
Elektrophorese Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (3,5 mM) SDS, entionisiertes H ₂ O, pH 8,3
Transferpuffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375 % SDS, 20 % Ethanol, entionisiertes H ₂ O
Blockierungslösungen	5 % Milchpulver in TBS-T, 5 % BSA in TBS-T
TBS-T Waschpuffer	10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, entionisiertes H ₂ O, pH 7,4

2.1.9. Zubehör für Westernblots

Bezeichnung	Bezugsquelle
BCA™ „Protein Assay Kit“	Thermofisher Scientific, Schwerte
Filterpapier	Biorad, München
Mini-Protean® Tetra Cell Gelkammer	Biorad, München
Mini Protean TGX Stain-Free Precast Gele	
Precision Plus Protein, Dual Color Standard	
Polyvinylidenfluorid-(PVDF-)Membran	Carl Roth, Karlsruhe
Clarity Max™ Western ECL Substrate	Biorad, München
10x ReBlot Plus Strong (Antibody-Stripping-Solution)	Merck, Darmstadt

2.1.10. Zubehör zur RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Bezeichnung	Bezugsquelle
NucleoSpin® RNA Plus Kit	Macherey-Nagel, Düren
dNTP Mix	Thermofisher Scientific, Schwerte
96-Loch Multiply®-PCR Platte	Sarstedt, Nümbrecht
Random Primer	Thermofisher Scientific, Schwerte
SuperScript™ II reverse Transkriptase (enthält 5x First Strand Buffer, 0,1 M DTT)	Thermofisher Scientific, Schwerte
Ultra Pure™ Destilliertes Wasser (DNase, RNase frei)	Thermofisher Scientific, Schwerte
GoTaq® qPCR Mastermix	Promega, Mannheim
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.11. Verwendete Primer für die quantitative Real-Time-PCR

Gen	Basensequenz Forward Sequenz (for) 5'→3' Reverse Sequenz (rev) 5'→3'	Amplikonlänge (bp)
CDK5	CDK5_for: GGAAGGCACCTACGGAAGT CDK5_rev: GGCACACCCTCATCATCGT	102
PD-L1	PDL-1_for: GGACAAGCAGTGACCATCAAG PDL-1_rev: CCCAGAATTACCAAGTGAGTCCT	235
CXCL1	CXCL1_for: AGGGAATTCACCCCAAGAAC CXCL1_rev: TAACTATGGGGGATGCAGGA	132
IL-8	IL8_for: ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC IL8_rev: AACCTCTGCACCCAGTTTTTC	112
CXCR2	CXCR2_for: CCTGTCTTACTTTTCCGAAGGAC CXCR2_rev: TTGCTGTATTGTTGCCCATGT	82
IL-6	IL-6_for: ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG IL6_rev: CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG	149

NOTCH1	NOTCH1_for: TGGACCAGATTGGGGAGTTC NOTCH1_rev: GCACACTCGTCTGTGTTGAC	82
c-FOS	c-FOS_for: GAGATTGCCAACCTGCTGAA c-FOS_rev: AGACGAAGGAAGACGTGTAA	484
FOSL1	FosL1_for: CAGGCGGAGACTGACAAACTG FosL1_rev: TCCTTCCGGGATTTTGCAGAT	132
VEGF-C	VEGF-C_for: GGCTGGCAACATAACAGAGAA VEGF-C_rev: CCCACATCTATACACACCTCC	159
CXCR1	CXCR1_for: CTGACCCAGAAGCGTCACTTG CXCR1_rev: CCAGGACCTCATAGCAAACCTG	139
VIP	VIP_for: GACACCAGAAATAAGGCCAG VIP_rev: GTCACCCAACCTGAGAGCAG	114
SDHA	SDHA_for: TGGGAACAAGAGGGCATCTG SDHA_rev: CCACCACTGCATCAAATTCATG	86

Alle Primer wurden von Metabion (Planegg, Bayern) synthetisiert und von Sequenzen des National Center for Biotechnology Information (NCBI) abgeleitet. Alle Primer sind Exon übergreifend konstruiert. Exon/Introngrenzen sind im Internet bei www.ensembl.org überprüft worden.

2.1.12. Software

Bezeichnung	Hersteller
E.A.S.Y Win32 Auswertungssoftware für Windows, 2000	Herolab GmbH, Wiesloch
GraphPad Prism, Version 4.03, 2005	GraphPad, La Jolla, USA
Microplate Reader Auswertungssoftware Gen5 Version 2.05, 2011	Biotek Instruments, Highland Park, USA
Microsoft Excel für Windows	Microsoft Corporation, Washington, USA
Microsoft Word für Windows	Microsoft Corporation, Washington, USA
Nanodrop 2000 Auswertungssoftware, Version 1.6, 2014	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Opticon Monitor 3 Auswertungssoftware, Version 3.1	Biorad, München
Relative Expression Software Tool_Multiple Condition Solver Rest-MCS®, Version 2, 2006	Pfaff & GW. Horgan, TU München
Image Lab Software	Biorad, München

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Wachstum

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Als Nährmedium wurde 10 %-Medium (RPMI 1640-Medium-25 mM HEPES-L-Glutamin, 10 % fötales Kälberserum [FCS], 1 % Penicillin/Streptomycin [P/S]) verwendet.

2.2.1.2. Subkultivierung

Bei 80 % Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert. Dafür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (DPBS) gewaschen und mit 5 ml einer 5 %-igen Trypsin-EDTA-Lösung (ThermoFisher Scientific, Schwerte) im Brutschrank inkubiert bis sich die Zellen lösten. Dann wurden die Zellen mit 5 ml 10 %-Medium in ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde in der Zentrifuge Universal 32 (Hettich, Tuttlingen) bei 1.500 U/min für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesogen und das Pellet mit 10 ml Nährmedium resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt, verdünnt und weiterkultiviert.

2.2.1.3. Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellen zu zählen, wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblaulösung gemischt, in eine Zählkammer (Biorad, München) pipettiert, und im automatischen Zellzähler (TC20™; Biorad, München) wurde die Lebendzellzahl pro ml ermittelt.

2.2.1.4. Kryokonservierung und Auftauen

Die Zellen in Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht) wurden mit DPBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und in einem 15 ml Zentrifugen-Röhrchen geerntet. Das Pellet wurde mit 10 %-Medium mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension mit mindestens 10⁶ Zellen wurde in ein Kryogefäß überführt, langsam heruntergekühlt und bei -80 °C bis zu sechs Monate oder für einen längeren Zeitraum in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die kryokonservierten Zellen wurden rasch bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, in ein 15 ml-Röhrchen mit 9 ml 10 %-Medium überführt und bei 1.500 U/min für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem 10 %-Medium resuspendiert und in der Zellkulturflasche mit 15 ml 10 %-Medium inkubiert.

2.2.1.5. Ansetzen der Wirksubstanzen

Der PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 (10 mM), der kompetitive und selektive ERK1/2-Inhibitor SCH772984 (8,51 mM) sowie das Zytokin Interferon- γ (1 mg/ml) wurden in DMSO gelöst. Die Stocklösungen wurden bei -20 °C eingefroren.

2.2.2. Proliferationsassay

Die Proliferation wurde mit dem MTS-Proliferationsassay (*CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent*, Promega, Mannheim) untersucht. Das gelbe Testreagenz enthält eine Tetrazolium-Verbindung [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium, inner salt*] sowie ein Elektronen übertragendes Reagenz, das Phenazinethosulfat (PES). In metabolisch aktiven Zellen wird das Testreagenz reduziert. Es kommt zu einem Farbumschlag von gelb nach braun. Der braune Farbstoff ist proportional zur Menge der vitalen Zellen.

2.2.2.1. Behandlung der Zellen

Es wurden je nach Zelllinie 1.000 oder 2.000 Zellen pro Loch in eine 96-Loch-Gewebekulturplatte mit 10 %-Medium ausgesät und für 24 h inkubiert. Aus den vorbereiteten Stocklösungen des PD-1/PD-L1-Inhibitors 1 und des ERK1/2-Inhibitors SCH772984 wurde mit 1 %-Medium (RPMI 1640-Medium mit 1 % FCS und 1 % P/S) eine Verdünnungsreihe der Inhibitoren hergestellt. Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO entsprechend der höchsten Konzentration des Inhibitors eingesetzt. Die Zellen wurden mit den Wirkmedien für 72 h inkubiert. Das Pipettierschema ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Pipettierschema für die Wirkmedien mit Inhibitoren einzeln oder in Kombinationen in einer 96-Loch-Platte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank						
B		0	A1	A2	A3	A4	A1+B1	A1+B4	A4+B1	A4+B4	K	
C		0	A1	A2	A3	A4	A1+B1	A1+B4	A4+B1	A4+B4	K	
D		0	A1	A2	A3	A4	A1+B1	A1+B4	A4+B1	A4+B4	K	
E		0	B1	B2	B3	B4	A2+B2	A2+B3	A3+B2	A3+B3	K	
F		0	B1	B2	B3	B4	A2+B2	A2+B3	A3+B2	A3+B3	K	
G		0	B1	B2	B3	B4	A2+B2	A2+B3	A3+B2	A3+B3	K	
H												

PD-1/PD-L1-Inhibitor: A1 = 0,31 μM , A2 = 0,63 μM , A3 = 1,25 μM , A4 = 2,5 μM . ERK1/2-Inhibitor: B1 = 1,25 μM , B2 = 2,5 μM , B3 = 5 μM , B4 = 10 μM . 0 = kein Inhibitor in 1 %-Medium, Blank = Leerkontrolle, K = ≤ 1 % DMSO (Lösungsmittelkontrolle).

2.2.2.2. Durchführung des MTS-Proliferationsassays

20 μl MTS-Reagenz wurden mit 100 μl 10 %-Medium je nach Probenanzahl vermischt, 120 μl davon in die geleerten Ansätze der 96-Loch Platte gegeben und für 1 – 2 h inkubiert. Danach wurden die Platten auf dem Schüttler (Titramax 100, Heidolph, Schwabach) gut durchmischt und dann die Farbstoffkonzentrationen in der Platte photometrisch bei 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm im Platten-Spektralphotometer (Epoch, BioTek, Bad Friedrichshall) gemessen.

2.2.2.3. Auswertung des MTS-Proliferationsassays

Das Wachstum nach Behandlung wurde im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle und die unterschiedlichen Inhibitionen zwischen den Zelllinien statistisch ausgewertet.

Bestimmung der IC₅₀-Werte

Die Konzentrationen für den IC₅₀-Wert (50 % Inhibition der Zellviabilität) wurden für die Inhibitoren im Programm Microsoft Excel bestimmt. Für die Berechnung wurden die Inhibitorkonzentrationen verwendet, die in der Konzentrationsreihe unmittelbar unter und über dem IC₅₀-Wert lagen und eine Gerade darübergelegt. Die lineare Funktion dieser Gerade hat die Formel $y = mx + z$ (y = Zellviabilität in %; m = Steigung der Gerade; x = Inhibitorkonzentration; z = Inhibitorkonzentration für $y = 0$). Wir setzten 50 als Wert für y und lösten anschließend die Formel nach x auf. Anschließend wurde x mit der Inhibitorkonzentration unter dem IC₅₀-Wert multipliziert.

Berechnung der kombinierten Wirkung

Um festzustellen, ob die Kombinationsbehandlung einen synergistischen Effekt auf die Zellviabilität hatte, wurde der Interaktionsindex (y) wie folgt berechnet [66]:

$$y = a/A + b/B$$

a und b sind die Konzentrationen der Inhibitoren, die in der Kombinationsbehandlung benötigt wurden, um einen bestimmten Effekt zu erreichen. A und B sind die Inhibitor-Konzentrationen, die bei alleiniger Anwendung für den gleichen Effekt nötig waren. Bei einem Interaktionsindex von 1 wird der Effekt der Kombinationsbehandlung als additiv bezeichnet. Für $y < 1$ handelt es sich um einen synergistischen Effekt und bei $y > 1$ um einen Antagonismus.

Die inhibitorischen Substanzkonzentrationen A und B wurden über die Formel für die Steigung ($y = mx + z$; $x = A$ bzw. B) in der Einzelbehandlung bestimmt, wobei für jede Zelllinie der Wert für y dem IC-Wert der jeweiligen Kombinationsbehandlung mit PD-1/PD-L1- und ERK-Inhibitor gleichgesetzt wurde.

2.2.3. Einfluss der Inhibitoren auf die Genexpression

In der quantitativen Real-Time-PCR (qPCR; Polymerase Kettenreaktion) nach reverser Transkription (qRT-PCR) wurde der Einfluss der eingesetzten Inhibitoren sowie ihrer Kombination auf die Expression bestimmter Gene untersucht.

2.2.3.1. RNA-Isolierung

400.000 Zellen wurden pro Loch in einer 6-Loch-Gewebekulturplatte in Nährmedium ausgesät und für 24 h bei Standardbedingungen inkubiert. Für die Behandlung der Zellen wurden je 5 μ M des PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und des ERK1/2-Inhibitors SCH772984 einzeln und in Kombination in 1 %-Medium jeweils mit und ohne 0,0001 %iger IFN- γ -Lösung für 24 h eingesetzt. Das Nähmedium wurde abgenommen, die Zellen mit DPBS gewaschen und pro Loch mit 350 μ l Lysepuffer (LBP) des NucleoSpin® RNA Plus Kits lysiert. Die RNA wurde nach Protokoll des Herstellers auf eine Säule gebunden und gewaschen. Im letzten Schritt wurde die RNA mit 30 μ l DNase- und RNase-freiem Wasser in ein 1,5 ml-Reagiergefäß eluiert. Die Proben wurden bei -80 °C eingefroren.

2.2.3.2. Messung der RNA-Konzentration

Die RNA wurde mit dem Nanodrop-Photometer (Thermofisher Scientific, Schwerte) gemessen und die Konzentration bestimmt.

2.2.3.3. Reverse Transkription

Die cDNA wurde mit dem Kit SuperScript™ II reverse Transkriptase (Thermofisher Scientific, Schwerte) synthetisiert. Hierfür wurde pro Probe folgender Ansatz auf Eis in ein 0,5 ml-Reagenzgefäß pipettiert:

1 µg	RNA
1 µl	Random-Primer (0,5 µg/µl)
1 µl	dNTP (je 10 mM)
ad 12 µl	Nuklease-freies Wasser

Die RNA wurde 5 min bei 65 °C in der PCR-Maschine (Biometra, Göttingen) denaturiert und danach auf Eis gestellt. Dann wurden 7 µl Mastermix (4 µl 5x First Strand Puffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl Nuklease-freies Wasser) zu jeder Probe gegeben, die 2 min bei Raumtemperatur weiter inkubiert wurde.

In die Proben wurde mit Ausnahme der RT-minus-Kontrolle jeweils 1 µl Superscript-II reverse Transkriptase pipettiert, die Proben 10 min bei 25 °C (Primer-Annealing und Strangverlängerung) und dann 50 min bei 42 °C (reverse Transkription) inkubiert. Schließlich wurde die Reaktion bei 70 °C für 15 min inaktiviert. Die cDNA wurde in Nuklease-freiem Wasser im Verhältnis 1:7,5 für die anschließende qPCR verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.4. QPCR

Für jedes Primerpaar wurden pro Ansatz 12,5 µl Polymerase GoTaq qPCR Mastermix, 0,5 µl mit dem entsprechenden Primerpaar (0,2 mM forward and reverse) und 8 µl Ultra Pure destilliertem Wasser gemischt. In einer 96-Loch Multiply-PCR Platte wurden pro Primerpaar im Doppelansatz 4 µl cDNA-Probe 4 µl RT-minus-Kontrolle oder 4 µl destilliertes Wasser als PCR-Kontrolle vorgelegt und 21 µl der entsprechenden Primerpaar-Lösung hinzupipettiert. Die PCR-Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen, kurz zentrifugiert und in der PCR-Maschine Opticon 2 (Biorad, München) nach dem folgenden PCR-Programm amplifiziert:

1.	95 °C	2 min	(initiale Denaturierung)	
2.	95 °C	5 s	(Denaturierung)	} 43 Zyklen
3.	60 °C	10 s	(Annealing)	
4.	72 °C	20 s	(Elongation)	
5.	60 °C – 95 °C	1 s/°C	(Schmelzkurve)	

2.2.3.5. Auswertung der qPCR

Die Auswertung der qPCR erfolgte mit dem relativen Quantifizierungsmodell nach Michael W. Pfaffl [67]. Dabei wird eine Fluoreszenzschwelle für die Ermittlung der CPs (Crossing Point) festgesetzt, bei der alle Proben gleichviel doppelsträngige DNA nach der Elongationsphase des entsprechenden Zyklus enthalten. Unter der Annahme einer 100 %igen Effizienz der PCR entspricht jeder Zyklus einer Verdopplung der DNA-Menge.

Wir verwenden die approximative relative Quantifizierung der cDNA in der REST (Relative Expression Software Tool, <https://www.gene-quantification.de/rest.html>; Qiagen, Hilden)-Software, die folgende Formel zur Berechnung verwendet:

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t} = \frac{2^{\Delta C_{PZielgen(Kontrolle-Behandlung)}}}{2^{\Delta C_{PReferenzgen(Kontrolle-Behandlung)}}$$

Abk.: Ct: cycle threshold values; CP: crossing points

Das Housekeeping-Gen Succinat-Dehydrogenase (SDHA) diene als Referenzgen und die unbehandelten Proben als Kontrollen. Pro Zelllinie bildet die Software Mittelwerte der crossing points der Kontrollen und der behandelten Proben und errechnet den Unterschied (Δ). Im weiteren Schritt wird deren Unterschied mit dem Unterschied der crossing points vom Housekeeping-Gen normalisiert.

2.2.4. Immunchemischer Proteinnachweis

2.2.4.1. Behandlung der Zellen

400.000 Zellen wurden pro Loch auf einer 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und mit je 5 μ M Inhibitor einzeln bzw. in Kombination behandelt. Ein Ansatz erfolgte zudem mit zusätzlicher INF- γ -Behandlung (0,1 μ g/ml).

2.2.4.2. Proteinisolierung

Nach 24 h Inkubation wurden die Proteine aus den Zellen der 6-Loch Zellkulturplatte isoliert. Das Medium wurde aus den Zellkulturplatten abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem DPBS gewaschen. Pro Loch wurden die Zellen mit 100 μ l eiskaltem RIPA-Puffer mit jeweils 1 % Phosphatase- und Proteinase-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich, München) lysiert, mit dem Zellschaber gesammelt und in 1,5 ml Reagenzgefäße überführt. Die Proben wurden für 30 bis 45 min auf Eis gekühlt und regelmäßig gevortext. Anschließend wurden die Gefäße 10 min in der Kühlzentrifuge (Biofuge Fresco Heraeus, Hettich, Tuttlingen) bei 4 °C und 13.200 U/min zentrifugiert und der Überstand in neue 1,5 ml Reagenzgefäße pipettiert. Die Proben wurden bei -80 °C eingefroren.

2.2.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration und Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit dem BCATM-Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Schwerte) bestimmt. In einer 96-Loch Platte wurden je 10 μ l der Protein-Standardlösungen (0 mg/ml bis 2 mg/ml) bzw. der 1:10 verdünnten Proben in Doppelbestimmung vorgelegt. Pro Loch wurden 200 μ l Gemisch aus den Reagenzien A und B in einem Verhältnis von 50 : 1 hinzu pipettiert. Nach dem Durchmischen auf einem Horizontalschüttler, 30 min Inkubation unter Standardbedingungen im Brutschrank und erneutem Durchmischen erfolgte die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 460 nm im Spektralphotometer Epoch und die Konzentration wurde in μ g/ μ l berechnet. Pro Probe wurden in einem 1,5 ml Reagenzgefäß 20 μ g Protein und 3,75 μ l 4-fach Laemmli-Puffer (Biorad,

München) mit destilliertem Wasser (DNase, RNase frei) zu einer Gesamtmenge von 15 µl ergänzt und bei -20 °C eingefroren.

2.2.4.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zur Bestimmung der Lauflänge der Moleküle wurde ein Standard mit bekannten Proteingrößen aufgetragen (Precision Plus Protein Unstained Standard; Biorad). Zwei Fertiggele wurden in das Elektrophorese-System platziert und die Mini-Protean®-Tetra-Cell-Gelkammer (Biorad, München) mit Elektrophorese-Laufpuffer bis zur Markierung befüllt. Die Protein-Ansätze wurden bei 96 °C im Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg) für 5 min erhitzt. Unter einem Laborabzug wurden jeweils 5 µl des Standards bzw. 15 µl der Proben in die Gel-Taschen pipettiert. Bei 200 mV erfolgte die Elektrophorese für 30 – 40 min. Nach dem Gellauf wurde jedes Gel in das Detektionssystem für Western Blots (Chemidoc Imaging System, Biorad, München) transferiert und für 45 s mit UV-Licht aktiviert, um die Gesamtproteinmenge im anschließenden Blotverfahren auf der Membran sichtbar, und somit quantifizierbar zu machen.

2.2.4.5. Proteintransfer

Die Proteine wurden im Blot-Verfahren aus den Gelen auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen (Carl Roth, Karlsruhe) übertragen. Pro Gel wurden zwei Filterpapiere, die PVDF-Membran (aktiviert in Methanol) sowie das Gel in Semidry-Transferpuffer äquilibriert. Auf die Anode der Blottapparatur (Trans-Blot Turbo Transfer-System, Biorad, München) wurde erst ein Filterpapier, dann die PVDF-Membran, das Gel und noch ein Filterpapier gestapelt und die Apparatur mit der Kathodenseite geschlossen. Die Proteine wurden bei 25 V für 15 min transferiert. Nach dem Transfer wurde jede Membran im Detektionssystem fotografiert, um die Gesamtproteinmenge zu dokumentieren.

2.2.4.6. Immunchemische Detektion

Nach dem Blotten wurde die Membran kurz in TBS-T gewaschen und anschließend in 10 ml Blockierungslösung für 1 h geschwenkt. Je nach verwendeten Antikörpern

wurde als Blockierungslösung 5 % Rinderserumalbumin (BSA) oder 5 % Magermilchpulver (MMP) in TBS-T eingesetzt.

Die Primärantikörper wurden in Blockierungslösung gemäß den in Tabelle 3 angegebenen Verhältnissen verdünnt und die Gele wurden über Nacht darin bei 4 °C inkubiert.

Tab. 3: Antikörper Verdünnungen und Blockierungslösung.

Primärantikörper	BL	Verd.	Wirtsorganismus	Bezugsquelle
p-p44/42 MAPK (ERK1/2)	BSA	1:2.000	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
Phospho S6 (Ser235/256)	BSA	1:1.000	Kaninchen, polyklonal	
S6 (5G10)	BSA	1:1.000	Kaninchen, monoklonal	
p-Stat3	BSA	1:2.000	Kaninchen, monoklonal	
Stat3 α (D1A5)	BSA	1:1.000	Kaninchen, monoklonal	
p44/42 MAPK (Erk1/2)	BSA	1:2.000	Kaninchen, monoklonal	
β -Aktin	MMP	1:4.000	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich, München
Sekundärantikörper				
ECL™ anti-Kaninchen IgG, Horseradish Peroxidase-Linked whole antibody			Esel	GE-Healthcare, München
ECL™ anti-Maus IgG, Horseradish Peroxidase-Linked whole antibody			Schaf	

BL: Blockierungslösung; BSA: TBS-T mit 5 % Rinderserumalbumin; MMP: TBS-T mit 5 % Magermilchpulver; Verd.: Verdünnung

Danach wurde die Membran 3 x 5 min in TBS-T gewaschen, mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 3) (im Verhältnis 1 : 4.000) in Blockierungslösung (entsprechend der BL der AK) für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler inkubiert und anschließend 3 x 10 min in TBS-T gewaschen.

Mit dem ECL-Substrat (*Clarity Max Western ECL Substrate*, Biorad, München) wurden die von Antikörpern gebundenen Proteine sichtbar gemacht. Dabei wurde die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid durch die am Sekundärantikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase (HRP) katalysiert. Das Luminol zerfällt bei seiner Oxidation in seinen Grundzustand und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 428 nm, das von der Kamera im Chemidoc Imaging System aufgenommen wurde.

Die Membran wurde in 2 ml ECL-Substrat (je 1 ml Luminol-Reagenz und 1 ml Verstärker-Reagenz) für 5 min inkubiert und im Detektionssystem fotografiert. Zunächst wird die Autofunktion verwendet. Bei nicht-zufriedenstellendem Ergebnis kann die Belichtungszeit manuell ausgewählt werden.

Um anschließend weitere Proteine auf der gleichen Membran nachzuweisen, wurden gebundene Antikörper mit dem 1 x Re-Blot-Reagenz (Merck, Darmstadt) 10 min gelöst. Nach je 15 min Waschen mit TBS-T und Inkubation mit Blockierungslösung wurde die Membran mit einem neuen Primärantikörper inkubiert.

2.2.4.7. Quantitative Auswertung

Die abgespeicherten Bilder wurden im Auswertungsprogramm (Image Lab Software, Biorad, München) hochgeladen, die Schwärzung der Proteinbanden gemessen und über das Volumenverhältnis zwischen Zielprotein und Gesamtproteingehalt pro Probe die Expression der Proteine normalisiert. Die normalisierten Werte wurden zwischen behandelten Proben und Kontrollen verglichen.

2.2.5. Statistik

Die Unterschiede zwischen TNBC und NTNBC-Zellen im MTS-Assay wurden mit einem T-Test auf Signifikanz geprüft. Mit dem gleichen Test erfolgte die Auswertung der Effekte der Inhibitoren auf die Expression, der in der qPCR untersuchten Gene im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Kontrolle). Folgende Signifikanzniveaus wurden in beiden Fällen je nach p-Wert definiert: * $p < 0,05$ signifikant; ** $p < 0,01$ hoch signifikant; *** $p < 0,001$ höchstsignifikant.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss eines PD-1/PD-L1-Inhibitors und eines kompetitiven, selektiven ERK1/2-Inhibitors auf die Zellviabilität der TNBC-Zelllinien und der NTNBC-Zelllinie MCF7

3.1.1. Der PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 hemmt die Zellviabilität stärker in TNBC-Zelllinien MDA-MB-231, HCC1937, HCC1806 als in der NTNBC-Zelllinie MCF7

MDA-MB-231-, HCC1937-, HCC1806- und MCF7-Zelllinien wurden mit dem PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 (0,625 μ M, 1,25 μ M, 2,5 μ M und 5 μ M) für 72 h behandelt. In den TNBC-Zelllinien führte der PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 bei 2,5 μ M zu einer signifikant stärkeren Hemmung der Zellviabilität als in MCF7-Zellen ($p < 0,001$; Abb. 3). Bei 1,25 μ M war die Inhibition durch den PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 signifikant stärker in MDA-MB-231 ($p < 0,01$) und in HCC1937 ($p < 0,001$) als in MCF7. Bei 0,625 μ M hemmte der PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 die Zellviabilität ausschließlich und signifikant in HCC1937 ($p < 0,001$) und in MDA-MB-231 ($p < 0,05$).

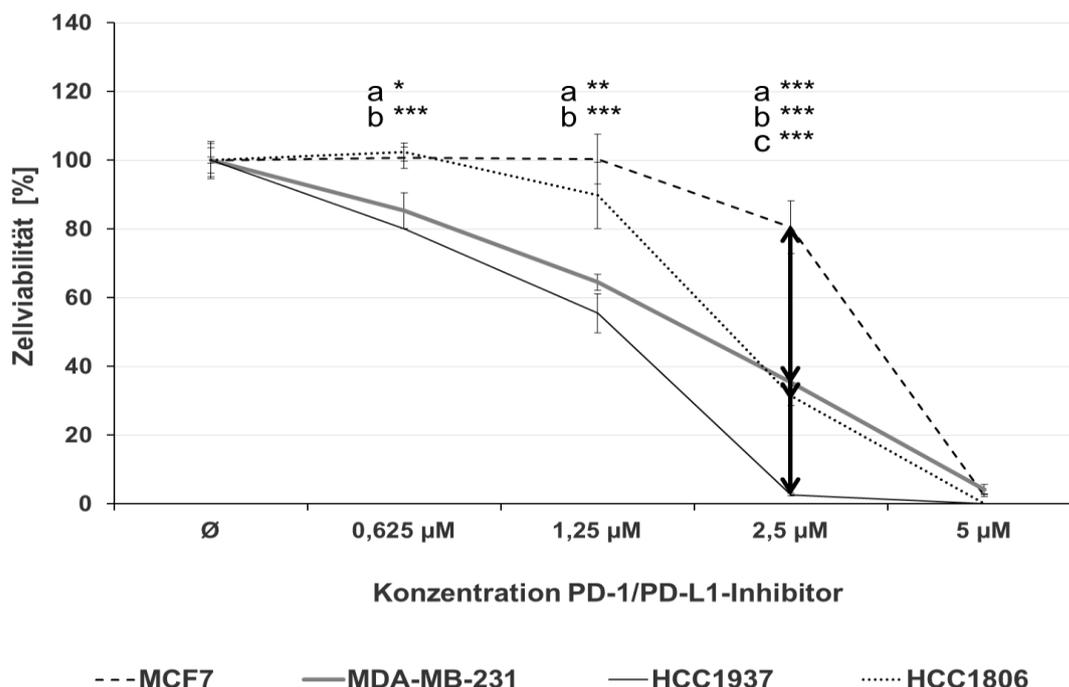


Abb. 3: MTS-Assay nach PD-1/PD-L1-Inhibitor 1-Behandlung. Die TNBC-Zellen MDA-MB-231, HCC1937, HCC1806 und die NTNBC-Zellen MCF7 wurden mit dem PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 für 72 h behandelt und die Zellviabilität wurde konzentrationsabhängig in % bestimmt. Die Versuche wurden dreifach durchgeführt. Statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen MCF7 und a) MDA-MB-231, b) HCC1937 und c) HCC1806: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.1.2. Der ERK-Inhibitor SCH772984 hemmt die Zellviabilität stärker in TNBC-Zelllinien MDA-MB-231, HCC1937, HCC1806 als in der NTNBC-Zelllinie MCF7

Mit 10 μM ERK-Inhibitor SCH772984 wurden die MCF7-Zellen signifikant schwächer ($p < 0,001$) inhibiert als die TNBC-Zelllinien. Mit 5 μM SCH772984 war die Inhibition von MCF7 ebenso signifikant schwächer als in MDA-MB-231 ($p < 0,01$), HCC1937 ($p < 0,001$) und HCC1806 ($p < 0,05$; Abb. 4). Bei niedrigeren Konzentrationen wurden nur die TNBC Zelllinien, aber nicht die MCF7-Zellen inhibiert.

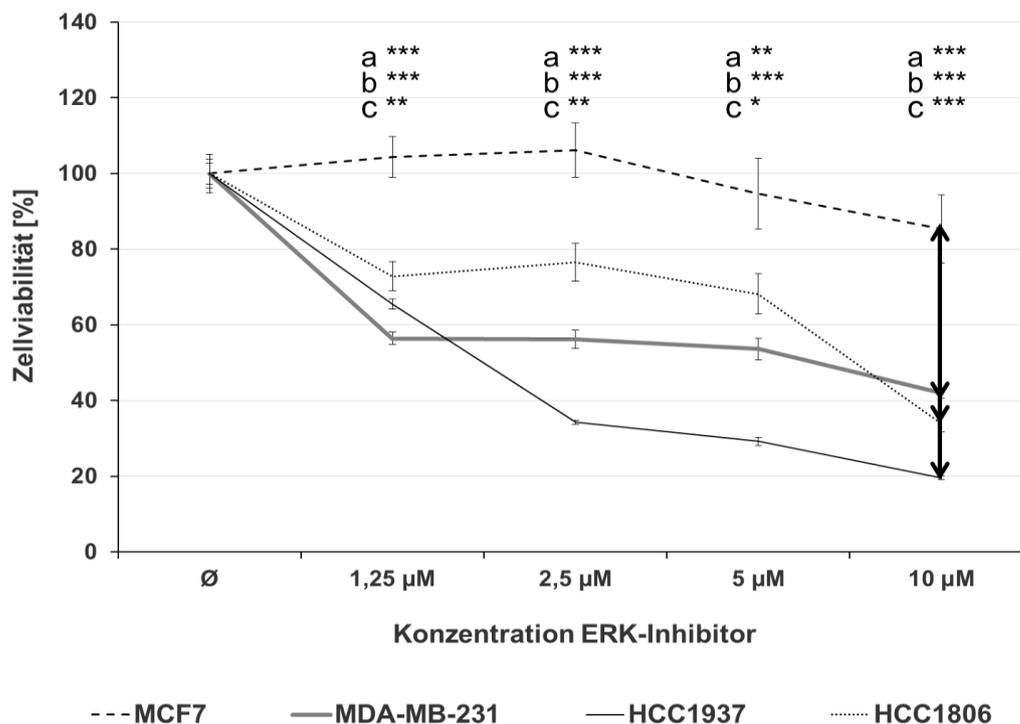


Abb. 4: MTS-Assay nach SCH772984-Behandlung. Die TNBC-Zellen MDA-MB-231, HCC1937, HCC1806 und die NTNBC-Zellen MCF7 wurden mit dem ERK-Inhibitor SCH772984 für 72 h behandelt und die Zellviabilität wurde konzentrationsabhängig in Prozent bestimmt. Die Versuche wurden dreifach durchgeführt. Statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen MCF7 und a) MDA-MB-231, b) HCC1937 und c) HCC1806: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.1.3. Bestimmung der IC50-Werte für die Inhibitoren bei TNBC-Zelllinien und der NTNBC Zelllinie MCF7

In drei unabhängigen Versuchswiederholungen wurden für alle Zelllinien die Mittelwerte der IC50-Werte für beide Inhibitoren bestimmt (Tab. 4). Für den PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 liegen die IC50-Werte für TNBC-Zelllinien zwischen 1,65 und 1,99 μM . Bei MCF7 ist der IC50-Wert des PD-1/PD-L1-Inhibitors 3,12 μM . Der ermittelte IC50-Wert für den ERK-Inhibitor SCH772984 liegt bei TNBC-Zellen zwischen 5,06 und 7,34 μM und bei MCF7 bei 27,00 μM .

Tab. 4: IC50-Werte aus MTS-Assays. IC50-Werte (μM) des PD-1/PD-L1-Inhibitors 1 und des ERK-Inhibitors SCH772984 für die TNBC-Zelllinien MDA-MB-231, HCC1937, HCC1806 (weiß) und die NTNBC-Zelllinie MCF7 (grau). Es sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

	PD-1/PD-L1 Inhibitor μM (+/- Stabw.)	ERK Inhibitor μM (+/- Stabw.)
MCF7	3,12 (0,44)	27,00 (3,55)
MDA-MB-231	1,99 (0,39)	6,86 (1,50)
HCC1937	1,41 (0,33)	7,34 (4,11)
HCC1806	1,65 (0,48)	5,06 (2,58)

3.1.4. Die Kombination beider Inhibitoren hemmte die Proliferation der TNBC-Zelllinien MDA-MB-231, HCC1937 und HCC1806 sowie der NTNBC-Zelllinie MCF7 verstärkt gegenüber den Einzelgaben

Inhibitorkonzentrationen, die in den MTS-Assays mit Einzelbehandlungen zu einer deutlich messbaren Reduktion der Zellviabilität führten, wurden in der Kombinationsbehandlung der beiden Inhibitoren eingesetzt (Abb. 5). MDA-MB-231 und MCF7 wurden einzeln und in Kombination mit 2,5 μM PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und 5 μM SCH772984 behandelt. HCC1937 und HCC1806, wurden mit 0,625 μM PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und 5 μM (HCC1937) oder 2,5 μM (HCC1806) ERK-Inhibitor SCH772984 behandelt. Die beiden Letzteren reagierten bei den Einzelgaben am sensitivsten auf den PD-1/PD-L1-Inhibitor 1.

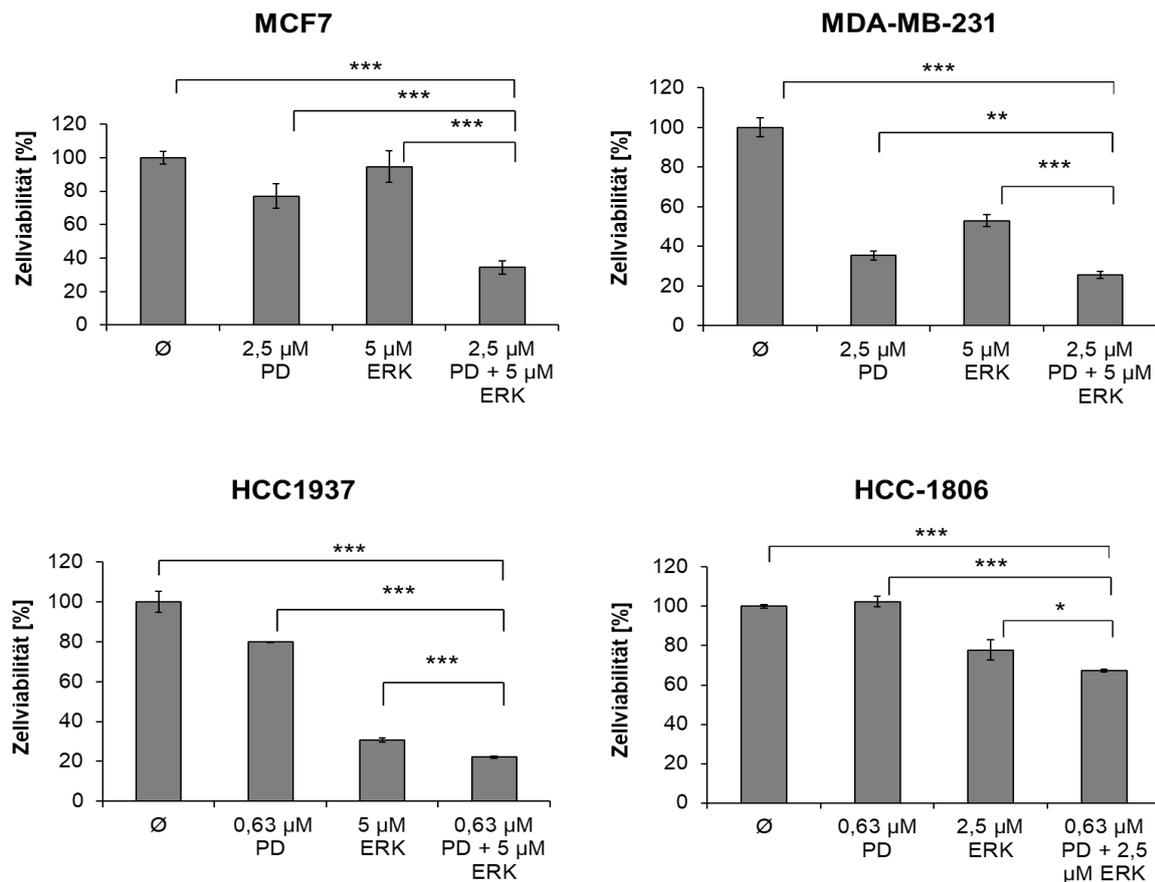


Abb. 5: MTS-Assay. Die MDA-MB-231-, HCC1937-, HCC1806- und MCF7-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des PD-1/PD-L1-Inhibitors 1 (PD) und des ERK-Inhibitors SCH772984 (E) einzeln und in Kombination (PD + E) für 72 h behandelt. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen in % bestimmt. 0,63 µM PD entspricht 0,625 µM PD gerundet. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Für die Kombinationsbehandlungen wurde der Interaktionsindex y für die jeweilige Zelllinie mit der Formel

$$y = a/A + b/B$$

bestimmt (siehe Punkt 2.2.2.3; Tab. 5).

Die simultane Gabe von PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und SCH772984 führte bei MDA-MB-231 zu einer additiven Wachstumshemmung ($y = 1,02$). In HCC1937 ($y = 0,88$), HCC1806 ($y = 0,85$) und MCF7 ($y = 0,76$) wurde die Zellviabilität synergistisch durch die Kombinationsbehandlung gehemmt.

Tab. 5: Berechnung der Interaktionsindex-Werte aus den Kombinationsbehandlungen im MTS-Assay. Die TNBC-Zelllinien MDA-MB-231, HCC1937, HCC1806 (weiß) und die NTNBC-Zelllinie MCF7 (grau) wurden simultan mit unterschiedlichen Konzentrationen des PD-1/PD-L1-Inhibitors 1 (0,625 bzw. 2,5 μ M) und des ERK-Inhibitors SCH772984 (2,5 bzw. 5 μ M) behandelt und der Interaktionsindex y ($y = a/A + b/B$) berechnet. Synergismus $y < 1$, additiver Effekt $y = 0$, Antagonismus $y > 1$

	MCF7	MDA-MB-231	HCC1937	HCC1806
y	0,76	1,02	0,88	0,85
a	2,5	2,5	0,625	0,625
A	3,98	3,37	2,04	1,73
b	5	5	5	2,5
B	37,13	17,99	8,69	5,1

3.2. Einfluss des PD-1/PD-L1-Inhibitors 1 und des ERK-Inhibitors SCH772984 auf die Expression immunmodulatorischer und wachstumsregulierender Gene

Für die qRT-PCR wurden die vier Zelllinien mit je 5 μ M des PD-1/PD-L1-Inhibitors 1 und ERK-Inhibitors SCH772984 einzeln und in Kombination für 24 h behandelt. Anschließend wurde die Expression der immunmodulatorischen Gene PD-L1, IL-8, IL-6, CXCL1 und CXCR2 sowie der wachstumsregulierenden Gene CDK5, NOTCH1, c-Fos, FosL und VEGFC untersucht.

3.2.1. Einfluss von PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und SCH772984 auf die Expression immunmodulatorischer Gene

Nach der Behandlung mit den Inhibitoren einzeln und in Kombination sind die veränderten Genexpressionen in Abbildung 6 und in Tabelle 6 dargestellt. Das Gen für PD-L1 wurde unter PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 in den TNBC-Zellen kaum reguliert (MDA-MB-231: $0,71 \pm 0,04$; $p = 0,199$; HCC1937: $1,44 \pm 0,05$; $p = 0,104$; HCC1806: $1,16 \pm 0,02$; $p = 0,032$). In MCF7 wurde PD-L1 durch PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 tendenziell verstärkt ($1,76 \pm 0,50$). Der ERK-Inhibitor SCH772984 führte zu einer in MDA-MB-231 ($0,38 \pm 0,05$; $p = 0,024$) signifikanten und in HCC1806 ($0,55 \pm 0,02$; $p = 0,843$) tendenziellen Verminderung der PD-L1-Expression sowie einer tendenziellen Verstärkung von PD-L1 in HCC1937 (2,06-fach; $p = 0,886$) und in MCF7 ($2,07 \pm 0,56$). Die Kombination beider Inhibitoren verstärkte in den Basal-ähnlichen Zelllinien HCC1937 ($p = 0,010$) und HCC1806 ($p = 0,001$) die PD-L1-Expression jeweils ca.

20-fach signifikant. In MDA-MB-231 wurde PD-L1 durch beide Inhibitoren tendenziell vermindert exprimiert ($0,30 \pm 0,006$; $p = 0,075$). Die Kombinationsbehandlung führte in MCF7 zur tendenziell verstärkten PD-L1-Expression ($1,70 \pm 0,48$; $p = 0,511$).

In MDA-MB-231-Zellen konnte eine signifikant verminderte Expression von IL-8 nach PD-1/PD-L1-Inhibitor 1-Behandlung nachgewiesen werden ($0,50 \pm 0,05$; $p = 0,039$). Der PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 verstärkte in HCC1937 die IL-8-Expression um das 4,2-fache tendenziell ($p = 0,128$) und in HCC1806 um das 2,4-fache signifikant ($p = 0,010$). Der Einsatz des ERK-Inhibitors SCH772984 alleine und in Kombination mit PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 führte in MDA-MB-231 (3,20-fach; $p = 0,007$ bzw. 2,62-fach; $p = 0,011$) und in HCC1806 (0,37; $p = 0,004$ bzw. 1,35-fach; $p = 0,015$) zu signifikant erhöhten IL-8-Expressionen. In MCF7 wurde die IL-8-Expression vom PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 0,65-fach tendenziell vermindert und durch SCH772984 und die Kombination beider Inhibitoren 1,21 - 1,57-fach verstärkt (alle $p > 0,05$).

In den Basal-ähnlichen Zellen wurde die IL-6-Expression durch die Kombinationsbehandlung signifikant verstärkt (3,48-fach; $p = 0,008$ in HCC1937 und 3,81-fach; $p = 0,037$ in HCC1806). In MCF7 oder in MDA-MB-231 erfolgte keine statistisch signifikante Regulation der Expression von IL-6 durch den Einsatz beider Inhibitoren. In der NTNBC Zelllinie MCF7 wurde die CXCL1-Expression jeweils auf ca. ein Zehntel signifikant durch den ERK-Inhibitor SCH772984 allein (0,11; $p = 0,0004$) und in der Kombination mit dem PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 (0,14; $p = 0,0004$) vermindert. In HCC1937 war CXCL1 im Gegensatz zu MCF7 signifikant erhöht nach der Kombinationsbehandlung mit beiden Inhibitoren (2,75-fach; $p = 0,007$). In den anderen TNBC-Zellen wurde CXCL1 durch die Inhibitorbehandlung nicht reguliert.

Die CXCR2-Expression wurde in den MCF7-Zellen durch die Kombinationsbehandlung signifikant auf 0,23 ($p = 0,047$), in HCC1806 auf 0,40 ($p = 0,02$) und auf 0,09 in den MDA-MB-231-Zellen ($p = 0,046$) reduziert. In HCC1937 wurde CXCR2 durch Kombinationsbehandlung verstärkt exprimiert ($3,58 \pm 0,02$).

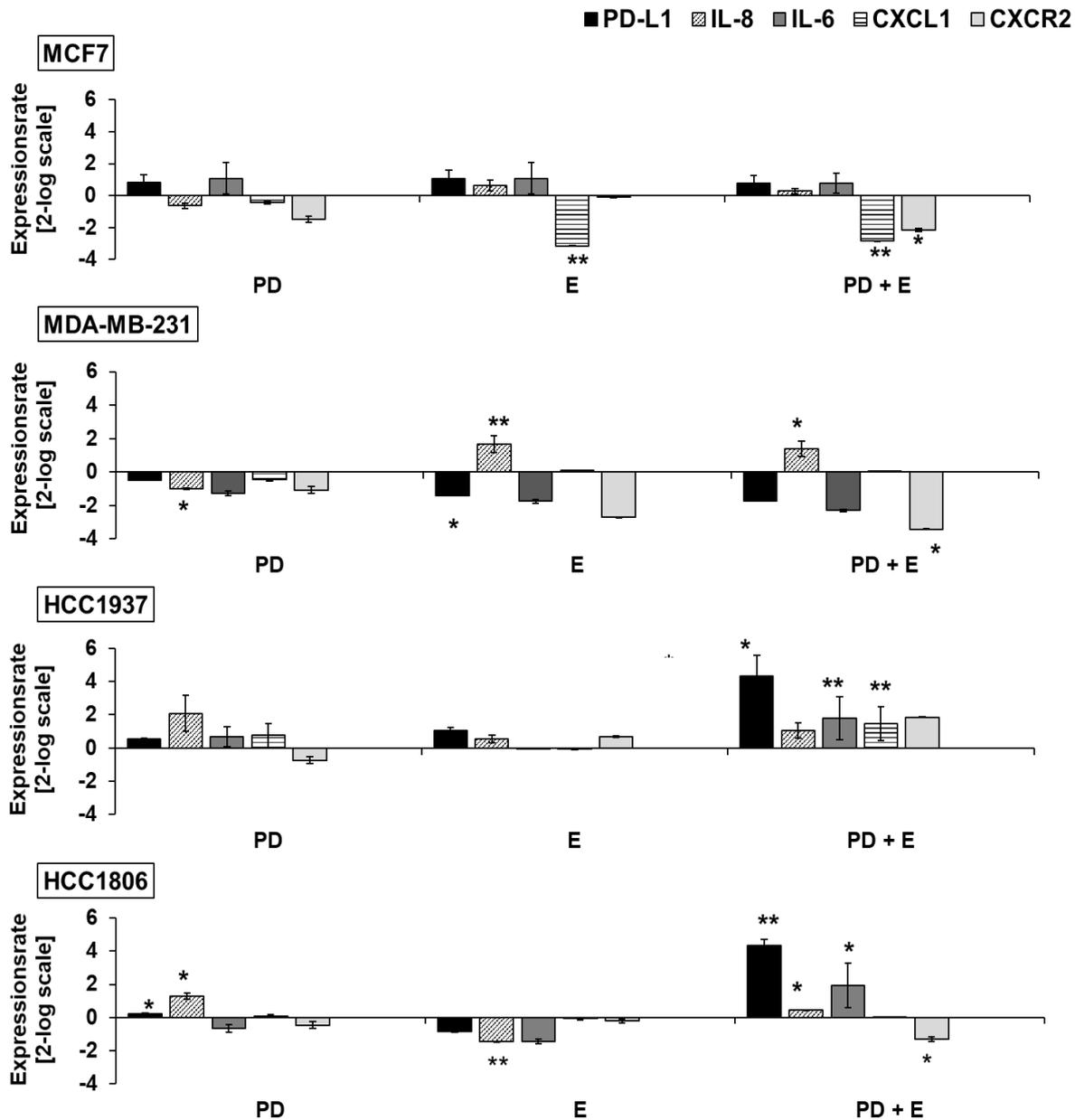


Abb. 6: QRT-PCR. Die Zellen wurden mit 5 μ M PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 (PD) und 5 μ M ERK-Inhibitor SCH772984 (E) einzeln und in Kombination (PD + E) für 24 h behandelt. Die Regulation der Gene PD-L1, IL-8, IL-6, CXCL1 und CXCR2 wurde in der qRT-PCR bestimmt. Die Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Proben wurden nach mindestens 2 unabhängigen Versuchswiederholungen berechnet und auf ihre statistische Signifikanz geprüft: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Tab. 6: Regulationen von immunmodulatorischen Genen durch PD-1/PD-L1- und ERK-Inhibitor: relative Expressionsrate von PD-L1, IL-8, IL-6, CXCL1 und CXCR2 in MCF7, MDA-MB-231, HCC1937 und HCC1806 nach Behandlung mit PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 (PD), ERK-Inhibitor SCH772984 (E) und der Kombinationsbehandlung (PD + E) mit Standardabweichungen. Die Ergebnisse der TNBC-Zelllinie MCF7 sind grau und die der TNBC-Zelllinien MDA-MB-231, HCC1937 und HCC1806 sind weiß unterlegt. Hervorgehoben (fett) sind signifikante Ergebnisse: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

MCF7			
	PD	E	PD + E
PD-L1	1,76 ± 0,50	2,07 ± 0,56	1,70 ± 0,48
IL-8	0,65 ± 0,18	1,57 ± 0,34	1,21 ± 0,16
IL-6	2,12 ± 0,99	2,12 ± 1,00	1,71 ± 0,62
CXCL1	0,74 ± 0,08	0,11 ± 0,01 **	0,14 ± 0,02 **
CXCR2	0,36 ± 0,18	0,95 ± 0,06	0,23 ± 0,10 *
MDA-MB-231			
	PD	E	PD + E
PD-L1	0,71 ± 0,04	0,38 ± 0,05 *	0,30 ± 0,06
IL-8	0,50 ± 0,05 *	3,20 ± 0,51 **	2,62 ± 0,47 *
IL-6	0,42 ± 0,14	0,30 ± 0,10	0,20 ± 0,07
CXCL1	0,72 ± 0,07	1,06 ± 0,02	1,04 ± 0,01
CXCR2	0,47 ± 0,22	0,15 ± 0,05	0,09 ± 0,02 *
HCC1937			
	PD	E	PD + E
PD-L1	1,44 ± 0,05	2,06 ± 0,19	20,24 ± 1,24 *
IL-8	4,24 ± 1,09	1,46 ± 0,24	2,10 ± 0,46
IL-6	1,61 ± 0,60	0,97 ± 0,03	3,48 ± 1,30 **
CXCL1	1,70 ± 0,71	0,97 ± 0,03	2,75 ± 1,00 **
CXCR2	0,60 ± 0,22	1,59 ± 0,05	3,58 ± 0,02
HCC1806			
	PD	E	PD + E
PD-L1	1,16 ± 0,02 *	0,55 ± 0,02	20,04 ± 0,38 **
IL-8	2,43 ± 0,18 *	0,37 ± 0,01 **	1,35 ± 0,04 *
IL-6	0,63 ± 0,24	0,37 ± 0,14	3,81 ± 1,34 *
CXCL1	1,06 ± 0,07	0,95 ± 0,05	1,01 ± 0,01
CXCR2	0,72 ± 0,21	0,86 ± 0,13	0,40 ± 1,15 *

3.2.2. Einfluss von PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und ERK-Inhibitor SCH772984 auf die Expression wachstumsregulierender Gene

Die veränderten Expressionen der wachstumsrelevanten Gene CDK5, NOTCH1, c-Fos, FosL und VEGFC nach Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren sind in Abbildung 7 und Tabelle 7 dargestellt. PD-1/PD-L1-Inhibitor 1, ERK-Inhibitor SCH772984 und die Kombination beider Substanzen erhöhten tendenziell die Expressionen von CDK5 und NOTCH1 in der TNBC-Zelllinie MCF7.

SCH772984 und die Kombinationsbehandlung bewirkten in MDA-MB-231 eine nicht signifikante Verminderung von CDK5 ($0,59 \pm 0,08$; $p = 0,324$ und $0,65 \pm 0,08$; $p = 0,788$). NOTCH1 wurde in MDA-MB-231-Zellen durch SCH772984 einzeln nicht signifikant gesenkt und durch die Kombination mit dem PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 signifikant ($0,33 \pm 0,07$; $p = 0,068$ und $0,25 \pm 0,04$; $p = 0,018$) vermindert. In HCC1937 wurde CDK5 durch die Inhibitoren nicht reguliert während die Kombination von SCH772984 und PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 zu einer signifikant gesteigerten Expression von NOTCH1 (3,92-fach; $p = 0,007$) führte. In HCC1806 wurden die Expressionen von CDK5 und NOTCH1 durch die Kombination beider Inhibitoren nur tendenziell reguliert. C-Fos wurde durch PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 in MCF7 nicht reguliert. PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 führte in MDA-MB-231 zu einer signifikant erhöhten Expression von c-Fos ($2,00 \pm 1,13$; $p = 0,038$). In HCC1937 und HCC1806 wurden die c-Fos-Expressionen nach der Behandlung mit PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 um ca. die Hälfte ($0,44 \pm 0,08$; $p = 0,050$ bzw. $0,48 \pm 0,16$; $p = 0,517$) reduziert. Der ERK-Inhibitor SCH772984 verminderte die Expressionen von c-Fos in HCC1806 ($0,23 \pm 0,11$; $p = 0,030$) und HCC1937 ($0,15 \pm 0,03$; $p = 0,014$) signifikant. Die Kombinationsbehandlungen führten zur Verminderung von c-Fos in HCC1806 tendenziell ($0,22 \pm 0,22$; $p = 0,059$) und in HCC1937 signifikant ($0,12 \pm 0,08$; $p = 0,001$).

Mit dem ERK-Inhibitor SCH772984 und der Kombination beider Inhibitoren wurde in allen Zelllinien die Expression von FosL verringert. In MCF7 wurde die Expression von FosL auf 4 % durch SCH772984 ($p = 0,011$) bzw. auf 5 % durch die Kombinationsbehandlung ($p = 0,010$) statistisch signifikant verringert. Im Vergleich dazu waren die Herabregulationen von FosL in den TNBC-Zelllinien tendenziell gering aber bei MDA-MB-231 signifikant.

VEGFC wurde in MCF7 verstärkt exprimiert sowohl mit SCH772984 ($2,01 \pm 0,14$; $p = 0,043$) als auch in der Kombination mit PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 ($2,61 \pm 0,20$;

$p = 0,262$). In den TNBC-Zellen wurde VEGFC durch die Behandlung mit den Inhibitoren nicht reguliert.

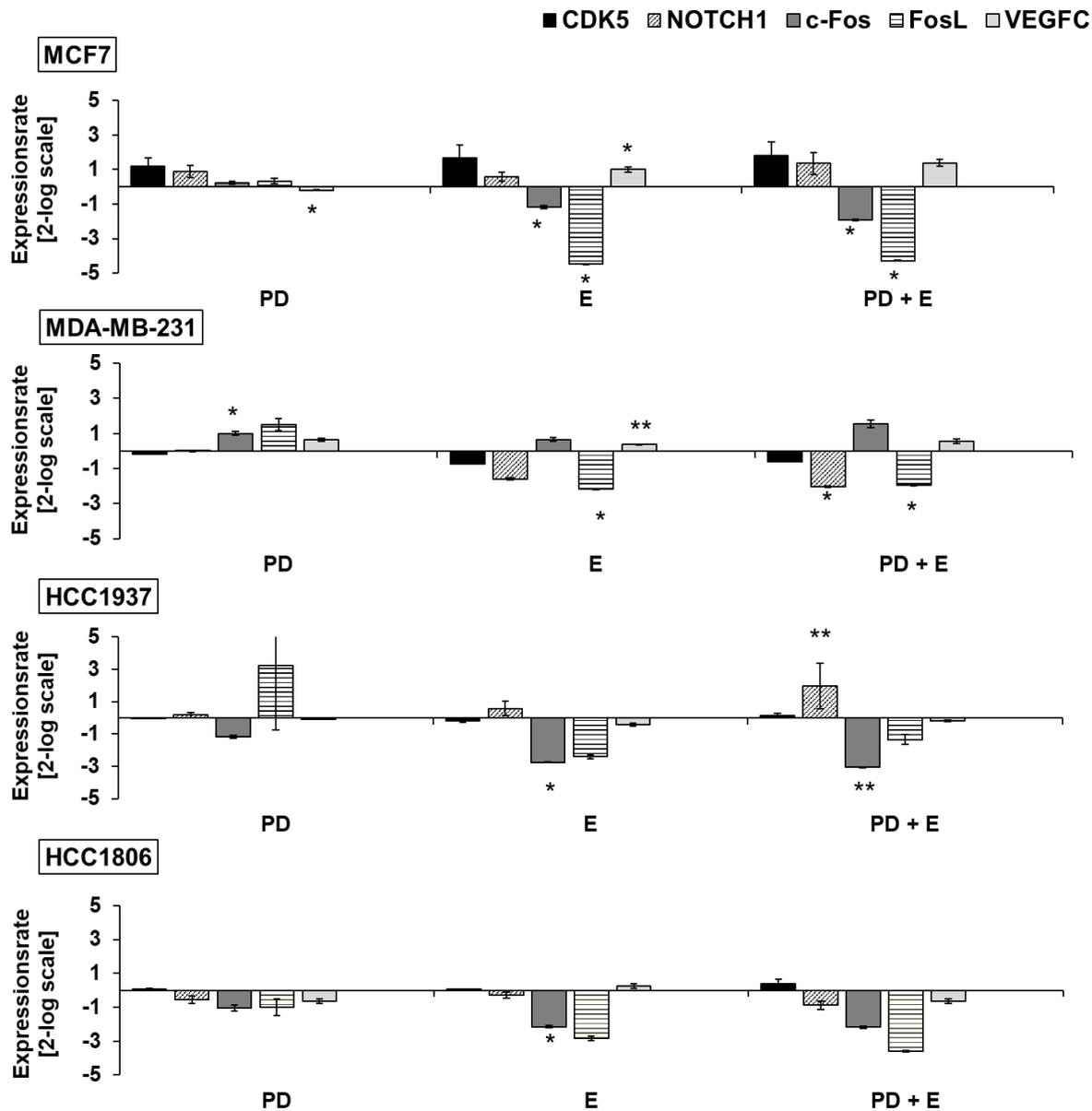


Abb. 7: QRT-PCR. MCF7, MDA-MB-231, HCC1937 und HCC1806 wurden mit 5 μ M PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 (PD) und 5 μ M ERK-Inhibitor SCH772984 (E) einzeln und in Kombination (PD + E) für 24 h behandelt, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In der qRT-PCR wurde die Expression von CDK5, NOTCH1, c-Fos, FosL und VEGFC untersucht. Die Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Proben wurden nach drei unabhängigen Versuchswiederholungen berechnet und auf ihre statistische Signifikanz geprüft: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ *

Tab. 7: Regulationen wachstumsrelevanter Gene durch PD-1/PD-L1- und ERK-Inhibitor: relative Expressionsrate nach Behandlung mit PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 (PD), ERK-Inhibitor SCH772984 (E) und Kombinationsbehandlung (PD + E) mit Standardabweichungen. In grau sind die Ergebnisse für die NTNBC-Zelllinie MCF7 und in weiß die der TNBC-Zelllinien MDA-MB-231, HCC1937 und HCC1806 dargestellt. In Fettschrift hervorgehoben sind signifikante Ergebnisse: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

MCF7			
	PD	E	PD + E
CDK5	2,28 ± 0,48	3,25 ± 0,74	3,48 ± 0,78
NOTCH1	1,85 ± 0,36	1,49 ± 0,26	2,55 ± 0,63
c-Fos	1,17 ± 0,09	0,45 ± 0,08 *	0,26 ± 0,04 *
FosL	1,26 ± 0,16	0,04 ± 0,00 *	0,05 ± 0,00 *
VEGFC	0,87 ± 0,02 *	2,01 ± 0,14 *	2,61 ± 0,20
MDA-MB-231			
	PD	E	PD + E
CDK5	0,88 ± 0,04	0,59 ± 0,08	0,65 ± 0,08
NOTCH1	1,00 ± 0,00	0,33 ± 0,07	0,25 ± 0,04 *
c-Fos	2,01 ± 0,16 *	1,56 ± 0,08	2,94 ± 0,06
FosL	2,84 ± 0,50	0,22 ± 0,12 *	0,26 ± 0,05 *
VEGFC	1,56 ± 0,13	1,29 ± 0,14 **	1,46 ± 0,12
HCC1937			
	PD	E	PD + E
CDK5	0,99 ± 0,02	0,88 ± 0,11	1,11 ± 0,11
NOTCH1	1,12 ± 1,15	1,49 ± 0,45	3,92 ± 1,42 **
c-Fos	0,44 ± 0,08	0,15 ± 0,03 *	0,12 ± 0,01 **
FosL	9,29 ± 3,99	0,19 ± 0,12	0,39 ± 0,32
VEGFC	0,94 ± 0,03	0,75 ± 0,11	0,87 ± 0,05
HCC1806			
	PD	E	PD + E
CDK5	1,04 ± 0,05	1,04 ± 0,04	1,29 ± 0,29
NOTCH1	0,68 ± 0,21	0,82 ± 0,17	0,54 ± 0,25
c-Fos	0,48 ± 0,13	0,23 ± 0,11 *	0,22 ± 0,22
FosL	0,50 ± 0,33	0,14 ± 0,02	0,08 ± 0,03
VEGFC	0,65 ± 0,09	1,19 ± 0,04	0,64 ± 0,14

3.3. Einfluss des PD-1/PD-L1-Inhibitors 1 und des ERK1/2-Inhibitors SCH772984 auf die Phosphorylierung von ERK, S6 und Stat3

Die Zellen wurden für 24 h mit 5 μ M konzentrierten Inhibitoren behandelt. Die Signaltransduktionsproteine ERK, S6 und Stat3 wurden im Westernblot analysiert (Abb. 8). In Abb. 9 ist der Anteil phosphorylierter Signaltransduktionsproteine an deren Gesamtmenge ausgewertet. Die Normalisierung auf die Gesamtproteinmenge wurde im Auswertungsprogramm (Image Lab Software, Biorad, München) durchgeführt. Als Kontrollen wurden Proteinlysate unbehandelter Zellen verwendet.

Der ERK-Inhibitor SCH772984 bewirkte sowohl in MCF7 als auch in den TNBC-Zellen erwartungsgemäß eine Deaktivierung von ERK. SCH772984 verminderte den Anteil von phosphoryliertem ERK zur gesamten Menge von ERK in den TNBC-Zellen auf Werte zwischen 35,45 und 9,05 % und damit stärker als in MCF7 (63,68 %).

Während der PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 in MCF7 und MDA-MB-231 verstärkte ERK-Phosphorylierungen im Vergleich zur Kontrolle bewirkte (MCF7: 154,31 %; MDA-MB-231: 190,22 %), war der phosphorylierte Anteil von ERK in HCC1937 fast halbiert (48,55 %) und blieb in HCC1806 unverändert (100,22 %) (Abb. 8 und 9). Die Kombination beider Inhibitoren bewirkte in MCF7 eine leicht verstärkte Phosphorylierung von ERK (116,82 %) und in den TNBC-Zelllinien Dephosphorylierungen auf 19,89 % in MDA-MB-231, 65,23 % in HCC1937 und auf 57,26 % in HCC1806 jeweils im Vergleich zur Kontrolle.

Das Signalprotein S6 war in MCF7 nach Behandlung mit dem PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 verstärkt phosphoryliert (157,27 %) und in den TNBC-Zelllinien unterschiedlich reguliert (Abb. 9). In MDA-MB-231 und HCC1806 waren pS6 leicht vermindert (97,97 % bzw. 91,61 %), in HCC1937 wurde der Anteil von phosphoryliertem S6 durch den PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 auf ca. 48 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen gesenkt.

In MCF7 verminderte SCH772984 sowohl allein auf 49,52 % als auch in Kombination mit dem PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 auf 66,34 % den Anteil von pS6 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. In den TNBC-Zellen führten SCH772984 sowie die Kombination beider Inhibitoren ebenso zur Dephosphorylierung von S6. Dabei wurden die Anteile des phosphorylierten S6 auf 28,25 % und auf 25,84 % am stärksten in MDA-MB-231 reduziert.

In HCC1937 betragen die Anteile des phosphorylierten S6 nach der Behandlung mit den einzelnen Inhibitoren 41,91 % bzw. 44,52 % und in Kombination wurden die Phosphorylierungen von S6 durch die Inhibitoren im Vergleich zur Kontrolle halbiert (50,32 %). In HCC1806 wurden pS6 auf 91,61 % durch den PD-1/PD-L1-Inhibitor 1, auf ca. ein Drittel durch SCH772984 auf 28,39 % und durch die Kombination beider Inhibitoren auf 29,98 % reduziert.

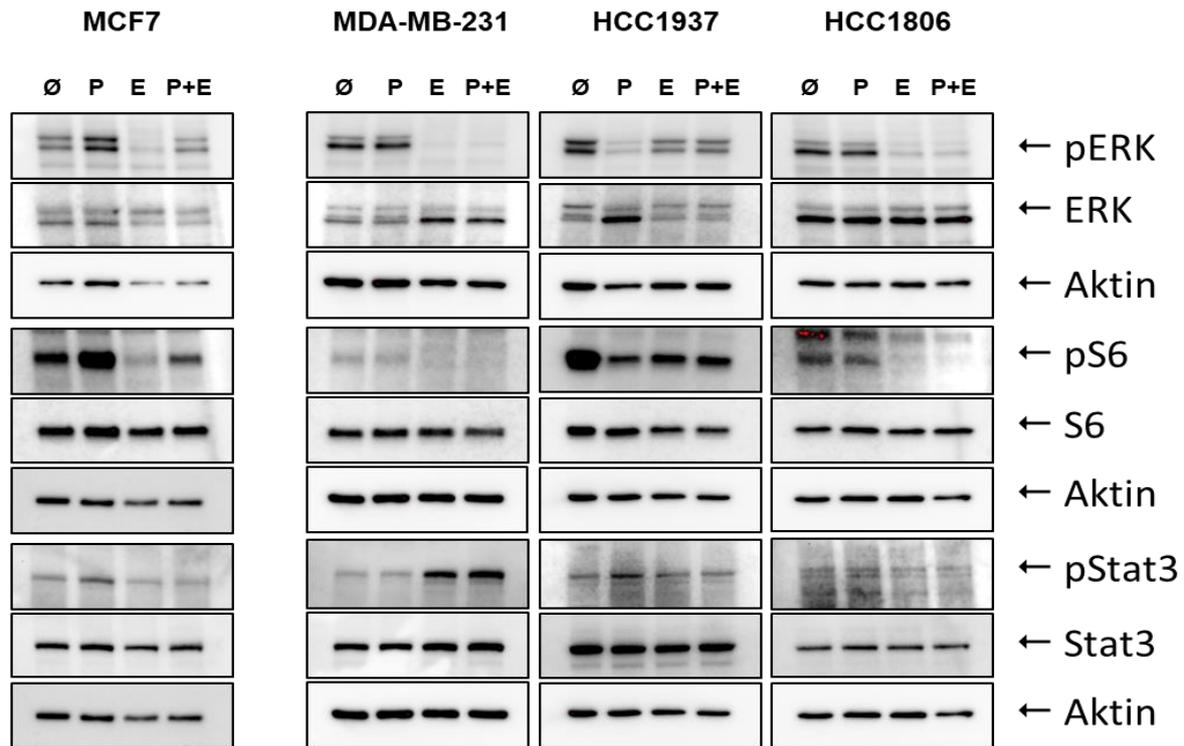


Abb. 8: Westernblot. MCF-, MDA-MB-231-, HCC1937-, und HCC1806-Zellen wurden mit 5 μ M PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 (PD) und 5 μ M ERK-Inhibitor SCH772984 (E) einzeln und in Kombination (PD + E) für 24 h behandelt und die Phosphorylierung der MAP-Kinase-Signalwegsmoleküle ERK, S6 sowie von Stat3 und dem Housekeepingprotein β -Aktin detektiert.

Die Phosphorylierungen von Stat3 wurden durch den PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 im Vergleich zur Kontrolle bei MCF7 auf 147,34 % verstärkt und in HCC1937 mehr als verdoppelt auf 227,79 %. In MDA-MB-231 (97,47 %), HCC1806 (110,08 %) wurden die Anteile von pStat3 mit dem PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 kaum reguliert. Der ERK-Inhibitor SCH772984 bewirkte keine Aktivierung von Stat3 in MCF7 (102,68 %). Dahingegen wurden die Phosphorylierungen von Stat3 in MDA-MB-231 durch die SCH772984-Behandlung fast verdreifacht (282,24 %), in HCC1937 auf 141,6 % erhöht und in HCC1806 kaum reguliert (88,84 %).

Nach der Kombinationsbehandlung war pStat3 in MCF nur leicht reduziert (94,07 %). In MDA-MB-231 wurde pStat3 mehr als verdreifacht (330,59 %), in HCC1937 auf 135,68 % verstärkt und in HCC1806 kaum beeinflusst (98,41 %).

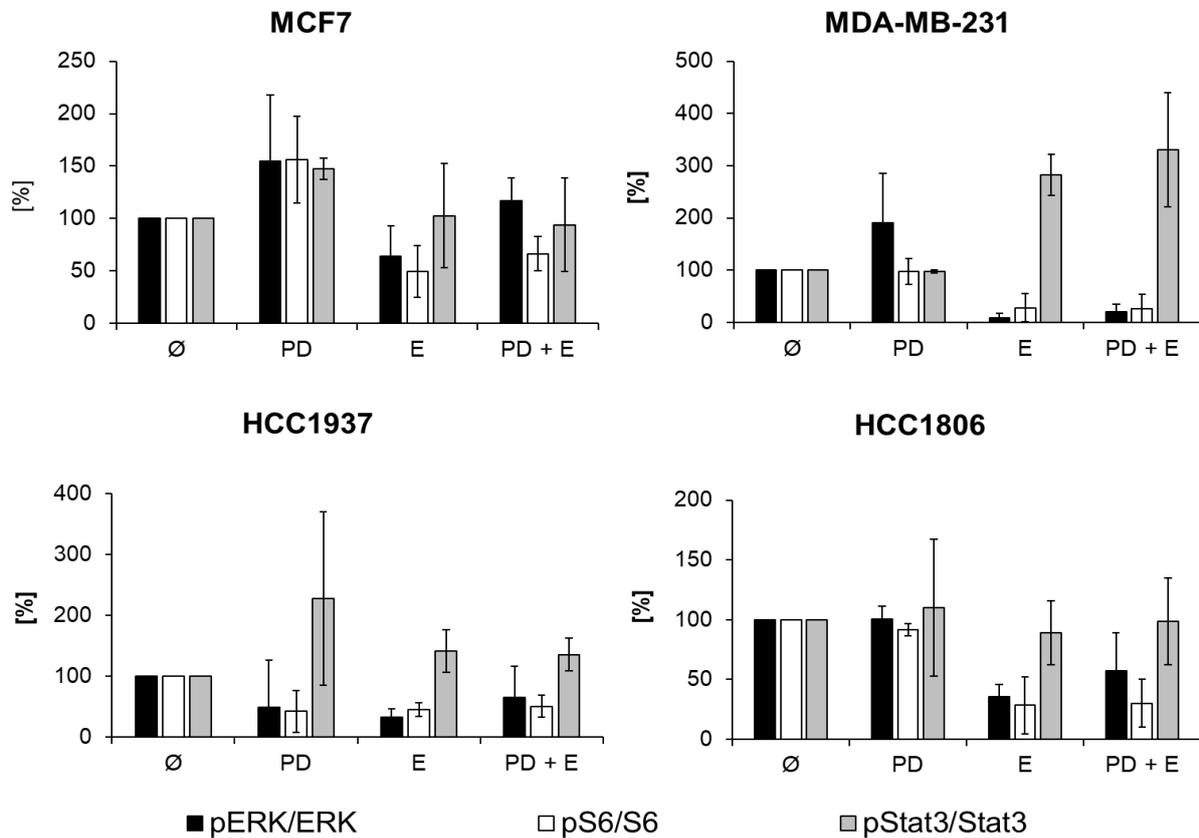


Abb. 9: Verhältnis von pERK/ERK, pS6/S6 und pStat3/Stat3 [%]. Kontrolle ist 100 %. NTNBC-Zelllinie: MCF7, TNBC-Zellen: MDA-MB-231, HCC1937, HCC1806. Unbehandelt (Ø) und Inkubation mit je 5 µM Inhibitoren PD (PD-1/PD-L1-Inhibitor 1), E (ERK-Inhibitor SCH772984) und der Kombination (PD + E) nach 24 h.

3.4. Einfluss der Interferon (IFN)- γ -Behandlung auf die Phosphorylierung der Proteine ERK, S6, Stat3 und auf die Genexpression

In der Literatur wird eine Verstärkung der PD-L1-Expression durch IFN- γ beschrieben. Um einen möglichen Einfluss dieses Zytokins auf den Effekt der Inhibitoren auf Brustkrebszellen zu untersuchen, erfolgten zusätzlich qRT-PCR- und Westernblot-Versuche nach simultaner Behandlung mit IFN- γ (0,1 µg/ml) und je 5 µM PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und SCH772984. Analog zu den Proben ohne INF- γ wurden die Ergebnisse dieser Versuche ausgewertet.

Die Interferon-Behandlung veränderte die Ergebnisse der qRT-PCR- sowie der Westernblot-Versuche im Vergleich zu den Ansätzen ohne Interferon nicht. Außerdem konnte keine verstärkte Expression von PD-L1 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse mit Interferon-Behandlung werden deshalb nicht dargestellt.

4. Diskussion

Der Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren in der Therapie triple-negativer Brustkarzinome ist Gegenstand der aktuellen Krebsforschung. Für eine verbesserte Ansprechrate werden in aktuellen Studien Kombinationsbehandlungen mit anderen antitumorösen Agenzien getestet. Patienten mit TNBC sprechen auf eine Anti-PD-1/PD-L1-Therapie an und Hemmstoffe der MAPK/ERK-Signalkaskade zeigen einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von Brustkrebszellen und auch klinische Wirksamkeit bei weiteren Krebsentitäten. Beide Signalwege fördern, wenn sie aktiviert sind, die Tumorgenese auf verschiedenen molekularen Ebenen, sodass eine kombinierte Blockade therapeutisch sinnvoll erscheint.

In der vorliegenden Arbeit konnte die wachstumsinhibierende Wirkung von Hemmstoffen des MAPK/ERK- und des PD-1/PD-L1-Signalwegs auf Brustkrebszellen bestätigt werden. Beide Inhibitoren hemmten konzentrationsabhängig die Viabilität in allen untersuchten Brustkrebszelllinien. Der PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 erzielte seine Wirkung mit geringerem IC₅₀-Wert in TNBC-Zellen als in der NTNBC-Zelllinie MCF7. Auch der ERK1/2-Inhibitor SCH772984 bewirkte in TNBC-Zellen mit geringeren Konzentrationen eine 50 %-ige Reduzierung der Zellviabilität als in NTNBC-Zellen. Somit scheinen die TNBC-Zelllinien und innerhalb dieser Gruppe häufig die Zellen vom Basal-ähnlichem-Typ besonders sensitiv gegenüber dem PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und dem ERK-Inhibitor SCH772984 zu sein. Hierzu passend erreichten Immuncheckpoint-Inhibitoren gegen PD-1/PD-L1 als Monotherapie in klinischen Studien Ansprechraten zwischen 4,7 und 23,1 % bei Patientinnen mit metastasierten Brustkrebs je nach Subtyp und PD-L1-Expression, wobei häufig TNBC-Patientinnen mit PD-L1-positivem Tumor die höchsten objektiven Ansprechraten (ORR; 18,5 bzw. 23,1 %) zeigten [65]. Adams und Kollegen berichteten von einer Remissionsrate unter Pembrolizumab von 5,3 % bei metastasiertem TNBC [68] und sogar 21,4 %, bei PD-L1-positivem TNBC [69]. Dirix und Kollegen fanden in Ihrer Studie, dass der Anti-PD-L1-Antikörper Avelumab in allen Brustkrebs-Subtypen zusammengenommen mit 3,0 % ORR wirkte, aber mit 5,2 % ORR in TNBC eine bessere Wirksamkeit in diesem Subtyp zeigt [70]. Eine antitumorale Wirkung einer MAPK-Hemmung in TNBC, wie hier gezeigt, bestätigen zudem Nagaria und Kollegen. Der MEK-Inhibitor U0126 verstärkte die zytotoxische Wirkung des dualen EGFR/HER2-Inhibitors Lapatinib additiv und die des

Raf-Inhibitors Sorafenib synergistisch [71]. Lee und Kollegen zeigten, dass der MEK-Inhibitor E6201 die Koloniebildungsrate, die Migration und die Invasion von TNBC-Zellen konzentrationsabhängig hemmte sowie einen Zellzyklus-Arrest herbeiführte und die Apoptose förderte [72]. In Mäusen hemmte E6201 das TNBC-Tumorwachstum, die Lungenmetastasierung und verbesserte das Überleben [72].

Brustkrebs wurde primär zu den Tumorerkrankungen ohne wesentliche immunologische Komponente gezählt. Die Immunogenität von Tumoren ist aber mit ihrer genetischen Mutationslast und die damit einhergehende Bildung neuer tumorspezifischer Antigene assoziiert [73]. Diese neuen tumorspezifischen Antigene sowie Mutationen in DNA-Reparaturgenen können eine Immunantwort mit Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine sowie eine vermehrte Aktivität zytotoxischer T-Zellen initiieren [74, 75]. Trägerinnen der an der DNA-Reparatur beteiligten Proteine BRCA1 und BRCA2 haben ein erhöhtes Lebensrisiko für die Entstehung von Ovarial- und Mammakarzinomen [76]. Zudem scheint das Tumorsuppressorgen p53, das in 80 % der TNBC mutiert vorliegt, die Immunantwort zu beeinflussen, indem es die Antwort der zytotoxischen T-Lymphozyten kontrolliert [77]. Brustkrebszellen weisen je nach Subtyp auf molekularer Ebene genetische Mutationen auf, wobei die Mutationslast in HER2-positiven und Basal-ähnlichen Subtypen am größten sind [78]. Diese Angaben werden durch zahlreiche Studien unterstützt, in denen eine klinische Wirkung von Immuncheckpoint-Inhibitoren wie mit der Blockade des PD-1/PD-L1-Signalweges nachgewiesen wurde. Zusammengenommen kann man schließen, dass Brustkrebs doch immunologischen Einflüssen unterliegt.

In unserer Arbeit konnte gezeigt werden, dass der PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 die Zellviabilität in Brustkrebszellen und besonders in TNBC hemmte. Ein spezifischer Einfluß auf die Immunantwort konnte in unseren Versuchen nicht dargestellt werden, weil die PD-1-Komponente auf Immunzellen in unseren Zellkulturversuchen fehlte. Allerdings scheint der PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 eine direkte Wachstumshemmung in Tumorzellen zu vermitteln und es konnte ausgeschlossen werden, dass eine unspezifische Wachstumssteigerung stattfand oder dass PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 in der Kombination mit dem MAPK-Inhibitor antagonistisch wirken würde.

Ganesan und Kollegen untersuchten im Rahmen von Zell-basierten und biochemischen Versuchen die Effekte niedermolekularer PD-L1-Inhibitoren auf HepG2 Leberzellkarzinom-Zellen und Immunzellen [79]. Die Arbeitsgruppe analysierte die IL-2-Expression in PD-1/PD-L1-vorbehandelten peripheren mononukleären Blutzellen, weil ein IL-2-Phänotypverlust ein signifikantes Kennzeichen für die Erschöpfung von T-Zellen ist [80] und seine Regulation ein wichtiger Indikator für die T-Zellaktivität darstellt. IL-2 wird von T-Lymphozyten sekretiert und fördert das Überleben, die Aktivität von Immunzellen wie natürlichen Killerzellen (NK) und T-Zellen und moduliert somit die Immunantwort [81]. Stimulierte T-Zellen produzierten in der Arbeit von Ganesan und Kollegen nach der Behandlung mit PD-1/PD-L1-Inhibitoren signifikant mehr IL-2 im Vergleich zu unbehandelten T-Zellen ($p < 0,0001$) [79]. Allerdings wurde IL-2 durch die verschiedenen Konzentrationen der verwendeten PD-1/PD-L1-Inhibitoren BMS-103, BMS-142 und BMSpep-57 unterschiedlich reguliert. Obwohl in T-Zellen die IL-2-Produktion angeregt wurde, waren niedrige Inhibitorkonzentrationen unzureichend für die Hemmung der PD-1/PD-L1-Interaktion sowie die Förderung der T-Zell-Aktivität über den Transkriptionsfaktor NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) [79]. In unseren Wachstumsversuchen konnte eine synergistische Wachstumshemmung mit der zusätzlichen Gabe des PD-1/PD-L1-Inhibitors 1 zum ERK-Inhibitor SCH772984 in Brustkrebszellen erzielt werden. Im Rahmen klinischer Tests wäre es sinnvoll, Konzentrationen des PD-1/PD-L1-Inhibitors einzusetzen, die für eine immunmodulatorische Wirkung ausreichend wären. Ob die Konzentrationen des PD-1/PD-L1-Inhibitors dann *in vivo* ausreichen, um einen synergistischen Effekt auf das Zellwachstum in der Kombination mit einem MAP-Kinase-Inhibitor zu erzielen, kann hier nicht beantwortet werden. Es wäre trotzdem denkbar, dass Immunmodulation und Wachstumshemmung von Tumorzellen durch die Applikation des PD-1/PD-L1-Inhibitors gleichzeitig möglich sind.

Der Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren ist für die Patienten mit Nebenwirkungen assoziiert. Bei der Behandlung mit dem PD-1-Inhibitor Pembrolizumab kann es z. B. zu Müdigkeit, Übelkeit, Durchfall bis hin zur Hypotonie, Migräne, Hyponatriämie und Autoimmunhepatitiden kommen [62]. Diese könnten sich bei Kombinationstherapien mit Chemotherapeutika verstärken. Die im Vergleich zu MCF7-Zellen niedrigen IC50-Werte für PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und ERK1/2-Inhibitor SCH772984 in TNBC-Zellen

können möglicherweise weniger potenzielle Nebenwirkungen beim klinischen Einsatz der Inhibitoren für TNBC-Patientinnen bedeuten.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Ausnahme einer TNBC-Zelllinie (MDA-MB-231) eine synergistische, inhibitorische Wirkung auf die Proliferation durch die Kombinationsbehandlung mit PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und SCH772984 erzielt werden. Liu und Kollegen zeigten *in vivo* an einem Mausmodell, dass die kombinierte Immuncheckpoint- und MEK-Blockade eine verstärkte Hemmung des Tumorstwachstums bei Brustkrebs im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit den Inhibitoren bewirkte [36]. Loi und Mitarbeiter zeigten im TNBC-Mausmodell, dass der inhibierte Ras/MAPK-Weg mit weniger tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten (TILs) und einer simultan erhöhten MHC- und PD-L1-Expression *in vivo* und *in vitro* einhergeht [61]. Die für die Immunantwort wichtige Antigen-Präsentation, die über die verstärkte MHC-Expression angezeigt ist, könnte gleichzeitig durch eine PD-L1-induzierte T-Zell-Checkpoint-Blockade verhindert werden, sodass eine Kombination mit einem PD-L1-Inhibitor für die Immunantwort förderlich sein könnte. Hierzu im Einklang konnte dieselbe Arbeitsgruppe verstärkte Expressionen zahlreicher Gene nachweisen, die für die Antigen-Präsentation und Verarbeitung wichtig sind. Darüber wurde eine gesteigerte Antitumor-Immunantwort durch die kombinierte Behandlung mit verschiedenen MEK- und PD-1/PD-L1-Inhibitoren in TNBC erzielt [61]. In TNBC-Patienten ergab sich aus der COLET-Studie eine ORR von 38 % mit der Kombinationsbehandlung von Cobimetinib, einem MEK-Inhibitor und Paclitaxel [82]. Eine weitere Erkenntnis aus dieser Studie war, dass Patienten mit metastasiertem TNBC von einer erweiterten Kombination aus Cobimetinib und Paclitaxel mit Atezolizumab (einem Anti-PD-L1-Antikörper) klinisch profitierten [83]. Bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom fanden Kakavand und Kollegen einen vermehrten Nachweis zytotoxischer Lymphozyten im Tumor unter MEK-Inhibitoren [84]. Zusammenfassend weist die Zahl der Studien darauf hin, dass die Kombination von MEK- und PD-1/PD-L1-Inhibitoren häufig getestet wird. Dabei scheint eine solche Kombination in TNBC besonders gut zu wirken und eine MEK-Inhibition Auswirkung auf das Immunsystem zu haben, sodass ein Synergismus von Inhibitoren des MAPK-Signalweges und Immuncheckpoint-Inhibitoren auch *in vivo* erzielt werden könnte.

Die Ergebnisse der hier präsentierten Zellkultur-Experimente stehen im Einklang mit der, in der Literatur beschriebenen, antitumoralen Wirkung von PD-1/PD-L1- und MAPK-Inhibitoren und bestätigen die Erkenntnisse aus den Studien, dass die kombinierte Blockade beider Signalwege besonders in TNBC-Patienten sinnvoll sein könnte. Bezüglich potenzieller Nebenwirkungen kann die Kombinationstherapie vorteilhaft sein, da so niedrigere Konzentrationen der einzelnen Inhibitoren verwendet werden können.

In der Zellkultur fehlt im Gegensatz zur Situation im Patienten der Einfluss der Tumorumgebung, sodass aus unseren Versuchen keine Rückschlüsse auf die klinische Bedeutung der Kombination von PD-1/PD-L1- und ERK-Inhibitoren für Brustkrebspatientinnen getroffen werden können. Die Tumorumgebung ist jedoch wichtig, denn gemäß Tumei und Kollegen sind beispielsweise ein vermehrter Nachweis von zytotoxischen (CD8+)-Lymphozyten prädiktiv für das Ansprechen auf eine Anti-PD-1-Therapie [85]. Man könnte *in vitro* mit Kokulturen von Tumorzellen und Immunzellen, wie T-Zellen, Tumor assoziierten Makrophagen, NK die tumorale Umgebung simulieren. Zhao und Mitarbeiter zeigten im hepatozellären Karzinom, dass die Wachstumshemmung durch NK PD-L1-abhängig ist und haben die Hemmung in Kokultur mit Hep62-hepatozellulären Krebszellen nachgewiesen [86].

Hinweise zur Wirkweise von PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und SCH772984 erhofften wir durch die Analyse der intrazellulären Prozesse. Bei der Untersuchung wachstumsspezifischer Proteine der zugrundeliegenden Signalwege im Western Blot oder wachstumsspezifischer und immunmodulatorischer Gene in der qRT-PCR reagierten TNBC- und NTNBC-Zelllinien unterschiedlich.

Im Westernblot hemmte der ERK-Inhibitor SCH772984 erwartungsgemäß die Phosphorylierung von ERK und S6. In TNBC-Zellen waren pERK und pS6 besonders stark vermindert. Giltnane und Balko berichteten in diesem Zusammenhang über eine hohe Prävalenz des aktivierten MAPK-Signalwegs in TNBC und Basalzelltyp-ähnlichem Brustkrebs (BLBC) im Vergleich zu anderen Subtypen [87]. Hierzu passend wiesen unabhängig voneinander die Arbeitsgruppen um Hoeflich [88], Jing [89] und Mirzoeva [90] nach, dass MEK-Inhibitoren insbesondere die Zellproliferation TNBC bzw. BLBC hemmten. In unserer Arbeit wurden phospho-ERK und phospho-S6 in TNBC-Zellen durch die Kombination von SCH772984 mit dem PD-1/PD-L1-Inhibitor 1

deutlich reduziert/inaktiviert, sodass anzunehmen ist, dass die Inhibitoren die Proliferation von TNBC-Zellen über die Inaktivierung des MAPK/ERK-Signalweg gehemmt haben könnten. Interessanterweise wurde in den MCF7-Zellen nach der Kombinationsbehandlung von SCH772984 mit dem PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 eine verstärkte Phosphorylierung von ERK beobachtet. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Interaktion beider Inhibitoren in MCF7 zu einer MAPK-Reaktivierung über alternative Signalwege führte.

In der vorliegenden Arbeit bewirkte der PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 allein eine Verstärkung von pERK in MDA-MB-231 und in MCF7. Black und Mitarbeiter zeigten in Brustkrebszelllinien, dass durch die Interaktion von PD-1 und PD-L1 die Resistenz gegenüber den Chemotherapeutika Doxorubicin und Docetaxel verstärkt wurde [91]. In der dort untersuchten Zelllinie MDA-MB-231 wurde mit einem rekombinanten PD-1-Inhibitor ebenfalls eine vermehrte ERK-Aktivierung gefunden.

Bei der kombinierten Behandlung mit PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und SCH772984 wurden die Onkogene c-Fos und FosL in TNBC reguliert. Der Transkriptionsfaktor AP-1 wird als Homo- oder Heterodimer aus Proteinen der Jun- (c-Jun, Jun B und Jun D) und der Fos-Familie (c-Fos, FosB, Fra-1/FosL (Fos-like) 1, Fra-2/FosL 2) gebildet [92]. AP-1 reguliert unter anderem die Zellproliferation, -differenzierung und -invasion sowie die Apoptose [92] und kann somit als Onkogen in verschiedenen soliden Tumoren, darunter auch Brustkrebs, wirken [93]. Die Transkription von c-Fos ist abhängig von aktiviertem ERK [92]. In der vorliegenden Arbeit bewirkte der ERK-Inhibitor eine verminderte Expression von c-Fos in allen Zelllinien mit Ausnahme von MDA-MB-231. Saeki und Mitarbeiter konnten zusätzlich nachweisen, dass im zeitlichen Verlauf die Wirkung des Proteins Fra-1 der Wirkung von c-Fos nachgeschaltet ist [92]. Die Reduktion der mRNA-Expression von FosL, die in unseren Versuchen nach der Behandlung der Basal-ähnlichen-TNBC- und MCF7-Zellen sowohl mit SCH772984 allein als auch in Kombination mit dem PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 gemessen wurde, könnte zusammen mit reduziertem c-Fos eine Hemmung von AP-1 und die darauf folgende Inhibition des Wachstums bedeutet haben. Der PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 allein sorgte zwar für eine gesteigerte Expression von FosL, aber in der Kombinationsbehandlung wurde die vom ERK-Inhibitor induzierte Reduktion von FosL durch den PD-1/PD-L1-Inhibitor nicht beeinflusst.

Der Stat3-Signalweg spielt neben dem MAPK-Signalweg eine wichtige Rolle in der Entstehung, Progression und Metastasierung von Brustkrebs. Stat3 vermittelt viele zelluläre Prozesse, die von Zytokinen und Wachstumsfaktoren initiiert werden. In ungefähr 40 % aller Mammakarzinome ist Stat3 vermehrt phosphoryliert [94]. Eine Stat3-Überexpression ist ursächlich für unkontrollierte Zellproliferation und fördert die Angiogenese. Paradoxe Weise fördert Stat3 in der Entwicklungsphase der Brustdrüse die Apoptose [95]. In Tumorzellen verhindert es allerdings die Apoptose [96]. Unsere Westernblot-Ergebnisse zeigten eine negative Korrelation zwischen den Phosphorylierungen von ERK und Stat3. Die Behandlung mit dem ERK-Inhibitor SCH772984 führte sowohl in den TNBC-Zellen als auch in MCF7 zu vermehrter Phosphorylierung von Stat3 bei verminderten pERK-Mengen. Sengupta und Mitarbeiter zeigten im Gegensatz hierzu, dass die Stat3-Phosphorylierung von MEK/ERK-Inhibitoren gehemmt wird [97]. In unserer Arbeit wurde pStat3 durch die Kombination aus PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und SCH772984 nur in TNBC-Zellen vermehrt, insbesondere, wenn IL-6 und oder IL-8 signifikant oder tendenziell verstärkt wurden. IL-8 sowie IL-6 können die Phosphorylierung von Stat3 initiieren, wobei pStat3 über die Transkription verschiedener Gene zur Progression von Brustkrebs führt [98]. Marotta und Kollegen zeigten in einer Studie mit 14 Brustkrebszelllinien, dass Stat3 in fünf der sechs untersuchten TNBC-Zelllinien [99] aktiviert war. Auch Walker und Mitarbeiter berichten, dass eine Aktivierung von Stat3 häufiger in TNBC-Zellen vorliegt [100]. Dies könnte die mit triple-negativem Brustkrebs vergesellschaftete hohe Metastasierungsrate und damit verbundene schlechte Prognose erklären. In Kombination hatten der PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und SCH772984 in unserer Arbeit keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Stat3 in HCC1806, obwohl sowohl IL-6 als auch IL-8 signifikant reguliert waren. Aufgrund der Rolle des Stat3-Signalwegs in der Tumorgenese und Metastasierung ist die Stat3-Aktivierung durch die Kombination des PD-1/PD-L1-Inhibitors 1 und SCH772984 ein kritischer Punkt, der noch genauer untersucht werden sollte. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die antiproliferative Wirkung durch beide Inhibitoren mit der Hemmung des MAPK-, aber nicht des Stat3-Signalweges einhergeht.

VEGFC ist an Angiogenese und Tumormetastasierung beteiligt. Bei 30 - 40 % der Patienten mit Brustkrebs wird eine VEGFC-Überexpression beschrieben [101]. Laut Raica und Kollegen weisen die HER2- und Luminal-Subtypen die höchsten VEGFC-

Mengen und die Basal-ähnlichen-Subtypen die niedrigsten VEGFC-Mengen auf [102]. Liu und Kollegen hingegen zeigten, dass TNBC mit einer hohen VEGFC-Expression assoziiert ist [103]. Hierzu passend berichtet die Arbeitsgruppe um Linderholm von hohen Mengen VEGF in Patienten mit TNBC im Vergleich zu NTNBC-Patienten und einem damit assoziierten geringeren remissionsfreien Überleben [104]. Die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren hatten keinen wesentlichen Einfluss auf die Expression von VEGFC in den untersuchten Brustkrebszellen. Nur MCF7 verstärkte unter simultaner Gabe beider Inhibitoren die Expression von VEGFC-mRNA. Da die Expression von VEGFC durch die Kombination des PD-1/PD-L1-Inhibitors 1 mit SCH772984 in TNBC nicht reguliert wird, ist dieser Aspekt als unproblematisch zu werten.

PD-L1 wird als prädiktiver Marker für die Behandlung von Brustkrebs mit Immuncheckpoint-Inhibitoren diskutiert. In unserer Arbeit wurde die PD-L1-Expression in Basal-ähnlichen Brustkrebszellen durch die kombinierte Behandlung des PD-L1-Inhibitors 1 mit dem ERK-Inhibitor SCH772984 signifikant verstärkt exprimiert. Im Gegensatz hierzu wiesen Qian und Kollegen in Harnblasen-Krebszellen in der qRT-PCR eine verminderte PD-L1-mRNA nach ERK-Inhibition nach [105]. In einigen Studien wird eine verstärkte Expression von PD-L1 in TNBC im Vergleich zu NTNBC angegeben [44, 106, 107], allerdings weichen die Ergebnisse stark voneinander ab. Eine mögliche Erklärung dafür sind die verschiedenen Nachweismethoden von PD-L1, die entweder mRNA oder Protein verwendeten. Zudem unterschied sich die Definition der PD-L1-Positivität mit Werten für PD-L1 von $\geq 1\%$ oder $\geq 5\%$ der positiv gefärbten Zellen in der Immunhistochemie. Die Quantifizierung von PD-L1 ist aber wichtig, da der PD-L1-Expression ein - kontrovers diskutierter - prognostischer Wert zugeschrieben wird. Einige Autoren berichten, dass eine vermehrte PD-L1-Expression auf Tumorzellen mit prognostisch günstigen pathologischen Faktoren wie Ki-67 [108] oder mit besserer Krankheitsprognose assoziiert ist [108-110]. Andere hingegen zeigten, dass mehr PD-L1 auf Tumorzellen negativ auf das klinische Outcome wirkt [111-113]. Da das PD-L1-Protein nur in seiner glycosylierten Form (g-PD-L1) aktiv ist und TNBC mehr g-PD-L1 als andere Subtypen besitzen [114], könnten weitere Erkenntnisse mit der Erfassung von g-PD-L1 gewonnen werden. Eine hohe PD-L1-Expression kann über die Modulation der Immunreaktion das Überleben bei bereits verminderten TILs zusätzlich verschlechtern [112] und die gute Prognose bei

vermehrter TILs-Menge revidieren [113]. Die Bedeutung der in unserer Arbeit signifikant verstärkten PD-L1-mRNA durch die simultane Hemmung von ERK1/2 und PD-1/PD-L1 in Basal-ähnlichen TNBC für die Prognose kann nicht eingeschätzt werden, da die Tumorumgebung und PD-1 nicht untersucht wurden. Die hohe PD-L1 Expression kann allerdings prädiktiv für das Ansprechen auf eine Anti-PD-L1-Therapie sein, denn Patienten mit PD-L1-positivem Brustkrebs zeigten in klinischen Studien häufig eine bessere Ansprechrate bei einer Anti-PD-1/PD-L1-Therapie als solche mit PD-L1-negativem Brustkrebs [65].

In der Literatur wurde eine Verstärkung der PD-L1-Expression durch Interferon- γ (IFN- γ) beschrieben [62, 107]. In der vorliegenden Arbeit sollte Interferon- γ eingesetzt werden, um eine stärkere Expression von PD-L1 in den TNBC-Zellen sowie eine mögliche Verstärkung der Effekte durch PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und SCH772984 zu überprüfen. Die Stimulation der Zellen mit IFN- γ ergab keine signifikante Änderung der Expression von PD-L1 oder anderer untersuchter Gene. Auch veränderte Aktivierungen von Signalproteinen wurden im Westernblot nicht gefunden. Deshalb wurden die Ergebnisse mit der zusätzlichen Gabe von IFN- γ nicht dargestellt.

Neben PD-L1 wurde die Expression weiterer immunmodulierender Gene durch die Kombinationsbehandlung vom PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und SCH772984 beeinflusst. Chemokine sind Peptide, die Migration und Differenzierung fördern. Sie regulieren die Angiogenese und rekrutieren Immunzellen (Chemotaxis) [115]. Zur Gruppe der Chemokine gehören IL-8 und CXCL1 mit Ihrem gemeinsamen Rezeptor CXCR2. Eine Überexpression von CXCL1 wurde in 4 - 7 % der Brustkrebspatienten detektiert, wobei dies am häufigsten in Tumoren vom Basalzell-ähnlichen Typ der Fall war [116]. CXCL1 wird hauptsächlich von Tumor-assoziierten Makrophagen exprimiert und kann, wie es Ma und Kollegen mit einem rekombinanten humanen CXCL1 nachwiesen *in vitro* das Wachstum, die Migration, die Invasion sowie die EMT von Brustkrebszellen fördern und die Apoptose hemmen [117]. Pawitan und Kollegen zeigten außerdem, dass die CXCL1-Expression in BRCA1-mutierten- und TNBC-Patienten signifikant erhöht ist, sodass eine starke CXCL1-Expression mit einer schlechten Prognose bei Brustkrebs einhergehen könnte [118]. Angesichts der tumorfördernden Wirkung von CXCL1 erscheint die signifikant verstärkte CXCL1-Expression in der Basal-ähnlichen TNBC-Zelllinie HCC1937 durch die kombinierte Blockade des PD-1/PD-L1- und ERK/MAPK-

Signalweges als problematisch. Im NTNBC-Subtyp MCF7 führten der ERK1/2-Inhibitor SCH772984 und die Kombination beider Inhibitoren zu einer signifikanten Herunterregulation der CXCL1-mRNA. Übereinstimmend hierzu konnten Bernard und Mitarbeiter zeigen, dass die Inhibition von ERK die CXCL1-Expression in Brustkrebszellen senkt und auch die Invasivität der Zellen vermindert [115].

Die Interleukine 8 und 6 sind beim Entstehen oder Progress von triple-negativem Brustkrebs beteiligt [119]. Die Hemmung von IL-8 und IL-6 beeinträchtigt die Migration und Lebensfähigkeit von TNBC-Zellen [120], sodass eine verminderte Expression beider Gene durch eine Therapie in den Tumorzellen sinnvoll wäre. Eine geringere Expression immunsupprimierender Zytokine wurde nach Hemmung des Ras/MAPK/ERK-Signalwegs in verschiedenen Zellen beschrieben. Hierzu gehörten Melanome [121], Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome [122] und Brustkrebs [123, 124]. In der vorliegenden Arbeit hatte der ERK-Inhibitor SCH772984 die IL-8-mRNA-Expression ausschließlich in HCC1806-Zellen signifikant reduziert. Als ein proinflammatorisches Chemokin wird IL-8 in ER-negativem und HER2-positivem Brustkrebs überexprimiert [125]. Kim und Kollegen konnten zudem eine signifikant erhöhte IL-8-mRNA-Expression in TNBC im Vergleich zu NTNBC nachweisen, die mit dem MEK-Inhibitor U0126 supprimiert werden konnte [125, 126]. Der ERK-Inhibitor SCH772984 in Kombination mit dem PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 verstärkte in unserer Arbeit die Expression von IL-8 in MDA-MB-231 und HCC1806 signifikant. IL-8 fördert die Zellproliferation durch die Aktivierung u. a. des klassischen MAPK-Signalweges und des Stat3-Signalweges und hemmt die Apoptose [127, 128]. Rody und Kollegen beobachteten, dass eine niedrige IL-8-Expression mit einer verbesserten Prognose für Patienten mit TNBC vergesellschaftet ist [129]. Zudem kann IL-8 die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren durch tumorinfiltrierende Makrophagen stimulieren [128] und so die Proliferation von Tumorzellen fördern. Demnach erscheint die signifikant gestiegene IL-8-Expression nach der Kombination von PD-1/PD-L1- und ERK-Inhibitoren in MDA-MB-231 und HCC1806 zunächst als ungünstig. Es ist allerdings denkbar, dass die therapiebedingt verstärkte IL-8-mRNA-Expression in TNBC-Zellen im Krankheitsverlauf klinisch irrelevant ist. In Zusammenhang mit der Tumorumgebung könnte überexprimiertes IL-8 die Aktivität von Immunzellen beeinflussen. Diese Fragestellung könnte mit Kokulturen z. B. mit T-Zellen untersucht werden.

Die mRNA des Rezeptors CXCR2 wurde durch die kombinierte Behandlung mit PD-1/PD-L1-Inhibitor und SCH772984 in den Brustkrebszellen mit Ausnahme von HCC1937 signifikant vermindert. In einer Metaanalyse von zwanzig Studien mit insgesamt ca. 4.000 Patienten mit soliden Tumoren kamen Yang und Kollegen zu dem Schluss, dass ein verstärkter CXCR2-Nachweis sich negativ auf das Gesamtüberleben bei soliden Tumoren auswirken kann [130]. Zudem kann IL-8 autokrin über seinen Rezeptor CXCR2 zu einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika führen [127, 131]. Da durch die in dieser Arbeit verwendete Behandlung die CXCR2-Expression vermindert wurde, könnten die Inhibitoren von ERK1/2 und PD-1/PD-L1 hierüber zu einer Verbesserung der Überlebensprognose geeignet sein und einer Chemoresistenz entgegenwirken.

Die IL-6-mRNA wurde in der vorliegenden Arbeit bei HCC1937 und HCC1806 durch die Kombinationsbehandlung mit dem PD1/PD-L1-Inhibitor 1 und SCH772984 am stärksten hochreguliert. Bei MDA-MB-231 vom mesenchymalen Typ war die IL-6-mRNA nach Behandlung mit den einzelnen Inhibitoren sowie nach der Kombinationsbehandlung hingegen vermindert. IL-6 wird von Adipozyten in der normalen Brustdrüse und von TNBC-Zellen sezerniert. Über den Stat3-Signalweg vermittelt IL-6 Tumorwachstum und -metastasierung [132]. Eine Analyse von Chavey und Kollegen zeigte einen signifikant höheren Nachweis von IL-6-Protein in ER-negativen Tumoren im Vergleich zu ER-positiven ($p < 0,001$) [133]. Ahmad und Kollegen wiesen hingegen nach, dass eine hohe IL-6-Protein-Expression signifikant mit einem ER-positiven-Status korrelierte und berichteten von einem signifikant assoziierten, längerem krankheitsfreiem Überleben bei hoher IL-6-Expression in ER-positivem Brustkrebs [134]. Passend hierzu wurde durch die Behandlung mit dem PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und SCH772984 einzeln und in Kombination IL-6-mRNA in der ER-positiven Zelllinie MCF7 hochreguliert. Die Vergleichbarkeit der widersprüchlichen Ergebnisse der erwähnten Studien mit den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit ist aufgrund der unterschiedlichen IL-6-Nachweismethoden für Protein in der Immunhistochemie oder mRNA in der qRT-PCR schwierig. Fu und Lin zeigten eine Hemmung der Zellviabilität in MDA-MB-231 durch den Östrogenrezeptor-modulator und IL-6-Hemmstoff Bazedoxifene [120]. Dementsprechend könnte die Hemmung der Zellviabilität in MDA-MB-231 in unserer Arbeit mit der verminderten IL-6-mRNA-Expression erklärt werden.

Die Zytokin-Expression in Basal-ähnlichen-Zellen wird durch den NOTCH-Signalweg reguliert [135]. Hierzu passend war in den Basal-ähnlichen HCC1937-Zellen nach der simultanen Gabe der Inhibitoren die NOTCH1-mRNA signifikant verstärkt bei gleichzeitig verstärkter Expression von IL-6 und IL-8. Gemäß Reedijk findet sich ein vermehrter Nachweis von NOTCH1-mRNA in Patienten mit Tumoren vom Basal-ähnlichen Typ und bei diesem ein signifikant geringeres Gesamtüberleben [136]. Als Onkogen ist NOTCH1 u. a. in Brustkrebs, Magenkrebs sowie Darmkrebs überexprimiert [137]. Der NOTCH-Signalweg ist wichtig für die Entwicklung der normalen Brustdrüse und der Erhaltung der Bruststammzellen [136]. Besonders in Krebsstammzellen ist der Signalweg aktiv und erleichtert die Tumorprogression durch die Förderung der EMT [138]. Somit wäre die verstärkte Expression in HCC1937 nach Gabe der Inhibitoren problematisch. Allerdings wurde durch die Kombination von PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und SCH772984 in MDA-MB-231 signifikant und in HCC1806 nicht signifikant die NOTCH1-Expression gesenkt. Neben NOTCH1 sind die Cyclin abhängigen Kinasen (CDK) an der Regulation des Zellzyklus beteiligt und können die Tumorgenese fördern. CDK5 ist bei Tumoren verstärkt [139]. In dieser Arbeit hatten die Inhibitoren keinen Einfluss auf die Expression von CDK5 in TNBC. In der NTNBC-Zelllinie MCF7 wurde CDK5 allerdings sowohl nach der Einzelbehandlung als auch der kombinierten Behandlung verstärkt exprimiert.

Angesichts der unterschiedlichen Ergebnisse sowohl zwischen TNBC- und NTNBC-Zellen als auch innerhalb der TNBC-Zelllinien konnten nur vage Hinweise darüber gefunden werden, welche Mechanismen zur Proliferationshemmung von Brustkrebszellen durch PD-1/PD-L1- und ERK-Inhibitor geführt haben. Besonders interessant war die Frage, ob die beiden Inhibitoren in die Signalwege oder Funktionsproteine des jeweils anderen Inhibitors eingreifen würden und dessen Wirksamkeit unterbinden könnten. Der PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 hatte keinen wesentlichen Einfluss auf Moleküle des MAPK/ERK-Signalweg. Andersherum beeinflusste die Hemmung des MAPK/ERK-Signalweges die Expression von PD-L1 in Brustkrebszellen nur uneinheitlich bei einigen Zelllinien. In TNBC-Zellen scheint der ERK-Inhibitor Stat3 als Proliferationsprotein zu aktivieren. Außerdem wurden IL-8, IL-6 und CXCL1, die eine Zellproliferation fördern können, in TNBC-Zellen tendenziell oder signifikant verstärkt exprimiert. Die kombinierte Behandlung mit PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 und SCH772984 bewirkte eine deutliche Hemmung der

Zellviabilität, insbesondere in TNBC-Zellen. Zusätzlich inaktivierte diese Kombination die Signalproteine ERK und S6 sowie die Gene c-Fos und FosL, die im AP-1-Komplex eine starke Wirkung auf das Zellwachstum haben. Somit können wir schließen, dass die kombinierte Immuncheckpoint- und MAPK-Blockade eine geeignete Option bei der Suche nach neuen Therapieansätzen für TNBC sein könnte.

5. Zusammenfassung

Das triple-negative Mammakarzinom (TNBC) zeichnet sich auf Grund seiner biologischen Eigenschaften durch eine ungünstige Prognose aus. Fehlende systemische Therapieansätze neben der Chemotherapie stellen einen weiteren Nachteil dar. Aktuelle Studien über den therapeutischen Einsatz von Hemmstoffen des Immuncheckpoints Programmed-cell-death (PD)-1 und seines Liganden PD-L1 zeigen vielversprechende Ergebnisse bei Brustkrebs und besonders im TNBC. Die „*extracellular-signal-regulated*“-Kinase (ERK)1/2 ist über den MAP-Kinase-Signalweg bei der Krebsentstehung involviert. Inhibitoren des MAPK-Signalweges können in der Krebstherapie eingesetzt werden. Eine duale Blockade von PD-1/PD-L1 und ERK1/2 erscheint somit sinnvoll. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirksamkeit und die intrazellulären Auswirkungen durch diese Kombination an Zellkulturen mit Brustkrebszelllinien untersucht werden.

In drei TNBC-Zelllinien unterschiedlicher Subtypen (HCC1937 = basal-like1, HCC1806 = basal-like2 und MDA-MB-231 = mesenchymal-like) und einer Nicht-TNBC-Zelllinie MCF7 (NTNBC) wurden die IC50-Konzentrationen beider Inhibitoren im MTS-Assay ermittelt und der Effekt der Kombinationsbehandlung bestimmt. Mit phosphospezifischen Antikörpern wurde im Westernblot untersucht, ob die Inhibitoren die Aktivierung des MAPK- und Stat3-Signalwegs beeinflussen. Mit quantitativer reverse Transkriptase-PCR wurden die Expressionen immunmodulatorischer sowie wachstumsrelevanter Gene untersucht.

Sowohl der PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 als auch SCH772984, ein ERK1/2-Inhibitor hemmten das Wachstum in den TNBC-Zelllinien stärker als in MCF7. In Kombination verstärkten beide Inhibitoren die Wachstumshemmung synergistisch in MCF7, HCC-1937 und HCC-1806 oder additiv in MDA-MB-231. Die Expression von Genen, die an Proliferation, Entzündungsreaktionen und am Immunsystem beteiligt sind, wurde durch die Behandlung der Inhibitoren sehr unterschiedlich beeinflusst. Z. B. führte die Kombinationsbehandlung zu einer signifikanten Überexpression von IL-8 in den TNBC-Zellen, CXCL1 wurde unter SCH772984 und der Kombinationsbehandlung ausschließlich in den NTNBC-Zellen signifikant vermindert exprimiert. Die Onkogene NOTCH1, c-Fos und FosL wurden nach Behandlung mit den Inhibitoren häufig vermindert exprimiert. Für die Phosphorylierung von ERK, S6 und Stat3 war der Effekt des ERK-Inhibitors ausschlaggebend bei der Kombination beider Inhibitoren.

ERK und S6 wurden durch SCH772984 und der Kombination mit dem PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 vermindert und Stat3 überwiegend verstärkt phosphoryliert in den TNBC-Zellen.

Die additive bzw. synergistische Proliferationshemmung insbesondere in den TNBC-Zellen spricht für eine geeignete Kombination zur möglichen Therapie von TNBC. Die verminderte Expression von c-Fos und FosL sowie die Deaktivierung von ERK und S6 würde einen Tumorprogress hemmen. Andererseits wurden in einigen Zelllinien nach Gabe der Inhibitoren die immunmodulierenden Gene IL-8 und IL-6 stärker exprimiert sowie Stat3 aktiviert, was sich ungünstig auswirken könnte und weiter zu untersuchen wäre.

Zusammenfassend konnten für die Tumorthherapie günstige Effekte durch die Kombination von PD-1/PD-L1- und ERK-Inhibitoren besonders bei TNBC-Zelllinien gezeigt werden. Weiterführende Untersuchungen sollten besonders die Interaktion zwischen Immun- und Tumorzellen und den Einfluss der Tumorumgebung einbeziehen.

6. Literaturverzeichnis

1. WHO (World Health Organisation), Breast Cancer. 2018 [cited 20.07.2018]; Available from: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>.
2. RKI (Robert Koch Institut), Krebs in Deutschland 2011/2012. 2015 [cited 03.12.2018]; Available from: <https://edoc.rki.de/handle/176904/3249>.
3. Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppapalati, A., Luu, H.H., Haydon, R.C., He, T.C. und Ren, G., Breast cancer development und progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis*, 2018. 5(2): p. 77-106.
4. Palma, G., Frasci, G., Chirico, A., Esposito, E., Siani, C., Saturnino, C., Arra, C., Ciliberto, G., Giordano, A. und D'Aiuto, M., Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments. *Oncotarget*, 2015. 6(29): p. 26560-74.
5. Gonzalez-Angulo, A.M., Timms, K.M., Liu, S., Chen, H., Litton, J.K., Potter, J., Lanchbury, J.S., Stemke-Hale, K., Hennessy, B.T., Arun, B.K., Hortobagyi, G.N., Do, K.A., Mills, G.B. und Meric-Bernstam, F., Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2011. 17(5): p. 1082-9.
6. Lee, J.A., Kim, K.I., Bae, J.W., Jung, Y.H., An, H. und Lee, E.S., Triple negative breast cancer in Korea-distinct biology with different impact of prognostic factors on survival. *Breast Cancer Res Treat*, 2010. 123(1): p. 177-87.
7. Hahnen, E., Hauke, J., Engel, C., Neidhardt, G., Rhiem, K. und Schmutzler, R.K., Germline Mutations in Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*, 2017. 12(1): p. 15-19.
8. Carey, L.A., Perou, C.M., Livasy, C.A., Dressler, L.G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M.A., Tse, C.K., Edmiston, S., Deming, S.L., Geradts, J., Cheang, M.C., Nielsen, T.O., Moorman, P.G., Earp, H.S. und Millikan, R.C., Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 2006. 295(21): p. 2492-502.
9. American Cancer Society, Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018, p. 44. 2017 [cited 10.12.2018]; Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2017-2018.pdf>
10. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet*, 2002. 360(9328): p. 187-95.
11. Sisti, J.S., Collins, L.C., Beck, A.H., Tamimi, R.M., Rosner, B.A. und Eliassen, A.H., Reproductive risk factors in relation to molecular subtypes of breast cancer: Results from the nurses' health studies. *Int J Cancer*, 2016. 138(10): p. 2346-56.
12. Parmigiani, G., Berry, D. und Aguilar, O., Determining carrier probabilities for breast cancer-susceptibility genes BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet*, 1998. 62(1): p. 145-58.
13. Ramus, S.J. und Gayther, S.A., The contribution of BRCA1 and BRCA2 to ovarian cancer. *Mol Oncol*, 2009. 3(2): p. 138-50.
14. Senter, L., Hereditary breast and ovarian cancer syndrome: considering the complexities. *Curr Probl Cancer*, 2014. 38(6): p. 226-34.
15. The Cancer Genome Atlas Network, Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2012. 490(7418): p. 61-70.
16. Anders, C.K. und Carey, L.A., Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 2009. 9 Suppl 2: p. S73-81.

17. Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lonning, P.E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P.O. und Botstein, D., Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000. 406(6797): p. 747-52.
18. Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y. und Pietenpol, J.A., Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*, 2011. 121(7): p. 2750-67.
19. Lehmann, B.D., Jovanovic, B., Chen, X., Estrada, M.V., Johnson, K.N., Shyr, Y., Moses, H.L., Sanders, M.E. und Pietenpol, J.A., Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One*, 2016. 11(6): p. e0157368.
20. Gonzalez, D.M. und Medici, D., Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*, 2014. 7(344): p. re8.
21. AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.), S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2020 [cited 03.04.2020], p. 212. Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OLk_S3_Mammakarzinom_2020-02.pdf
22. Liedtke, C., Broglio, K., Moulder, S., Hsu, L., Kau, S.W., Symmans, W.F., Albarracin, C., Meric-Bernstam, F., Woodward, W., Theriault, R.L., Kiesel, L., Hortobagyi, G.N., Pusztai, L. und Gonzalez-Angulo, A.M., Prognostic impact of discordance between triple-receptor measurements in primary and recurrent breast cancer. *Ann Oncol*, 2009. 20(12): p. 1953-8.
23. Yang, Y.F., Liao, Y.Y., Yang, M., Peng, N.F., Xie, S.R. und Xie, Y.F., Discordances in ER, PR and HER2 receptors between primary and recurrent/metastatic lesions and their impact on survival in breast cancer patients. *Med Oncol*, 2014. 31(10): p. 214.
24. Liedtke, C. und Kiesel, L., Current Issues of Targeted Therapy in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*, 2011. 6(3): p. 234-239.
25. Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., Lickley, L.A., Rawlinson, E., Sun, P. und Narod, S.A., Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(15 Pt 1): p. 4429-34.
26. Carey, L.A., Dees, E.C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D.T., Collichio, F., Ollila, D.W., Sartor, C.I., Graham, M.L. und Perou, C.M., The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(8): p. 2329-34.
27. Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K.R., Andre, F., Tordai, A., Mejia, J.A., Symmans, W.F., Gonzalez-Angulo, A.M., Hennessy, B., Green, M., Cristofanilli, M., Hortobagyi, G.N. und Pusztai, L., Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 2008. 26(8): p. 1275-81.
28. Li, X., Yang, J., Peng, L., Sahin, A.A., Huo, L., Ward, K.C., O'Regan, R., Torres, M.A. und Meisel, J.L., Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2017. 161(2): p. 279-287.
29. Santen, R.J., Song, R.X., McPherson, R., Kumar, R., Adam, L., Jeng, M.H. und Yue, W., The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2002. 80(2): p. 239-56.
30. McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A.M. und Franklin, R.A., Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1773(8): p. 1263-84.
31. Friday, B.B. und Adjei, A.A., Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(2): p. 342-6.
32. McCain, J., The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *P T*, 2013. 38(2): p. 96-108.

33. Berg, J.M., John L. Tymoczko, Gregory J. Gatto, Lubert Stryer, Stryer Biochemie. 8 ed2018, Berlin: Springer Spektrum. 1408: p. 488-9.
34. Hatzivassiliou, G., Liu, B., O'Brien, C., Spoerke, J.M., Hoeflich, K.P., Haverty, P.M., Soriano, R., Forrest, W.F., Heldens, S., Chen, H., Toy, K., Ha, C., Zhou, W., Song, K., Friedman, L.S., Amler, L.C., Hampton, G.M., Moffat, J., Belvin, M. und Lackner, M.R., ERK inhibition overcomes acquired resistance to MEK inhibitors. *Mol Cancer Ther*, 2012. 11(5): p. 1143-54.
35. Chen, Y., Wang, X., Cao, C., Liang, S., Peng, C., Fu, L. und He, G., Inhibition of HSP90 sensitizes a novel Raf/ERK dual inhibitor CY-9d in triple-negative breast cancer cells. *Oncotarget*, 2017. 8(61): p. 104193-104205.
36. Liu, B., Fu, L., Zhang, C., Zhang, L., Zhang, Y., Ouyang, L., He, G. und Huang, J., Computational design, chemical synthesis, and biological evaluation of a novel ERK inhibitor (BL-EI001) with apoptosis-inducing mechanisms in breast cancer. *Oncotarget*, 2015. 6(9): p. 6762-75.
37. Hatzidaki, E., Parsonidis, P., Apostolou, P., Daikopoulou, V. und Papisotiriou, I., Novel small molecule decreases cell proliferation, migration, clone formation, and gene expression through ERK inhibition in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. *Anticancer Drugs*, 2019. 30(6): p. 618-627.
38. Liu, C.Y., Chu, P.Y., Huang, C.T., Chen, J.L., Yang, H.P., Wang, W.L., Lau, K.Y., Lee, C.H., Lan, T.Y., Huang, T.T., Lin, P.H., Dai, M.S. und Tseng, L.M., Varlitinib Downregulates HER/ERK Signaling and Induces Apoptosis in Triple Negative Breast Cancer Cells. *Cancers (Basel)*, 2019. 11(1).
39. Meyuhas, O., Ribosomal Protein S6 Phosphorylation: Four Decades of Research. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2015. 320: p. 41-73.
40. Arasanz, H., Gato-Canas, M., Zuazo, M., Ibanez-Vea, M., Breckpot, K., Kochan, G. und Escors, D., PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget*, 2017. 8(31): p. 51936-51945.
41. Bardhan, K., Anagnostou, T. und Boussiotis, V.A., The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol*, 2016. 7: p. 550.
42. Patel, S.P. und Kurzrock, R., PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther*, 2015. 14(4): p. 847-56.
43. Nanda, R., Chow, L.Q., Dees, E.C., Berger, R., Gupta, S., Geva, R., Puzstai, L., Pathiraja, K., Aktan, G., Cheng, J.D., Karantza, V. und Buisseret, L., Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J Clin Oncol*, 2016. 34(21): p. 2460-7.
44. Gatalica, Z., Snyder, C., Maney, T., Ghazalpour, A., Holterman, D.A., Xiao, N., Overberg, P., Rose, I., Basu, G.D., Vranic, S., Lynch, H.T., Von Hoff, D.D. und Hamid, O., Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014. 23(12): p. 2965-70.
45. Migali, C., Milano, M., Trapani, D., Criscitiello, C., Esposito, A., Locatelli, M., Minchella, I. und Curigliano, G., Strategies to modulate the immune system in breast cancer: checkpoint inhibitors and beyond. *Ther Adv Med Oncol*, 2016. 8(5): p. 360-74.
46. Pardoll, D.M., The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2012. 12(4): p. 252-64.
47. Mittendorf, E.A., Philips, A.V., Meric-Bernstam, F., Qiao, N., Wu, Y., Harrington, S., Su, X., Wang, Y., Gonzalez-Angulo, A.M., Akcakanat, A., Chawla, A., Curran, M., Hwu, P., Sharma, P., Litton, J.K., Molldrem, J.J. und Alatrash, G., PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res*, 2014. 2(4): p. 361-70.
48. Chen, L. und Han, X., Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J Clin Invest*, 2015. 125(9): p. 3384-91.
49. Francisco, L.M., Sage, P.T. und Sharpe, A.H., The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*, 2010. 236: p. 219-42.

50. Francisco, L.M., Salinas, V.H., Brown, K.E., Vanguri, V.K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K. und Sharpe, A.H., PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med*, 2009. 206(13): p. 3015-29.
51. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. und Honjo, T., Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*, 1992. 11(11): p. 3887-95.
52. Hamanishi, J., Mandai, M., Matsumura, N., Abiko, K., Baba, T. und Konishi, I., PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. *Int J Clin Oncol*, 2016. 21(3): p. 462-73.
53. Leach, D.R., Krummel, M.F. und Allison, J.P., Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 1996. 271(5256): p. 1734-6.
54. Hodi, F.S., Mihm, M.C., Soiffer, R.J., Haluska, F.G., Butler, M., Seiden, M.V., Davis, T., Henry-Spires, R., MacRae, S., Willman, A., Padera, R., Jaklitsch, M.T., Shankar, S., Chen, T.C., Korman, A., Allison, J.P. und Dranoff, G., Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(8): p. 4712-7.
55. Ascierto, P.A., Kirkwood, J.M., Grob, J.J., Simeone, E., Grimaldi, A.M., Maio, M., Palmieri, G., Testori, A., Marincola, F.M. und Mozzillo, N., The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med*, 2012. 10: p. 85.
56. Chen, M., Pockaj, B., Andreozzi, M., Barrett, M.T., Krishna, S., Eaton, S., Niu, R. und Anderson, K.S., JAK2 and PD-L1 Amplification Enhance the Dynamic Expression of PD-L1 in Triple-negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*, 2018. 18(5): p. e1205-e1215.
57. Alsaab, H.O., Sau, S., Alzhrani, R., Tatiparti, K., Bhise, K., Kashaw, S.K. und Iyer, A.K., PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol*, 2017. 8: p. 561.
58. OPTIVO, European Medicines Agency. 2018 [cited 14.09.2018]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/opdivo>.
59. KEYTRUDA, European Medicines Agency. 2020 [cited 22.04.2020]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/keytruda>.
60. Marra, A., Viale, G. und Curigliano, G., Recent advances in triple negative breast cancer: the immunotherapy era. *BMC Med*, 2019. 17(1): p. 90.
61. Loi, S., Dushyanthen, S., Beavis, P.A., Salgado, R., Denkert, C., Savas, P., Combs, S., Rimm, D.L., Giltneane, J.M., Estrada, M.V., Sanchez, V., Sanders, M.E., Cook, R.S., Pilkinton, M.A., Mallal, S.A., Wang, K., Miller, V.A., Stephens, P.J., Yelensky, R., Doimi, F.D., Gomez, H., Ryzhov, S.V., Darcy, P.K., Arteaga, C.L., und Balko, J.M., RAS/MAPK Activation Is Associated with Reduced Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer: Therapeutic Cooperation Between MEK and PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin Cancer Res*, 2016. 22(6): p. 1499-509.
62. Swoboda, A. und Nanda, R., Immune Checkpoint Blockade for Breast Cancer. *Cancer Treat Res*, 2018. 173: p. 155-165.
63. Schmid, P., Rugo, H.S., Adams, S., Schneeweiss, A., Barrios, C.H., Iwata, H., Dieras, V., Henschel, V., Molinero, L., Chui, S.Y., Maiya, V., Husain, A., Winer, E.P., Loi, S. und Emens, L.A., Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2020. 21(1): p. 44-59.
64. US Food and Drug Administration FDA, FDA approves atezolizumab for PD-L1 positive unresectable locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer. 2019 [22.05.2019]; Available from: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-atezolizumab-pd-l1-positive-unresectable-locally-advanced-or-metastatic-triple-negative>.

65. Solinas, C., Gombos, A., Latifyan, S., Piccart-Gebhart, M., Kok, M. und Buisseret, L., Targeting immune checkpoints in breast cancer: an update of early results. *ESMO Open*, 2017. 2(5): p. e000255.
66. Tallarida, R.J., The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain*, 2002. 98(1-2): p. 163-8.
67. Pfaffl, M.W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001. 29(9): p. e45.
68. Adams, S., Schmid, P., Rugo, H.S., Winer, E.P., Loirat, D., Awada, A., Cescon, D.W., Iwata, H., Campone, M., Nanda, R., Hui, R., Curigliano, G., Toppmeyer, D., O'Shaughnessy, J., Loi, S., Paluch-Shimon, S., Tan, A.R., Card, D., Zhao, J., Karantza, V., und Cortes, J., Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol*, 2019. 30(3): p. 397-404.
69. Adams, S., Loi, S., Toppmeyer, D., Cescon, D.W., De Laurentiis, M., Nanda, R., Winer, E.P., Mukai, H., Tamura, K., Armstrong, A., Liu, M.C., Iwata, H., Ryvo, L., Wimberger, P., Rugo, H.S., Tan, A.R., Jia, L., Ding, Y., Karantza, V. und Schmid, P., Pembrolizumab monotherapy for previously untreated, PD-L1-positive, metastatic triple-negative breast cancer: cohort B of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol*, 2019. 30(3): p. 405-411.
70. Dirix, L.Y., Takacs, I., Jerusalem, G., Nikolinakos, P., Arkenau, H.T., Forero-Torres, A., Boccia, R., Lippman, M.E., Somer, R., Smakal, M., Emens, L.A., Hrinchenko, B., Edenfield, W., Gurtler, J., von Heydebreck, A., Grote, H.J., Chin, K. und Hamilton, E.P., Avelumab, an anti-PD-L1 antibody, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer: a phase 1b JAVELIN Solid Tumor study. *Breast Cancer Res Treat*, 2018. 167(3): p. 671-686.
71. Nagaria, T.S., Shi, C., Leduc, C., Hoskin, V., Sikdar, S., Sangrar, W. und Greer, P.A., Combined targeting of Raf and Mek synergistically inhibits tumorigenesis in triple negative breast cancer model systems. *Oncotarget*, 2017. 8(46): p. 80804-80819.
72. Lee, J., Lim, B., Pearson, T., Choi, K., Fuson, J.A., Bartholomeusz, C., Paradiso, L.J., Myers, T., Tripathy, D. und Ueno, N.T., Anti-tumor and anti-metastasis efficacy of E6201, a MEK1 inhibitor, in preclinical models of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2019. 175(2): p. 339-351.
73. Talhouk, A., Derocher, H., Schmidt, P., Leung, S., Milne, K., Gilks, C.B., Anglesio, M.S., Nelson, B.H. und McAlpine, J.N., Molecular Subtype Not Immune Response Drives Outcomes in Endometrial Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2019. 25(8): p. 2537-2548.
74. Boissiere-Michot, F., Lazenec, G., Frugier, H., Jarlier, M., Roca, L., Duffour, J., Du Paty, E., Laune, D., Blanchard, F., Le Pessot, F., Sabourin, J.C. und Bibeau, F., Characterization of an adaptive immune response in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Oncoimmunology*, 2014. 3: p. e29256.
75. Saeterdal, I., Bjorheim, J., Lislud, K., Gjertsen, M.K., Bukholm, I.K., Olsen, O.C., Nesland, J.M., Eriksen, J.A., Moller, M., Lindblom, A. und Gaudernack, G., Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(23): p. 13255-60.
76. Toss, A., Tomasello, C., Razzaboni, E., Contu, G., Grandi, G., Cagnacci, A., Schilder, R.J. und Cortesi, L., Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes. *Biomed Res Int*, 2015. 2015: p. 341723.
77. Zeng, Y., Wang, C.L., Xian, J., Ye, Q., Qin, X., Tan, Y.W. und Cao, Y.D., Positive correlation between programmed death ligand-1 and p53 in triple-negative breast cancer. *Onco Targets Ther*, 2019. 12: p. 7193-7201.
78. Curtis, C., Shah, S.P., Chin, S.F., Turashvili, G., Rueda, O.M., Dunning, M.J., Speed, D., Lynch, A.G., Samarajiwa, S., Yuan, Y., Graf, S., Ha, G., Haffari, G., Bashashati, A., Russell, R., McKinney, S., Langerod, A., Green, A., Provenzano, E., Wishart, G., Pinder, S., Watson, P., Markowitz, F., Murphy, L., Ellis, I., Purushotham, A., Borresen-Dale, A.L., Brenton, J.D., Tavaré, S., Caldas, C., und Aparicio, S., The genomic and

- transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 2012. 486(7403): p. 346-52.
79. Ganesan, A., Ahmed, M., Okoye, I., Arutyunova, E., Babu, D., Turnbull, W.L., Kundu, J.K., Shields, J., Agopsowicz, K.C., Xu, L., Tabana, Y., Srivastava, N., Zhang, G., Moon, T.C., Belovodskiy, A., Hena, M., Kandadai, A.S., Hosseini, S.N., Hitt, M., Walker, J., Smylie, M., West, F.G., Siraki, A.G., Lemieux, M.J., Elahi, S., Nieman, J.A., Tyrrell, D.L., Houghton, M., und Barakat, K., Comprehensive in vitro characterization of PD-L1 small molecule inhibitors. *Sci Rep*, 2019. 9(1): p. 12392.
 80. Wherry, E.J. und Kurachi, M., Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*, 2015. 15(8): p. 486-99.
 81. Mitra, S. und Leonard, W.J., Biology of IL-2 and its therapeutic modulation: Mechanisms and strategies. *J Leukoc Biol*, 2018. 103(4): p. 643-655.
 82. A Brufsky, D.M., Z Zvirbule, A Eniu, E Lopez-Miranda, JH Seo, M Orditura, F Le Du, M Wongchenko, M Poulin-Costello, B Simmons, V McNally, S Loi and S-B Kim Abstract P5-21-01: Cobimetinib combined with paclitaxel as first-line treatment for patients with advanced triple-negative breast cancer (COLET study): Primary analysis of cohort I. 2018. 78.
 83. Brufsky, A., Kim, S.-B., Zvirbule, Z., Dirix, L.Y., Eniu, A.E., Carabantes, F., Izarzugaza, Y., Mebis, J., Sohn, J., Wongchenko, M., Chohan, S., Amin, R., McNally, V.A., Miles, D. und Loi, S., Phase II COLET study: Atezolizumab (A) + cobimetinib (C) + paclitaxel (P)/nab-paclitaxel (nP) as first-line (1L) treatment (tx) for patients (pts) with locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC). *Journal of Clinical Oncology*, 2019. 37(15_suppl): p. 1013-1013.
 84. Kakavand, H., Wilmott, J.S., Menzies, A.M., Vilain, R., Haydu, L.E., Yearley, J.H., Thompson, J.F., Kefford, R.F., Hersey, P., Long, G.V. und Scolyer, R.A., PD-L1 Expression and Tumor-Infiltrating Lymphocytes Define Different Subsets of MAPK Inhibitor-Treated Melanoma Patients. *Clin Cancer Res*, 2015. 21(14): p. 3140-8.
 85. Tumei, P.C., Harview, C.L., Yearley, J.H., Shintaku, I.P., Taylor, E.J., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., West, A.N., Carmona, M., Kivork, C., Seja, E., Cherry, G., Gutierrez, A.J., Grogan, T.R., Mateus, C., Tomasic, G., Glaspy, J.A., Emerson, R.O., Robins, H., Pierce, R.H., Elashoff, D.A., Robert, C., und Ribas, A., PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 2014. 515(7528): p. 568-71.
 86. Zhao, Y., Jia, Y., Shi, T., Wang, W., Shao, D., Zheng, X., Sun, M., He, K. und Chen, L., Depression Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression through a Glucocorticoids Mediated Up-Regulation of PD-1 Expression in Tumor infiltrating NK Cells. *Carcinogenesis*, 2019.
 87. Giltnane, J.M. und Balko, J.M., Rationale for targeting the Ras/MAPK pathway in triple-negative breast cancer. *Discov Med*, 2014. 17(95): p. 275-83.
 88. Hoeflich, K.P., O'Brien, C., Boyd, Z., Cavet, G., Guerrero, S., Jung, K., Januario, T., Savage, H., Punnoose, E., Truong, T., Zhou, W., Berry, L., Murray, L., Amler, L., Belvin, M., Friedman, L.S. und Lackner, M.R., In vivo antitumor activity of MEK and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in basal-like breast cancer models. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(14): p. 4649-64.
 89. Jing, J., Greshock, J., Holbrook, J.D., Gilmartin, A., Zhang, X., McNeil, E., Conway, T., Moy, C., Laquerre, S., Bachman, K., Wooster, R. und Degenhardt, Y., Comprehensive predictive biomarker analysis for MEK inhibitor GSK1120212. *Mol Cancer Ther*, 2012. 11(3): p. 720-9.
 90. Mirzoeva, O.K., Das, D., Heiser, L.M., Bhattacharya, S., Siwak, D., Gendelman, R., Bayani, N., Wang, N.J., Neve, R.M., Guan, Y., Hu, Z., Knight, Z., Feiler, H.S., Gascard, P., Parvin, B., Spellman, P.T., Shokat, K.M., Wyrobek, A.J., Bissell, M.J., McCormick, F., Kuo, W.L., Mills, G.B., Gray, J.W., und Korn, W.M., Basal subtype and MAPK/ERK kinase (MEK)-phosphoinositide 3-kinase feedback signaling determine susceptibility of breast cancer cells to MEK inhibition. *Cancer Res*, 2009. 69(2): p. 565-72.

91. Black, M., Barsoum, I.B., Truesdell, P., Cotechini, T., Macdonald-Goodfellow, S.K., Petroff, M., Siemens, D.R., Koti, M., Craig, A.W. und Graham, C.H., Activation of the PD-1/PD-L1 immune checkpoint confers tumor cell chemoresistance associated with increased metastasis. *Oncotarget*, 2016. 7(9): p. 10557-67.
92. Saeki, Y., Endo, T., Ide, K., Nagashima, T., Yumoto, N., Toyoda, T., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., Sakaki, Y. und Okada-Hatakeyama, M., Ligand-specific sequential regulation of transcription factors for differentiation of MCF-7 cells. *BMC Genomics*, 2009. 10: p. 545.
93. Lu, D., Chen, S., Tan, X., Li, N., Liu, C., Li, Z., Liu, Z., Stupack, D.G., Reisfeld, R.A. und Xiang, R., Fra-1 promotes breast cancer chemosensitivity by driving cancer stem cells from dormancy. *Cancer Res*, 2012. 72(14): p. 3451-6.
94. Chang, Q., Bournazou, E., Sansone, P., Berishaj, M., Gao, S.P., Daly, L., Wels, J., Theilen, T., Granitto, S., Zhang, X., Cotari, J., Alpaugh, M.L., de Stanchina, E., Manova, K., Li, M., Bonafe, M., Ceccarelli, C., Taffurelli, M., Santini, D., Altan-Bonnet, G., Kaplan, R., Norton, L., Nishimoto, N., Huszar, D., Lyden, D., und Bromberg, J., The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis. *Neoplasia*, 2013. 15(7): p. 848-62.
95. Levy, D.E. und Lee, C.K., What does Stat3 do? *J Clin Invest*, 2002. 109(9): p. 1143-8.
96. Bromberg, J. und Wang, T.C., Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer Cell*, 2009. 15(2): p. 79-80.
97. Sengupta, T.K., Talbot, E.S., Scherle, P.A. und Ivashkiv, L.B., Rapid inhibition of interleukin-6 signaling and Stat3 activation mediated by mitogen-activated protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(19): p. 11107-12.
98. Ma, J.H., Qin, L. und Li, X., Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Commun Signal*, 2020. 18(1): p. 33.
99. Marotta, L.L., Almendro, V., Marusyk, A., Shipitsin, M., Schemme, J., Walker, S.R., Bloushtain-Qimron, N., Kim, J.J., Choudhury, S.A., Maruyama, R., Wu, Z., Gonen, M., Mulvey, L.A., Bessarabova, M.O., Huh, S.J., Silver, S.J., Kim, S.Y., Park, S.Y., Lee, H.E., Anderson, K.S., Richardson, A.L., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Liu, X.S., Root, D.E., Hahn, W.C., Frank, D.A., und Polyak, K., The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44(+)/CD24(-) stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *J Clin Invest*, 2011. 121(7): p. 2723-35.
100. Walker, S.R., Nelson, E.A., Zou, L., Chaudhury, M., Signoretti, S., Richardson, A. und Frank, D.A., Reciprocal effects of STAT5 and STAT3 in breast cancer. *Mol Cancer Res*, 2009. 7(6): p. 966-76.
101. Eroglu, A., Ersoz, C., Karasoy, D. und Sak, S., Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C, VEGF-D, VEGFR-3 and D2-40 expressions in primary breast cancer: Association with lymph node metastasis. *Adv Clin Exp Med*, 2017. 26(2): p. 245-249.
102. Raica, M., Cimpean, A.M., Ceausu, R. und Ribatti, D., Lymphatic microvessel density, VEGF-C, and VEGFR-3 expression in different molecular types of breast cancer. *Anticancer Res*, 2011. 31(5): p. 1757-64.
103. Liu, H.T., Ma, R., Yang, Q.F., Du, G. und Zhang, C.J., Lymphangiogenic characteristics of triple negativity in node-negative breast cancer. *Int J Surg Pathol*, 2009. 17(6): p. 426-31.
104. Linderholm, B.K., Hellborg, H., Johansson, U., Elmberger, G., Skoog, L., Lehtio, J. und Lewensohn, R., Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*, 2009. 20(10): p. 1639-46.
105. Qian, Y., Deng, J., Geng, L., Xie, H., Jiang, G., Zhou, L., Wang, Y., Yin, S., Feng, X., Liu, J., Ye, Z. und Zheng, S., TLR4 signaling induces B7-H1 expression through MAPK pathways in bladder cancer cells. *Cancer Invest*, 2008. 26(8): p. 816-21.
106. Barrett, M.T., Anderson, K.S., Lenkiewicz, E., Andreozzi, M., Cunliffe, H.E., Klassen, C.L., Dueck, A.C., McCullough, A.E., Reddy, S.K., Ramanathan, R.K., Northfelt, D.W. und Pockaj, B.A., Genomic amplification of 9p24.1 targeting JAK2, PD-L1, and PD-L2

- is enriched in high-risk triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 2015. 6(28): p. 26483-93.
107. Bedognetti, D., Maccalli, C., Bader, S.B., Marincola, F.M. und Seliger, B., Checkpoint Inhibitors and Their Application in Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*, 2016. 11(2): p. 108-15.
 108. Botti, G., Collina, F., Scognamiglio, G., Rao, F., Peluso, V., De Cecio, R., Piezzo, M., Landi, G., De Laurentiis, M., Cantile, M. und Di Bonito, M., Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Tumor Expression Is Associated with a Better Prognosis and Diabetic Disease in Triple Negative Breast Cancer Patients. *Int J Mol Sci*, 2017. 18(2).
 109. Barrett, M.T., Lenkiewicz, E., Malasi, S., Basu, A., Yearley, J.H., Annamalai, L., McCullough, A.E., Kosiorek, H.E., Narang, P., Wilson Sayres, M.A., Chen, M., Anderson, K.S. und Pockaj, B.A., The association of genomic lesions and PD-1/PD-L1 expression in resected triple-negative breast cancers. *Breast Cancer Res*, 2018. 20(1): p. 71.
 110. Lee, J., Kim, D.M. und Lee, A., Prognostic Role and Clinical Association of Tumor-Infiltrating Lymphocyte, Programmed Death Ligand-1 Expression with Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Locally Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res Treat*, 2019. 51(2): p. 649-663.
 111. Choi, S.H., Chang, J.S., Koo, J.S., Park, J.W., Sohn, J.H., Keum, K.C., Suh, C.O. und Kim, Y.B., Differential Prognostic Impact of Strong PD-L1 Expression and 18F-FDG Uptake in Triple-negative Breast Cancer. *Am J Clin Oncol*, 2018. 41(11): p. 1049-1057.
 112. Tomioka, N., Azuma, M., Ikarashi, M., Yamamoto, M., Sato, M., Watanabe, K.I., Yamashiro, K. und Takahashi, M., The therapeutic candidate for immune checkpoint inhibitors elucidated by the status of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and programmed death ligand 1 (PD-L1) expression in triple negative breast cancer (TNBC). *Breast Cancer*, 2018. 25(1): p. 34-42.
 113. Zhu, X., Zhang, Q., Wang, D., Liu, C., Han, B. und Yang, J.M., Expression of PD-L1 Attenuates the Positive Impacts of High-level Tumor-infiltrating Lymphocytes on Prognosis of Triple-negative Breast Cancer. *Cancer Biol Ther*, 2019. 20(8): p. 1105-1112.
 114. Shao, B., Li, C.W., Lim, S.O., Sun, L., Lai, Y.J., Hou, J., Liu, C., Chang, C.W., Qiu, Y., Hsu, J.M., Chan, L.C., Zha, Z., Li, H. und Hung, M.C., Deglycosylation of PD-L1 by 2-deoxyglucose reverses PARP inhibitor-induced immunosuppression in triple-negative breast cancer. *Am J Cancer Res*, 2018. 8(9): p. 1837-1846.
 115. Bernard, S., Myers, M., Fang, W.B., Zinda, B., Smart, C., Lambert, D., Zou, A., Fan, F. und Cheng, N., CXCL1 Derived from Mammary Fibroblasts Promotes Progression of Mammary Lesions to Invasive Carcinoma through CXCR2 Dependent Mechanisms. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2018. 23(4): p. 249-267.
 116. Wang, N., Liu, W., Zheng, Y., Wang, S., Yang, B., Li, M., Song, J., Zhang, F., Zhang, X., Wang, Q. und Wang, Z., CXCL1 derived from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via activating NF-kappaB/SOX4 signaling. *Cell Death Dis*, 2018. 9(9): p. 880.
 117. Ma, K., Yang, L., Shen, R., Kong, B., Chen, W., Liang, J., Tang, G. und Zhang, B., Th17 cells regulate the production of CXCL1 in breast cancer. *Int Immunopharmacol*, 2018. 56: p. 320-329.
 118. Pawitan, Y., Bjohle, J., Amler, L., Borg, A.L., Egyhazi, S., Hall, P., Han, X., Holmberg, L., Huang, F., Klaar, S., Liu, E.T., Miller, L., Nordgren, H., Ploner, A., Sandelin, K., Shaw, P.M., Smeds, J., Skoog, L., Wedren, S. und Bergh, J., Gene expression profiling spares early breast cancer patients from adjuvant therapy: derived and validated in two population-based cohorts. *Breast Cancer Res*, 2005. 7(6): p. R953-64.
 119. Hartman, Z.C., Poage, G.M., den Hollander, P., Tsimelzon, A., Hill, J., Panupinthu, N., Zhang, Y., Mazumdar, A., Hilsenbeck, S.G., Mills, G.B. und Brown, P.H., Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. *Cancer Res*, 2013. 73(11): p. 3470-80.

120. Fu, S. und Lin, J., Blocking Interleukin-6 and Interleukin-8 Signaling Inhibits Cell Viability, Colony-forming Activity, and Cell Migration in Human Triple-negative Breast Cancer and Pancreatic Cancer Cells. *Anticancer Res*, 2018. 38(11): p. 6271-6279.
121. Sumimoto, H., Imabayashi, F., Iwata, T. und Kawakami, Y., The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J Exp Med*, 2006. 203(7): p. 1651-6.
122. Mohan, S., Vander Broek, R., Shah, S., Eytan, D.F., Pierce, M.L., Carlson, S.G., Coupár, J.F., Zhang, J., Cheng, H., Chen, Z. und Van Waes, C., MEK Inhibitor PD-0325901 Overcomes Resistance to PI3K/mTOR Inhibitor PF-5212384 and Potentiates Antitumor Effects in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2015. 21(17): p. 3946-56.
123. Liu, Q., Zhu, H., Zhang, C., Chen, T. und Cao, X., Small GTPase RBJ promotes cancer progression by mobilizing MDSCs via IL-6. *Oncoimmunology*, 2017. 6(1): p. e1245265.
124. Liu, X., Zhao, W., Wang, W., Lin, S. und Yang, L., Puerarin suppresses LPS-induced breast cancer cell migration, invasion and adhesion by blockage NF-kappaB and Erk pathway. *Biomed Pharmacother*, 2017. 92: p. 429-436.
125. Kim, S., Jeon, M., Lee, J.E. und Nam, S.J., MEK activity controls IL-8 expression in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Oncol Rep*, 2016. 35(4): p. 2398-404.
126. Kim, S., Lee, J., Jeon, M., Lee, J.E. und Nam, S.J., MEK-dependent IL-8 induction regulates the invasiveness of triple-negative breast cancer cells. *Tumour Biol*, 2016. 37(4): p. 4991-9.
127. Al-Khalaf, H.H., Al-Harbi, B., Al-Sayed, A., Arafah, M., Tulbah, A., Jarman, A., Al-Mohanna, F. und Aboussekhra, A., Interleukin-8 Activates Breast Cancer-Associated Adipocytes and Promotes Their Angiogenesis- and Tumorigenesis-Promoting Effects. *Mol Cell Biol*, 2019. 39(2).
128. Waugh, D.J. und Wilson, C., The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(21): p. 6735-41.
129. Rody, A., Karn, T., Liedtke, C., Pusztai, L., Ruckhaeberle, E., Hanker, L., Gaetje, R., Solbach, C., Ahr, A., Metzler, D., Schmidt, M., Müller, V., Holtrich, U. und Kaufmann, M., A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2011. 13(5): p. R97.
130. Yang, Y., Luo, B., An, Y., Sun, H., Cai, H. und Sun, D., Systematic review and meta-analysis of the prognostic value of CXCR2 in solid tumor patients. *Oncotarget*, 2017. 8(65): p. 109740-109751.
131. Ha, H., Debnath, B. und Neamati, N., Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. *Theranostics*, 2017. 7(6): p. 1543-1588.
132. Jin, K., Pandey, N.B. und Popel, A.S., Simultaneous blockade of IL-6 and CCL5 signaling for synergistic inhibition of triple-negative breast cancer growth and metastasis. *Breast Cancer Res*, 2018. 20(1): p. 54.
133. Chavey, C., Bibeau, F., Gourgou-Bourgade, S., Burlinçon, S., Boissiere, F., Laune, D., Roques, S. und Lazennec, G., Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res*, 2007. 9(1): p. R15.
134. Ahmad, N., Ammar, A., Storr, S.J., Green, A.R., Rakha, E., Ellis, I.O. und Martin, S.G., IL-6 and IL-10 are associated with good prognosis in early stage invasive breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*, 2018. 67(4): p. 537-549.
135. Shen, Q., Cohen, B., Zheng, W., Rahbar, R., Martin, B., Murakami, K., Lamorte, S., Thompson, P., Berman, H., Zuniga-Pflucker, J.C., Ohashi, P.S. und Reedijk, M., Notch Shapes the Innate Immunophenotype in Breast Cancer. *Cancer Discov*, 2017. 7(11): p. 1320-1335.
136. Reedijk, M., Notch signaling and breast cancer. *Adv Exp Med Biol*, 2012. 727: p. 241-57.
137. Li, L., Tang, P., Li, S., Qin, X., Yang, H., Wu, C. und Liu, Y., Notch signaling pathway networks in cancer metastasis: a new target for cancer therapy. *Med Oncol*, 2017. 34(10): p. 180.

138. Chen, J., Jiang, C.C., Jin, L. und Zhang, X.D., Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Ann Oncol*, 2016. 27(3): p. 409-16.
139. Strock, C.J., Park, J.I., Nakakura, E.K., Bova, G.S., Isaacs, J.T., Ball, D.W. und Nelkin, B.D., Cyclin-dependent kinase 5 activity controls cell motility and metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2006. 66(15): p. 7509-15.

7. Anhänge

- MTS-Assay: Viabilitätswerte in Prozent für die Erstellung der Ergebnisse in Abb. 3 und Signifikanzen (p-Werte)

Zelllinie	Zellviabilität (%) nach PD-1/PD-L1					
		Ø	0,625 µM	1,25 µM	2,5 µM	5 µM
MCF7		104,10	97,19	92,08	74,41	2,62
		96,78	102,72	105,48	89,19	2,07
		99,13	102,30	103,41	78,00	2,90
	<i>MW</i> <i>St. Abw.</i>	100,00 3,74	100,74 3,08	100,32 7,21	80,53 7,70	2,53 0,42
MDA-MB-231		96,59	79,93	62,58	32,89	3,41
		97,98	90,31	67,11	37,56	5,85
		105,44	85,78	63,83	35,54	3,14
	<i>MW</i> <i>St. Abw.</i>	100,00 4,76	85,34 5,21	64,51 2,34	35,33 2,34	4,13 1,50
HCC1937		94,51	80,14	50,65	2,31	
		105,24	80,06	54,07	2,53	0
		100,25	80,14	61,74	3,20	
	<i>MW</i> <i>St. Abw.</i>	100,00 5,37	80,11 0,04	55,49 5,68	2,68 0,47	0 0
HCC1806		100,29	99,43	78,82	31,94	
		100,63	104,41	93,59	34,00	0
		99,08	103,38	96,85	28,33	
	<i>MW</i> <i>St. Abw.</i>	100,00 0,81	102,40 2,63	89,75 9,61	31,43 2,87	0 0

Zelllinie	Signifikanzen (p-Werte)			
	0,625 µM	1,25 µM	2,5 µM	5 µM
MDA-MB-231	0,012	0,0012	0,0006	0,15
HCC1937	6,04E-007	1,82E-005	5,50E-005	0
HCC1806	0,51	0,20	0,0005	0

- MTS-Assay: Viabilitätswerte in Prozent für die Erstellung der Ergebnisse in Abb. 4 und Signifikanzen (p-Werte)

Zelllinie	Zellviabilität (%) nach ERK-Konzentration					
		Ø	0,625 µM	1,25 µM	2,5 µM	5 µM
MCF7		103,70	107,66	111,49	102,11	92,60
		96,04	107,40	108,98	97,62	87,98
		100,26	98,15	98,02	84,28	75,30
	<i>MW</i> <i>St. Abw.</i>	100,00 3,84	104,40 5,42	106,16 7,17	94,67 9,28	85,29 8,96
MDA-MB-231		100,89	56,76	57,81	54,36	42,59
		104,56	57,81	57,39	56,05	42,87
		94,55	54,78	53,37	50,41	40,47
	<i>MW</i> <i>St. Abw.</i>	100,00 5,07	56,45 1,54	56,19 2,45	53,61 2,89	41,97 1,31

		∅	0,625 µM	1,25 µM	2,5 µM	5 µM
HCC1937		102,98	65,56	33,81	29,27	19,70
		99,43	66,90	34,87	28,14	19,06
		97,59	64,07	34,09	30,33	20,06
	<i>MW</i>	100,00	65,51	34,25	29,25	19,61
	<i>St. Abw.</i>	2,74	1,42	0,55	1,10	0,50
HCC1806		103,49	73,94	81,04	71,24	32,75
		100,62	75,97	77,49	71,24	36,47
		95,89	68,54	71,07	62,13	32,58
	<i>MW</i>	100	72,82	76,53	68,20	33,93
	<i>St. Abw.</i>	3,84	3,84	5,05	5,26	2,19

Zelllinie	Signifikanzen (p-Werte)			
	1,25 µM	2,5 µM	5 µM	10 µM
MDA-MB-231	0,0001	0,0003	0,0019	0,0012
HCC1937	0,0003	6,51E-005	0,0003	0,0002
HCC1806	0,0012	0,0042	0,013	0,0006

- MTS-Assay: Viabilitätswerte in Prozent für die Erstellung der Ergebnisse in Abb. 5 und Signifikanzen (p-Werte)

Zelllinie	Zellviabilität (%)							
	∅	PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 (µM)		ERK-Inhibitor SCH772984 (µM)		Kombinationsbehandlungen PD + E (µM)		
		0,625	2,5	2,5	5	0,625 PD + 2,5 E	0,625 PD + 5 E	2,5 PD + 5 E
MCF7	100 (+/-) 3,84	-	77,06 (+/-) 7,37	-	94,67 (+/-) 9,28	-	-	34,39 (a) (+/-) 4,09
MDA-MB-231	100 (+/-) 4,76	-	35,33 (+/-) 2,34	-	52,98 (+/-) 2,86	-	-	25,71 (b) (+/-) 1,76
HCC1937	100 (+/-) 5,37	80,11 (+/-)0,04	-	-	30,73 (+/-) 1,15	-	22,14 (c) (+/-) 0,52	-
HCC1806	100 (+/-) 0,81	102,40 (+/-)2,63	-	-	77,85 (+/-) 5,14	67,43 (d) (+/-) 0,69	-	-

(+/-): Standard Abweichung

Kombinationsbehandlung	Signifikanzen im Vergleich zu Einzelbehandlungen (p-Werte)				
	∅	PD-1/PD-L1-Inhibitor 1 (µM)		SCH772984 (µM)	
		0,625	2,5	1,25	5
MCF7 (a)	3,51E-05	-	0,0009	-	0,0005
MDA-MB-231 (b)	1,44E-05	-	0,0047	-	0,0001
HCC1937 (c)	1,52E-005	4,48E-009	-	-	0,0003
HCC1806 (d)	7,68E-007	2,40E-005	-	0,0253	-

- qRT-PCR: p-Werte für unterschiedliche Expressionen für die Ergebnisse in Abb. 6 und 7

	MCF7			MDA-MB-231			HCC1937			HCC1806		
	PD	E	PD+E	PD	E	PD+E	PD	E	PD+E	PD	E	PD+E
PD-L1	0,650	0,718	0,511	0,199	0,024	0,075	0,104	0,886	0,010	0,032	0,843	0,001
IL-8	0,315	0,847	0,215	0,039	0,007	0,011	0,128	0,545	0,330	0,010	0,004	0,015
IL-6	0,625	0,825	0,625	0,305	0,191	0,135	0,090	0,383	0,008	0,102	0,050	0,037
CXCL1	0,073	0,0004	0,0004	0,573	0,254	0,142	0,112	0,413	0,007	1,000	0,867	0,562
CXCR2	0,233	0,555	0,047	0,547	0,079	0,046	-	-	-	0,365	0,962	0,020
CDK5	0,184	0,184	0,387	0,898	0,324	0,788	0,244	0,525	0,108	0,971	0,688	0,835
NOTCH1	0,379	0,717	0,991	0,454	0,068	0,018	0,212	0,147	0,007	0,258	0,910	0,246
cFOS	0,293	0,030	0,017	0,038	0,143	0,070	0,050	0,014	0,001	0,517	0,030	0,059
FosL	0,310	0,011	0,010	0,053	0,015	0,011	0,221	0,392	0,558	0,855	0,281	0,304
VEGFC	0,042	0,043	0,262	0,135	0,010	0,450	0,584	0,783	0,343	0,721	0,072	0,126

- Westernblot: Relationen in Prozent für die Erstellung von Abb. 9

Zelllinie			pERK/ERKE	pS6/S6	pStat3/Stat3	
MCF7	∅		100	100	100	
	PD		156,01	31,73	124,07	
			217,25	90,31	134,36	
		MW St. Abw.	89,68 154,31	69,01 63,68	92,04 116,82	
	E		31,73	41,78	89,97	
			90,31	29,74	60,38	
		MW St. Abw.	69,01 63,68	77,05 49,52	157,67 102,68	
	PD+E		124,07	80,53	70,37	
			134,36	69,92	66,28	
		MW St. Abw.	92,04 116,82	48,56 66,34	145,54 94,07	
	MDA-MB-231	∅		100	100	100
		PD		112,68	76,25	87,30
			160,70	92,88	91,08	
MW St. Abw.			297,28 190,22	124,78 97,97	114,03 97,47	
E			3,37	17,76	384,39	
			18,21	7,93	329,56	
		MW St. Abw.	5,57 9,05	58,92 28,20	132,76 282,24	
PD+E			4,33	6,18	501,56	
			20,13	13,98	346,85	
		MW St. Abw.	35,21 19,89	57,35 25,84	143,37 330,59	
			15,44	27,57	109,40	

HCC1937	Ø		100	100	100
	PD		4,63	18,07	158,40
			2,42	26,43	132,61
			138,62	81,23	392,34
	MW		48,55	41,91	227,79
		St. Abw.	78,01	34,30	143,09
	E		45,40	32,46	110,24
			34,62	46,64	134,75
			18,72	54,45	179,81
		MW	32,91	44,52	141,60
		St. Abw.	13,42	11,15	35,28
PD+E		77,26	33,80	128,58	
		108,77	46,97	112,47	
		9,65	70,19	165,99	
	MW	65,23	50,32	135,68	
	St. Abw.	50,64	18,43	27,46	
HCC1806	Ø		100	100	100
	PD		91,61	86,83	88,05
			112,56	90,96	174,92
			96,50	97,03	67,28
		MW	100,22	91,61	110,08
		St. Abw.	10,96	5,13	57,10
	E		24,29	20,72	96,28
			43,30	9,28	111,20
			38,75	55,17	59,06
		MW	35,45	28,39	88,84
		St. Abw.	9,93	23,89	26,86
	PD+E		23,78	26,99	112,81
		87,30	11,67	125,48	
		60,68	51,27	56,94	
MW		57,26	29,98	98,41	
St. Abw.		31,90	19,97	36,47	