

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktorin: Frau Prof. med. habil. Dr. rer. nat. Barbara Seliger)  
sowie  
dem Institut für Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktorin: Frau Prof. Dr. med. Katrin Hoffmann)

**„Pathophysiologische und molekulargenetische Analyse von  
Melanomzelllinien sowie Analyse zum pharmakologischen Stellenwert  
von Vemurafenib in der Zelldynamik“**

**Dissertation**

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

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

von  
Juliane Mech, geb. Kaltenborn  
geboren am 14.09.1989 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Barbara Seliger
2. Prof. Dr. Stefan Eichmüller (Heidelberg)
3. Prof. Dr. Cord Sunderkötter

02.05.2017

11.04.2018

## Referat

Die molekularen Grundlagen von malignen Melanomen sowie die Entwicklung angeborener bzw. erworbener Resistenzmechanismen gegenüber Chemotherapeutika sind bislang noch nicht eindeutig geklärt. Mit dieser Arbeit soll zum Verständnis der pathologischen Vorgänge auf zellulärer Ebene sowie der Entstehung von Resistenzen gegenüber Inhibitoren in malignen Melanomen beigetragen werden.

Hierzu wurden 25 Melanomzelllinien des Institutes für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg auf molekularbiologischer Ebene untersucht. Im ersten Schritt erfolgte die Analyse der Melanomzellen auf zellbiologische und molekulargenetische Auffälligkeiten. Dabei wurde sich primär auf die verschiedenen Mutationen der Zelllinien sowie ihre spezifische Zellbiologie und Expressionsmuster fokussiert. Anhand der ermittelten Daten konnten keine signifikanten Unterschiede im untersuchten Zellverhalten in Abhängigkeit der *RAS*- und *RAF*-Mutationenstatus der Melanomzellen gefunden werden. In einem zweiten Schritt wurden die Melanomzellen unter dem Einfluss verschiedener Inhibitoren analysiert und wiederum zellbiologische Expressionsmuster und Zellverhalten untersucht. Hier konnte eindeutig bestätigt werden, dass Zellen, die eine *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutation besitzen, besonders sensibel auf die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Vemurafenib reagieren. Einige Zellen, die trotz dieser Mutation resistent gegenüber Vemurafenib waren, wiesen ein spezielles Expressionsmuster der untersuchten Rezeptortyrosinkinasen auf. In den untersuchten Zelllinien wurde gezeigt, dass bei Expression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors ErbB1 der verwandte Rezeptor ErbB3 nicht nachgewiesen werden konnte. Diese wahrscheinliche Nihilierung der Koexistenz gilt offenbar auch im Umkehrschluss, da in 11 Zelllinien ErbB3, aber nicht ErbB1 nachgewiesen wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei fehlender Expression von ErbB3 auch der wichtige prognostische Faktor MIA nur im geringen Maße exprimiert wurde. Melanomzellen mit hoher ErbB1-Expression exprimieren nur unwesentlich den Transkriptionsfaktor MITF. Somit wird ein Zusammenhang zwischen dem Expressionsmuster von ErbB1 und ErbB3 und der Expression von MITF und MIA postuliert. Hier können weitere Analysen anschließen, um den komplexen Kontext dieser Zieltranskripte im Entstehungsmechanismus der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zu ermitteln.

Mech geb. Kaltenborn, Juliane: Pathophysiologische und molekulargenetische Analyse von Melanomzelllinien sowie Analyse zum pharmakologischen Stellenwert von Vemurafenib in der Zelldynamik, Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2017

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Aufbau und Funktion der Haut.....	1
1.2 Epidemiologische Daten zum malignen Melanom .....	2
1.3 Klinische Daten zum malignen Melanom .....	3
1.4 Stadien des malignen Melanoms .....	3
1.5 Diagnostik, Prognose und Therapiemöglichkeiten .....	4
1.6 Tumorentstehung.....	6
1.7 Der MAP-Kinase-Signalweg .....	7
1.7.1 Beteiligte Zieltranskripte im MAP-Kinase-Signalweg .....	8
1.7.2 Die Rolle des MAP-Kinase-Signalwegs in der Tumorentstehung .....	9
1.8 Aktuelle Möglichkeiten in der Tumorthapie .....	10
1.9 Resistenzentstehung bei der Verwendung von Kinaseinhibitoren .....	12
1.10 Zielstellung der Arbeit .....	14
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1 Verwendete Melanomzelllinien .....	15
2.2 Zellbiologische Methoden .....	15
2.2.1 Kulturbedingungen.....	15
2.2.2 Kryokonservierung von Zellen.....	16
2.2.3 Zellzahlbestimmung .....	16
2.2.4 Soft-Agar-Test .....	16
2.2.5 Verdopplungszeit .....	17
2.2.6 Zellproliferationsassay .....	17
2.2.7 Behandlung der Zellen mit MAPK-Inhibitoren .....	18
2.3 Molekularbiologische Methoden .....	18
2.3.1 DNA-Isolation aus Zelllinien .....	18
2.3.2 RNA-Isolation aus Zelllinien.....	18
2.3.4 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen.....	19
2.3.5 Reverse Transkription .....	19
2.3.6 Allelspezifische Polymerasekettenreaktion (PCR).....	19
2.3.7 Agarosegelelektrophorese .....	20
2.3.8 Quantitative <i>Real-Time</i> PCR (RT-qPCR) .....	20

2.3.9 <i>High Resolution Melting</i> -Analysen .....	22
2.3.10 Sequenzierung.....	23
2.4 Proteinbiochemische Methoden .....	24
2.4.1 Proteinisolierung .....	24
2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung .....	24
2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	24
2.4.4 Western Blot (Immunblot) .....	25
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>28</b>
3.1 Mutationsanalysen der Melanomzelllinien .....	28
3.1.1 <i>BRAF</i> -Mutation c.1799T>A (V600E) .....	28
3.1.2 <i>NRAS</i> -Mutationen c.181C>A und c.182A>T (Q61K und Q61L) .....	30
3.1.3 <i>KRAS</i> -Mutationen c.34G>C (G12R).....	31
3.1.4 Zusammenfassung der Mutationsanalysen .....	32
3.2 Expressionsanalysen der Melanomzelllinien.....	33
3.2.1 Expressionsdaten zu <i>BRAF</i> .....	33
3.2.2. Expressionsanalysen zum MAP-Kinase-Signalweg .....	35
3.2.3 Expressionsanalysen zum PI3K-AKT-Signalweg.....	39
3.3 Zellbiologische Charakterisierung der Melanomzelllinien .....	40
3.3.1 Bestimmung der Wachstumsrate.....	40
3.3.2 Soft-Agar-Koloniebildung .....	41
3.3.3 Bestimmung der Zellvitalität von Melanomzelllinien.....	42
3.3.4 Antiproliferativer Effekt von Vemurafenib auf Melanomzelllinien in Abhängigkeit vom <i>BRAF</i> -Status .....	43
3.3.5 Zusammenhang zwischen Phänotyp und Expressionsdaten.....	46
3.4 Auffälligkeiten der Zelllinien WM-1552c und UKRV-Mel14a .....	47
3.4.1 Relative Proliferation in Abhängigkeit vom Inhibitor .....	48
3.4.2 Expressionsanalysen unter Inhibitoreinfluss.....	49
3.4.2.1 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf den MAP-Kinase-Signalweg.....	50
3.4.2.2 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf den PI3K-AKT-Signalweg.....	51
3.4.2.3 Rezeptortyrosinkinasen als Faktoren bei der Resistenz gegen Vemurafenib .....	53
3.5 Korrelation der ermittelten Daten mit den Zieltranskripten MITF und MIA .....	56
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>58</b>
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>68</b>
<b>6 Referenzen .....</b>	<b>69</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>77</b>

7.1 Abbildungen .....	77
7.2 Thesen .....	80
7.3 Erklärung .....	i
7.5 Curriculum Vitae.....	ii
7.4 Danksagung .....	iii

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTB	Beta-Actin
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AMM	amelanotisches malignes Melanom
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cu <sup>+</sup>	Kupfer-(I)-Ion
Cu <sup>2+</sup>	Kupfer-(II)-Ion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
ERK1	<i>extracellular-signal regulated kinase 1</i>
ERK2	<i>extracellular-signal regulated kinase 2</i>
et al.	et alii
ff.	folgende
for	<i>forward</i>
FKS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GRB2	<i>growth factor receptor bound protein 2</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	hora (Stunde)
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure wasserfrei)
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HRAS	<i>Harvey rat sarcoma virus</i>

HRM	<i>high resolution melting</i>
IGF1R	<i>insulin-like growth factor-1-receptor</i>
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma virus</i>
l	Liter
LMM	Lentigo-maligna-Melanom
m	milli
M	Molarität
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MAP-K	MAP-Kinase
MAP-KK	MAP-Kinase-Kinase
MAP-KKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MIA	<i>melanoma inhibitory activity</i>
MITF	Mikrophthalmie-assoziiertes Transkriptionsfaktor
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar (mmol/l)
mRNA	messenger RNA
mt	mutiert
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar (µmol/l)
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMM	noduläres malignes Melanom
NRAS	<i>neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
n.s.	nicht signifikant

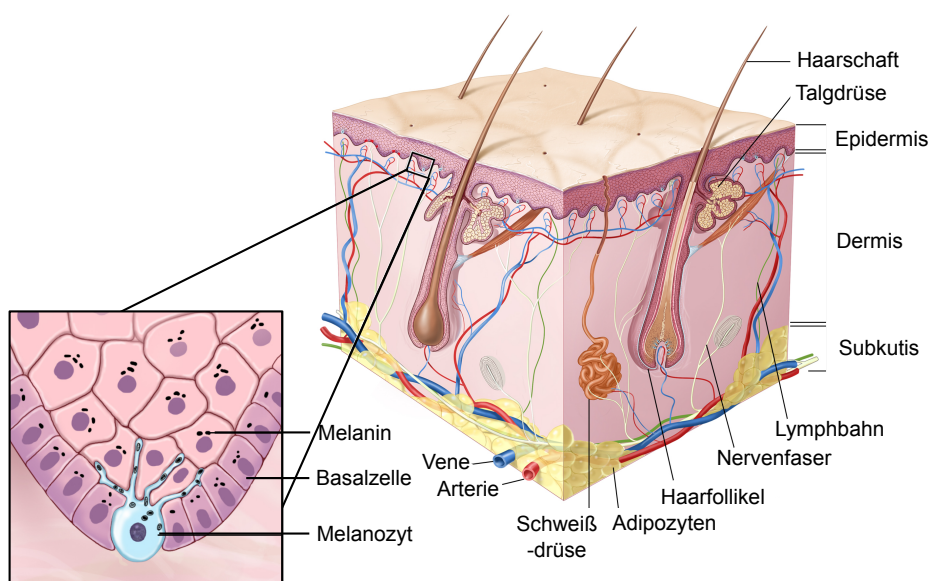
OD	optische Dichte
pAKT	phosphoryliertes AKT
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGFR $\beta$	<i>platelet-derived growth factor receptor <math>\beta</math></i>
PDK	<i>phosphoinositide-dependent kinase</i>
pERK	phosphoryliertes ERK
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PMS	Phenazine-methosulfate
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
RT-qPCR	quantitative <i>Real-Time</i> PCR
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i>
rev	<i>reverse</i>
RGP	<i>radial growth phase</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S.	Seite
SCF	<i>stem cell factor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SOS	<i>son of sevenless</i>
SSM	superfiziell-spreitende <i>Melanom</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
VGP	<i>vertical growth phase</i>
Vol.	Volumen
wt	wildtypisch, Wildtyp
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide
z.B.	zum Beispiel
$\infty$	unendlich große Zahl



# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut ist eines der größten Organe des menschlichen Körpers. Mit einer Ausdehnung von circa 1,7 m<sup>2</sup> stellt sie die Grenze zwischen Organismus und Umwelt dar (Faller und Schünke, 2004). Sie erfüllt eine Vielzahl von lebenswichtigen Funktionen wie die Regulation des Wärme- und Wasserhaushalts, und dient mit ihrer großen Anzahl an Rezeptoren als größtes Sinnesorgan des menschlichen Körpers. Sie wird in drei Schichten unterteilt: Subkutis, Dermis und Epidermis (Abb. 1).



**Abb. 1: Aufbau der Haut und Lokalisation der Melanozyten. Abbildung modifiziert nach Terese Winslow 2008.**

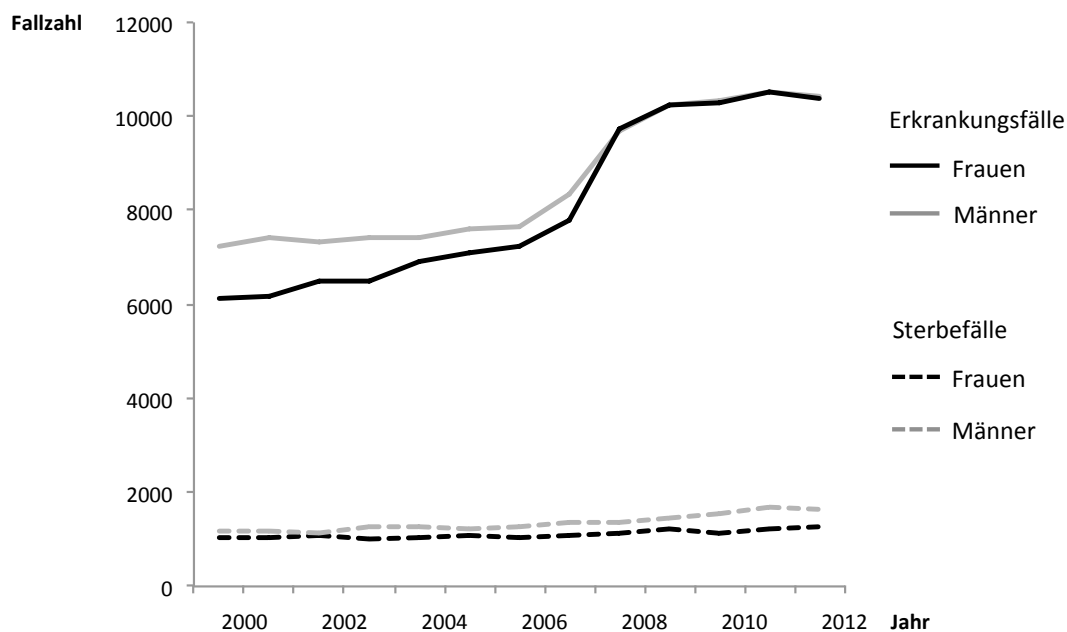
Die Subkutis ist die untere Hautschicht und besteht zum größten Teil aus lockerem Bindegewebe, in das reichlich Fettzellen (Adipozyten) eingelagert sind. Diese Schicht dient vor allem der Wärmeisolation und als Energiereservoir. An die Subkutis schließt sich die Dermis an. Sie besteht vorrangig aus einem dichten Netz kollagener und elastischer Fasern, durch die die Haut ihre Elastizität und Reißfestigkeit erhält. Die Dermis enthält einen dichten Plexus aus Blut- und Lymphgefäßen, sowie eine Fülle an freien Nervenendigungen. Des Weiteren ist die Dermis reich an immunmodulatorischen Zellen (z. B. Mastzellen, Histozyten). Die äußere Schicht der Haut wird als Epidermis bezeichnet und wird aus einem gefäßlosen, mehrschichtigen, verhornenden Plattenepithel gebildet. Ihre Dicke schwankt zwischen 40 µm und 1,6 mm. Die Epidermis besitzt an den meisten Stellen des Körpers eine feine rhombische Felderung und bildet hier die sogenannte Felderhaut. In der Hohlhand und an den Fußsohlen findet man die sogenannte Leistenhaut. Hier bildet die Haut parallele Furchen, die bei jedem Individuum genetisch determiniert sind. Hauptbestandteil der Epidermis sind die Keratinozyten, welche nach Zellkernverlust und

Verhornung die äußerste Schicht, das Stratum corneum (Hornschicht) bilden. Neben den Keratinozyten befinden sich weitere funktionsspezifische Zellen in der Epidermis, beispielsweise die antigenpräsentierenden Langerhanszellen, die mechanorezeptorischen Merkelzellen und die Melanin produzierenden Melanozyten (Thews et al., 1999). Melanozyten sind Abkömmlinge der Neuralleiste und ausschließlich in der Basalschicht der Epidermis sowie der Aderhaut des Auges zu finden. In der Epidermis haften sie an der Basalmembran, nicht wie Keratinozyten über desmosomale Verbindungen, sondern über Adhäsionsmoleküle (Fritsch, 2009). Melanozyten interagieren mit den sie umgebenden Keratinozyten über Cadherine (Bologna et al., 2008). Das melanozytäre Wachstum und die Melaninsynthese sind abhängig von der Interaktion der Keratinozyten mit den Melanozyten (Abdel-Naser, 1999; De Luca et al., 1988). Diese Kommunikation erfolgt unter anderem durch Wachstumsfaktoren und Oberflächenmoleküle, die von den Keratinozyten produziert werden (Scott und Haake, 1991). Die Melanozyten bilden das braune Pigment Melanin aus Tyrosin und geben es über lange Zellausläufer an die darüber liegenden Keratinozyten ab. Das Melanin dient Keratinozyten und anderen Zellen zum Schutz der nukleären DNA vor Schäden durch UV-Strahlen (Moll, 2010).

## 1.2 Epidemiologische Daten zum malignen Melanom

Das maligne Melanom, auch als schwarzer Hautkrebs bezeichnet, zählt wie die epithelialen (hellen) Hauttumore zu den bösartigen Neubildungen der Haut. Laut dem statistischen Bundesamt stellten maligne Neubildungen im Jahr 2015 nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. Von den circa 870 000 Todesfällen gingen im Jahr 2014 25,8 % auf eine Krebserkrankung zurück. Nach Angaben der Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2012 verstarben 3 563 Menschen an einer bösartigen Neubildung der Haut, davon gingen 2 875 Fälle und somit 80,7 % der Hauttumore auf ein malignes Melanom zurück (Gesundheitsberichterstattung der Länder, 2012). Das Robert-Koch-Institut gibt die Neuerkrankungsrate (Inzidenz) für das Jahr 2012 mit 20 820 Fällen an, dabei ist die Inzidenz zwischen den Geschlechtern nahezu gleich verteilt (Abb. 2). Prognosen für 2016 zeigen einen geringen Anstieg dieser Zahlen (Robert-Koch-Institut, 17.12.2015).

Im Juli 2008 wurde in Deutschland die Früherkennungsuntersuchung für Hautkrebs ab dem 36. Lebensjahr eingeführt. Seit diesem Jahr liegt die Rate diagnostizierter Neuerkrankungen circa 20 % über der Rate der Vorjahre. Auffällig ist dabei, dass sich die Sterbezahlen nicht im gleichen Maß erhöht haben. Das liegt vorrangig daran, dass vermehrt Hauttumore in einem frühen (T1) Stadium diagnostiziert und somit die Überlebenschancen verbessert werden (Robert-Koch-Institut, 17.12.2015). Laut SEER-Programm verbessert sich die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate stetig: Lag diese 1980 noch bei 83,8 %, so ist sie im Jahr 2005 auf 93,1 % gestiegen (SEER: Surveillance, 2012).



**Abb. 2: Verlauf der Erkrankungs- und Sterbefälle in Deutschland zwischen den Jahren 2000 und 2012 (Robert-Koch-Institut, 17.12.2015).**

### 1.3 Klinische Daten zum malignen Melanom

Aus den Daten des statistischen Bundesamtes ist ersichtlich, dass das maligne Melanom zu den bösartigsten Hauttumoren zählt. Es metastasiert frühzeitig lymphogen sowie hämatogen und zeigt so eine ungünstige Prognose. Fernmetastasen bildet dieser Tumor vorrangig in Lunge, Leber und Hirn (Balch et al., 1998). Das maligne Melanom entwickelt sich aus den pigmentbildenden Zellen der Epidermis – den Melanozyten. Die Inzidenz innerhalb der wenig pigmentierten Bevölkerung steigt weltweit an (de Vries et al., 2003). Die International Agency of Research on Cancer IARC der WHO definierte 2009 die UV-Strahlung als Karzinogen der Gruppe 1 und somit als Risikofaktor für die Entstehung von malignen Melanomen (El Ghissassi et al., 2009). Als weitere Risikofaktoren gelten genetische Prädisposition mit familiärer Häufung, heller Hauttyp (Gandini et al., 2005b) sowie Vorläuferläsionen wie beispielsweise atypische Nävi oder multiple melanozytäre Nävi (> 100) (Gandini et al., 2005a). Klinisch lassen sich vier Hauptformen des Melanoms unterscheiden: superfiziell-spreitendes Melanom (SSM), noduläres malignes Melanom (NMM), lentigo-maligna Melanom (LMM) und akrolentiginöses Melanom. Sonderformen des malignen Melanoms sind das amelanotische maligne Melanom (AMM), das Aderhautmelanom und Melanome der Schleim- und Hirnhäute (Pschyrembel et al., 1994).

### 1.4 Stadien des malignen Melanoms

Maligne Melanome können aus einem vorbestehenden Nävuszellnävus entstehen oder entwickeln sich spontan auf zuvor gesunder Haut. Ein Nävuszellnävus besteht aus einer Ansammlung von Nävuszellen, die den Melanozyten stark verwandt sind. Sie sind jedoch eher kugelförmig und in

Nestern anzutreffen. Auf dem Boden eines solchen Nävus kann ein dysplastischer Nävus entstehen, der sich histologisch durch eingestreute Melanozyten und Entzündungsinfiltrate von einem typischen Nävus unterscheidet. In den Melanozyten der dysplastischen Nävi findet man Kernatypien und Mitosen. Ein dysplastischer Nävus bildet eine Vorstufe des malignen Melanoms (Elder et al., 1993; Moll, 2010). Allgemein geht man von einer stufenweisen Entwicklung des Nävus bis zum metastasierenden malignen Melanom aus (Abb. 3) (Clark et al., 1984). Nach der Entstehung eines dysplastischen Nävus mit zellulären Atypien innerhalb der Melanozyten beginnt die radiale bzw. horizontale Wachstumsphase (RGP = *radial growth phase*). Hier entsteht das erste maligne Stadium des Melanoms. Die Melanomzellen beginnen, innerhalb der Epidermis zu proliferieren. Der nächste Entwicklungsschritt ist die vertikale Wachstumsphase (VGP = *vertical growth phase*). Der entscheidende Schritt in dieser Phase ist der Durchbruch der Melanomzellen durch die Basalmembran der Epidermis und die Fähigkeit zum Eindringen in die Dermis. Durch diese Eigenschaft wird es den Tumorzellen möglich, über Blut- und Lymphbahnen zu metastasieren (Clark et al., 1975). Die Entwicklung der Invasivität des Melanoms ist u. a. mit der Bildung von Matrixmetalloproteasen (Blackburn et al., 2009), einer vermehrten N-Cadherin-Expression (Hsu et al., 1996) und bestimmten Entzündungsreaktionen durch UV-Strahlen (Bald et al., 2014) assoziiert.

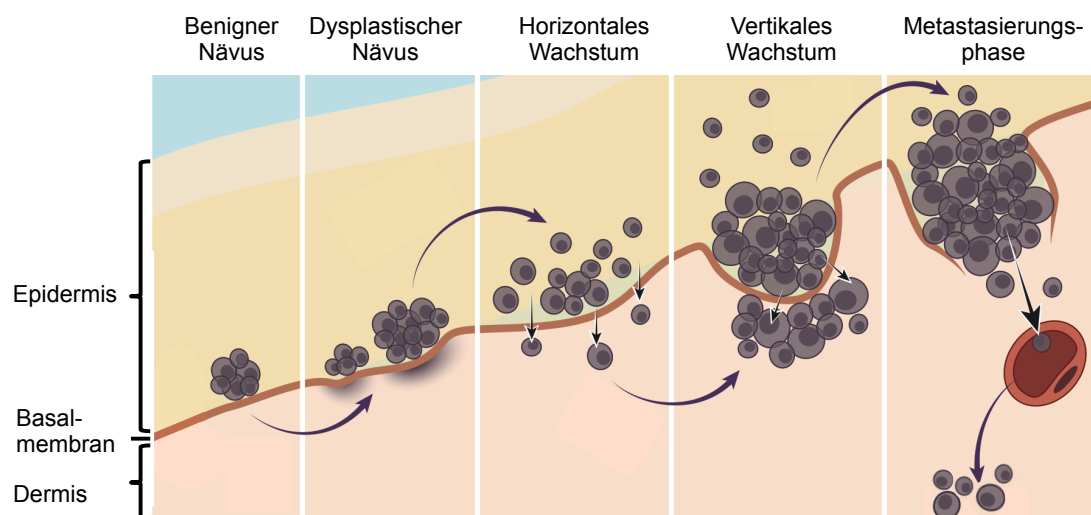
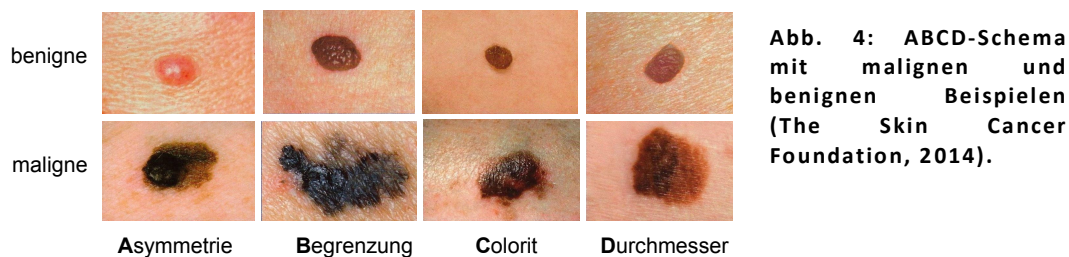


Abb. 3: Progressionsmodell nach Clark et al. 1984. Abbildung modifiziert nach Jenna Rebelo.

## 1.5 Diagnostik, Prognose und Therapiemöglichkeiten

Die meisten melanotischen Veränderungen sind mit bloßem Auge oder einem Dermatoskop zu identifizieren. Ihre Erkennung kann durch das vereinfachte ABCD-Schema jedem Patienten beigebracht werden (Abb. 4). So sind Veränderungen eines Nävus in Symmetrie (A = Asymmetrie), Begrenzung (B), Färbung (C = Colorit) und in seinem Durchmesser (D > 5mm) auffällige Merkmale für einen malignen melanozytären Prozess (Friedman und Rigel, 1985).



Die Prognose eines malignen Melanoms ist von dessen Stadium bei der Diagnosestellung abhängig. So beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei einem lokalisierten Melanom 98,3 %, bei Fernmetastasen jedoch nur noch 16 % (SEER: Surveillance, 2012). Es zeigt sich also, dass eine frühe Diagnosestellung entscheidend für die Prognose und damit die Überlebenschancen des Patienten ist. Als einer der wichtigsten Prognosefaktoren gilt die Tumordicke (Balch et al., 2004). Sie wird durch das Clark-Level (Clark et al., 1969) oder den Breslow-Index (Breslow, 1970) angegeben. Weitere wichtige Prognosefaktoren und die Einteilung nach dem TNM-System wurden 2009 in einer vorerst endgültigen Version des American Joint Committee on Cancer (Balch et al., 2009) zusammengestellt. Hier wurden weitere histologische und morphologische Merkmale wie zum Beispiel Ulzerationen, regionale Lymphknotenmetastasen und das Geschlecht einbezogen, die als prädiktive Werte für die Überlebenswahrscheinlichkeit gelten (Balch et al., 2009). Bei der Suche nach spezifischen Tumormarkern, die es ermöglichen, den Erkrankungsverlauf zu kontrollieren und zu beurteilen, erwiesen sich die Proteine S-100 und MIA bisher als vielversprechendste Marker für die Prognosebewertung beim malignen Melanom (Garbe et al., 2003).

Jede melanomverdächtige Struktur sollte mittels radikaler Exzisionsbiopsie genauer untersucht werden. Dabei erfolgt abhängig vom Breslow-Index eine Exzision mit definiertem Sicherheitsabstand, um eine Rezidiventwicklung zu verhindern. Primäres Ziel in der Therapie des malignen Melanoms ist die Resektion des Tumors im Gesunden. Bei schon vorliegenden Fernmetastasen hängt die Therapie vor allem vom Metastasierungsgrad ab. Sie beinhaltet unter anderem operative Verfahren, Radiotherapie, Chemotherapie, Immunotherapie und Biochemotherapie (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, 01.01.2013). Fortschritte gibt es in der sogenannten gezielten Krebstherapie (englisch: *targeted molecular therapy*). Hier werden neueste molekularbiologisch wirksame Medikamente eingesetzt, die gezielt auf die Tumorzellen wirken und gesunde körpereigene Zellen schonen. Neben dem Raf-Kinaseinhibitor Vemurafenib (Zelboraf®) steht seit Oktober 2013 mit Dabrafenib (Tafinlar®) ein zweiter selektiver Kinaseinhibitor (siehe 1.9) auf dem europäischen Markt zur Verfügung. Beide Inhibitoren sind als Monotherapie für nicht resezierbare oder metastasierte Melanome mit einer spezifischen Mutation vorgesehen (European Commission of European Medicines Agency, Januar 2012). Durch die Weiterentwicklung innerhalb der Immunotherapie zeigen vor allem die Anti-CTLA-4- und Anti-PD-1-Antikörpern Ipilimumab und Pembrolizumab bzw. Nivolumab neue Therapieoptionen innerhalb der Behandlung des malignen Melanoms auf (Vennepureddy et al., 2016).

## 1.6 Tumorentstehung

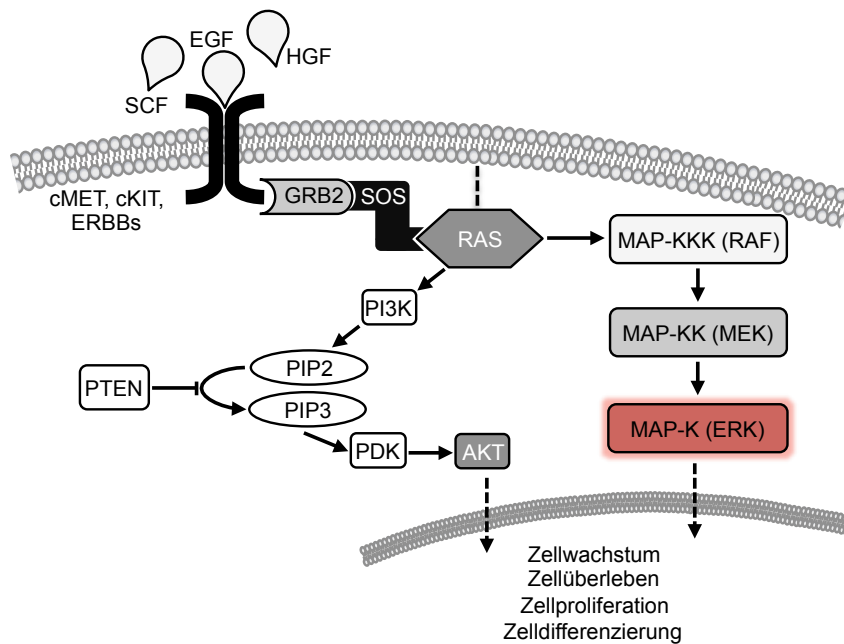
Tumore unterscheiden sich vom umgebenen gesunden Gewebe durch grundlegende Veränderungen in ihrem Verhalten, z. B. verminderte Apoptoseneigung oder stimulusunabhängiges Wachstum (Freedberg IM et al., 2003). Neoplasien (Neubildungen) lassen sich in benigne und maligne Formen unterscheiden. Dabei definiert man Malignität zum einen durch autonomes, invasives Wachstum des Tumors sowie zum anderen durch die hohe Metastasierungstendenz und der damit verbundenen potentiellen Lebensbedrohung (Büttner und Thomas, 2003). Schon in den 1940er Jahren wurde die Vorstellung eines mehrstufigen Modells zur Entwicklung von Tumoren publiziert (Cohen und Ellwein, 1991). Im Jahr 1947 wurden von Berenblum und Shubik die Begriffe Tumorinitiation und Tumorpromotion genauer beschrieben und definiert (Berenblum und Shubik, 1947). Das heutige dreistufige Modell aus Initiation, Promotion und Progression wurde 1996 von Pitot aufgezeigt (Pitot, 1996). Es zeigt sich, dass zur Tumorentstehung mehrere Ereignisse notwendig sind. Treibende Kraft ist hierbei die genetische Instabilität, die die Anhäufung von Mutationen fördert und zur Aufrechterhaltung der abnormalen Zellfunktionen beiträgt (Freedberg IM et al., 2003). Vor allem Veränderungen in sogenannten Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen sind entscheidend.

**Proto-Onkogene** sind Bestandteil der normalen Genausstattung einer Zelle. Sie kodieren Gene, die zur Stimulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung beitragen. Durch genetische Veränderungen innerhalb eines Proto-Onkogens kann es zur funktionalen Umwandlung des Proto-Onkogens in ein aktives Onkogen kommen. Solche Veränderungen können auf verschiedene Weise eintreten. Es kann beispielsweise durch eine Mutation innerhalb der codierenden Sequenz des Onkogens ein Protein mit überdurchschnittlicher Aktivität exprimiert werden. Weiterhin ist es möglich, dass aufgrund einer Genamplifikation ein Protein mit normaler Aktivität übermäßig exprimiert wird. Durch Chromosomentranslokationen kann es zu Hybridgenen mit Expressionssteigerung des Genproduktes kommen. Die erhöhte Aktivität oder vermehrte Expression führen zu Störungen in mitogenen Signalkaskaden und somit zum Kontrollverlust von Wachstums- und Differenzierungsprozessen. Da Onkogene eine dominante Wirkung haben, reicht oftmals schon eine Veränderung auf einem Allel aus, um solch eine Störung zu verursachen (Alberts et al., 2005).

**Tumorsuppressorgene** kodieren für Proteine, die z.B. auf die Zellteilung hemmend wirken. Im Gegensatz zu den Proto-Onkogenen müssen bei Tumorsuppressorgenen beide Allele defekt sein, damit sich eine tumorauslösende bzw. tumorfördernde Wirkung entfalten kann. Sofern ein Allel noch intakt ist, ist in der Regel die ordnungsmäßige Wachstumskontrolle innerhalb der Zelle gewährleistet. Häufig wird jedoch ein Heterozygotie-Verlust (englisch: *loss of heterozygosity*) bei Tumorsuppressorgenen innerhalb von Tumorzellen beobachtet (Siegenthaler und Blum, 2006).

## 1.7 Der MAP-Kinase-Signalweg

Der MAP-Kinase-Signalweg ist einer der bedeutendsten Transduktionswege, welcher Stimuli von der Zelloberfläche in das Zellinnere weiterleitet und so wichtige Zellprozesse wie das Zellüberleben und die Proliferation steuert (Abb. 5) (McCubrey et al., 2007). Er interagiert mit vielen anderen Signalwegen innerhalb der Zelle und bildet somit einen zentralen Verknüpfungspunkt. Ausgangspunkt der Signalkaskade ist ein extrazellulärer Stimulus in Form von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren an einem transmembranösen Oberflächenrezeptor (z.B. c-Met, ErbB3) (Meyers, 2007). Das Bindeglied zwischen Rezeptor und dem zytoplasmatischen MAP-Kinase-Weg bildet RAS, ein kleines G-Protein, das mittels Lipidschwanz an der zytosolischen Seite der Plasmamembran verankert ist. Es wird seinerseits wiederum durch Adaptermoleküle (z.B. GRB2) mit dem Rezeptor verknüpft (Alberts et al., 2005). RAS wechselt mit Hilfe von speziellen Austauschfaktoren (z.B. SOS) und GTPase-aktivierenden Proteinen zwischen einem aktiven GTP-gebundenen Zustand und einer inaktiven GDP-gebundenen Form. Aus seinem GDP-gebundenen Grundzustand wird RAS aktiviert, indem es GDP gegen GTP austauscht. Durch Hydrolyse des GTP zu GDP wird RAS wieder inaktiviert (Weber, 2007). Aktiviertes RAS setzt eine Kaskade von Phosphorylierungsreaktionen in Gang, die unter anderem auch den MAP-Kinase-Weg aktivieren. In dieser Kettenreaktion wird die erste Kinase (MAP-KKK, RAF) über einen mehrschrittigen Prozess aus Konformationsänderung, Phosphorylierung und Dimerisierung durch RAS aktiviert (Goetz et al., 2003). Im angeregten Zustand phosphoryliert die Kinase RAF wiederum die Serine/Threonin-Kinase MEK (MAP-KK), die ihrerseits die letzte Kinase im MAP-Kinase-Signalweg aktiviert – ERK (MAP-K) (Crews et al., 1992; Kyriakis et al., 1992). ERK obliegt als Endglied des MAP-Kinase-Wegs eine gewisse Schlüsselrolle. Als Kinase phosphoryliert ERK eine Vielzahl verschiedener Substrate und reguliert dadurch unter anderem Proliferations- und Differenzierungsprozesse sowie das Zellüberleben durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. Elk-1, Myc) (zusammengefasst in Inamdar et al., 2010).



**Abb. 5: MAP-Kinase-Signalweg mit Verlinkung zum PI3K-AKT-Signalweg (modifiziert nach Castellano und Downward, 2011).**

Neben der Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs stimuliert RAS mit dem PI3K-AKT-Signalweg einen weiteren bedeutenden Signalweg im Melanom. Obwohl dieser Transduktionsweg über eine Vielzahl anderer Zieltranskripte aktiviert werden kann, spielt die gemeinsame Aktivierung durch RAS in der Pathogenese des Melanoms eine entscheidende Rolle. Der PI3K-AKT-Signalweg steuert, wie auch der MAP-Kinase-Signalweg, essenzielle zelluläre Vorgänge, die zum Zellwachstum und -überleben beitragen (Kwong und Davies, 2013; Mendoza et al., 2011).

### 1.7.1 Beteiligte Zieltranskripte im MAP-Kinase-Signalweg

RAS gilt als Initiator des MAP-Kinase-Signalwegs. Zur Familie der RAS-Proteine zählen HRAS, KRAS und NRAS. Alle RAS-Proteine unterscheiden sich vorrangig durch ihre Verankerung in der Plasmamembran, da sie ansonsten eine hohe Sequenzanalogie aufweisen (Weber, 2007). RAS sind Proto-Onkogene und zählen zur Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine, die als molekulare Schalter fungieren (Alberts et al., 2005).

Im aktiven Zustand stimuliert RAS im MAP-Kinase-Weg die Mitglieder aus der Familie der RAF-Proteine. Zu dieser gehören drei Kinasen – ARAF, BRAF und CRAF (auch Raf-1 bezeichnet). Die Proteine der RAF-Gruppe sind Serin/Threonin-Kinasen und wie die Mitglieder der RAS-Familie Proto-Onkogene. Der molekulare Aufbau der drei RAF-Kinasen unterscheidet sich nur gering. Charakteristisch sind drei funktionelle Domänen, nämlich die für die RAF-Interaktion essenzielle Bindungsdomäne, die für die weitere Funktion im Signalweg wichtige Kinase-Domäne sowie die regulatorische Domäne (Matallanas et al., 2011). BRAF weist im Gegensatz zu den beiden anderen RAF-Kinasen die höchste basale Kinase-Aktivität auf und kann ohne weitere aktivierende Faktoren durch RAS allein stimuliert werden. Weiterhin besitzt BRAF die stärkste Affinität zu den



*Downstream*-Zieltranskripten MEK1 und MEK2 und ist somit in der RAF-Familie der wirksamste Effektor des MAP-Kinase-Signalwegs (Marais et al., 1997; Papin et al., 1996). Die exakte Aktivierung der RAF-Kinasen ist ein komplexer Vorgang aus mehreren Prozessen. Es wird angenommen, dass die RAF-RAS-Bindung eine Konformationsänderung von RAF zur Folge hat, die RAS zur Phosphorylierung von RAF befähigt. Ein weiterer Schritt ist die RAS-vermittelte Bildung von RAF-Homo- und Heterodimeren, die letztendlich entscheidend für die Aktivierung der Kinase-Aktivität von RAF ist (Goetz et al., 2003; Lito et al., 2013). Als charakteristische Substrate von RAF gelten die dual-spezifischen Tyrosin-Threonin-Kinasen MEK1 und MEK2, die eine bis zu 85 %-ige Homologie besitzen. MEK1/2 aktivieren ihre einzigen bekannten physiologischen Zieltranskripte, die Serin/Threonin-Kinasen ERK1 und ERK2, über Phosphorylierung von Tyrosin- und Threonin-Resten. Diese Kinasen haben im Gegensatz zu RAF und MEK eine Vielzahl verschiedener zytosolischer und intranukleärer Substrate (zusammengefasst in Wortzel und Seger, 2011).

### 1.7.2 Die Rolle des MAP-Kinase-Signalwegs in der Tumorentstehung

Aus den vorangegangenen Kapiteln wird ersichtlich, dass der MAP-Kinase-Signalweg eine Schlüsselrolle in den verschiedensten Zellprozessen einnimmt und unter physiologischen Bedingungen Wachstum, Proliferation und Differenzierung einer Zelle reguliert. Melanome weisen jedoch die höchste Mutationsrate aller gängigen Karzinome auf (Lawrence et al., 2013). Entscheidend für das Verständnis der Tumorgenese im Melanom ist hierbei die Häufung aktivierender Mutationen in potenten Onkogenen innerhalb des MAP-Kinase-Signalwegs (Davies et al., 2002; Hodis et al., 2012; Solus und Kraft, 2013). So zeigt sich in bis zu 60 % der Melanome eine Mutation im *BRAF*-Gen. Die am häufigsten vorkommende *BRAF*-Mutation bewirkt eine Substitution der Aminosäure Valin durch Glutaminsäure an Position 600 (c.1799T>A, kurz: V600E). Es konnte gezeigt werden, dass durch diesen Aminosäureaustausch die Kinaseaktivität von BRAF bis zu zehnfach höher ist als in *BRAF* V600 (c.1799T>A)-wildtypischen Zellen (Davies et al., 2002). Die Mutation V600E (c.1799T>A) in *BRAF* destabilisiert hierbei die inaktive Konformität der Kinase und verschiebt das Gleichgewicht in Richtung aktiven Zustand, was zu einer konsekutiven Daueraktivierung von BRAF führt. Aus diesem Grund resultiert die Aktivierung der nachfolgenden Zieltranskripte in der MAP-Kinase-Transduktionskette mit Signalverstärkung der proliferativen Prozesse unabhängig von Wachstumsfaktoren (Wan et al., 2004). In circa 90 % der Melanome konnte eine erhöhte Aktivität des Signalwegs nachgewiesen werden (Cohen et al., 2002). Die Mitglieder der RAS-Familie bilden eine weitere Gruppe potenter Onkogene der MAP-Kinase-Kaskade und weisen eine der häufigsten Mutationsraten in Karzinomen (30 %) auf. *KRAS* zeigt unter allen Karzinomen mit 20 % die höchste Mutationsrate innerhalb der RAS-Familie. *NRAS* hat mit circa 18 % jedoch die höchste Mutationsrate im Melanom, wohingegen *HRAS* nur in 1-2 % der Melanome mutiert ist (COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer, August 2014; Fernandez-

Medarde und Santos, 2011; Prior et al., 2012). Die am häufigsten im Melanom vorkommende *RAS*-Mutation bewirkt den in *NRAS* vorkommenden Austausch der Aminosäure Leucin an Position 61 (Q61) (Davies et al., 2002). Als Folge wird die intrinsische GTPase-Aktivität von *NRAS* eingeschränkt und der GTP-gebundene, aktive Zustand stabilisiert (Posch und Ortiz-Urda, 2013). Das konsekutiv aktivierte *NRAS* führt zu einer onkogenen Signaltransduktion sowohl in den MAP-Kinase- als auch den PI3K-AKT-Signalweg (Kwong und Davies, 2013; Mendoza et al., 2011). Neben den erwähnten *BRAF*- und *NRAS*-Alterationen kann der MAP-Kinase-Weg eine Vielzahl weiterer molekulargenetischer Veränderungen der verschiedensten Signalebenen aufweisen. Diese finden sich unter anderem in den membranständigen Rezeptortyrosinkinasen (z.B. *ckIT*, *ErbB4*) sowie auch in diversen Transkriptionsfaktoren (z.B. *MITF*) oder weiteren Zieltranskripten des Signalwegs (z.B. *MEK*) (Glitza und Davies, 2014; Sekulic et al., 2008).

## 1.8 Aktuelle Möglichkeiten in der Tumorthherapie

Neueste Therapieformen in der Onkologie zielen auf spezifische molekulargenetische Veränderungen in den Tumoren. Dieses Therapieprinzip wird als gezielte Krebstherapie bezeichnet und eröffnet eine spezielle patienten- und tumorspezifische Behandlungsoption, die nebenwirkungsärmer sein und gezielter ansprechen soll. Wichtigste Grundlage dieser Therapie ist die Kenntnis über molekulare Veränderungen und deren Auswirkungen innerhalb der Tumorzellen. Es ist bekannt, dass die häufigsten Mutationen im malignen Melanom die Gene des MAP-Kinase-Signalwegs betreffen. Die in circa zwei Drittel der malignen Melanome vorliegende *BRAF*-Mutation V600E (c.1799T>A) erlangte in den letzten Jahren vor allem in der Entwicklung spezifischer Therapiemöglichkeiten besondere Bedeutung (Davies et al., 2002). Hierauf baute die Entwicklung des im Jahr 2012 auf dem europäischen Markt zugelassenen selektiven *BRAF*-Inhibitors Vemurafenib (Zelboraf®) auf (European Commission of European Medicines Agency, Januar 2012). In präklinischen Studien zeigte Vemurafenib antiproliferative Wirkung in Zellen mit mutiertem *BRAF*. Seine Wirksamkeit blieb bei *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen aus (Yang et al., 2010). In *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen mit einer *RAS*-Mutation zeigte Vemurafenib jedoch eine paradoxe Wirkung. Hier wird der MAP-Kinase-Signalweg wieder konsekutiv aktiviert und führt so zu verstärkter Proliferation der Zellen (Hatzivassiliou et al., 2010). Vemurafenib erhielt seine Zulassung für nicht resezierbare oder metastasierte maligne Melanome mit einer nachweisbaren *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutation und repräsentiert somit einen Vertreter aus der gezielten Krebstherapie. In einer prospektiven, randomisierten Phase-3 Studie (BRIM-3) mit 675 Patienten konnte ein signifikanter Vorteil in der Behandlung mit Vemurafenib im Vergleich zur Standardtherapie bei metastasierten Melanom mit Dacarbazine gezeigt werden. Die Gesamtansprechrate lag mit Vemurafenib bei 48,4 %, mit Dacarbazine lag sie hingegen bei lediglich 5,5 %. Das progressionsfreie Überleben konnte mit Vemurafenib auf 5,3 Monate im Vergleich zu

1,6 Monaten bei Dacarbazine verlängert werden, sodass nach sechs Monaten die Gesamtüberlebensrate in der Vemurafenib-Gruppe bei 84 % (95 % Konfidenzintervall, 78 zu 89) lag im Vergleich zur Dacarbazine-Gruppe mit 64 % (95 % Konfidenzintervall, 56 zu 73) (Chapman et al., 2011). Ähnliche Ergebnisse konnten in der BREAK-3-Studie für den seit 2013 auf dem europäischen Markt zur Verfügung stehenden BRAF-Inhibitor Dabrafenib erzielt werden (Hauschild et al., 2012). Trotz jahrzehntelanger Forschung zur Familie der RAS-Proteine und ihrer Schlüsselrolle als Onkogene in der Tumorgenese war es bis heute nicht möglich, einen RAS-Inhibitor im klinischen Alltag zu etablieren. Die komplex-gesteuerten Signalwege, die RAS innerhalb der Zellen initiiert, erschwerte die Entwicklung solcher Arzneimittelgruppen (zusammengefasst in Baines et al., 2011). In letzter Zeit wurde der Schwerpunkt in der Behandlung des malignen Melanoms auf die Erforschung von Kombinationstherapien gelegt. Hier gilt der MEK-Inhibitor Trametinib als ein vielversprechender Kombinationspartner der BRAF-Inhibitoren. Trametinib zeigt in der Monotherapie deutliche Vorteile in der Gesamtüberlebensrate und im progressionsfreien Intervall gegenüber der Standardchemotherapie mit Dacarbazine (Flaherty et al., 2012). In Kombination mit dem BRAF-Inhibitor Dabrafenib konnten nur geringe Verbesserungen der Überlebensrate gegenüber der Monotherapie mit Dabrafenib ermittelt werden. Jedoch traten die unter Monotherapie mit BRAF-Inhibitoren häufig vorkommenden sekundären Hautläsionen (z.B. Plattenepithelkarzinome) seltener auf (Long et al., 2015; Sanlorenzo et al., 2014). So ermöglicht eine Kombinationstherapie die Senkung von Nebenwirkungen und trägt zu einer verbesserten Verträglichkeit bei. Ähnliche Ergebnisse konnte auch die Kombinationstherapie aus Vemurafenib und dem selektiven MEK1/2-Inhibitor Cobimetinib im Vergleich zur Monotherapie mit Vemurafenib zeigen (Ascierto et al., 2016; Larkin et al., 2014). MEK-Inhibitoren erweisen sich zunehmend in der Behandlung von *NRAS*-mutierten Melanomen als wichtige Therapieoption. So konnte in einer Phase-II-Studie erstmals ein Therapieeffekt des MEK-Inhibitors Binimetinib in *NRAS*-mutierten Melanomen gezeigt werden (Ascierto et al., 2013).

Die jüngsten Fortschritte bezüglich der Melanomtherapie wurden im Bereich der Immuntherapie gemacht (Vennepureddy et al., 2016). Durch die Behandlung mit dem seit 2011 in Europa zugelassenen CTLA-4-Antikörper Ipilimumab konnte zwar das mittlere progressionsfreie Überleben verlängert werden, jedoch stellten sich vermehrt drastische immunologische Nebenwirkungen während der Behandlung ein (Eggermont et al., 2015; Hodi et al., 2010; Vennepureddy et al., 2016). Seit dem Jahr 2015 sind mit den PD-1-Rezeptor-Antikörpern Nivolumab und Pembrolizumab zwei weitere Vertreter der Immuntherapie für die Behandlung des malignen Melanoms in Europa auf dem Markt. In der CheckMate066-Studie konnte eine Ein-Jahres-Überlebensrate unter Nivolumab von 72,9 % erreicht werden. Die objektive Ansprechrage lag bei 40 % im Vergleich zu 14 % bei der Standardtherapie mit Dacarbazine (Robert et al., 2015a). Für Pembrolizumab konnten in der KEYNOTE-006-Studie ebenfalls verbesserte mittlere

progressionsfreie Intervalle ermittelt werden. Im Gegensatz zu Ipilimumab wurden hierbei deutlich geringere immunologische Nebenwirkungen (Robert et al., 2015b) und eine verbesserte Lebensqualität unter Therapie festgestellt (Schadendorf et al., 2016).

### 1.9 Resistenzentstehung bei der Verwendung von Kinaseinhibitoren

Mit der Entwicklung der Kinaseinhibitoren eröffneten sich neue und vielversprechende Behandlungsaussichten innerhalb der Melanomtherapie. Die anfängliche Euphorie gegenüber dieser Arzneimittelgruppe wurde jedoch durch relativ kurz anhaltende Therapieerfolge getrübt. Es stellte sich heraus, dass 20-50 % der Melanompatienten trotz nachgewiesener *BRAF* V600E-Mutation kein Ansprechen auf die Therapie mit Vemurafenib zeigten (Chapman et al., 2011; Flaherty et al., 2010). Dieses Verhalten wird als primäre/intrinsische Resistenz bezeichnet. Verantwortlich hierfür scheint vorrangig die Tumorheterogenität im Melanom zu sein, sodass durch die Vielzahl an Alterationen schon zu Beginn der Therapie unterschiedliche Aktivierungswege im Tumor stimuliert sind (Yancovitz et al., 2012). Die Entstehung von sekundären/erworbenen Resistenzen war ein weiterer Rückschlag während der Melanomtherapie mit Kinaseinhibitoren. Eine Vielzahl der mit Vemurafenib behandelten Patienten zeigte eine anfängliche Tumorregression und eine hohe objektive Ansprechrate, schließlich aber eine Krankheitsprogression im Verlauf (Chapman et al., 2011; Flaherty et al., 2010). Der Wirkverlust der *BRAF*-Inhibitoren im Melanom ist im Gegensatz zur Resistenzentwicklung anderer gezielter Therapien nicht auf die Entwicklung einer zweiten Mutation im *BRAF*-Gen zurückzuführen (Roumiantsev et al., 2002; Wardelmann et al., 2006). Grundlage dieser erworbenen Resistenzen scheint eher ein multimodaler Prozess zu sein, der in einer Reaktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs endet. Eine Rolle spielen dabei unter anderem aktivierende Mutationen in *NRAS*, *MEK1* und *MEK2*, die in verschiedenen RAF-Inhibitor-resistenten Proben identifiziert werden konnten und für eine erneute Aktivierung des Signalwegs verantwortlich sind (Nazarian et al., 2010; Wagle et al., 2014). Des Weiteren werden bei 15-20 % der Patienten mit Krankheitsprogress eine alternative Splicevariante von *BRAF* gefunden. Dieser kürzeren Splicevariante fehlt die *RAS*-Bindungsdomäne, was zur Folge hat, dass die RAF-Moleküle *RAS*-unabhängig und stärker dimerisieren (Poulikakos et al., 2011). Die stärkere Bindungsaffinität der RAF-Dimere soll die Wirkung der RAF-Kinaseinhibitoren mindern und zur Resistenzentwicklung beitragen. Weitere Studien zeigten, dass wiederum circa 20 % der Patienten mit progressivem Krankheitsverlauf eine Amplifikation des mutierten Allels von *BRAF* aufweisen, was zu einer verstärkten *BRAF*-Expression führt. Im Gegensatz zu anderen Resistenzmechanismen konnte gezeigt werden, dass durch eine Erhöhung der Inhibitorkonzentration ein erneuter Wachstumsstopp der resistenten Zelllinien erreicht wird (Shi et al., 2012; Van Allen et al., 2014; Wagle et al., 2014). Bei der Verwendung von RAF-Inhibitoren scheinen Rezeptortyrosinkinasen eine mögliche Rolle im heterogenen Prozess der Resistenzentstehung einzunehmen. In RAF-Inhibitor-

resistenten Zellen konnte eine verstärkte Expression von verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen (z.B. IGF1R, cKIT, cMET, EGFR, PDGFR $\beta$ ) aufgezeigt werden, die unter anderem eine erhöhte Aktivität aufwiesen (Nazarian et al., 2010; Villanueva et al., 2010). Rezeptortyrosinkinasen leiten über die verschiedensten Signalwege externe Stimuli in das Zellinnere. Eine erhöhte Expression dieser Oberflächenrezeptoren kann somit Proliferationssignale unabhängig vom MAP-Kinase-Weg fortleiten und einen Tumorprogress begünstigen. Untersuchungen zeigten, dass vor allem der PI3K-AKT-Signalweg in der Resistenzentstehung beteiligt scheint. Die Aktivierung dieses alternativen Signalwegs kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen, wie beispielsweise Gen-Amplifikation und Mutationen der beteiligten Zieltranskripte (Perna et al., 2015; Wagle et al., 2014). Die Vielzahl an möglichen Resistenzmechanismen lässt die Therapie vor allem im fortgeschrittenen Krankheitsstadium des Melanoms zu einer Herausforderung werden. Zudem können bei einem Patienten verschiedene Resistenzmechanismen innerhalb einer Läsion oder zwischen verschiedenen Läsionen vorkommen. Diese Tumoheterogenität erschwert die zielgerichtete Melanomtherapie zusätzlich (Rizos et al., 2014; Shi et al., 2014). Verschiedene neuere Ansätze zeigen, dass die Kombinationstherapie aus mehreren gezielten Krebstherapien eine Lösung bieten kann, um die multifaktorielle Pathogenese im Melanom zu behandeln (zusammengefasst in Spagnolo et al., 2015). Fraglich bleibt, inwieweit die große Vielzahl an Pathomechanismen bei jedem einzelnen Patienten berücksichtigt werden kann. Dennoch hat die Forschung zur Resistenzentwicklung bei der Verwendung von RAF-Inhibitoren einen großen Beitrag zum Verständnis der pathogenen Signalwege im Melanom geliefert. Die Entwicklungsmöglichkeiten scheinen noch vielfältig zu sein und bieten im Besonderen auf Ebene der molekulargenetischen Pharmakotherapie großes Potential.

## 1.10 Zielstellung der Arbeit

Das maligne Melanom zählt zu den aggressivsten Karzinomen der Haut. Eine metastatische Aussaat der Melanomzellen senkt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit um 84 % (SEER: Surveillance, 2012). Die Therapieansätze der letzten Jahre im Behandlungskonzept des malignen Melanoms sind zwar vielversprechend, aber häufig noch nicht vollständig ausgereift, da vor allem Resistenzmechanismen innerhalb der Melanomzellen oft eine erfolgreiche Therapie verhindern. Die molekularen Grundlagen der Karzinogenese rückten vor allem durch die Einführung der gezielten Krebstherapie (englisch: *targeted molecular therapy*) in das Zentrum der Forschung. Im Melanom stellen insbesondere die Zieltranskripte des MAP-Kinase-Signalwegs einen vielversprechenden Ansatzpunkt in der Tumorthherapie dar. Die selektiven BRAF-Kinase-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib zeigten bei der Einführung in die klinische Anwendung gute Ergebnisse im Ansprechen metastasierter maligner Melanome. Zeitnah zeigte sich jedoch bei einer Vielzahl der behandelten Patienten Resistenzmechanismen, die ein Fortschreiten der Erkrankung begünstigten. Trotz langjähriger Erforschung der Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika im malignen Melanom konnten die molekularen Grundlagen hierzu noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Das Verständnis über die Entwicklung von Chemoresistenzen ist ein vielversprechender Ausgangspunkt für die Erarbeitung neuer medikamentöser Therapien. Aus diesem Grund befasst sich die hier vorliegende Arbeit mit diesem wichtigen Thema in der Behandlung des malignen Melanoms.

Das Ziel dieser Dissertation ist, ein besseres Verständnis über die molekularen Grundlagen der Chemoresistenz von malignen Melanomzellen zu erlangen. Zur Klärung dieser Fragestellung sollten Expressionsanalysen von Melanom abstammenden Tumorzelllinien beitragen. Hierzu sollten im ersten Teil dieser Arbeit 25 Melanomzelllinien hinsichtlich ihrer pathophysiologischen und molekulargenetischen Auffälligkeiten charakterisiert werden. Im nachfolgenden Abschnitt wird der pharmakologische Einfluss des Chemotherapeutikums Vemurafenib untersucht. Dadurch sollten neue putative Mechanismen der Resistenzentwicklung bei mit Vemurafenib behandelten Melanomzellen identifiziert und so neue Ansätze für weitere pharmakologische Behandlungskonzepte gewonnen werden.

## 2 Material und Methoden

Alle verwendeten Reagenzien stammen, soweit nicht anders vermerkt, von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### 2.1 Verwendete Melanomzelllinien

Die 25 verwendeten Melanomzelllinien sind in Tabelle 1 aufgelistet. Dabei stammen 16 Melanomzelllinien aus der ESTDAB-Datenbank (Pawelec und Marsh, 2006). Die übrigen Zelllinien wurden von Soldano Ferrone (Hillman Cancer Research Institute, Pittsburgh, PA) bereitgestellt.

**Tab. 1: Übersicht der verwendeten Melanomzelllinien.** (Cormier et al., 1999; EMBL-EBI, 2016)

Zelllinien		
ESTDAB-Datenbank (The European Bioinformatics Institute, 2016)		Weitere Zelllinien (Cormier et al., 1999)
FM-3	Colo-857	buf 501
FM-6	IRNE	buf 526
FM-28	MZ-Mel3	buf 624
FM-79	WM-1552c	buf 1102
FM-81	UKRV-Mel14	buf 1182
FM-82	Mel1359	buf 1280
GR-M	WM-1862	buf 1286
Colo-794	WM-39	buf 1383
		buf 1402

### 2.2 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1 Kulturbedingungen

Die kultivierten Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Feuchtinkubator inkubiert. Das Nährmedium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert. Hauptbestandteil des Mediums war RPMI-1640 (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin), 1 % Penicilin/Streptomycin (PAA) und 1 % HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Puffer) (CCPro, Neustadt). Zur Kultivierung wurden die Zellen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, Invitrogen) gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung von der Platte gelöst und weiter kultiviert.

<u>PBS</u>	Dinatriumhydrogenphosphat	10 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	2 mM
	Natriumchlorid	137 mM
	Kaliumchlorid	2,7 mM

### 2.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und anschließend in Nährmedium aufgenommen. Das Pelletieren der Zellsuspension erfolgte bei 10 °C für 5 min und 400 x g (1500 rpm) in der Zentrifuge (HERAEUS Biofuge Stratos, Thermo). Das Zellpellet wurde in Nährmedium, das mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und 20 % FKS versetzt wurde, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein Kryogefäß gefüllt und zuerst in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox gelagert. Die endgültige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

### 2.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Neubauer Improved, LO-Laboroptik GmbH, Lancing, UK). Zu Beginn wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert, in Kulturmedium aufgenommen und anschließend in der Zentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Danach wurde eine 1:20 Verdünnung in PBS hergestellt und 10 µl dieser Verdünnung in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Nach Auszählung der vier Eckquadranten und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde die Zellzahl wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl der 4 Quadranten}}{4} * \frac{\text{Verdünnung (20)}}{\text{Volumen pro Quadranten (10}^{-4}\text{)}}$$

### 2.2.4 Soft-Agar-Test

Der Soft-Agar-Test ist eine zellbiologische Methode zur Überprüfung des kontaktunabhängigen Wachstums von Tumorzellen. Hiermit kann abgeschätzt werden, inwiefern diese Zellen ohne Kontakt zur extrazellulären Matrix oder zum Zellverband überleben können und eigene Kolonien bilden. Diese Tatsache bildet eine wichtige Eigenschaft im Metastasierungsprozess von Zellen.

Zur Herstellung des Soft-Agars wurde zunächst eine Unterschicht bestehend aus 6 mL 0,5 %-iger Agarsuspension in Nährmedium (Noble Agar, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) pro 6 cm-Platte gegossen und bei Raumtemperatur ausgehärtet. Diese Unterschicht verhindert die Adhäsion der Zellen an den Kulturschalenboden. In der Zwischenzeit wurden die Zellen gewaschen, trypsiniert und gezählt. Für die Oberschicht wurden  $2 \cdot 10^4$  Zellen in einem 0,3 %-igem Agar auf die Unterschicht pipettiert. Nach einer weiteren Polymerisationszeit von 20 min wurden die Zellkulturplatten für 3 Wochen unter 37 °C und 5 %-iger CO<sub>2</sub>-Konzentration inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit erfolgte das Anfärben der Zellen mit Iodnitrotetrazoliumchlorid (5 mg/ml) über Nacht bei 37 °C und anschließend die lichtmikroskopische Auswertung mit Hilfe des Mikroskop Leica DM-IRB (Leica, Wetzlar).



### 2.2.5 Verdopplungszeit

Als Verdopplungszeit wird das Zeitintervall bezeichnet, in welchem sich die Zellzahl verdoppelt. Um die Verdopplungszeit zu bestimmen, wurden die Zellen gewaschen, trypsiniert und nach der oben beschriebenen Methode ausgezählt. Anschließend wurden  $2 \cdot 10^4$  Zellen pro 12-Well Kavität eingesät und die Zellzahl nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h bestimmt. Dieser Versuch wurde dreimal unabhängig von einander durchgeführt.

Die Verdopplungszeit wurde nach folgender Formel berechnet:

$$DT = \frac{\log 2 * \Delta t}{\log N - \log N_0}$$

*DT ... Verdopplungszeit*  
*Δt ... Kulturdauer in Stunden*  
*N ... Zellzahl nach Kulturdauer*  
*N<sub>0</sub> ... Zellzahl zu Beginn t<sub>0</sub>*

### 2.2.6 Zellproliferationsassay

Mit Hilfe des Zellproliferationsassays lässt sich die metabolische Aktivität von Zellen bestimmen. Das Grundprinzip ist die Reduktion des gelben Tetrazoliumsals XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) durch Dehydrogenasen von metabolisch aktiven Zellen in ein wasserlösliches rötliches Formazansalz. Diese Reaktion läuft nur in vitalen Zellen ab, deren mitochondrialen Dehydrogenasen intakt sind. Die Konzentration des Formanzansalz ist somit direkt proportional zu den metabolisch aktiven Zellen.

Um die Aktivität der Zellen zu überprüfen, wurden zunächst  $5 \cdot 10^3$  Zellen in eine Kavität einer 96-Well-Platte pipettiert. Die Analyse der Zellaktivität erfolgte entweder nach der Behandlung mit normal konzentriertem Nährstoffmedium, nach Zugabe von verschiedenen Inhibitoren oder mit Kulturmedium versetzt mit 0,5 % FKS nach 48 bzw. 72 h mit Hilfe des Cell Proliferation Kit II (Roche, Mannheim). Hierzu wurde das Kulturmedium der zuvor behandelten Zellen entfernt und die Zellen mit 100 µl Kulturmedium, 50 µl XTT-Reagenz und 1 µl Phenanzinmethosulfat (PMS) versetzt. PMS ist ein Elektronenüberträger (Electron-coupling reagent) und sorgt für einen stabilen Ablauf der XTT-Reduktionsreaktion. Nach einer Inkubationszeit des XTT-Reagenz von 2 bis 4 h erfolgte die Auswertung der Analyse spektrophotometrisch mit Hilfe des ELISA-Reader MRX TC II (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA) bei einer Wellenlänge von 490 nm. Bei dieser Wellenlänge besitzt das Formazansalz im Gegensatz zum XTT sein Absorptionsmaximum. Die Absorptionsrate ist direkt proportional zur Konzentration des Formazansalz bei dieser Wellenlänge. Eine höhere Konzentration an Formazansalz bedeutet einen höheren Umsatz an XTT und somit eine erhöhte Anzahl an vitalen Zellen (Luttmann et al., 2014, S. 199-200).

### 2.2.7 Behandlung der Zellen mit MAPK-Inhibitoren

Zur Untersuchung der Wirksamkeit von MAPK-Inhibitoren wurden die Zellen mit dem BRAF-Inhibitor Vemurafenib (PLX 403 2) (LC Laboratories, Woburn, MA, USA) und dem MEK1/2- Inhibitor U-0126 (ENZO Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland) behandelt.

Um die Regulation der proliferativen Zellaktivität zu bestimmen, wurden  $5 \cdot 10^3$  Zellen in 96 Well-Platten eingesät, mit den Inhibitoren Vemurafenib ( $c = 3 \mu\text{M}$ ) und U-0126 ( $c = 20 \mu\text{M}$ ) für 48 h versetzt und anschließend mit Hilfe des XTT-Tests analysiert. Zur Untersuchung der dosisabhängigen Wirkung des BRAF-Inhibitors Vemurafenib wurden die Zellen mit zehn verschiedenen Konzentrationen ( $c_1 = 0,1 \mu\text{M}$  bis  $c_{10} = 100 \mu\text{M}$ ) von Vemurafenib behandelt. Des Weiteren wurde der Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf die Proteinexpression in den Zellen untersucht (siehe 2.4.4). Dafür wurden die Zellen mit den Inhibitoren für 24 h behandelt und nachfolgend die zellulären Proteine extrahiert. Bei allen Versuchen wurden mit DMSO behandelte Kontrollen als Referenz verwendet.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 DNA-Isolation aus Zelllinien

Die Isolation der DNA aus den kultivierten Melanomzelllinien wurde mit Hilfe des NucleoSpin® Tissue Kits von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.3.2 RNA-Isolation aus Zelllinien

Für die Isolation der RNA wurde das NucleoSpin® RNA II Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurden die zuvor  $5 \times 10^6$  pelletierten Zellen mit 1 %-igem  $\beta$ -Mercaptoethanol/RA1-Puffer-Lösung (350  $\mu\text{l}$ ) lysiert, auf eine NucleoSpin®-Filtersäule gegeben und zentrifugiert. Nach Zugabe von 350  $\mu\text{l}$  70 %-igem Ethanol zum Filtrat wurde dieses auf eine NucleoSpin® RNA II-Säule gegeben, zentrifugiert und die Säule in ein neues 2 ml-Sammelgefäß gesetzt. Das Zentrifugat wurde verworfen. Zum Entsalzen der Säulenmembran wurden 350  $\mu\text{l}$  MD-Puffer auf die Säule pipettiert und diese 30 s zentrifugiert. Auf die Säule wurden 95  $\mu\text{l}$  einer DNase Reaktionsmischung gegeben und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe, wobei der erste Schritt mit 200  $\mu\text{l}$ , der zweite Schritt mit 600  $\mu\text{l}$  und der letzte Schritt mit 250  $\mu\text{l}$  RA3-Puffer erfolgt. Dabei wurde nach den ersten zwei Waschschriffen die Säulen zentrifugiert und das Lysat verworfen. Die Zentrifugation nach dem dritten Waschschriff erfolgte 2 min bei 11000 x g. Im Anschluss wurde die Säule in ein RNase-freies Sammelgefäß (1,5 ml) überführt und 40  $\mu\text{l}$  RNase-freies Wasser hinzugefügt. Nach 1 min bei 11000 x g Zentrifugieren eluierte man die RNA aus den Säulen.

### 2.3.4 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Zur Konzentrationsbestimmung wurden die DNA-Proben in einem Verhältnis von 1:50 und die RNA-Proben in einem Verhältnis von 1:75 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Die Messung der jeweiligen Konzentrationen erfolgte UV-spektrometrisch mittels BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) mit einer Wellenlänge von 260 nm. Grundlage für die Berechnung der Konzentrationen aus den Extinktionswerten ist folgende Annahme:

Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml und einer doppelsträngigen DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Thieman et al., 2015). Den Berechnungen liegt das Lambert-Beer'sche Gesetz zu Grunde:

$$E = \ln \frac{I_0}{I_x} = \varepsilon * c * d$$

$$E \sim c$$

*E* .... Extinktion

*I*<sub>0</sub> .... eingefallene Lichtintensität

*I*<sub>x</sub> .... transmittierte Lichtintensität

*ε* .... Extinktionskoeffizient

*c* .... Konzentration des absorbierenden Stoffes

*d* .... Schichtdicke des durchstrahlten Körpers

Hiernach ist die Extinktion direkt proportional zur Konzentration des absorbierenden Stoffes in der Lösung.

### 2.3.5 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription dient dem Umschreiben der gewonnenen RNA in komplementäre DNA (cDNA). Zur cDNA-Synthese wurde das RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas (Ontario, Kanada) genutzt. Hierfür wurden 2 µg RNA und 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer vermischt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt. Um die Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen, wurde der Mix nun bei 65 °C für 5 min inkubiert und anschließend auf 2 °C abgekühlt. Im nächsten Schritt wurde dem Gemisch Folgendes hinzugefügt:

Reaktionspuffer	4,0 µl
RiboLock™ RNase Inhibitor (20 U/µl)	1,0 µl
10 mM dNTP Mix	2,0 µl
RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1,0 µl

Dieser Ansatz wurde im T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen) 5 min bei 25 °C, 60 min bei 42 °C und anschließend 5 min bei 70 °C inkubiert. Als letzter Schritt erfolgte die Abkühlung der Probe auf 2 °C.

### 2.3.6 Allelspezifische Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasenkettenreaktion handelt es sich um eine molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte. Für die allelspezifische PCR wurden zwei verschiedene *Forward*-Primer und ein gemeinsamer *Reverse*-Primer genutzt, um eine

allelspezifische Vervielfältigung des *BRAF*-Genabschnittes zu erlangen. Der verwendete wt-Primer bindet an die nicht-mutierte (wildtypische = wt) Variante des *BRAF*-Gens. Der mt-Primer (mutiert = mt) bindet die mutierte V600E (c.1799T>A)-Variante des *BRAF*-Gens. Es wurden jeweils zwei unabhängige PCR pro DNA-Probe durchgeführt, je eine mit dem wt-Primer und eine mit mt-Primer. Folgender Reaktionsansatz wurde zuvor für jede Probe in einem 0,5 ml-Gefäß hergestellt. Die Polymerasekettenreaktion erfolgte im Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) und wurde nach folgendem Ablauf für den wt-Primer durchgeführt:

<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/μl)	0,3 μl	94 °C	2 min	} 48 Zyklen
10 mM dNTP Mix	0,5 μl	94 °C	30 sek	
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,5 μl	59,5 °C	30 sek	
10 x PCR-Puffer	2,5 μl	72 °C	20 sek	
Wasser	19,7 μl	72 °C	5 min	
<i>Forward</i> -Primer (wt/mt-Primer)	0,25 μl	7 °C	∞	
<i>Reverse</i> -Primer	0,25 μl			
gDNA	1,0 μl			

Das Programm wurde für den mt-Primer angepasst, in dem die Hybridisierungstemperatur auf 59 °C festgelegt wurde. Die weiteren PCR-Bedingungen wurden nicht verändert.

V600 wt for (wt- <i>Forward</i> -Primer):	5'-AGG-TGA-TTT-TGG-TCT-AGC-TAC-AGT-3'
V600E mt for (mt- <i>Forward</i> -Primer):	5'-AGG-TGA-TTT-TGG-TCT-AGC-TAC-AGA-3'
V600E rev ( <i>Reverse</i> -Primer):	5'-GTA-ACT-CAG-CAG-CAT-CTC-AGG-G-3'

Zur Überprüfung der Ergebnisse der allelspezifischen Polymerasen-Kettenreaktion wurden die PCR-Produkte in einer Agarosegelelektrophorese (3 %-iges Agarosegel, siehe 2.3.7) analysiert.

### 2.3.7 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten ihrer Größe nach. Die Agarose (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) wurde mit Tris-Acetate-EDTA-Puffer (TAE) aufgekocht und nach Zugabe von 3 μl Ethidiumbromid/100 ml Agarose-TAE-Lösung zum Verfestigen in eine Laufkammer gegossen. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 10 μl Ladepuffer (Bromphenolblau/Glycerin) versetzt. Die Auswertung und Dokumentation der Gelelektrophorese erfolgte mit Hilfe des Transilluminators (Might Bright, Hoefer).

<u>TAE-Puffer:</u>	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	40 mM
	Eisessig	20 mM
	EDTA	1 mM

### 2.3.8 Quantitative *Real-Time* PCR (RT-qPCR)

Mit Hilfe der RT-qPCR ist es möglich, die Quantität von PCR-Produkten zu ermitteln und damit beispielsweise auf das Expressionsniveau von RNA zu schließen. Hierzu wird der Farbstoff SYBR Green genutzt, der nach Einlagern in doppelsträngige DNA (dsDNA) fluoresziert. Die Fluoreszenz wird nach jedem PCR-Zyklus gemessen. Da nur Farbstoff in dsDNA stark fluoresziert, ist

die detektierte Fluoreszenz proportional zur Menge des PCR-Produktes und lässt somit Rückschlüsse über die Konzentration des Transkripts zu. Um den PCR-Ablauf qualitativ zu prüfen, wird am Ende des Vorgangs der Schmelzpunkt des PCR-Amplikons bestimmt. Ist die PCR korrekt abgelaufen, gibt es nur einen spezifischen Schmelzpunkt, der dem des PCR-Produktes entspricht. Folgender Reaktionsansatz wurde für die RT-qPCR hergestellt:

Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	10 µl
Wasser	8,5 µl
Forward-Primer (100 pmol/µl)	0,25 µl
Reverse-Primer (100 pmol/µl)	0,25 µl
cDNA	1,0 µl

Die RT-qPCR erfolgte unter folgenden PCR-Bedingungen im Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australien):

95 °C	2 min	} x 40
95 °C	15 sek	
60 °C	30 sek	
60 °C	2 min	

**Tab.2: Auflistung der verwendeten Primer für die qRT-PCR und deren Basensequenzen.**

Gen	Primer	Primersequenz 5'- 3'	Referenzsequenz
<i>BRAF</i>	<i>BRAF</i> RT FW	CAGCGAGAAAGGAAGTCATCTT	NM_00433
	<i>BRAF</i> RT Rev	GAAGGCTTGTAAGTCTGAGGT	NP_004324
<i>NRAS</i>	<i>NRAS</i> RT FW	GCCATGAGAGACCAATACATGA	NM_002524
	<i>NRAS</i> RT Rev	ACTTGTTCCCACTAGCACCAT	NP_002515
<i>ERK1</i>	<i>ERK1</i> RT FW	GCTACACGCAGTTGCAGTACAT	NM_001040056
	<i>ERK1</i> RT Rev	TCAGGTCCTGCACAATGTAGAC	NP_001035145
<i>ERK2</i>	<i>ERK2</i> RT FW	CATGGTGTGCTCTGCTTATGAT	NM_002745
	<i>ERK2</i> RT Rev	CCCTCTGAGGATCTGGTAGAGA	NP_002736
<i>ErbB1</i>	<i>ErbB1</i> RT FW	CCCGTAATTATGTGGTGACAGA	NM_201283
	<i>ErbB1</i> RT Rev	GGATCCAGAGGAGGAGTATGTG	NP_958440
<i>ErbB2</i>	<i>ErbB2</i> RT FW	GTGACACAGCTTATGCCCTATG	NM_001005862
	<i>ErbB2</i> RT Rev	CTGCATGGTACTCTGTCTCGTC	NP_004439
<i>ErbB3</i>	<i>ErbB3</i> RT FW	GCTCCAGGAGAAAGTGTCAATGTGT	NM_001982
	<i>ErbB3</i> RT Rev	GGACAGAACTGAGACCACTGAAGA	NP_001973
<i>ErbB4</i>	<i>ErbB4</i> RT FW	CAGAGTGACGTTTGGAGCTATG	NM_001042599
	<i>ErbB4</i> RT Rev	CTTCATACGATCATCACCTGA	NP_001036064
<i>cKIT</i>	<i>cKIT</i> RT FW	CTTACTCATGGTCGGATCACAA	NM_000222
	<i>cKIT</i> RT Rev	GAAGCCTTCCTTGATCATCTTG	NP_000213
<i>MIA</i>	<i>MIA</i> RT FW	GGCCAAGTGGTGTATGTCTTCT	NM_006533
	<i>MIA</i> RT Rev	CCCATTGTCTGTCTTCACATC	NP_006524
<i>MITF</i>	<i>MITF</i> E318K HRM FW	TTATTCCATCCACGGGTCTC	NM_000248
	<i>MITF</i> E318K HRM Rev	AGGTCTTGGCTGCAGTTCTC	NP_000239

Die Primer wurden auf Grundlage bekannter cDNA-Sequenzen des National Center for Biotechnology Information „NCBI“ mit Hilfe des Programms Primer3 (Version 0.4.0) generiert

(Institute for Biomedical Research et al., 2012). Zur Überprüfung der Vollständigkeit wurden alle PCR-Produkte auf einem 2 %-igem Agarosegel aufgetragen und per Elektrophorese kontrolliert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode unter Verwendung der  $C_t$ -Werte (*threshold cycle*) (Livak und Schmittgen, 2001). Hierfür wurden die  $\Delta C_t$ -Werte des Zieltranskripts in der Zielpopulation sowie der Referenzpopulation unter Normalisierung auf ein Kontrolltranskript miteinander verglichen. Es wurde hierbei eine Effizienz von 100 % angenommen. Als Kontrollgene dienten Beta-Actin (ACTB) oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Folgende Formel wurde für die Berechnungen verwendet:

$$rel. mRNA - Menge = 2^{-( (ZZ - KZ) - (ZR - KR) )}$$

*ZZ ....  $C_t$  des Zieltranskripts der Zielpopulation*

*KZ ....  $C_t$  des Kontrolltranskripts der Zielpopulation*

*ZR ....  $C_t$  des Zieltranskripts der Referenzpopulation*

*KR ....  $C_t$  des Kontrolltranskripts der Referenzpopulation*

### 2.3.9 High Resolution Melting-Analysen

Die *High Resolution Melting*-Analyse (kurz: HRM) ist eine Methode, die es ermöglicht, genetische Varianten in einem PCR-Amplifikat zu detektieren. Dabei wird zu Beginn eine PCR des zu untersuchenden Genabschnitts in Gegenwart eines dsDNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs durchgeführt. In dieser Arbeit wurde der Farbstoff EvaGreen® verwendet. Im Anschluss an die durchgeführte PCR erfolgte eine hochauflösende Schmelzpunktanalyse – die HRM. Die entstandenen doppelsträngigen PCR-Produkte werden bei der Schmelzpunktanalyse durch stetiges Erhöhen der Temperatur in ihre Einzelstränge wieder aufgetrennt. Jedes PCR-Amplifikat hat einen spezifischen Schmelzpunkt, der unter anderem von der Basenpaarlänge sowie der Basenpaarzusammensetzung abhängig ist. Wenn die doppelsträngige DNA dissoziiert, wird der Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen® freigesetzt und die Abnahme der Fluoreszenz gemessen. Diese liefert eine Aussage über den spezifischen Schmelzpunkt des amplifizierten Genbereiches. Weiterhin wird für jede Probe ein sequenzspezifischer Schmelzkurvenverlauf ermittelt, der je nach Mutationsstatus (wildtypisch, heterozygot, homozygot) seine Charakteristik verändert, sodass Veränderungen im Basenaufbau der Sequenzen unterschieden werden können. Diese Vorgänge erfordern eine hohe Genauigkeit der Temperaturänderung sowie die Messung einer Vielzahl von Fluoreszenzdaten. Dieser Vorgang wurde im Rotor Gene 6000 durchgeführt. Folgender Reaktionsansatz wurde für die HRM-Analysen hergestellt:

Evagreen Mix		7,5 $\mu$ l
gDNA		1,0 $\mu$ l
Wasser		5,45 $\mu$ l
Primer-Mix:		1,05 $\mu$ l
<i>Forward</i> -Primer (100 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	
<i>Reverse</i> -Primer (100 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	
Wasser	8 $\mu$ l	

Die HRM-Analysen erfolgten unter diesen Bedingungen:

95 °C	5 min	}	x 45	}	PCR	
95 °C	10 sek					
60 °C	15 sek					
95 °C	5 min					
55 °C	2 min					
→ 65 °C bis 95 °C Temperaturerhöhung in 0,1 °C-Schritten					}	HRM

Die gewonnenen HRM-Daten wurden mit Hilfe der Rotor-Gene-6000-Series-Software ausgewertet. Anhand dieser Daten konnte der Mutationsstatus der Proben bestimmt werden.

**Tab.3: Auflistung der verwendeten Primer für die HRM-Analysen und deren Basensequenzen.**

Gen	Primer	Primersequenz 5'-3'	Referenzsequenz
<i>BRAF</i> (Codon 600)	<i>BRAF</i> HRM V600 FW	GAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTG	NM_00433
	<i>BRAF</i> HRM V600 Rev	CTGATGGGACCCACTCCAT	NP_004324
<i>NRAS</i> (Codon 12 und 13)	<i>NRAS</i> HRM 2G FW	TACAACTGGTGGTGGTTGG	NM_002524
	<i>NRAS</i> HRM 2G Rev	AAGTGGTTCTGGATTAGCTGGA	NP_002515
<i>NRAS</i> (Codon 61)	<i>NRAS</i> HRM Q FW	TGGTGAAACCTGTTTGTGG	NM_002524
	<i>NRAS</i> HRM Q Rev	TCGCTGTCTCATGTATTG	NP_002515
<i>KRAS</i> (Codon 12 und 13)	<i>KRAS</i> HRM 2G FW	CTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGA	NM_004985
	<i>KRAS</i> HRM 2G Rev	TTGGATCATATTCGTCCACAA	NP_004976

### 2.3.10 Sequenzierung

Die Sequenzierungen der Proben erfolgten mittels *LIGHTrun*<sup>TM</sup> Sequenzierungsservice der Firma GATC Biotech AG, European Genom and Diagnostics Centre (Konstanz, Deutschland). Pro Probe wurden 0,5 µl Primer (Tab. 4) mit einer Konzentration von 5 pmol/µl verwendet. Anschließend wurden 9,5 µl der PCR-Produkte und 0,5 µl der Primerverdünnung zusammengeführt. Die Auswertung der Sequenzierungen erfolgte mit Hilfe der Software CodonCode Aligner Version 5.0.2. Es wurde abhängig vom Gen ein bestimmter Locus und die flankierenden Sequenzabschnitte analysiert.

**Tab. 4: Auflistung der verwendeten Sequenzierprimer und deren Basensequenz.**

Gen	Primer	Primersequenz 5'-3'	Referenzdatenbank
<i>BRAF</i> (Codon 600)	RT FW	CAGCGAGAAAGGAAGTCATCTT	NM_00433; NP_004324
<i>KRAS</i> (Codon 12 und 13)	<i>KRAS</i> HRM 2G Rev	TTGGATCATATTCGTCCACAA	NM_002524; NP_002515
<i>NRAS</i> (Codon 12, 13 und 61)	<i>NRAS</i> + 67 Rev	GTCAGGACCAGGGTGTCACT	NM_002524; NP_002515

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.1 Proteinisolierung

Zur Extraktion der Proteine wurde das Medium aus den Kulturschalen entfernt und den konfluent gewachsenen Zellen 1,2 ml RIPA-Puffer hinzugefügt. Der RIPA-Puffer, der als Lysepuffer dient, wurde zuvor mit je 1 % (v/v) Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 1 und 2 sowie Protease-Inhibitor-Cocktail versetzt.

<u>RIPA-Puffer</u>	Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	Nonidet P – 40	1 %
	Natriumdesoxycholat	1 %

Die Zellen wurden vom Schalenboden abgeschabt, die Zellsuspension in gekühlte 1,5 ml-Gefäße überführt und anschließend für 30 min auf Eis lysiert. Für einen vollständigen Zellaufschluss wurde das Zelllysat mit Ultraschall behandelt. Danach wurde das Lysat bei 4 °C 20 min bei 800 x g zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und in neue gekühlte Gefäße überführt.

### 2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den jeweiligen Proben wurde das BCA Protein Assay Kit (Pierce, Bonn) verwendet. Es arbeitet auf der Grundlage, dass Proteine im alkalischen Milieu  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduzieren. Die Bicinchoninsäure (BCA) fungiert als Chelatbildner. Zwei dieser Moleküle komplexieren ein  $\text{Cu}^+$ -Ion und bilden dabei eine wasserlösliche violette Verbindung, die ein Absorptionsmaximum bei 562 nm besitzt. Nach Bestimmen einer Standardkurve anhand einer Verdünnungsreihe von FKS ( $c_1 = 0,005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  bis  $c_9 = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wird jede Proteinprobe photometrisch vermessen und die Konzentration auf Basis der zuvor festgelegten Standardkurve durch lineare Regression ermittelt. An erster Stelle wurde eine Verdünnung von 1:10 der Proben hergestellt. Es wurden je 10  $\mu\text{l}$  der Proteinverdünnung in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die BCA Protein Assay Reagenzien A und B wurden in einem Verhältnis von 50:1 gemischt und 200  $\mu\text{l}$  dieser Lösung zu jeder Probe gegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit bei 60 °C erfolgte die Messung der Extinktionen mit Hilfe des Elisa-Readers bei einer Wellenlänge von 570 nm.

### 2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Methode der SDS-Page beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen anhand ihres spezifischen Molekulargewichts. Die zu bestimmenden Proteinproben ( $c = 50 \mu\text{g}$ ) müssen vor dem Auftragen auf den Gelen mit 10 % (v/v) Dithiothreitol (DTT) und 25 % (v/v) Laemmli-Ladepuffer versetzt werden.



<u>Laemmli-Ladepuffer</u>	Tris-HCl (pH 6,8)	62,5 mM
	Glycerol	10 %
	SDS	2 %
	2-Mercaptoethanol	5 %
	Bromphenolblau	0,1 %

Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 95 °C inkubiert. Das Natriumdodecylsulfat (SDS) und der 2-Mercaptoethanol im Ladepuffer sowie das DTT dienen als reduzierende Agenzien, die der vollständigen Denaturierung der Proteine dienen. Die SDS-Page ist eine diskontinuierliche Methode, bei der sich die beiden Gele im Hinblick auf Acrylamidkonzentration und pH der Tris/HCl-Puffer unterscheiden. Die Trenngele wurden je nach Größe des zu selektierenden Proteins in zwei verschiedenen Konzentrationen (10 % und 12 %) angefertigt. Mit höherer Konzentration des Acrylamids im Gel werden die dreidimensionalen Netze feiner und dadurch wird die Auftrennung kleiner Proteine ermöglicht.

Zuerst wurde das Trenngel in eine Gelkammer (1,5 mm-Kassette, Invitrogen) gegossen und nach 20-minütiger Polymerisationsphase das Sammelgel aufgetragen. Die Kassetten wurden in eine Gelelektrophorese-Kammer gespannt und diese mit 1 x Tris-Glycin-Laufpuffer befüllt. Die Taschen wurden anschließend mit 30 µl der vorbereiteten Proteinproben beladen. Als Größenstandard wurde ein Proteinmarker (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Fermentas) aufgetragen. Im Sammelgel erfolgte die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 30 V. Im Trenngel wurde die Spannung auf 100 bis 170 V erhöht.

<u>Tris-Glycin-Laufpuffer (pH 8,5)</u>	Tris-HCl	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 %

**Tab. 5: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele.**

Reagenzien	Sammelgel [ml]	Trenngel 10 % [ml]	Trenngel 12 % [ml]
Wasser	2,4	4,8	4,3
40 %-ige Acrylamid-Lösung	0,5	2,5	3
1,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	1		
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)		2,5	2,5
10 % SDS	0,04	0,1	0,1
TEMED	0,006	0,004	0,004
10 % Ammoniumpersulfat	0,04	0,1	0,1

#### 2.4.4 Western Blot (Immunblot)

Mit Hilfe der Western Blot-Methode ist es möglich, die zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran zu transferieren, somit zu immobilisieren und für den spezifischen Proteinnachweis nutzbar zu machen. Der Proteinnachweis erfolgt auf Grundlage einer immunologischen Methode, bei der Antikörper gegen spezifische Proteinepitope gerichtet sind.

Proteine wandern aufgrund ihrer negativen Ladung während des Blot-Vorganges vom Polyacrylamidgels in Richtung Anode. Hier binden sie an der Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell, Dassel). Der Elektrotransfer wird nach dem *Semi-Dry*-Verfahren in einem diskontinuierlichen Puffersystem mit drei verschiedenen Puffern durchgeführt. Hierzu werden jeweils vier Lagen Whatman®-Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) für 10 min in die jeweiligen Pufferlösungen (Anodenpuffer I und II sowie Kathodenpuffer) gelegt. Die Nitrocellulosemembran wurde in Anodenlösung II getränkt und der Blot wie folgt aufgebaut:

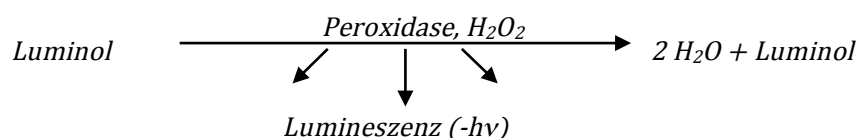
Die Pufferlösungen setzen sich wie folgt zusammen:

<u>Anodenpuffer I (pH 10,4)</u>	Tris-HCl	30 mM
	Methanol	20 % (v/v)
<u>Anodenpuffer II (pH 10,4)</u>	Tris-HCl	25 mM
	Methanol	20 % (v/v)
<u>Kathodenpuffer (pH 7,6)</u>	6-Aminohexansäure	40 mM
	Methanol	20 % (v/v)

Der Blot wurde für 90 min bei einer Stromstärke von 65 mA pro Blot laufen gelassen. Der Transfer der Proteine sowie die Blot-Qualität wurde im Anschluss durch eine Färbung mit Ponceau S (Applichem, Darmstadt) (0,1 % (w/v) Ponceau S und 5 % Essigsäure) geprüft. Unspezifische Bindungen auf der Membran wurden für 1 h in TBS-T (0,1 % (v/v) Tween 20 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) in TBS mit 5 % (w/v) Milch (Difco, Sparks, MD, USA) bei Raumtemperatur geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurden die Membranen über Nacht bei 8 °C mit je 5 ml des Primärantikörpers (Tab. 6) inkubiert.

<u>TBS pH(7,5)</u>	Natriumchlorid	150 mM
	Tris-HCl	25 mM

Nach der Inkubationszeit mit dem Primärantikörper wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und für 1,5 h mit dem entsprechenden Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. An den Sekundärantikörper ist eine Peroxidase gekoppelt, die es möglich macht, den Antikörperkomplex mittels enzymatischer Umsetzung eines Chemilumineszenzsubstrats nachzuweisen. Hierzu wurde die Membran wieder mit TBS-T und im Anschluss einmal mit TBS gewaschen. Die Luminolverstärkerlösung und der Peroxidase-Puffer (Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche, Mannheim) wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und auf die Membran gegeben. Die Chemilumineszenz, die mit Hilfe der LAS 3000-Kamera (Fujifilm, Düsseldorf) detektiert wurde, erfolgte durch die Oxidation des Luminols mit Wasserstoffperoxid durch die Peroxidase.



Neben den zu untersuchenden Proteinen dienten GAPDH und ACTB als Referenzgene (Ladungskontrollen). Die quantitative Auswertung der Daten erfolgte mittels PC und der Software AIDA Image Analyzer Version 4.11 (Raytest GmbH).

**Tab. 6: Auflistung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern im Western Blot.**

	Antikörper	kDa	Source	Firma	Verdünnung	Inkubation
Primärantikörper	pAKT (S473)	60	Kaninchen	CS	1:1000	FKS (5% w/v in TBS-T)
	AKT	60	Kaninchen	CS	1:1000	FKS (5% w/v in TBS-T)
	p44/45 MAPK (ERK1/2)	44/45	Kaninchen	CS	1:1000	FKS (5% w/v in TBS-T)
	ERK1/2	44/45	Maus	BD	1:1000	FKS (5% w/v in TBS-T)
	BRAF	86	Maus	CS	1:1000	FKS (5% w/v in TBS-T)
	NRAS	21	Kaninchen	Thermo	1:100	Milchpulver (5% w/v in TBS-T)
	GAPDH	37	Kaninchen	CS	1:1000	FKS (5% w/v in TBS-T)
	ACTB	45	Kaninchen	CS	1:1000	FKS (5% w/v in TBS-T)
Sekundärantikörper	Anti-Kaninchen-HRP		Ziege	CS	1:2500	Milchpulver (5% w/v in TBS-T)
	Anti-Maus-HRP		Schwein	Dako	1:1000	Milchpulver (5% w/v in TBS-T)

CS=Cell Signaling Technology; BD=BD Biosciences; Dako=Dako GmbH; Thermo=Thermo Fisher Scientific

### 3 Ergebnisse

In dieser Dissertation sollte unter anderem die Rolle der Onkogene *BRAF*, *NRAS* und *KRAS* in der Tumorgenese des Melanoms analysiert werden. Hierfür wurden Mutations- (siehe 3.1) und Expressionsanalysen (siehe 3.2) der 25 Melanomzelllinien (siehe 2.1) durchgeführt. Letztere wurden aus Metastasen maligner Melanome gewonnen. Die Analysen zu *HRAS* wurden aufgrund der geringen Mutationsrate im Melanom nicht durchgeführt.

**Tab. 7: Übersicht der analysierten Mutationen (EMBL-EBI und Institute, 2016).**

Gen	Mutationskodierung codierende DNA	Mutationskodierung Protein	Genbereich	Referenzsequenz	Kurzform
<i>BRAF</i>	c.1799T>A	p.Val600Glu	Exon 15	NM_00433, NP_004324	V600E
<i>NRAS</i>	c.34G	p.Gly12	Exon 2	NM_002524, NP_002515	G12
	c.37G	p.Gly13	Exon 2	NM_002524, NP_002515	G13
	c.181C>A	p.Gln61Lys	Exon 3	NM_002524, NP_002515	Q61K
	c.182A>T	p.Gln61Leu	Exon 3	NM_002524, NP_002515	Q61L
<i>KRAS</i>	c.34G>C	p.Gly12Arg	Exon 2	NM_002524; NP_002515	G12R
	c.37G	p.Gly13	Exon 2	NM_002524; NP_002515	G13

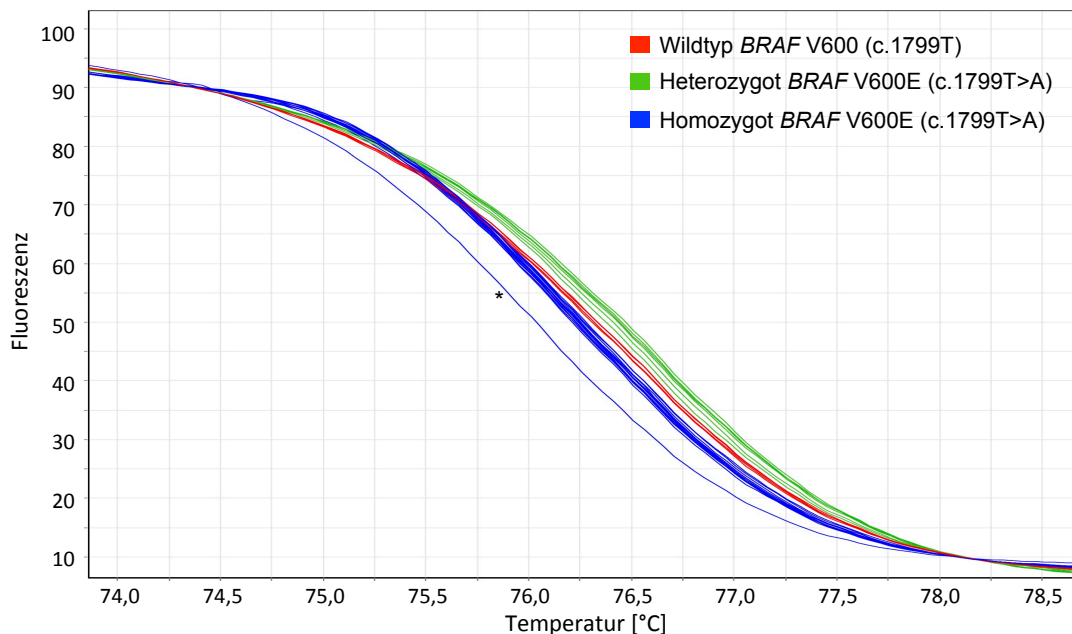
#### 3.1 Mutationsanalysen der Melanomzelllinien

Die Mutationsanalysen für *BRAF*, *NRAS* und *KRAS* erfolgten in zwei Schritten: zum Screening wurde die hochauflösende Schmelzpunktanalyse (*High Resolution Melting* = HRM) aus genomischer DNA in Kombination mit SYBR Green-Detektion durchgeführt. Nachfolgend wurden die Daten der Schmelzpunktanalysen mittels Sequenzierung ausgewählter Zelllinien verifiziert. Für die Sequenzierungen wurde RNA aus den Zelllinien isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Sequenzierung der gewonnenen cDNA erfolgte im Anschluss mittels spezifischer Primer. Ergänzend zu den Sequenzierungen und den Schmelzpunktcurven wurde die genomische DNA anhand allelspezifischer PCR untersucht.

##### 3.1.1 *BRAF*-Mutation c.1799T>A (V600E)

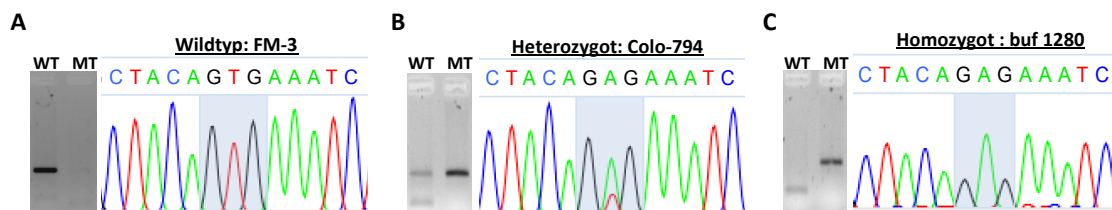
Die häufigste der bisher bekannten *BRAF*-Mutationen im Melanom ist ein Basenaustausch von Thymin zu Adenosin, wodurch das entsprechende Codon (GAG) statt der Aminosäure Valin Glutaminsäure kodiert (Davies et al., 2002). Um diese als V600E (c.1799T>A) bezeichnete Mutation in den 25 ausgewählten Melanomzelllinien zu analysieren, wurde zu Beginn eine Schmelzpunktanalyse auf DNA-Ebene durchgeführt. Die hier gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der Rotor-Gene 6000 Series-Software ausgewertet. So konnte anhand der spezifischen Schmelzpunkte sowie der Schmelzkurvenverläufe der Mutationsstatus der DNA-Proben bestimmt werden. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse erfolgte die Sequenzierung des entsprechenden Genabschnittes von *BRAF* bei allen 25 Melanomzelllinien auf RNA-Ebene. Ergänzend zu den

Mutationsanalysen wurden weiterhin allelspezifische PCRs auf DNA-Ebene durchgeführt. Die allelspezifische PCR erfolgte mit spezifischen Primern für das wildtypische *BRAF* V600 (c.1799T)- sowie das mutierte V600E (c.1799T>A)-Allel. Die PCR-Produkte wurden anschließend zur Analyse auf Agarosegele aufgetragen. Hierbei konnte nun nachgewiesen werden, ob wildtypische und/oder mutierte Allele in der untersuchten Zelllinie vorlagen.



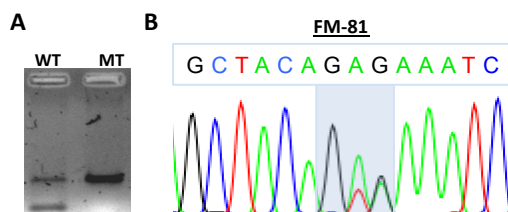
**Abb. 6: HRM-Kurvenverlauf zur Detektion der Punktmutation *BRAF* V600E (c.1799T>A).** Abgebildet ist der Schmelzkurvenverlauf der 25 Melanomzelllinien. Die Graphen zeigen eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz, sobald die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen wird. Die verschiedenen Kurvenverläufe zeigen dabei die verschiedenen Mutationsstatus. Rot = wildtypisch, Grün = heterozygot, Blau = homozygot. \* abweichender Schmelzkurvenverlauf der Zelllinie FM-81. Es erfolgte die Durchführung zwei unabhängiger Experimentdurchläufe.

Anhand der spezifischen Kurvenverläufe (Abb. 6) sowie der ermittelten Schmelzpunkte konnten die untersuchten Proben den *BRAF*-Allelen zugeordnet werden. Die Zelllinie FM-81 fiel dabei durch einen stark abweichenden Kurvenverlauf auf, der sich in den Sequenzierungen als Doppelmutation im Codon 600 zeigte (siehe Abb. 8). In Abb. 7 wurden repräsentativ eine *BRAF* V600 (c.1779T) wildtypische Zelllinie (FM-3), eine *BRAF* V600E (c.1799T>A) heterozygote Zelllinie (Colo-794) sowie eine *BRAF* V600E (c.1799T>A) homozygote Zelllinie (buf 1280) dargestellt.



**Abb. 7: Repräsentative Mutationsanalyse am *BRAF*-Locus V600E (c.1799T>A) in Melanomzelllinien.** Analyse der 25 Zelllinien mittels Sequenzierung auf RNA-Ebene sowie allelspezifischer PCR auf DNA-Ebene. Abbildung der mutationsrelevanten Chromatogrammausschnitte und der auf Agarosegel aufgetragen PCR-Produkte der allelspezifischen PCR. Dargestellt sind stellvertretend eine (A) *BRAF* V600 (c.1779T) wildtypische Zelllinie, (B) *BRAF* V600E (c.1799T>A) heterozygote Zelllinie und (C) *BRAF* V600E (c.1799T>A) homozygote Zelllinie. Es erfolgte die Durchführung eines unabhängigen Experimentdurchlaufs.

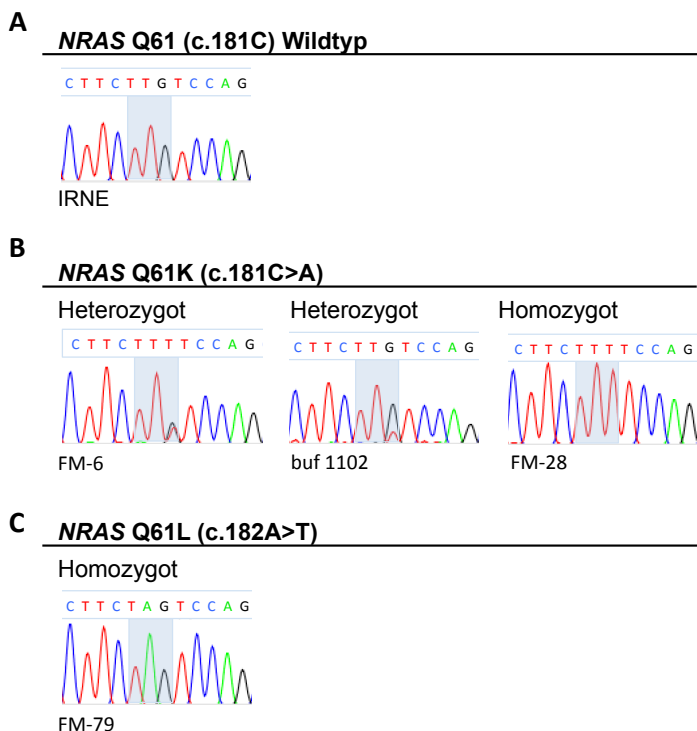
Es wurde in 19 der 25 Zelllinien eine *BRAF* V600E (c.1799T>A) Mutation auf DNA- und RNA-Ebene nachgewiesen (siehe Anhang 7.1). Wildtypische Genotypen für *BRAF* V600 (c.1799T) fanden sich in sechs der untersuchten Zelllinien (buf 624, FM-3, FM-6, FM-28, FM-79 und GR-M), was 24 % des Gesamtkollektivs entspricht. Das Vorliegen von Doppelbanden in der Agarose-Gelelektrophorese sowie Doppelpeaks in den Chromatogrammen sprechen für das gleichzeitige Vorhandensein eines wildtypischen und eines mutierten Allels von *BRAF* V600 (c.1799T). Diese heterozygote Genotypkonstellation fand sich bei 15 der 25 untersuchten Zelllinien (buf 1285, buf 1383, buf 1402, buf 501, buf 526, buf 1102, buf 1182, Colo-794, Colo-857, FM-81, FM-82, IRNE, MZ-Mel3, WM-1552c und UKRV-Mel14a) und somit bei 60 % der Melanomzelllinien. Homozygote Genotypen wurden in vier (buf 1280, Mel1359, WM-1862 und WM-39) der 25 Zelllinien gefunden. Eine Ausnahme bildete die Zelllinie FM-81. Bei ihr trat neben der Mutation *BRAF* (c.1799 T>A) eine weitere Mutation (c.1800 G>A) im Codon 600 des *BRAF*-Gens auf (Abb. 8). Diese zusätzliche genetische Veränderung hat jedoch keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz, sodass die Zelllinie FM-81 trotz zweifacher Mutation im Codon 600 an dieser Stelle Glutaminsäure (E) kodiert. Die Aminosäuresequenz entspricht den einfach mutierten *BRAF* V600E (c.1799 T>A)-Zellen. Diese Variante wird auch als *BRAF* V600E<sup>2</sup> (c.1799\_1800 TG>AA) bezeichnet. Frühere Publikationen zeigten, dass die zweifache Nukleotidsubstitution (c.1799\_1800 TG>AA) bei circa 3 % der Melanome auftritt (Boursault et al., 2013). Auffällig erscheinen die unterschiedlich stark ausgeprägten Amplituden in den Sequenzierung der heterozygoten Zelllinien. Zudem fallen Unterschiede in den Bandenintensitäten der allelspezifischen PCR auf.



**Abb. 8: Mutationsanalyse zu *BRAF* V600E (c.1799T>A) in der Melanomzelllinie FM-81.** (A) Darstellung der auf Agarosegel aufgetragenen PCR-Produkte der allelspezifischen PCR. (B) Abbildung des Chromatogrammausschnitts der Zelllinie FM-81 mit Nachweis einer zusätzlichen Mutation (*BRAF* V600E<sup>2</sup> (c.1799\_1800 TG>AA)). Dargestellt ist jeweils eins von drei unabhängigen Experimenten.

### 3.1.2 *NRAS*-Mutationen c.181C>A und c.182A>T (Q61K und Q61L)

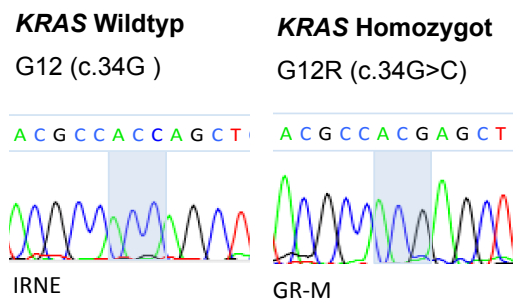
Im Gen *NRAS* befinden sich die meisten onkogenen Mutationen in den Codons 12, 13 und 61 (COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer, August 2014; Fernandez-Medarde und Santos, 2011; Prior et al., 2012). Für die Generierung der Ergebnisse zu *NRAS* wurden ausschließlich Schmelzpunktanalysen (siehe Anhang 7.2) sowie ausgewählte Sequenzierungen dieser Codons sowie der flankierenden Sequenzabschnitte mittels spezifischer Primer durchgeführt. Es wurden bei vier Zelllinien Mutationen im Codon 61 des *NRAS*-Gens gefunden, wobei eine heterozygot und drei homozygot waren (Abb. 9). Weitere genetische Veränderungen konnten weder in Codon G12 noch in Codon G13 festgestellt werden.



**Abb. 9: Repräsentative Darstellung der Mutationsanalysen zu NRAS im Codon 61 von Melanomzelllinien.** Es erfolgte die Sequenzierung des Genbereichs, welcher für das Codon 61 kodiert, auf RNA-Ebene mittels spezifischer Primer. Es wurden *Reverse-Primer* zur Sequenzierung verwendet. Darstellung des jeweiligen Chromatogrammschnitts mit mutationspezifischer Veränderung. **(A)** Für NRAS Q61 (c.181C) wildtypisch stellt sich die Zelllinie IRNE dar, **(B)** heterozygot für NRAS Q61K (c.181C>A) zeigen sich die Zelllinien FM-6 und buf 1102, homozygot für NRAS Q61K (c.181C>A) ist die Zelllinie FM-28. **(C)** Allein die Zelllinie FM-79 besitzt die homozygote Mutation Q61L (c.182A>T) in NRAS. Durchführung eines unabhängigen Experimentdurchlaufs.

### 3.1.3 KRAS-Mutationen c.34G>C (G12R)

Analog zum Vorgehen bei NRAS wurden für die Untersuchungen des KRAS-Gens ausschließlich Schmelzkurvenanalysen der Codons 12 und 13 (siehe Anhang 7.2) sowie ausgewählte Sequenzierungen des Genlocus sowie der flankierenden Sequenzabschnitte durchgeführt. Publierte Studien zeigten, dass nahezu 99 % der gefundenen Mutationen im KRAS-Gen in diesen zwei Hotspots liegen (COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer, August 2014; Fernandez-Medarde und Santos, 2011; Prior et al., 2012). In den untersuchten Proben wurde eine homozygote KRAS-Mutation im Codon 12 in der Zelllinie GR-M festgestellt (Abb. 10). Im weiteren untersuchten Codon 13 des KRAS-Gens konnten keine genomischen Veränderungen nachgewiesen werden.



**Abb. 10: Repräsentative Darstellung der Mutationsanalysen zu KRAS im Codon 12.** Sequenzierung des Genbereichs auf RNA-Ebene mittels spezifischem Primer, welcher für das Codon 12 kodiert. Es wurde ein *Reverse-Primer* zur Sequenzierung verwendet. Darstellung des jeweiligen Chromatogrammschnitts mit mutationsspezifischer Veränderung. Im Vergleich wird die für KRAS G12 (c.34G) wildtypische Zelllinie IRNE gezeigt und die für KRAS G12R (c.34G>C) homozygote Zelllinie GR-M. Durchführung eines unabhängigen Experimentdurchlaufs.

### 3.1.4 Zusammenfassung der Mutationsanalysen

Frühere Publikationen belegen, dass circa 80 % der aus malignen Melanomen gewonnenen Zelllinien Mutationen im Codon 600 des *BRAF*-Gens aufweisen (Hocker und Tsao, 2007). In Übereinstimmung mit diesen Angaben zeigte sich bei 19 der 25 untersuchten Melanomzelllinien (76 %) eine *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutation. Des Weiteren wurde in 4 von 25 der Melanomzelllinien (16 %) eine *NRAS* Mutation gefunden. Dieses Ergebnis bestätigt bereits aus früheren Publikationen ermittelte Mutationsraten von *NRAS* im Melanom (Colombino et al., 2012; COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer, August 2014; Ellerhorst et al., 2011; Fernandez-Medarde und Santos, 2011). Weiterhin konnte eine *KRAS*-Mutation (4 %) identifiziert werden. Entsprechende publizierte Ergebnisse belegen, dass ein gleichzeitiges Auftreten von Mutationen in *BRAF* und *NRAS* sehr selten vorkommt (Curtin et al., 2005; Goel et al., 2006). Nur die Analysen der Zelllinie buf 1102 zeigten das gleichzeitige Vorliegen einer *BRAF*-Mutation V600E (c.1799T>A) sowie einer *NRAS*-Mutation Q61K (c.181C>A). Zusammenfassend betrachtet wiesen ausschließlich zwei Zelllinien (buf 624 und FM-3) keine Mutationen in den untersuchten Genabschnitten von *BRAF*, *NRAS* und *KRAS* auf. In Tabelle 8 ist die Verteilung der Mutationen innerhalb der 25 Zelllinien als Übersicht dargestellt.

Gene	Substitution	FM-3	FM-6	FM-28	FM-79	GR-M	buf 624	buf 501	buf 526	buf 1102	buf 1182	buf 1286	buf 1383	buf 1402	Colo-794	Colo-857	FM-81	FM-82	IRNE	MZ-Mel3	WM-1552c	UKRV-Mel14a	buf 1280	Mel1359	WM-1862	WM-39
<i>BRAF</i>	V600E (c.1799T>A)																*									
<i>NRAS</i>	Codon 12																									
	Codon 13																									
	Q61K (c.181C>A)																									
	Q61L (c.182A>T)																									
<i>KRAS</i>	G12R (c.34 G>C)																									
	Codon 13																									

**Tab. 8: Zusammenfassung der in 25 Melanomzelllinien identifizierten Genotypen der untersuchten Genabschnitte von *BRAF*, *NRAS* und *KRAS*.** Zusammengefasst wurden die Ergebnisse der *BRAF*-, *NRAS*- und *KRAS*-Mutationsanalysen. Das gleichzeitige Vorliegen einer *BRAF* V600E (c.1799T>A)-sowie einer *NRAS* Q61K (c.181C>A)-Mutation wurde nur bei einer Zelllinie (buf 1102) detektiert. Durchführung eines unabhängigen Experimentdurchlaufs. \*FM-81 mit V600E<sup>2</sup>-Mutation.

homozygot  
heterozygot  
Wildtyp



## 3.2 Expressionsanalysen der Melanomzelllinien

Die *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutation gewann vor allem in Hinblick auf ihre klinische Relevanz in der Behandlung von metastasierten Melanomen in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung. Demzufolge konzentrieren sich die nachfolgenden Abschnitte vor allem auf *BRAF* sowie seine Zieltranskripte im MAP-Kinase-Signalweg (Chapman et al., 2011; McArthur et al., 2014).

Für die Expressionsuntersuchungen wurde die mRNA- und Proteinexpression verschiedener Zieltranskripte mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) und Western Blots analysiert. Um die Auswertung sowie die Vergleichbarkeit der einzelnen Daten zu erleichtern, wurde eine farblich abgestimmte Kategorisierung der Werte eingeführt. Hierzu dienten die Schwellenwerte der qRT-PCR sowie die Quotienten aus der Differenz des Maximal- und Minimalwertes der AIDA-Auswertung des Western Blots und der eingeteilten neun Kategorien (Abb. 11).

Schwellenwert (qRT-PCR)	< 12	12-14	14-16	16-18	18-20	20-22	22-24	24-26	> 26
	9	8	7	6	5	4	3	2	1

Protein	viel			mittel			wenig		
		9	8	7	6	5	4	3	2

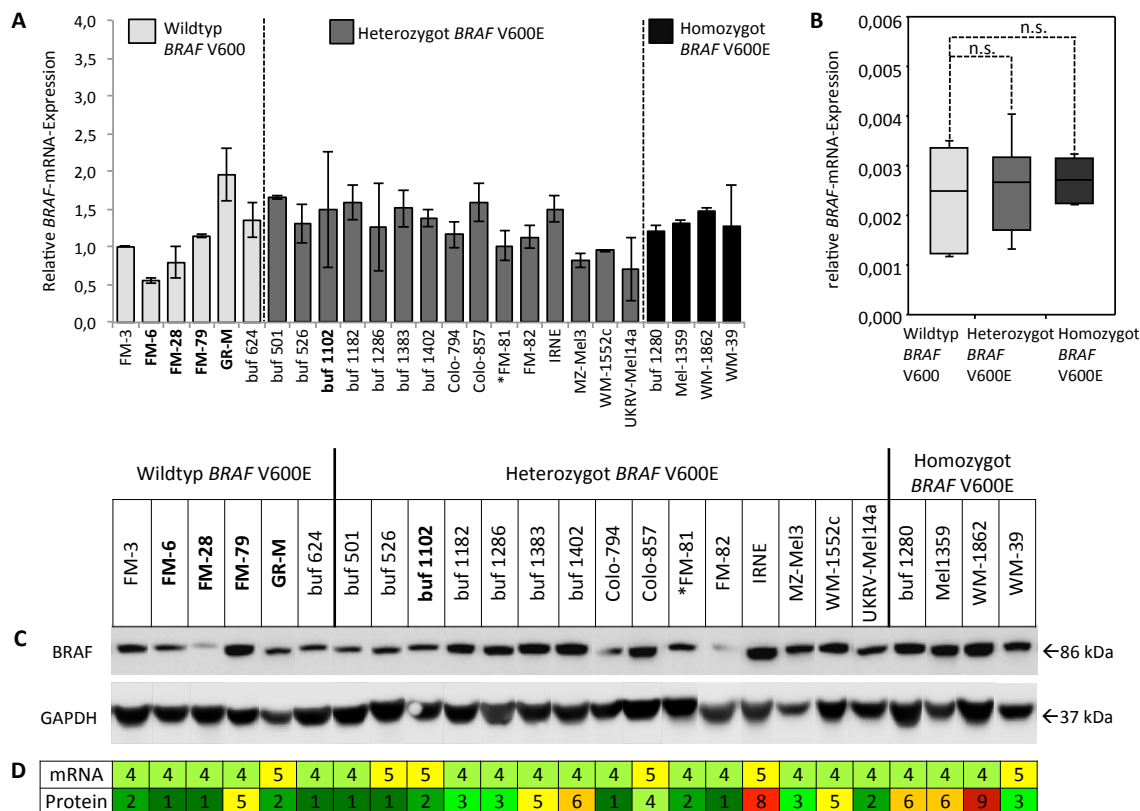
Quotient =  $\frac{\text{Wert}_{\max} - \text{Wert}_{\min}}{9}$

**Abb. 11: Farbliche Kategorisierung der quantitativen Daten zu mRNA- und Proteinexpression (Ampelbewertung).** Es wurde eine farblichen Kodierung der Ergebnisse auf Grundlage der Schwellenwerte der qRT-PCR für die mRNA-Daten sowie der AIDA-Ergebnisse (siehe 2.4.4) für die Proteinexpression erstellt. Die entstehenden neun Kategorien wurden zur einfacheren optischen Unterscheidung farblich unterlegt.

### 3.2.1 Expressionsdaten zu BRAF

Um den Einfluss der *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutation auf die Signalkaskaden der Melanomzellen zu untersuchen und so das Verständnis über die Kanzerogenese des Melanom zu erweitern, wurden verschiedene Expressionsdaten des Onkogens *BRAF* erhoben. Hierzu wurden die mRNA- und Proteinmengen mittels quantitativer RT-PCR und Western Blot analysiert. Die bezüglich *BRAF* V600 (c.1799T) wildtypische Melanomzelllinie FM-3 diente bei den Analysen als Referenz- bzw. Normalisierungslinie.

In Abb. 12 sind die Expressionsdaten zu *BRAF* aller 25 Melanomzelllinien dargestellt.



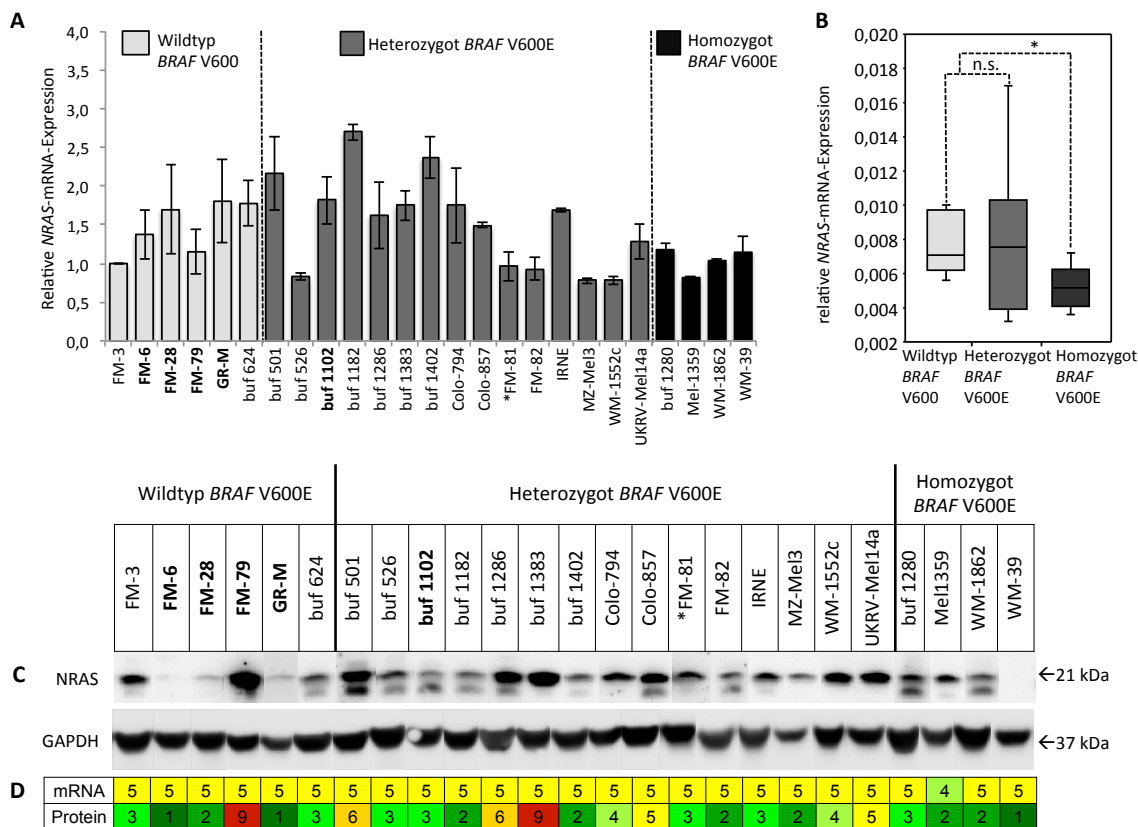
**Abb. 12: Heterogene Expression von *BRAF*-mRNA bzw. -Protein in Melanomzelllinien sowie entsprechende Farbkodierungen (Ampelbewertung) der mRNA- und Proteinexpressionsdaten.** (A) Die *BRAF*-mRNA wurde mittels qRT-PCR analysiert und ist relativ zu Beta-Actin (ACTB) sowie der Zelllinie FM-3 dargestellt. Standardabweichung bezeichnet die Streuung zwischen zwei unabhängigen Experimenten. (B) Die zu ACTB relative mRNA-Expression von *BRAF* in Abhängigkeit vom *BRAF* V600 (c.1799T>A)-Mutationsstatus ist als Boxplot zusammengefasst. Statistische Signifikanz wurde durch den Student's T-Test berechnet: nicht signifikant (n.s.). (C) Proteinabundanz von *BRAF* in 25 Melanomzelllinien mittels Western Blot-Analysen. Als Ladungskontrolle diente Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Dargestellt ist jeweils eines von zwei unabhängigen Experimenten. (D) Zur optischen Erfassung der Ergebnisse wurde eine auf quantitativen Aspekten beruhende Farbkodierung eingeführt. Ampelbewertung: grün: minimal, gelb: mittel, rot: maximal (siehe Abb. 11). **fett gedruckt:** *NRAS*-mutierte Zelllinien; \* *BRAF* V600E<sup>2</sup>-mutierte Zelllinie.

Die mRNA-Expression von *BRAF* wurde in Abb. 12 A relativ zur Zelllinie FM-3 dargestellt. Dabei stellen sich die weiteren *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen um einen Wert von 1 dar. GR-M bildet mit einer relativen mRNA-Expression von 1,95 hierbei eine Ausnahme, die jedoch eine große Standardabweichung aufweist. Im Mittel sind zwar deutliche Abweichungen erkennbar, jedoch keine signifikanten quantitativen Expressionsunterschiede zwischen den *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen, den *BRAF* V600E (c.1799T>A)-heterozygoten sowie den *BRAF* V600E (c.1799T>A)-homozygoten Zellen zu erkennen (Abb. 12 B). Des Weiteren wird deutlich, dass in allen Zelllinien *BRAF* als Protein exprimiert wird. Diese Expressionsverteilung innerhalb der 25 Zelllinien ist, wie auch die mRNA-Expression von *BRAF*, heterogen. Gleichmaßen lassen sich keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen den *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutationsstatus und der Proteinexpression von *BRAF* finden. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Proteinabundanz nicht äquivalent zur relativen mRNA-Expression von *BRAF* ist. So weist beispielsweise die Zelllinie buf 501 eine

große Menge an *BRAF*-mRNA auf, enthält vergleichsweise jedoch nur geringe Mengen an BRAF-Protein. Die Zelllinie WM-1862 besitzt verhältnismäßig ähnliche Mengen mRNA. Die BRAF-Proteinexpression liegt hier jedoch deutlich über der von buf 501. Somit wird gezeigt, dass die Proteinexpression von BRAF nicht von der mRNA-Expression abhängig ist. Gründe hierfür können weitere Regulationsmechanismen wie posttranskriptionelle Veränderungen sein.

### **3.2.2. Expressionsanalysen zum MAP-Kinase-Signalweg**

Die Kinase BRAF spielt eine entscheidende Rolle im MAP-Kinase-Signalweg. Sie wird ihrerseits durch die vorgeschaltete Kinase NRAS phosphoryliert und somit aktiviert. NRAS hat auf diese Weise einen wichtigen Stellenwert zu Beginn des MAP-Kinase-Signalwegs (Alberts et al., 2005; Weber, 2007). Diese Tatsache gab den Anlass, Expressionsanalysen von NRAS auf mRNA- und Proteinebene durchzuführen, um mögliche Einflüsse von NRAS auf den MAP-Kinase-Signalweg aufzuzeigen. Die Vorgehensweise hierbei ist analog zu den Expressionsanalysen von BRAF (siehe 3.2.1). Zur Ermittlung der mRNA- und Proteindaten wurden qRT-PCR sowie Western Blot-Analysen durchgeführt. In Abb. 13 sind die Daten der mRNA- und Proteinmengen von NRAS innerhalb der 25 Melanomzelllinien abgebildet.

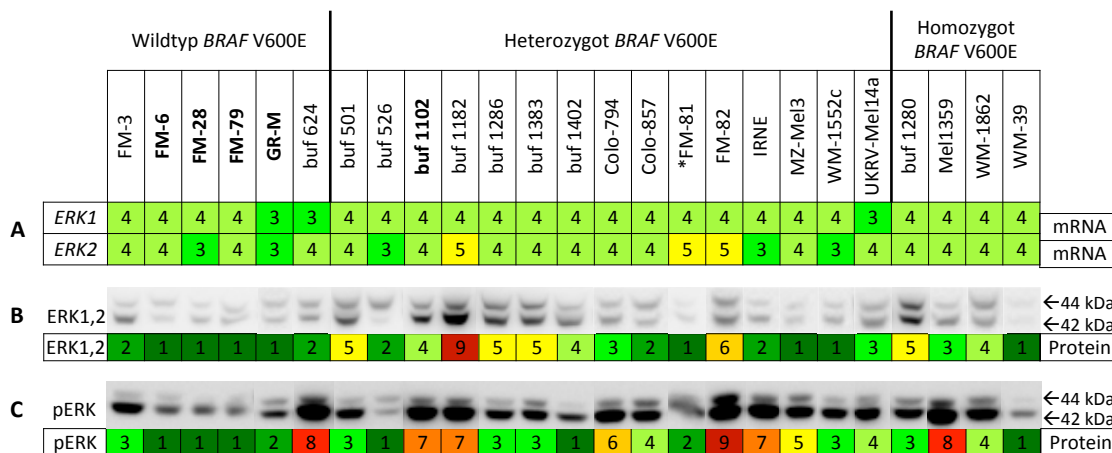


**Abb. 13: Heterogene Expression von NRAS-mRNA bzw. -Protein in Melanomzelllinien sowie entsprechende Farbkodierungen (Ampelbewertung) der mRNA- und Proteinexpressionsdaten.** (A) Die NRAS-mRNA wurde mittels qRT-PCR untersucht und ist relativ zu ACTB sowie der Zelllinie FM-3 dargestellt. Standardabweichung bezeichnet die Streubreite zwischen zwei unabhängigen Experimenten. (B) Die zu ACTB relative mRNA-Expression von NRAS in Abhängigkeit vom BRAF V600E (c.1799T>A)-Mutationsstatus ist als Boxplot zusammengefasst. Statistische Signifikanz wurde durch den Student's T-Test berechnet: \*p<0,05; nicht signifikant (n.s.). (C) Die Proteinexpression von NRAS wurde mittels Western Blot analysiert. Als Ladungskontrolle diente GAPDH. Dargestellt ist jeweils eins von zwei unabhängigen Experimenten. (D) Zur optischen Erfassung der Ergebnisse wurde eine auf quantitativen Aspekten beruhende Farbkategorisierung (Ampelbewertung) eingeführt und die entsprechende farbliche Kodierung mRNA- und Proteinexpression vorgenommen - grün: minimal, gelb: mittel, rot: maximal (siehe Abb. 11). **fett gedruckt:** NRAS-mutierte Zelllinien; \* BRAF V600E<sup>2</sup>-mutierte Zelllinie.

Die Darstellung der NRAS-mRNA-Daten erfolgt relativ zur Zelllinie FM-3. Aus Abb. 13 ist erkennbar, dass die mRNA-Mengen der restlichen BRAF V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen über dem Niveau von FM-3 liegen. Es wird jedoch deutlich, dass vor allem bei den BRAF V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen große statistische Schwankungen vorliegen. Ursächlich hierfür könnte die geringe Zahl an durchgeführten Messungen sein. Im Mittel zeigt sich gleichwohl kein signifikanter Unterschied zwischen der NRAS-mRNA-Expression der BRAF V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen und den BRAF V600E (c.1799T>A)-heterozygoten Zellen (Abb. 13 B). Abweichungen weisen die Zellen buf 526, MZ-Mel3 sowie WM-1552c mit sehr geringen Mengen an mRNA auf. Die Zelllinien buf 1182 und buf 1402 weichen mit hohen NRAS mRNA-Mengen ebenfalls vom Mittel ab. Ein signifikanter Expressionsunterschied zeigt sich bei der Betrachtung der BRAF V600E (c.1799T>A)-homozygoten Zellen. Das NRAS-mRNA-Expressionsniveau dieser Zellen liegt unter dem der

*BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen. Die mRNA-Expression von *NRAS* spiegelt sich nicht in den verschieden stark ausgeprägten *NRAS*-Proteinniveaus der 25 Melanomzelllinien wider. Vergleichbar mit den Expressionsdaten von *BRAF* können die Unterschiede in der Proteinexpression von *NRAS* nicht mit dem Expressionsniveau der mRNA erklärt werden. Außerdem lässt sich kein Zusammenhang zwischen Proteinexpression und *BRAF*- bzw. *NRAS*-Mutationsstatus erkennen. Es müssen folglich weitere Mechanismen auf vorgeschalteten Ebenen bestehen, die als Regulatoren dienen.

Im MAP-Kinase-Signalweg werden von der Kinase *BRAF* weitere Kinasen durch Phosphorylierung aktiviert. Eine dieser Kinasen ist die *extracellular-signal regulated kinase* (kurz ERK), von der mehrere Isoformen bekannt sind. Die bedeutendsten Isoformen im MAP-Kinase-Signalweg sind ERK1 und ERK2, die nach ihrer Aktivierung Transkriptionsfaktoren aktivieren, welche wiederum die Expression von proliferationsfördernden Faktoren induzieren (McCubrey et al., 2007; Mebratu und Tesfaigzi, 2009). ERK1 und ERK2 sind somit entscheidende Endglieder im MAP-Kinase-Signalweg, die in die Analysen zu den 25 Melanomzelllinien miteingeschlossen wurden. Die Ermittlung der Daten erfolgte entsprechend der Analysen zu *BRAF* und *NRAS* (siehe 3.2.1 und 3.2.2). In Abb. 14 sind die farbkodierten mRNA-Expressionsdaten von *ERK1* und *ERK2* sowie die Proteinexpressionen der ERK-Kinasen im nicht-phosphorylierten (ERK) und phosphorylierten (pERK) Zustand dargestellt.



**Abb. 14: Expression von ERK1 und ERK2 in 25 Melanomzelllinien.** (A) Farbkodierung der mRNA-Expression von *ERK1* und *ERK2*. Die mRNA wurde mit Hilfe von qRT-PCR analysiert. Die Darstellung der Daten erfolgt nach Einteilung in neun Farbkategorien anhand der Schwellenwerte der qRT-PCR (siehe Abb. 11). (B) Die Proteinabundanz von ERK1 (44kDa) und ERK2 (42 kDa) mit entsprechender Farbkodierungen (siehe Abb. 11) wurde mit Hilfe von Western Blots ermittelt. Als Ladungskontrolle diente GAPDH. (C) Der Aktivierungsgrad wurde anhand des phosphorylierten ERK1,2 (pErk) durch Western Blot-Analysen ermittelt und ebenfalls farbkodiert. Dargestellt ist jeweils eins von zwei unabhängigen Experimenten. Ampelbewertung - grün: minimal, gelb: mittel, rot: maximal. **fett gedruckt**: *NRAS*-mutierte Zelllinien; \* *BRAF* V600E<sup>2</sup>-mutierte Zelllinie

Analog zu den vorangegangenen Analysen von *NRAS* und *BRAF*, zeigt sich in Abb. 14 eine homogene mRNA-Expression von *ERK1* und *ERK2* innerhalb der 25 Melanomzelllinien, die nicht mit dem Niveau der Proteinexpression im Verhältnis steht. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Proteine

ERK1,2 tendenziell vermehrt in den *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zellen exprimiert werden. Es wird ebenfalls ersichtlich, dass verstärkt in *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zellen ERK1,2 durch Phosphorylierung aktiviert wird. Ausnahme bildet hier die Zelllinie buf 624, bei der als einzige *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypische Zelllinie stark phosphoryliertes ERK1,2 nachgewiesen werden konnte. Aus publizierten Daten ist bekannt, dass *BRAF* V600E (c.1799T>A) eine im Vergleich zum Wildtyp mehrfach erhöhte Kinaseaktivität besitzt (Davies et al., 2002; Kwong und Davies, 2013; Pratilas et al., 2009; Wan et al., 2004). Diese Tatsache könnte der Grund für die verstärkte Phosphorylierung der im MAP-Kinase-Weg *downstream* gelegenen Kinasen ERK1,2 sein. Der MAP-Kinase-Signalweg wird durch diverse Wachstumsfaktoren stimuliert, die ihrerseits an Tyrosinkinase-Rezeptoren der Zelloberfläche binden. Zu diesen membranständigen Rezeptoren zählen die Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) der ErbB-Familie 1 bis 4 sowie cKIT und cMET (zusammengefasst in Katz et al., 2007). Um mögliche quantitative Unterschiede in der MAP-Kinase-Signalweg-Aktivierung zu erkennen, wurde hierzu die quantitative mRNA-Expression der verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen mittels qRT-PCR festgestellt. Die Ergebnisse wurden anschließend, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, kategorisiert und farbkodiert (Abb. 15).

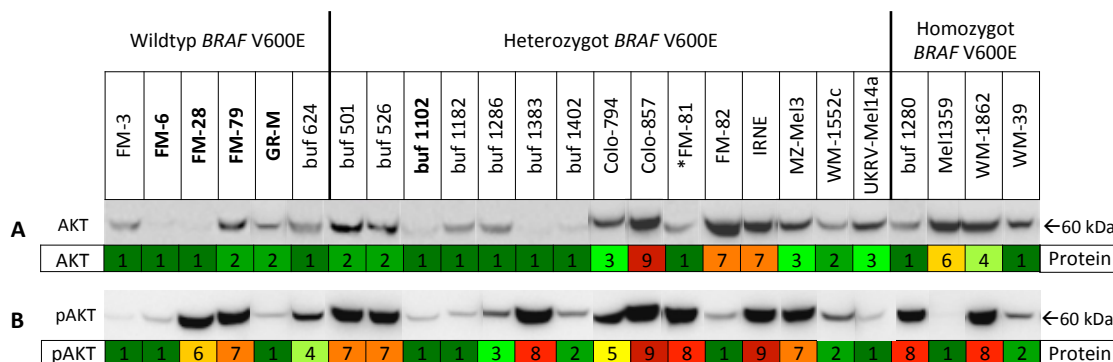
	Wildtyp <i>BRAF</i> V600E					Heterozygot <i>BRAF</i> V600E													Homozygot <i>BRAF</i> V600E							
	FM-3	FM-6	FM-28	FM-79	GR-M	buf 624	buf 501	buf 526	buf 1102	buf 1182	buf 1286	buf 1383	buf 1402	Colo-794	Colo-857	*FM-81	FM-82	IRNE	MZ-Mel3	WM-1552c	UKRV-Mel14a	buf 1280		Mel1359	WM-1862	WM-39
<i>ErbB1</i>	1	5	3	1	5	1	1	2	2	1	1	2	1	2	1	2	3	1	3	5	5	1	3	1	1	mRNA
<i>ErbB2</i>	4	3	6	4	3	3	4	4	4	3	4	3	3	4	4	4	4	4	5	3	4	4	4	4	4	mRNA
<i>ErbB3</i>	5	3	5	5	1	4	1	6	5	5	5	3	1	4	5	5	4	6	5	1	1	5	5	5	5	mRNA
<i>ErbB4</i>	1	1	2	1	1	2	1	3	1	1	2	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	mRNA
<i>cKIT</i>	1	1	2	1	1	3	5	1	5	1	5	7	6	4	3	3	2	2	1	3	2	2	1	5	6	mRNA
<i>cMET</i>	5	5	4	5	6	6	6	6	5	4	4	6	7	5	6	3	5	4	4	5	5	6	6	6	4	mRNA

**Abb. 15: Korrelation der mRNA-Expression von MAP-Kinase-Signalweg aktivierenden Rezeptortyrosinkinasen.** Ermitteln der mRNA-Daten mittels qRT-PCR und anschließender Kategorisierung (Ampelbewertung) anhand der Schwellenwerte (siehe Abb. 11). Dargestellt ist jeweils der farblich kategorisierte Mittelwert von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Ampelbewertung - grün: minimal, gelb: mittel, rot: maximal. **fett gedruckt:** *NRAS*-mutierte Zelllinien; \* *BRAF* V600E<sup>2</sup>-mutierte Zelllinie

Die mRNA-Expression von *ErbB4* liegt innerhalb der 25 Melanomzelllinien homogen auf einem sehr geringen Niveau. Analog zur mRNA-Expression von *ErbB4* zeigt sich ein homogenes Expressionsmuster bei *ErbB2*. Auffällig ist, dass in den Zelllinien, die eine verstärkte mRNA-Expression von *ErbB1* aufweisen, deutlich geringere Mengen mRNA von *ErbB3* zu finden sind und umgekehrt. Es zeigen sich bei den mRNA-Mengen der Rezeptortyrosinkinasen cKIT und cMET keine Abhängigkeiten vom *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutationsstatus der Zelllinien. Insgesamt lässt sich also kein Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression der Rezeptortyrosinkinasen und dem Mutationsstatus der Zelllinien erkennen.

### 3.2.3 Expressionsanalysen zum PI3K-AKT-Signalweg

Der PI3K-AKT-Signalweg ist ebenfalls wichtig, da er entscheidenden Einfluss auf Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben hat und eng mit dem MAP-Kinase-Signalweg verknüpft ist. Seine Zieltranskripte interagieren ihrerseits wieder mit den Zieltranskripten des MAP-Kinase-Signalwegs und bilden so ein verknüpfendes Netzwerk innerhalb der Zelle. Entscheidender Punkt ist, dass die Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs unter anderem auch durch RAS erfolgen kann (Mendoza et al., 2011). Weiterhin haben publizierte Daten gezeigt, dass insbesondere die enge Verknüpfung der beiden Signalwege zum Tumorprogress des Melanoms beiträgt (Cheung et al., 2008). Auf Grundlage dessen wurden in dieser Arbeit in Ergänzung der Expressionsdaten des MAP-Kinase-Signalwegs weitere Untersuchungen bezüglich des Aktivierungsgrades des PI3K-AKT-Signalwegs durchgeführt. Hierzu wurde die Proteinabundanz von AKT mittels Western Blot analysiert und anschließend diese mit der Proteinexpression des phosphorylierten AKTs (aktivierter Zustand) verglichen. In Abb. 16 sind diese Daten sowie die entsprechenden farblich kodierten Kategorisierungswerte dargestellt.



**Abb. 16: Proteinexpression von AKT und phosphoryliertem AKT (pAKT).** Western Blot-Analysen zu AKT (A) und pAKT (B) sowie die entsprechenden Farbkodierungen (Ampelbewertung) der ermittelten Werte in neun Kategorien (siehe Abb. 11). Der Aktivierungsgrad von AKT wurde anhand des phosphorylierten AKTs ermittelt. Dargestellt ist jeweils eins von zwei unabhängigen Experimenten. Ampelbewertung - grün: minimal, gelb: mittel, rot: maximal. **fett gedruckt:** *NRAS*-mutierte Zelllinien; \* *V600E*<sup>2</sup>-mutierte Zelllinie

Anhand der Daten des Western Blots von AKT und pAKT zeigt sich, dass der Aktivierungsgrad unabhängig von der vorhandenen Menge von AKT ist. So weisen beispielsweise die Zelllinien FM-28 und buf 1383 trotz geringer Proteinabundanz von AKT eine hohe Akkumulation an phosphoryliertem AKT auf. Andererseits zeigen einige Zelllinien (z. B. FM-82 und Mel1359) trotz hoher Proteinexpression nur geringe Mengen des phosphorylierten Zustands von AKT. Letztendlich lässt sich der Aktivierungszustand von AKT weder in einen Zusammenhang mit dem *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutationsstatus der Zelllinien bringen noch auf die Proteinexpression von AKT zurückführen.

### 3.3 Zellbiologische Charakterisierung der Melanomzelllinien

Der MAP-Kinase-Signalweg hat entscheidenden Einfluss auf das Proliferations- und Wachstumsverhalten von Zellen (McCubrey et al., 2007; Nandan und Yang, 2011). Weiterhin ist bekannt, dass die Kinaseaktivität des mutierten V600E (c.1799T>A) BRAF im Vergleich zur wildtypischen BRAF V600 (c.1799T)-Kinase um ein Vielfaches erhöht ist (Davies et al., 2002; Kong et al., 2010; Pratilas et al., 2009; Wan et al., 2004). Hieraus ergab sich die Annahme, dass ein durch die Mutation V600E (c.1799T>A) vermehrt aktives BRAF zu einer Steigerung von zellbiologischen Aktivitäten führen kann. Diese Vermutung wurde mit Hilfe von Wachstumsraten, Soft-Agar-Kolonietests sowie Zellvitalitätsassays untersucht.

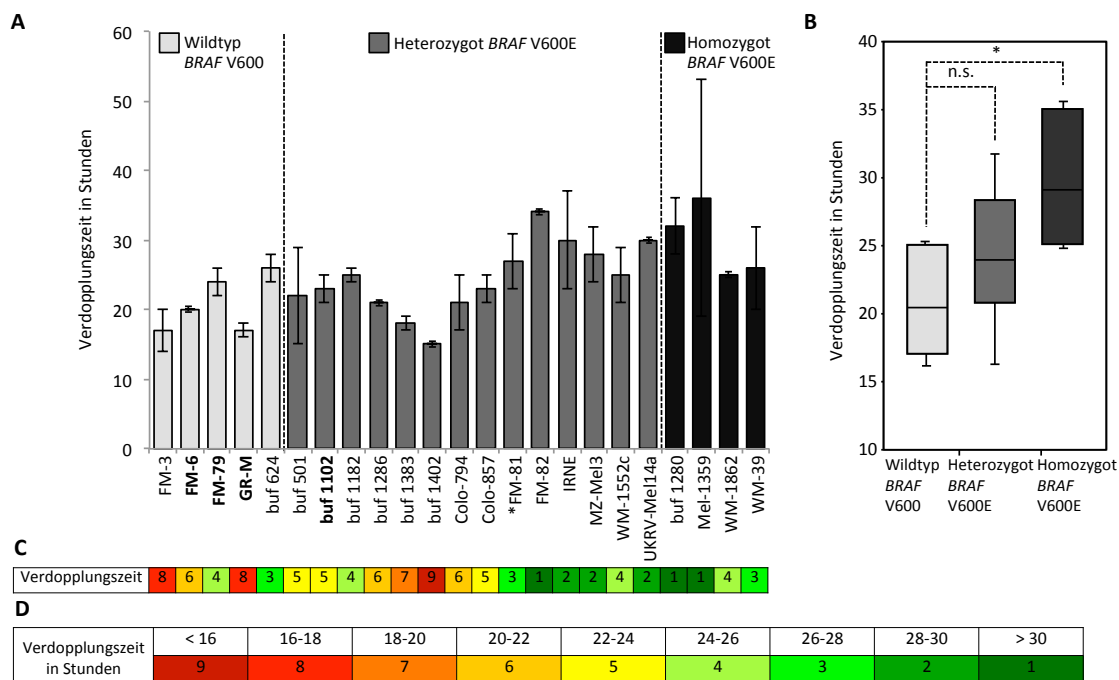
Der Fokus der nachfolgenden Analysen liegt weiterhin auf dem Mutationsstatus von *BRAF* V600E (c.1799T>A), da *RAS*-Mutationen innerhalb der Stichprobe so gering ausgefallen sind, dass eine valide Aussage hierzu kaum möglich ist. Die Analysen zu den zellbiologischen Charakteristika wurden mit 23 der 25 Melanomzelllinien durchgeführt.

#### 3.3.1 Bestimmung der Wachstumsrate

Um den Einfluss des Mutationsstatus von *BRAF* V600E (c.1799T>A) auf das Proliferationsverhalten der Melanomzellen zu überprüfen, wurden Wachstumskurven angefertigt. Das Wachstum der Melanomzelllinien wurde nach Einsäen von  $2 \times 10^5$  Zellen in eine 6-Well-Platte und Bestimmung der Zellzahl nach 24, 48, 72 bzw. 96 h ermittelt. Wachstumskurven wurden aufgestellt und die Verdopplungszeit (Zeit für die Verdopplung der Zellzahl) anschließend mit Hilfe der Formel aus Abschnitt 2.2.5 errechnet.

Im Mittel verdoppelten sich die *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen aller 20,8 h, die heterozygoten *BRAF* V600E (c.1799T>A) Zellen alle 24,4 h und die *BRAF* V600E (c.1799T>A)-homozygoten Zellen alle 29,8 h. Wie Abb. 17 zeigt, besitzen die *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zellen eine höhere Verdopplungszeit. Dieser Unterschied ist zwischen den *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen und den *BRAF* V600E (c.1799T>A)-homozygoten Zellen als signifikant zu bezeichnen (Abb. 17 B). Ergänzend zu der Farbkodierung der ermittelten Expressionsdaten wurden die Werte entsprechend der Verdopplungsdauer in neun Kategorien eingeteilt und farblich unterlegt (Abb. 17 C und D).





**Abb. 17: Bestimmung der Verdopplungszeiten der 23 Melanomzelllinien.** (A) Nach Einsäen von  $2 \times 10^5$  Zellen wurde je nach 24, 48, 72 und 96 h die Zellzahl bestimmt und daraus die Verdopplungszeit errechnet. (B) Die Wachstumsrate in Abhängigkeit vom BRAF V600E (c.1799T>A)-Mutationsstatus ist als Boxplot zusammengefasst. Statistische Signifikanz wurde durch den Student's T-Test berechnet: \* $p < 0,05$ ; nicht signifikant (n.s.). (C) Farbliche Kategorisierung (Ampelbewertung) der Werte anhand der (D) Verdopplungszeiten, die zuvor in neun festgelegte Rubriken eingeteilt wurden. Standardabweichungen bezeichnen die Streubreite zwischen drei unabhängigen Experimenten. Ampelbewertung - grün: minimal, gelb: mittel, rot: maximal. **fett gedruckt:** NRAS-mutierte Zelllinien; \* BRAF V600E<sup>2</sup>-mutierte Zelllinie.

### 3.3.2 Soft-Agar-Koloniebildung

Im Soft-Agar-Kolonietest wird das adhäsionsunabhängige Wachstum der Melanomzellen in einer dreidimensionalen Matrix überprüft. Hierzu wurden die Zellen in einem 0,3 %-igen polymeren Agar vereinzelt, nach einer Inkubationszeit von drei Wochen mit Iodnitrotetrazoliumchlorid angefärbt und die Kolonien ausgezählt. Dabei gibt die Zahl der Kolonien an, wie viele der eingesäten Zellen in der Matrix unabhängig vom Zell-Zell-Kontakt proliferieren konnten. In Abb. 18 sind die Koloniezahlen der 23 Melanomzelllinien und beispielhaft drei repräsentative Aufnahmen von Kulturschalen mit wenig (WM 1862) Koloniebildung sowie verschiedener Koloniegröße (buf 1286 und FM-3) dargestellt.

A		Zelllinie	Anzahl der Kolonien
Wildtyp <i>BRAF</i> V600	FM-3	274 ± 35	
	<b>FM-6</b>	89 ± 43	
	<b>FM-79</b>	258 ± 22	
	<b>GR-M</b>	16 ± 7	
	buf 624	743 ± 495	
Heterozygot <i>BRAF</i> V600E	buf 501	197 ± 63	
	<b>buf 1102</b>	19 ± 7	
	buf 1182	53 ± 33	
	buf 1286	358 ± 117	
	buf 1383	942 ± 422	
	buf 1402	667 ± 348	
	Colo-794	63 ± 12	
	Colo-857	21 ± 12	
	*FM-81	10 ± 4	
	FM-82	6 ± 2	
	IRNE	218 ± 49	
	MZ-Mel3	4 ± 1	
	WM-1552	842 ± 374	
	UKRV-Mel14a	13 ± 9	
Homozygot <i>BRAF</i> V600E	buf 1280	16 ± 8	
	Mel-1359	16 ± 4	
	WM-1862	10 ± 5	
	WM-39	155 ± 121	



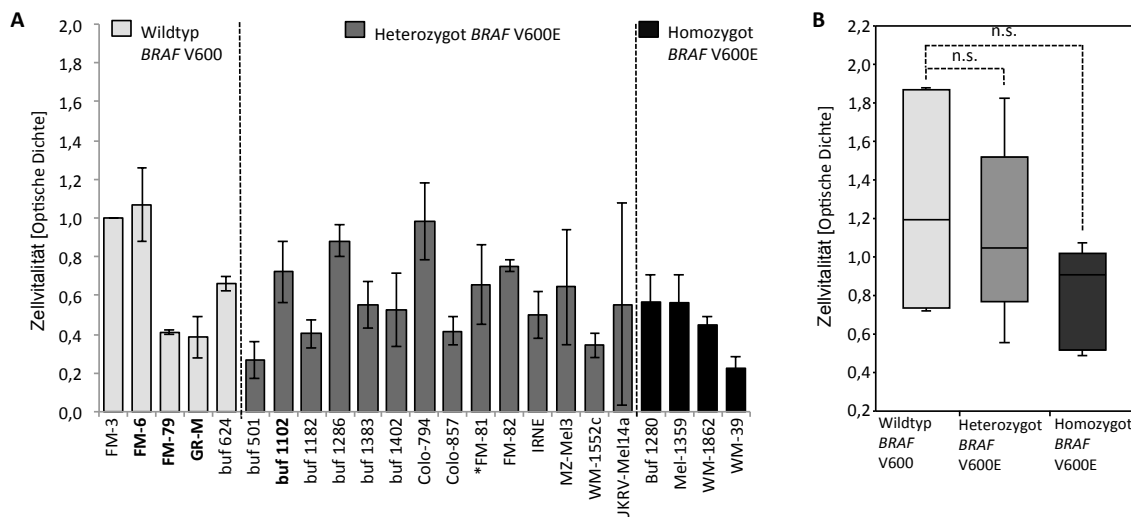
**Abb. 18: Soft-Agar-Kolonietest von 23 Melanomzelllinien. (A)** Einsäen von  $2 \times 10^5$  vereinzelter Zellen in eine polymere Agarmatrix, um das adhäsionsunabhängige Wachstum der Zellen zu bestimmen. Koloniezahlenbestimmung nach drei Wochen Inkubation. **(B)** Beispiele für verschiedene Kolonieausbildung - enorme Koloniegröße (buf 1286), geringe Koloniegröße (FM-3) sowie geringe Koloniezahl (WM-1862). Standardabweichungen bezeichnen die Streubreite zwischen vier unabhängigen Experimenten. **fett gedruckt:** *NRAS*-mutierte Zelllinien; \* *BRAF* V600E<sup>2</sup>-mutierte Zelllinie

In der hier vorliegenden Arbeit war die Anzahl der Kolonien im Soft-Agar-Koloniebildungstest sehr heterogen. Sie variierte zwischen 4 Kolonien pro Soft-Agar-Kolonietest für MZ-Mel3 und circa 950 Kolonien für buf 1383. Es ließ sich keine Abhängigkeit zwischen *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutationsstatus und Koloniezahl erkennen.

### 3.3.3 Bestimmung der Zellvitalität von Melanomzelllinien

Wie andere Studien belegten, führt die Mutation *BRAF* V600E (c.1799T>A) zu einer gesteigerten *BRAF*-Kinaseaktivität (siehe 3.3), die vermutlich zu einer Steigerung der zellbiologischen Aktivitäten führen kann. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde mittels XTT-Zellproliferations-Assay die metabolische Aktivität der Melanomzellen untersucht. Hierzu wurden zunächst je  $5 \times 10^4$  Zellen eingesät und nach 72 h Inkubationszeit mit dem Tetrazoliumsalz XTT behandelt. Die Auswertung erfolgte spektrophotometrisch. Die Darstellung der Daten erfolgte relativ zur Zelllinie FM-3.

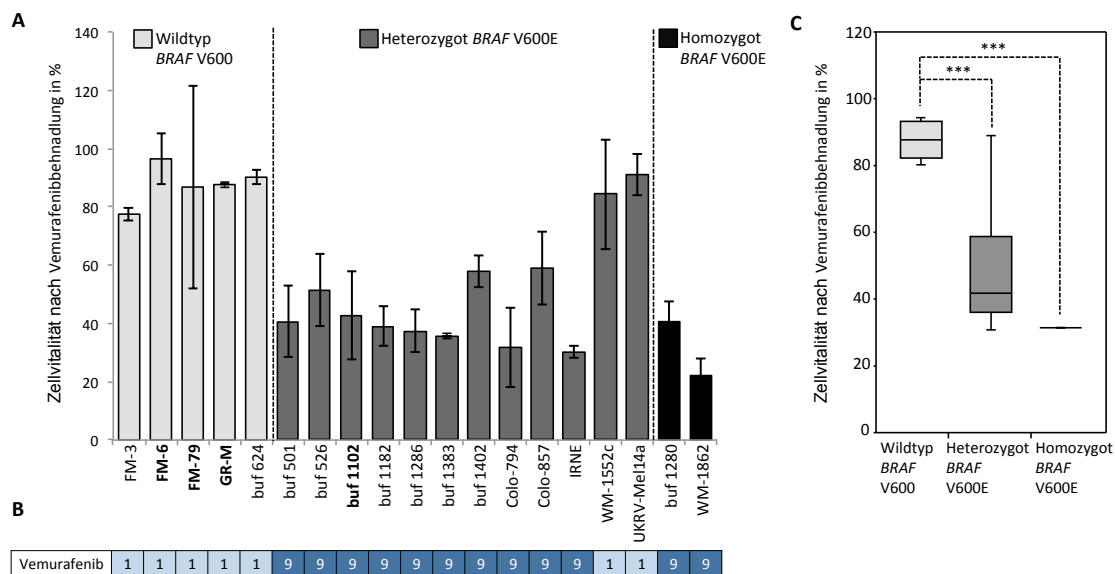
Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten zur Zellvitalität der Melanomzelllinien (Abb. 19 A) zeigten, dass sowohl die *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zelllinien FM-3 und FM-6 eine ähnlich hohe metabolische Aktivität besaßen wie die *BRAF* V600E (c.1799T>A)-heterozygoten Zelllinien buf 1286 und Colo-794. Jedoch zeigte sich eine hohe Variabilität in der Zellvitalität innerhalb der verschiedenen *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutationszustände. So wiesen die *BRAF* V600 (c.1799T) wildtypischen Zelllinien FM-79 und GR-M eine weniger als halb so große Zellvitalität wie die ebenso *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zelllinien FM-3 und FM-6 auf. Auffällig waren die Zelllinien buf 501, WM-1552c sowie WM-39, die eine im Vergleich zu den restlichen Zelllinien deutlich reduzierte Zellvitalität besaßen. Zusammengefasst ließ sich somit aus diesen Daten kein signifikantes mutationsspezifisches Verhalten der Zellen ableiten (Abb. 19 B).



**Abb. 19: Bestimmung der Zellvitalität von 23 Melanomzelllinien in Abhängigkeit vom *BRAF V600E* (c.1799T>A)-Mutationsstatus. (A)** Bestimmung der metabolischen Aktivität nach Einsäen von  $5 \times 10^4$  Zellen und nachfolgender Zugabe von XTT. Der Umsatz von XTT durch metabolisch aktive Zellen in ein rötliches Formazansalz wurde anschließend spektrophotometrisch anhand der optischen Dichte (OD) ermittelt. Die ermittelten Werte wurden relativ zur Zelllinie FM-3 dargestellt. Standardabweichungen bezeichnen die Streuung zwischen mindestens zwei unabhängigen Experimenten. **fett gedruckt:** *NRAS*-mutierte Zelllinien; \* *BRAF V600E*<sup>2</sup>-mutierte Zelllinie. **(B)** Die Zellvitalität in Abhängigkeit vom *BRAF V600E* (c.1799T>A)-Mutationsstatus ist als Boxplot zusammengefasst. Statistische Signifikanz wurde durch den Student's T-Test berechnet: nicht signifikant (n.s) Signifikanzniveau 5%.

### 3.3.4 Antiproliferativer Effekt von Vemurafenib auf Melanomzelllinien in Abhängigkeit vom *BRAF*-Status

Der im Jahr 2012 für die Melanomtherapie zugelassene *BRAF*-Inhibitor Vemurafenib zeigte in präklinischen Studien einen selektiven antiproliferativen Effekt auf Zellen mit einer *BRAF V600E* (c.1799T>A)-Mutation (Yang et al., 2010). Um diesen Sachverhalt in der hier untersuchten Population von 25 Melanomzelllinien zu überprüfen, wurde die Sensitivität der Zellen auf das Chemotherapeutikum Vemurafenib mittels XTT-Zellvitalitäts-Assay analysiert. Hierzu erfolgte die Inkubation der Zellen mit Vemurafenib über 48 h. Die Analysen zum antiproliferativen Effekt von Vemurafenib mussten ohne die Zelllinien FM-28, FM-81, FM-82, MZ-Mel3, Mel1359 und WM-39 durchgeführt werden, da diese ihr Wachstum vor der Behandlung mit dem Chemotherapeutikum einstellen.



**Abb. 20: Antiproliferativer Effekt von Vemurafenib in Abhängigkeit vom BRAF-Status. (A)** Nach Inkubation der 19 Melanomzelllinien mit Vemurafenib über 48 h erfolgte die Erfassung der zellbiologischen Aktivität mittels XTT-Assay. Als Referenz dienten jeweils mit Vemurafenib unbehandelte Zellen. Darstellung der Zellvitalität in Prozent im Bezug zu mit Vemurafenib unbehandelten Zellen. Standardabweichungen bezeichnen die Streuung zwischen mindestens zwei unabhängigen Experimenten. **(B)** Analog zur Kategorisierung aus Abschnitt 3.2 wurde die Vemurafenib-Sensibilität der Zellen farbkodiert. Zellen, die auf die Chemotherapeutikabehandlung mit einer Inhibition der Zellvitalität von mehr als 30 % reagieren, wurden als Vemurafenib-sensibel eingestuft und bekamen die Kategorie 9 (dunkelblau). Vemurafenib-resistente Zellen wurden in die Kategorie 1 (hellblau) eingestuft. **fett gedruckt:** *NRAS*-mutierte Zelllinien. **(C)** Die Chemosensitivität auf Vemurafenib in Abhängigkeit vom *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutationsstatus ist als Boxplot zusammengefasst. Statistische Signifikanz wurde durch den Student's T-Test berechnet: \*\*\* $p < 0,005$ .

Aus Abb. 20 wird der Einfluss der Vemurafenib-Behandlung in Abhängigkeit des *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutationsstatus sichtbar. Es zeigt sich nahezu keine Inhibition der Zellvitalität in den *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen. Hingegen kommt es zu einer signifikanten Hemmung der metabolischen Aktivität in den Zellen, die Träger einer *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutation sind (Abb. 20 C). Die Zellvitalität sinkt bei diesen Zellen auf bis zu 22 % (WM-1862) des Ausgangswertes. Ausnahme hierbei bilden die Zelllinien WM-1552c sowie UKRV-Mel14a. Ihr Aktivitätszustand wird durch die Behandlung mit Vemurafenib im Mittel nur um circa 12 % inhibiert. Das entspricht im Mittel der Inhibitionsrate der *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen. Hier stellt sich die Frage, welche Mechanismen der beiden *BRAF* V600E (c.1799T>A)-heterozygoten Zelllinien WM-1552c und UKRV-Mel14a die Resistenz gegenüber Vemurafenib begünstigen. Weiterhin fällt jedoch keine deutlich stärkere Hemmung der Zellvitalität bei *BRAF* V600E (c.1799T>A)-homozygoten im Vergleich zu den *BRAF* V600E (c.1799T>A)-heterozygoten Zellen auf. Ebenso scheint weder der *NRAS*- noch der *KRAS*-Mutationsstatus Einfluss auf die Sensibilität der Zellen gegenüber Vemurafenib zu nehmen. Insgesamt bestätigt sich die Selektivität des *BRAF*-Kinase-Inhibitors Vemurafenib für *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierte Zellen, mit Ausnahme der Zellen WM-1552c und UKRV-Mel14a (Abb. 20) (Yang et al., 2010).

	FM-3	buf 624	FM-6	FM-79	GR-M	WM-1552c	UKRV-Mel14a	buf 501	buf 1383	buf 1402	Colo-794	buf 1102	buf 1286	buf 1182	Colo-857	buf 526	IRNE	buf 1280	WM-1862	
Vemurafenib	1	1	1	1	1	1	1	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
<i>BRAF</i> V600E	1	1	1	1	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	9	9
<i>NRAS</i> Q61K	1	1	5	1	1	1	1	1	1	1	1	5	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>NRAS</i> Q61L	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>KRAS</i> G12R	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

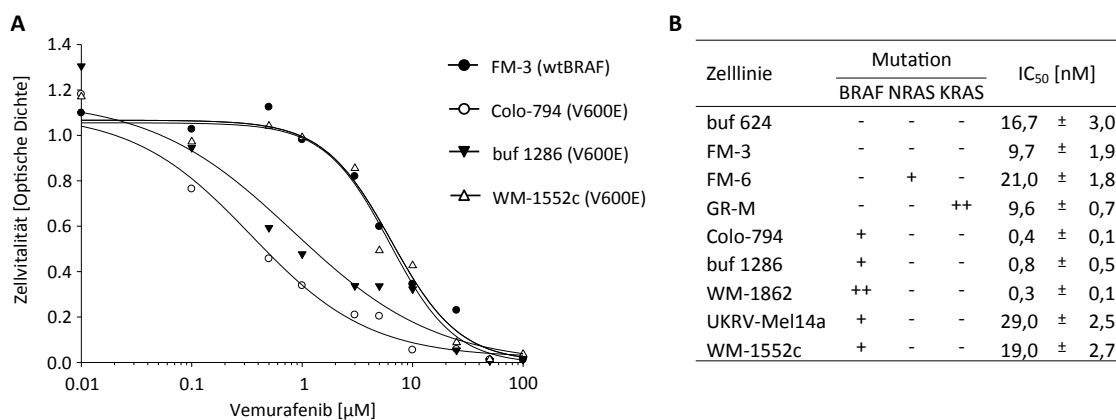
Mutation	
homozygot	9
heterozygot	5
keine	1

Vemurafenib-Sensibilität	
sensibel	9
nicht sensibel	1

**Abb. 21: Überblick der Vemurafenib-Sensibilität in Abhängigkeit vom *BRAF*- und *RAS*-Mutationsstatus.** Zusammenfassung der Mutationsanalysen (siehe 3.1.4) sowie der Daten zum antiproliferativen Effekt von Vemurafenib (siehe Abb. 20). Dargestellt sind die 19 Melanomzelllinien, die mit Vemurafenib behandelt wurden.

Im weiteren Verlauf wurden gezielt neun Zelllinien der 25 Melanomzelllinien mit verschiedenen Konzentrationen des *BRAF*-Inhibitors behandelt. Hierzu erfolgte die Inkubation der Zellen mit je zwölf verschiedenen Vemurafenib-Konzentrationen von 0,01  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  über 48 h. Anschließend wurden die metabolisch aktiven Zellen mittels XTT-Zellaktivitäts-Assay bestimmt. Es erfolgte die halblogarithmische Darstellung der Werte nach sigmoidaler Regression mit Hilfe der Software SigmaPlot. Weiterhin wurden für die untersuchten Zelllinien die Konzentrationen berechnet, bei denen eine Hemmung des Wachstums der Zellen um 50 % eintritt. Eine solche Konzentration wird als  $\text{IC}_{50}$ -Wert bezeichnet (Abb. 22).



**Abb. 22: Dosis-Wirkungskurven sowie  $\text{IC}_{50}$ -Werte ausgewählter Melanomzelllinien.** (A) Behandlung ausgewählter Zelllinien über 48 h mit je zwölf verschiedenen Vemurafenib-Konzentrationen von 0,01  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$ . Anschließende Zellvitalitätsbestimmung mittels XTT-Assay. Nach sigmoidaler Regression erfolgte die halblogarithmische Darstellung der Daten von FM-3, Colo-794, buf 1286 und WM-1552c. (B) Bestimmung derjenigen Vemurafenib-Konzentration, bei der eine Inhibition des Wachstums der Zellen auf 50 % des Anfangswertes eintritt (entspricht  $\text{IC}_{50}$ -Wert). Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software SigmaPlot. Standardabweichungen bezeichnen die Streuungen zwischen zwei unabhängigen Experimenten. - keine Mutation; + heterozygot; ++ homozygot.

Anhand der Dosis-Wirkungskurven wird ersichtlich, dass die *BRAF* V600E (c.1799T>A)-heterozygoten Zellen buf 1286 und Colo-794 einen deutlich flacheren Kurvenverlauf zeigen als die Zelllinien FM-3 und die WM-1552c. FM-3 sowie WM-1552c weisen erst bei deutlich höheren Vemurafenib-Dosen eine reduzierte Zellvitalität auf. Diese Tatsache ist deswegen interessant, weil das Verhalten der *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zelllinie WM-1552c nicht dem der anderen

*BRAF V600E (c.1799T>A)*-mutierten Zellen entspricht, sondern vielmehr dem der *BRAF V600 (c.1799T)*-wildtypischen Zellen gleicht. Diese Annahme spiegelt sich ebenso in den  $IC_{50}$ -Werten wider. Hier liegt die halbmaximale, inhibitorische Konzentration der *BRAF V600 (c.1799T)*-wildtypischen Zellen zwischen 9,6 nM und 21,0 nM. Ähnliche Werte zeigen die *BRAF V600E (c.1799T>A)*-mutierten Zelllinien WM-1552c und UKRV-Mel14a. Die  $IC_{50}$ -Werte der übrigen untersuchten *BRAF V600E (c.1799T>A)*-mutierten Zellen liegen zwischen 0,3 nM und 0,8 nM Vemurafenib und somit deutlich unterhalb der *BRAF V600 (c.1799T)*-Wildtypischen. Folglich sprechen *BRAF V600E (c.1799T>A)*-mutierte Zellen sensibler auf eine Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Vemurafenib an. Ausnahmen bilden hier die Zelllinien WM-1552c und UKRV-Mel14a.

### 3.3.5 Zusammenhang zwischen Phänotyp und Expressionsdaten

In Zusammenschau der ermittelten Daten zu Mutationsstatus, Protein- und mRNA-Expression, zellbiologischem Verhalten sowie Chemosensitivität gegenüber Vemurafenib zeigt sich ein sehr heterogenes Zellprofil der 25 Melanomzelllinien. Allein in Abhängigkeit des *BRAF V600E (c.1799T>A)*-Mutationsstatus lässt sich keine einheitliche Charakterisierung der Zelllinien festlegen. Betrachtet man hingegen die Chemosensitivität der Zellen gegenüber Vemurafenib in Verbindung mit dem Mutationsstatus, lassen sich einige signifikante Zusammenhänge erkennen (Abb. 23). So weisen Vemurafenib-sensible Zellen einen höheren Grad an AKT-Phosphorylierung auf als Vemurafenib-resistente. Des Weiteren ist die Proteinabundanz von ERK1,2 in Vemurafenib-sensiblen Zellen erhöht. Die Rezeptortyrosinkinasen ErbB1 und cKIT zeigen ebenfalls ein auffälliges Expressionsmuster in Abhängigkeit von der Chemosensitivität der Zellen gegenüber Vemurafenib. Demnach weisen Vemurafenib-resistente Zellen eine höhere Expression an *ErbB1*-mRNA auf. Die mRNA-Menge von *cKIT* ist hingegen in Vemurafenib-sensiblen Zellen erhöht. Außergewöhnlich in ihrem zellbiologischen Verhalten stellen sich die Zelllinien WM-1552c und UKRV-Mel14a dar. Sie zeichnen sich beide durch das Vorliegen einer *BRAF V600E (c.1799T>A)*-Mutation und das Fehlen einer *RAS*-Mutation aus. Im Ansprechverhalten auf Vemurafenib gleichen sie jedoch den *BRAF V600 (c.1799T)*-wildtypischen Zellen und zeigen so eine bestehende Resistenz gegenüber Vemurafenib.

	FM-3	FM-6	FM-79	GR-M	buf 624	WM-1552c	UKRV-Mel14a	buf 501	buf 526	buf 1102	buf 1182	buf 1286	buf 1383	buf 1402	Colo-794	Colo-857	IRNE	buf 1280	WM-1862	
Vemurafenib	1	1	1	1	1	1	1	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	Zellbiologie
BRAF V600E	1	1	1	1	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	9	9	Mutation
NRAS Q61K	1	5	1	1	1	1	1	1	1	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Mutation
NRAS Q61L	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Mutation
KRAS G12R	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Mutation
NRAS G12,G13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Mutation
KRAS Q61	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Mutation
pAKT	1	1	7	1	4	2	1	7	7	1	1	3	8	2	5	9	9	8	8	Protein *
AKT	1	1	2	2	1	2	3	2	2	1	1	1	1	3	9	7	1	4	Protein	
pERK	3	1	1	2	8	3	4	3	1	7	7	3	3	1	6	4	7	3	4	Protein
ERK1,2	2	1	1	1	2	1	3	5	2	4	9	5	5	4	3	2	2	5	4	Protein ***
NRAS	3	1	9	1	3	4	5	6	3	3	2	6	9	2	4	5	3	3	2	Protein
BRAF	2	1	5	2	1	5	2	1	1	2	3	3	5	6	1	4	8	6	9	Protein
ErbB1	1	5	1	5	1	5	5	1	2	2	1	1	2	1	2	1	1	1	1	mRNA **
ErbB2	4	3	4	3	3	3	4	4	4	4	3	4	3	3	4	4	4	4	4	mRNA
ErbB3	5	3	5	1	4	1	1	1	6	5	5	5	3	1	4	5	6	5	5	mRNA
ErbB4	1	1	1	1	2	1	1	1	3	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	mRNA
ckIT	1	1	1	1	3	3	2	5	1	5	1	5	7	6	4	3	2	2	5	mRNA *
cMET	5	5	5	6	6	5	5	6	6	5	4	4	6	7	5	6	4	6	6	mRNA
ERK1	4	4	4	3	3	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	mRNA
ERK2	4	4	4	3	4	3	4	4	3	4	5	4	4	4	4	4	3	4	4	mRNA
NRAS	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	mRNA
BRAF	4	4	4	5	4	4	4	4	5	5	4	4	4	4	4	5	5	4	4	mRNA
Verdopplung	8	6	4	8	3	4	2	5		5	4	6	7	9	6	5	2	1	4	Zellbiologie

**Farbkategorisierung**

Vemurafenib-Sensibilität	sensibel 9									nicht sensibel 1										
Mutation	homozygot 9		heterozygot 5				keine 1													
Schwellenwert (qRT-PCR)	< 12	12-14	14-16	16-18	18-20	20-22	22-24	24-26	> 26	9	8	7	6	5	4	3	2	1		
Protein	viel			mittel				wenig				9	8	7	6	5	4	3	2	1
Verdopplungszeit in Stunden	< 16	16-18	18-20	20-22	22-24	24-26	26-28	28-30	> 30	9	8	7	6	5	4	3	2	1		

**Abb. 23: Zusammenfassung der Analysen zu Expression, Zellverhalten, Chemosensitivität und genetischen Veränderungen von 19 Melanomzelllinien.** Zusammenfassende Darstellung der ermittelten Daten in farblicher Kategorisierung (Ampelbewertung). Farblich unterlegte Legende der verschiedenen Kategorien (siehe 3.2). Statistische Signifikanz wurde durch den T-Test berechnet: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,005.

**3.4 Auffälligkeiten der Zelllinien WM-1552c und UKRV-Mel14a**

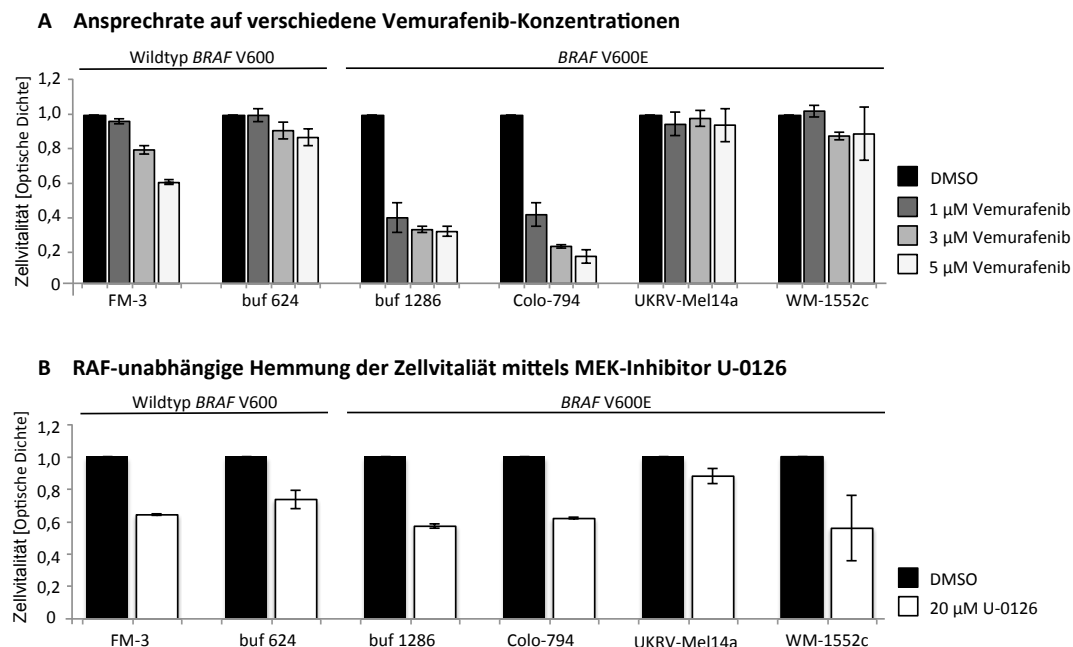
Während der Analysen zur Chemosensitivität der 25 Melanomzellen gegenüber dem selektiven BRAF-Inhibitor Vemurafenib fielen die zwei Zelllinien WM-1552c und UKRV-Mel14a durch ihr im Vergleich zum Bezugskollektiv abnormes Verhalten auf. Trotz ihrer BRAF V600E (c.1799T>A)-Mutation zeigten diese Zelllinien nur eine geringe Wachstumsinhibition unter der Behandlung mit Vemurafenib. In diesem Verhalten ähneln sie den BRAF V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen und weichen somit gänzlich vom Habitus der anderen BRAF V600E (c.1799T>A)-mutierten Zellen ab. Es bleibt zu klären, welche Ursachen der Chemosensitivität der Zelllinien WM-1552c und UKRV-Mel14a gegenüber Vemurafenib zu Grunde liegen und welche möglichen Erkenntnisse sich daraus auf die klinische Melanomtherapie übertragen lassen.

Die Zelllinien WM-1552c und UKRV-Mel14a weisen im Vergleich zu den übrigen BRAF V600E (c.1799T>A)-mutierten Zelllinien unter normalen Wachstumsbedingungen keine auffälligen Charakteristika in den zellbiologischen Parametern wie Wachstumsrate, Zellvitalität oder im

adhäsionsunabhängigen Wachstum auf (siehe 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3). Die nachfolgenden Untersuchungen fokussieren daher den Einfluss des Chemotherapeutikums Vemurafenib auf das Zellverhalten der beiden Zelllinien WM-1552c und UKRV-Mel14a.

### 3.4.1 Relative Proliferation in Abhängigkeit vom Inhibitor

Der erste Schritt zur Analyse der zwei auffälligen Zelllinien WM-1552c und UKRV-Mel14a beruht auf der fehlenden Inhibition der Wachstumsrate unter Vemurafenibbehandlung. Im Folgenden wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen des Chemotherapeutikums (1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 5  $\mu$ M) auf das Proliferationsverhalten der Zellen untersucht. Zum Vergleich der zwei Zelllinien WM-1552c und UKRV-Mel14a mit der Reaktion *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischer sowie *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierter Zellen wurden hierzu jeweils zwei Zelllinien ebenfalls mit verschiedenen Konzentrationen Vemurafenibs behandelt. Als Referenz zur Chemotherapeutikabehandlung diente die Inkubation mit 10 %-igem DMSO/FKS-Medium. Die Inkubationsdauer betrug bei allen Zellen 48 h. Im Anschluss daran erfolgte die Zellvitalitätsmessung mittels XTT. In einem weiteren Schritt wurde das Proliferationsverhalten unter dem Einfluss des selektiven MEK-Inhibitors U-0126 untersucht. Hierzu erfolgte die Inkubation der Zellen über 48 h mit dem Inhibitor sowie anschließender Zellvitalitätsmessung mittels XTT. Als Referenz dienten wieder mit 10 %-igem DMSO/FKS-Medium behandelte Kontrollen.



**Abb. 24: Unterschiedliches Ansprechen von Melanomzelllinien auf Vemurafenib abhängig vom BRAF-Status. (A)** Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Vemurafenib (1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 5  $\mu$ M) über 48 h. Messung der Zellvitalität mittels XTT. Als Referenzen dienen jeweils mit 10 %-igem DMSO/FKS-Medium behandelte Kontrollen. Standardabweichungen bezeichnen die Streuungen zwischen zwei unabhängigen Experimenten. **(B)** Behandlung der Zellen mit dem selektiven MEK-Inhibitor U-0126 über 48 h und anschließende Bestimmung der Zellvitalität mittels XTT. Als Referenzen dienen jeweils mit 10 %-igem DMSO/FKS-Medium behandelte Kontrollen. Standardabweichungen bezeichnen die Streuungen zwischen zwei unabhängigen Experimenten.



Unter der Behandlung mit dem selektiven BRAF-Inhibitor stellte sich in den *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen FM-3 und buf 624 nur eine geringe Hemmung der Zellvitalität ein. Eine merkliche Inhibition um 40 % trat bei der Zelllinie FM-3 erst ab einer Vemurafenib-Konzentration von 5  $\mu$ M auf. Bei dieser Konzentration sank die Zellvitalität der Zelllinie buf 624 gerade einmal auf 87 % des Ausgangswertes. Im Gegensatz zu den *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen reagierten die *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zelllinien buf 1286 und Colo-794 schon ab einer Vemurafenib-Konzentration von 1  $\mu$ M mit einer deutlichen Hemmung auf 60 % der Zellvitalität (Abb. 24 A). Bei höheren Konzentrationen sank die Zellvitalität sogar auf Werte unter 20 % des Ausgangswertes der Zelllinie Colo-794. Paradox erschien dabei die Reaktion der Zellen von UKRV-Mel14a. Hier zeigte sich nahezu keine Inhibition der Zellvitalität unter der Behandlung mit Vemurafenib unabhängig von der Höhe der Konzentration. Die Zellen der Zelllinie WM-1552c ähnelten im Inhibitorversuch dem Verhalten der *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen von buf 624. So wurde ihre Zellvitalität sogar bei höheren Vemurafenib-Konzentrationen nicht mehr als 13 % gehemmt.

Durch die Behandlung der Zellen mit dem MEK-Inhibitor U-0126 sollte analysiert werden, inwiefern sich der MAP-Kinase-Signalweg innerhalb der Zellen unabhängig von der *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutation hemmen lässt. Im Mittel wurde die Zellvitalität unabhängig vom Mutationsstatus durch den MEK-Inhibitor um 33 % gehemmt (Abb. 24 B). Ausnahme bildete hier wieder die Zelllinie UKRV-Mel14a, deren Aktivität nur um 12 % inhibiert wurde. Zusammengefasst zeigte sich, dass vor allem unter der Behandlung mit Vemurafenib die Zellen WM-1552c und UKRV-Mel14a in ihrem Verhalten stark von dem der anderen *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zelllinien differieren. Besonders die Zelllinie UKRV-Mel14a wies eine konzentrationsunabhängige Resistenz gegenüber den beiden Inhibitoren auf.

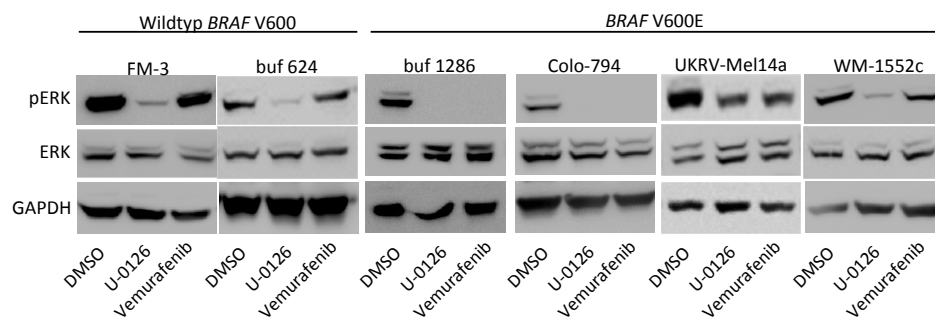
### 3.4.2 Expressionsanalysen unter Inhibitoreinfluss

Vor allem der MAP-Kinase-Signalweg und der eng mit diesem verknüpfte PI3K-AKT-Signalweg spielen eine wichtige Rolle bei zellulären Vorgängen wie Zellwachstum und Zellüberleben (Kwong und Davies, 2013; Mendoza et al., 2011). Insbesondere die vermehrte Initiation dieser Transduktionswege könnte eine entscheidende Rolle bei der Resistenz gegenüber Inhibitoren spielen. Um dieser Vermutung nachzugehen, erfolgte eine Analyse auf Proteinebene. Hierbei stand unter anderem die Überprüfung des Aktivierungsgrads der beteiligten Zieltranskripte unter Inhibitoreinfluss im Fokus.

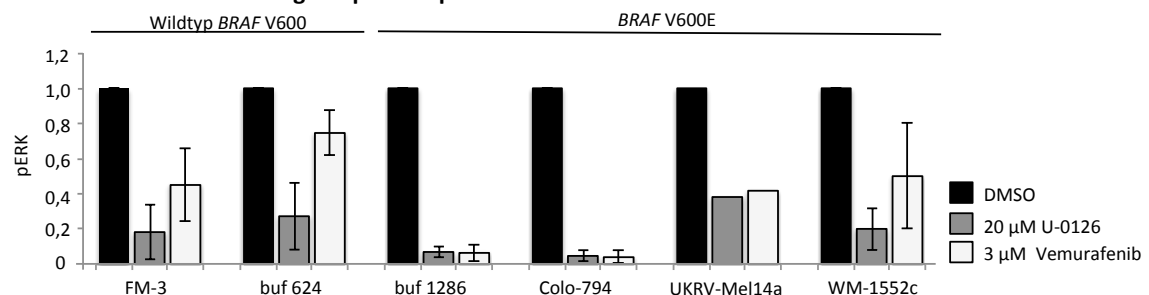
### 3.4.2.1 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf den MAP-Kinase-Signalweg

Endglied und somit wichtiger Effektor des MAP-Kinase-Signalwegs bildet die Kinase ERK. Besonders ihr Aktivierungsgrad bildet eine Schlüsselrolle in den nachfolgenden Proliferations- und Differenzierungsprozessen der Zelle (zusammengefasst in Inamdar et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund analysiert, inwiefern sich dieser Aktivierungsgrad sowie die Proteinexpression von ERK unter dem Einfluss von Inhibitoren und in Abhängigkeit des *BRAF V600E* (c.1799T>A)-Mutationsstatus verändern. Als Maß für den Aktivierungszustand von ERK wurde das phosphorylierte ERK (pERK) bestimmt. Das Hauptaugenmerk lag hier wiederum auf einem möglichen charakteristischen Verhalten der Zelllinien WM-1552c und UKRV-Mel14a, welches ein Resistenzverhalten dieser Zellen eventuell erklären könnte. Zu Beginn der Analysen wurde die Behandlung der Zellen mit jeweils 3  $\mu$ M Vemurafenib sowie 20  $\mu$ M U-0126 über 48 h durchgeführt. Es erfolgte die Extraktion der Proteine sowie der Phosphoproteine und deren anschließende Analyse mittels Western Blot. Als Referenz dienten für alle Durchführungen mit 10 %-igem DMSO/FKS-Medium behandelte Kontrollen. Im zweiten Durchgang der Messung stellten die Zellen der Zelllinie UKRV-Mel14a das Wachstum ein.

#### A Proteinexpression von ERK und pERK unter Inhibitoreinfluss



#### B Grafische Darstellung der pERK-Expression unter Inhibitoreinfluss

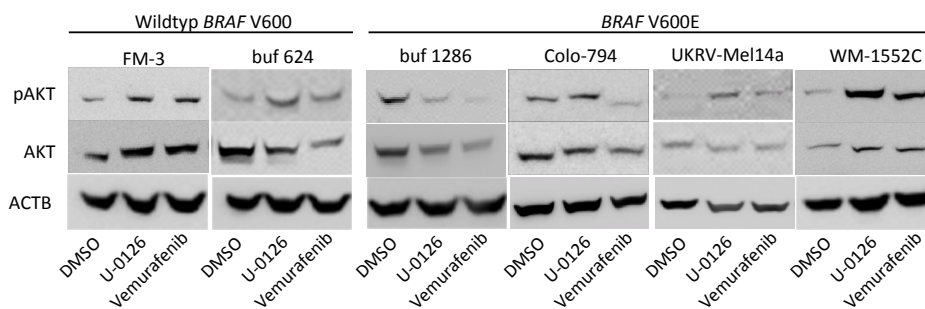
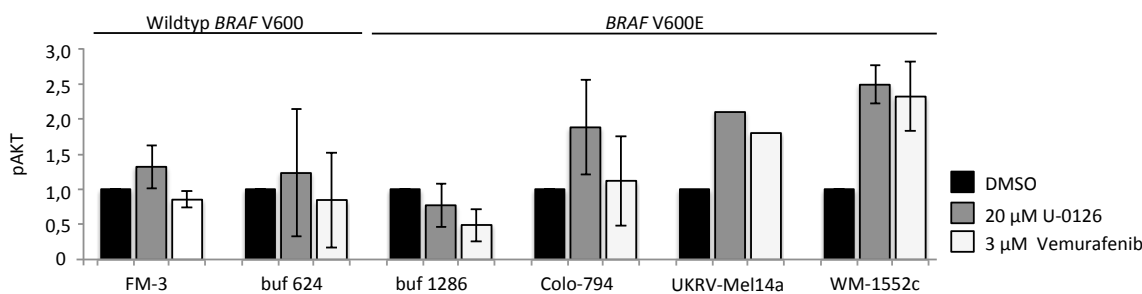


**Abb. 25: Analyse der Proteinexpression sowie des Aktivierungsgrad von ERK unter Inhibitoreinfluss.** (A) Behandlung der Zellen mit 3  $\mu$ M Vemurafenib und 20  $\mu$ M U-0126 über 48 h. Es folgte die Proteinextraktion und anschließende Analyse mittels Western Blot. Als Referenz dienten mit 10 %-igem DMSO/FKS-Medium behandelte Kontrollen. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH verwendet. Dargestellt ist jeweils eines von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. (B) Darstellung der mittels Western Blot analysierten Werte für pERK unter der Behandlung mit Vemurafenib und U-0126 relativ zur Kontrollbehandlung mit 10 %-igem DMSO/FKS-Medium. Standardabweichungen bezeichnen die Streubreite zwischen mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Unter dem Einfluss der Inhibitoren Vemurafenib und U-0126 zeigten alle Zellen annähernd gleiche Expressionen von ERK (Abb. 25 A). Weiterhin wurde ersichtlich, dass durch die Behandlung mit Vemurafenib und U-0126 der Aktivierungsgrad von ERK in unterschiedlichem Ausmaß gehemmt wurde (Abb. 25 B). Die *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zellen buf 1286 und Colo-794 wiesen sowohl unter der Behandlung mit Vemurafenib als auch unter U-0126-Inkubation eine drastische Hemmung des Aktivierungszustandes von ERK bis zu 3 % des Ausgangswertes auf. Bei den *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen war diese Inhibition verstärkt unter dem Einfluss des MEK-Inhibitors U-0126 zu erkennen. Unter der Behandlung mit Vemurafenib sank das phosphorylierte ERK der Zelllinie FM-3 auf Werte von 45 % und bei buf 624 auf 75 % der Ausgangswerte. Ein ähnliches Verhalten lies sich bei den *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zellen WM1552c und UKRV-Mel14a nachweisen. Hier wurde vor allem bei der Zelllinie WM-1552c das phosphorylierte ERK unter der Behandlung mit U-0126 (20 % des Ausgangswertes) stärker inhibiert als mit der Inkubation von Vemurafenib (50 % des Ausgangswertes). Die Zellen der Zelllinie UKRV-Mel14a reagierten mit einer nahezu gleichen Reduktion von pERK auf die Behandlung mit U-0126 und Vemurafenib. Die Daten zeigten somit eine starke Hemmung der Phosphorylierung von ERK in den *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zellen buf 1286 und Colo-794 unabhängig von der Art des Inhibitors. Die restlichen Zellen reagierten weder auf die Behandlung mit U-0126 noch auf die Inkubation mit Vemurafenib mit einer so starken Hemmung von pERK. Das Ausmaß der Inhibition bei der Behandlung mit U-0126 war jedoch stärker ausgeprägt im Vergleich zur Vemurafenib-Inkubation. Vergleichbar mit den Proliferationsanalysen unter Vemurafenib und U-0126 wiesen die Zellen WM-1552c und UKRV-Mel14a wieder ähnliche Charakteristika in der Proteinexpression auf wie die *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen.

#### **3.4.2.2 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf den PI3K-AKT-Signalweg**

Der PI3K-AKT-Signalweg steht in enger Beziehung zum MAP-Kinase-Signalweg (Kwong und Davies, 2013; Mendoza et al., 2011). Aus diesem Grund wurden in Ergänzung der Daten zur Proteinexpression und -regulation des MAP-Kinase-Signalwegs weitere Untersuchungen bezüglich des Aktivierungsgrad des PI3K-AKT-Signalwegs unter Inhibitoreinfluss durchgeführt. Das Hauptaugenmerk dieser Analysen lag hierbei wieder auf den Zellen WM-1552c und UKRV-Mel14a sowie auf dem Unterschied zwischen den Zelllinien mit verschiedenen *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutationsstatus. Die Vorgehensweise ähnelte der zu den Analysen des MAP-Kinase-Signalwegs unter Inhibitoreinfluss. Es erfolgte zunächst die Inkubation der Zellen jeweils mit 3  $\mu$ M Vemurafenib sowie 20  $\mu$ M U-0126 über 48 h. Im Anschluss wurden die Proteine sowie Phosphoproteine gewonnen und mittels Western Blot analysiert. Als Referenz dienten für alle Durchführungen mit 10 %-igem DMSO/FKS-Medium behandelte Kontrollen. Im zweiten Durchgang der Messung stellten die Zellen der Zelllinie UKRV-Mel14a das Wachstum ein.

**A Proteinexpression von AKT und pAKT unter Inhibitoreinfluss****B Grafische Darstellung der pAKT-Expression unter Inhibitoreinfluss**

**Abb. 26: Analyse der Proteinexpression sowie des Aktivierungsgrad von AKT unter Inhibitoreinfluss.** (A) Behandlung der Zellen mit 3  $\mu$ M Vemurafenib und 20  $\mu$ M U-0126 über 48 h. Es folgte die Proteinextraktion und anschließende Analyse mittels Western Blot. Als Referenz dienten mit 10 %-igem DMSO/FKS-Medium behandelte Kontrollen. Als Ladungskontrolle wurde ACTB verwendet. Dargestellt ist jeweils eines von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. (B) Darstellung der mittels Western Blot analysierten Werte für pAKT unter der Behandlung mit Vemurafenib und U-0126 relativ zur Kontrollbehandlung mit 10 %-igem DMSO/FKS-Medium. Standardabweichungen bezeichnen die Streuungen zwischen mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Die Daten zur Proteinexpression von AKT zeigten keine relevante Veränderung der Proteinabundanz in Abhängigkeit vom verwendeten Inhibitor (Abb. 26 A). Jedoch ließ sich eine diskrete Erhöhung um im Mittel 27 % des Phosphorylierungsgrades von AKT in den *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen FM-3 und buf 624 erkennen, die mit dem Inhibitor U-0126 behandelt worden sind. Durch die Inkubation mit Vemurafenib kam es bei diesen Zellen zu einem marginalen Abfall des phosphorylierten AKTs um 15 % des Ausgangswertes. Die Zelllinie buf 1286 wies sowohl unter der Behandlung mit U-0126 als auch mit Vemurafenib eine Hemmung des pAKT auf. Unter Vemurafenib sank der Aktivierungszustand von AKT in buf 1286 auf unter 50 % des Ausgangswertes. Im Gegensatz zu buf 1286 kam es bei der ebenfalls *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zelllinie Colo-794 zu einem deutlichen Anstieg des phosphorylierten AKTs unter U-0126-Behandlung auf nahezu das Doppelte des Ausgangswertes. Unter dem Einfluss von Vemurafenib zeigte die Zelllinie Colo-794 annähernd keine Veränderung im Level von pAKT. Interessant war die Reaktion des pAKTs der beiden Zelllinien WM-1552c und UKRV-Mel14a auf die Behandlung mit den Inhibitoren. Beide Zelllinien zeigten vor allem unter dem Einfluss von U-0126 eine deutliche Steigerung des Aktivierungszustandes von AKT auf mehr als das Doppelte des Ausgangswertes (Abb. 26 B). Ebenso erhöhte sich das Level des phosphorylierten AKTs unter Behandlung von

Vemurafenib deutlich. Bei den Analysen zum Expressions- und Aktivierungsstatus von AKT zeigte sich, dass wieder die Zelllinien WM-1552c und UKRV-Mel14a ein deutlich abweichendes Verhalten im Vergleich zu den restlichen untersuchten Zelllinien aufwiesen. Insbesondere das Phosphorylierungsniveau von AKT unter der Inhibitorbehandlung differierte deutlich von allen anderen untersuchten Zellen. Es bleibt somit zu vermuten, dass die verstärkte Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs in diesen Zelllinien ein möglicher Weg zur Resistenzentstehung gegenüber den Inhibitoren des MAP-Kinase-Signalwegs ist.

### 3.4.2.3 Rezeptortyrosinkinasen als Faktoren bei der Resistenz gegen Vemurafenib

Schon seit Längerem wird für die Entstehung von Resistenzen gegen RAF-Inhibitoren eine Aktivierung und Überexpression von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) verantwortlich gemacht (Lee-Hoeflich et al., 2008; Nazarian et al., 2010; Shi et al., 2011; Villanueva et al., 2010). Im Melanom rückten in diesem Zusammenhang vor allem die RTKs der ErbB-Familie in den Fokus. Sie ermöglichen durch Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs einen vom MAP-Kinase-Signalweg unabhängigen Resistenzmechanismus und stehen damit im Mittelpunkt für die Entwicklung neuer pharmakologischer Behandlungskonzepte (Fattore et al., 2013; Ng et al., 2014). Aus diesem Grund wurden im Folgenden die in 3.2.2 ermittelten Expressionsdaten der vier Mitglieder der ErbB-Familie (ErbB1, ErbB2, ErbB3 und ErbB4) mit der Chemosensitivität der untersuchten Melanomzelllinien gegenüber Vemurafenib verglichen (Abb. 27).

	FM-3	FM-79	buf 624	FM-6	GR-M	WM-1552c	UKRV-Mel14a	buf 501	buf 1383	buf 1402	Colo-794	buf 1102	buf 1286	buf 1182	Colo-857	buf 1280	WM-1862	buf 526	IRNE	
Vemurafenib	1	1	1	1	1	1	1	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	Zellbiologie
<i>ERBB1</i>	1	1	1	5	5	5	5	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	2	1	mRNA
<i>ERBB2</i>	4	4	3	3	3	3	4	4	3	3	4	4	4	3	4	4	4	4	4	mRNA
<i>ERBB3</i>	5	5	4	3	1	1	1	1	3	1	4	5	5	5	5	5	5	6	6	mRNA
<i>ERBB4</i>	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	3	1	mRNA

#### Farbkategorisierung

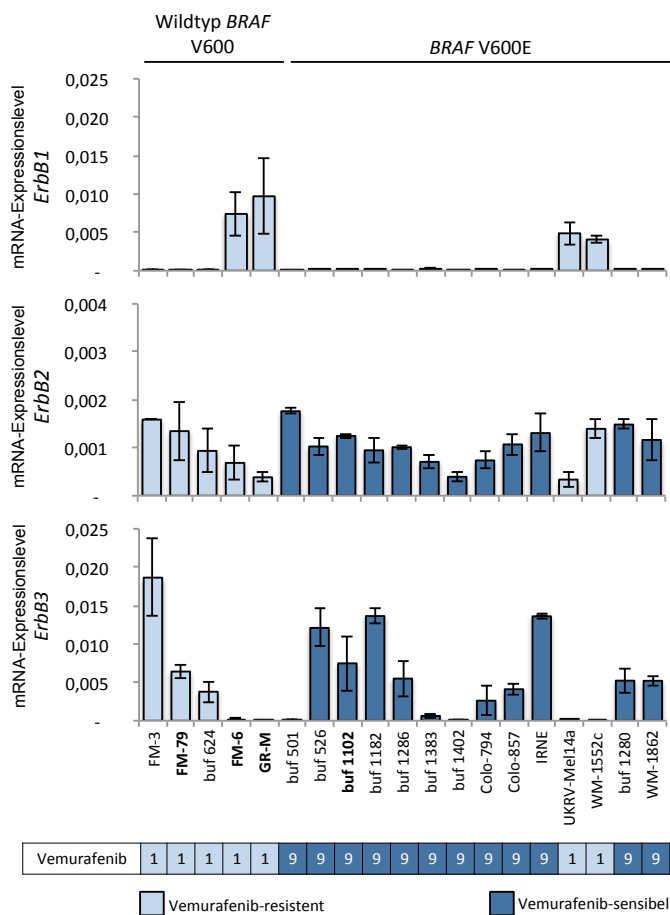
Schwellenwert (qRT-PCR)	< 12	12-14	14-16	16-18	18-20	20-22	22-24	24-26	> 26
Vemurafenib-Sensibilität	9	8	7	6	5	4	3	2	1
	sensibel						nicht sensibel		
	9						1		

**Abb. 27: Korrelation der mRNA-Expression der ErbB-Familie mit der Chemosensitivität gegenüber Vemurafenib.** Die in 3.2.2 ermittelten Expressionsdaten zu *ErbB1*, *ErbB2*, *ErbB3* und *ErbB4* sowie die in 3.3.4 analysierte Chemosensitivität der 19 Melanomzelllinien wurden im semiquantitativen Kategorisierungssystem (Ampelbewertung) farblich dargestellt. Farblich unterlegte Legende der verschiedenen Farbkategorien (siehe 3.2).

Interessanterweise konnten innerhalb des untersuchten Zelllinien-Kollektivs bei nahezu allen Zellen nur sehr geringe Mengen *ErbB4*-mRNA detektiert werden. Für *ErbB2* konnten ebenfalls keine relevanten mRNA-Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien festgestellt werden. Unterschiede im mRNA-Expressionsniveau zeigten sich bei *ErbB1* sowie *ErbB3*. Auffällig hierbei war, dass die Anwesenheit der mRNA des einen Oberflächenrezeptors anscheinend die Expression der mRNA des anderen ausschließt. Es konnten in den Zellen, die vermehrt *ErbB1*-mRNA exprimieren, nur sehr geringe *ErbB3*-mRNA-Mengen detektiert werden. Diese negative Korrelation konnte ebenfalls in den Zelllinien mit erhöhten mRNA-Mengen von *ErbB3* gefunden werden. Nur drei (buf 501, buf 1383, buf 1402) der untersuchten Melanomzelllinien zeigten weder vermehrte *ErbB1*- noch *ErbB3*-Expression. In diesen Zellen konnten jedoch gesteigerte mRNA-Expressionslevel sowie mittels Durchflusszytometrie ermittelte Oberflächenexpressionen der Rezeptortyrosinkinase cKIT gefunden werden (Daten hier nicht gezeigt). Bezieht man das Ansprechverhalten auf Vemurafenib in die Auswertung mit ein, so wird ersichtlich, dass Vemurafenib-sensible Zellen nur gering *ErbB1*-mRNA exprimierten. Die Mehrheit dieser Zellen wies jedoch erhöhte Mengen an *ErbB3*-mRNA auf. Die Vemurafenib-resistenten Zellen teilen sich in zwei Kategorien. Hier zeigten drei der sieben Zelllinien hohe Expressionslevel von *ErbB3*-mRNA. Hingegen konnten in den anderen vier Zelllinien deutlich erhöhte Mengen *ErbB1*-mRNA festgestellt werden. Die Zelllinien WM-1552c und UKRV-Mel14a, die trotz *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutation nicht auf Vemurafenib sensibel sind, gleichen im Expressionsmuster den *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen FM-6 und GR-M.

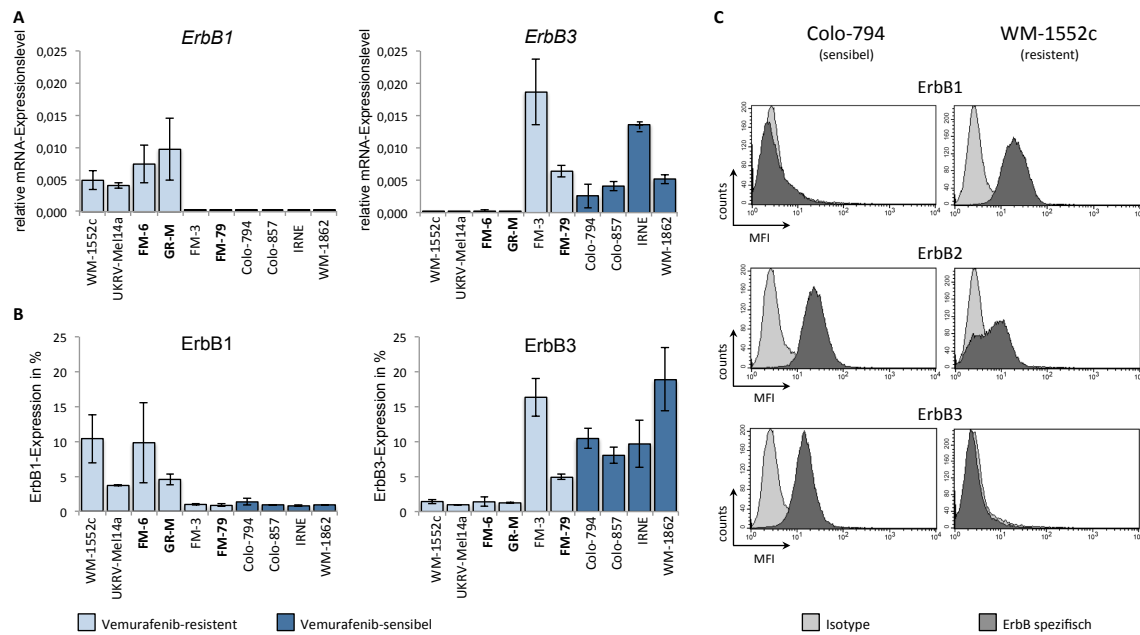
Im nachfolgenden Schritt der Analyse erfolgte die genaue Betrachtung der einzelnen mRNA-Expressionen von *ErbB1*, *ErbB2* und *ErbB3* in Abhängigkeit der Chemosensitivität gegenüber Vemurafenib (Abb. 28). Die hierzu verwendeten Daten stammen aus den Analysen zum Expressionsprofil der 25 Melanomzelllinien (siehe 3.2.2). Die Bestimmung der mRNA-Mengen erfolgte mittels qRT-PCR.

Betrachtet man die einzelnen mRNA-Spiegel der *ErbB*-Familie, so fällt auf, dass genau die vier Zelllinien, die eine deutlich erhöhte Expression von *ErbB1* zeigten, nahezu keine detektierbaren Mengen *ErbB3*-mRNA aufwiesen (Abb. 28). Hierzu zählten die zwei Ausnahmezelllinien WM1552c und UKRV-Mel14a sowie die *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen FM-6 und GR-M. Jedoch waren diese *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zelllinien beide Träger einer *RAS*-Mutation. Zu klären bleibt hier demnach, inwiefern diese *RAS*-Mutationen Einfluss auf die Expression der RTKs besitzen und in welchem Zusammenhang diese Tatsache mit dem Ansprechverhalten der Zellen auf Vemurafenib stehen. Die Daten zur *ErbB2*-mRNA zeigten ein nahezu homogenes Expressionsmuster innerhalb der 19 Melanomzelllinien.



**Abb. 28: Veränderung der relativen mRNA-Expression von *ErbB* in Abhängigkeit von der Sensibilität gegenüber Vemurafenib.** Darstellung der mittels qRT-PCR bestimmten mRNA-Daten zu *ErbB1*, *ErbB2* und *ErbB3*. Die Werte sind relativ zu ACTB abgebildet. Die Daten sind nach *BRAF V600E* (*c.1799T>A*)-Mutationsstatus sowie Ansprechen auf Vemurafenib angeordnet. Standardabweichung bezeichnet die Streubreite zwischen zwei unabhängigen Experimenten. Farbliche Kategorisierung der in 3.3.3 ermittelten Chemosensitivität gegenüber Vemurafenib. **fett gedruckt:** *NRAS*-mutierte Zelllinien.

Außerdem wurde die Oberflächenexpression ausgewiesener RTKs in den Melanomzelllinien mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Aus Gründen der Übersicht werden im Folgenden nur ausgewählte Zelllinien abgebildet (Abb. 29). Primär zeigte sich, dass die mRNA-Mengen mit den Expressionsniveaus der Oberflächenrezeptoren korrelierten. Des Weiteren wurde deutlich, dass Zellen mit einer Oberflächenexpression von ErbB1 fehlende Oberflächenrezeptoren von ErbB3 besaßen. Invers konnte dieses Ergebnis für die ErbB3-exprimierenden Zellen festgestellt werden. Somit konnte eine simultane Expression der beiden Rezeptortyrosinkinasen ErbB1 und ErbB3 in keiner Zelllinie festgestellt werden. Mit Ausnahme der Zelllinien FM-3 und FM-79 waren alle ErbB3-tragenden Zellen sensibel auf Vemurafenib. Aus Abb. 29 C wird ersichtlich, dass es einen deutlichen Wechsel zwischen der Expression von ErbB1 und ErbB3 in Abhängigkeit von der Chemosensitivität gegenüber Vemurafenib gab. So zeigte die Vemurafenib-sensible Zelllinie Colo-794 Oberflächenexpressionen für ErbB2 und ErbB3. Die Vemurafenib-resistente Zelllinie WM-1552c hingegen besaß Oberflächenrezeptoren für ErbB2 und ErbB1. In diesem auffälligen Expressionsmuster könnte sich eine Erklärung für den Resistenzmechanismus gegenüber Vemurafenib finden.



**Abb. 29: Expressionsanalysen der Rezeptortyrosinkinasen ErbB1, ErbB2 und ErbB3. (A)** Darstellung der mittels qRT-PCR bestimmten mRNA-Daten zu *ErbB1* und *ErbB3*. Die Werte sind relativ zu ACTB abgebildet. Standardabweichung bezeichnet die Streubreite zwischen zwei unabhängigen Experimenten. **fett gedruckt:** *NRAS*-mutierte Zelllinien **(B)** Die mittels Durchflusszytometrie bestimmten Oberflächenexpressionen von ErbB1 und ErbB3 wurden hier dargestellt. Standardabweichung bezeichnet die Streuung zwischen zwei unabhängigen Experimenten. **fett gedruckt:** *NRAS*-mutierte Zelllinien **(C)** Durchflusszytometrie zur Ermittlung der Oberflächenexpression von ErbB1, ErbB2 und ErbB3 anhand zwei exemplarischer Zelllinien (Colo-7984 und WM-1552c), die ein unterschiedliches Ansprechen auf Vemurafenib zeigen. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität.

### 3.5 Korrelation der ermittelten Daten mit den Zieltranskripten MITF und MIA

Unter Beachtung der Vielzahl an aktuellen Untersuchungen zum besseren Verständnis der Kanzerogenese sowie deren klinischen Einsatz in der Behandlung des malignen Melanoms gewinnen bestimmte Zieltranskripte immer mehr an Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass invasives Wachstum und damit verbunden eine schlechtere Prognose mit der vermehrten Expression von beispielsweise ErbB3, pAKT und MIA (*melanoma inhibitory activity*) assoziiert ist (Bossert et al., 2001; Dai et al., 2005; Guba et al., 2000; Reschke et al., 2008; Tiwary et al., 2014). Der selektive BRAF-Inhibitor Vemurafenib ist seit einigen Jahren in klinischer Anwendung und seither werden die Entstehungsmechanismen der im Verlauf der Behandlung auftretenden Resistenz untersucht. Hier scheinen vor allem Rezeptortyrosinkinasen wie cKIT und ErbB3 sowie die Expressionsmenge des *microphthalmia-associated transcription factor* (kurz MITF) eine entscheidende Rolle zu spielen (Abel et al., 2013; Ji et al., 2015; Konieczkowski et al., 2014; Nazarian et al., 2010). Aus diesen Gründen und zur Vervollständigung des komplexen Zellprofils der untersuchten Melanomzellen wurden abschließend die ermittelten Expressionsdaten verglichen. Es erfolgte aufgrund der substanziellen Bedeutung dieser Zieltranskripte in der Kanzerogenese des Melanoms die Erweiterung der Daten um die mRNA-Expressionswerte von *MIA* und *MITF* mittels qRT-PCR (Abb. 30).



	buf 624	FM-79	FM-3	FM-6	GR-M	WM-1552c	UKRV-Mel14a	buf 1383	buf 1402	buf 501	buf 526	buf 1182	buf 1286	buf 1102	Colo-794	Colo-857	IRNE	buf 1280	WM-1862	
Vemurafenib	1	1	1	1	1	1	1	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	Zellbiologie
BRAF V600E	1	1	1	1	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	9	9	Mutation
<i>ErbB1</i>	1	1	1	5	5	5	5	2	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	1	mRNA
<i>ErbB3</i>	4	5	5	3	1	1	1	3	1	1	6	5	5	5	4	5	6	5	5	mRNA
ERK1,2	2	1	2	1	1	1	3	5	4	5	2	9	5	4	3	2	2	5	4	Protein
<i>cKIT</i>	3	1	1	1	1	3	2	7	6	5	1	1	5	5	4	3	2	2	5	mRNA
pAKT	4	7	1	1	1	2	1	8	2	7	7	1	3	1	5	9	9	8	8	Protein
<i>MITF</i>	8	7	7	5	4	4	4	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	mRNA
<i>MIA</i>	7	7	7	2	2	2	2	2	3	4	6	6	6	7	7	7	7	7	6	mRNA

#### Farbkodierung

Vemurafenib-Sensibilität	sensibel 9		nicht sensibel 1										
Mutation	homozygot 9	heterozygot 5	keine 1										
Schwellenwert (qRT-PCR)	< 12 9	12-14 8	14-16 7	16-18 6	18-20 5	20-22 4	22-24 3	24-26 2	> 26 1				
Protein	viel 9		mittel 8		7		wenig 6		5	4	3	2	1

**Abb. 30: Synopsis über verschiedene Charakteristika der Expressionsanalysen in Abhängigkeit von der Chemosensitivität sowie ergänzende Expressionsdaten zu *MITF* und *MIA*.** Zusammenfassende Darstellung der aus den vorangegangenen Abschnitten ermittelten Daten mit zusätzlichen mRNA-Expressionsdaten zu *MITF* und *MIA*. Farblich unterlegte Legende der verschiedenen Kategorien (siehe 3.2).

Es erfolgte die Sortierung der Daten in Abhängigkeit der Chemosensitivität gegen Vemurafenib und des *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutationsstatus der Zellen. Wie schon im vorangegangenen Kapitel gezeigt, besaßen die Zelllinien ein auffälliges *ErbB1*/*ErbB3*-Expressionsmuster. Die Zelllinien, die weder *ErbB1* noch *ErbB3* exprimierten, kennzeichneten sich durch ein erhöhtes Level an *cKIT*. Für das Verteilungsmuster von *MIA* fiel auf, dass sich vor allem Zellen, die eine erhöhte Menge *ErbB3* aufwiesen auch durch eine deutlich gesteigerte *MIA*-Expression charakterisierten. *MITF* hingegen wurde in Zellen verstärkt gebildet, in denen eine *ErbB1*-Expression fehlte. Deutlich wurde jedoch, dass vor allem in den Vemurafenib-sensiblen Zelllinien eine ausgeprägte Expression von *MITF* zu finden war. In Anbetracht der Chemosensitivität gegen Vemurafenib zeichnete sich die Mehrzahl der sensiblen Zelllinien durch eine verstärkte AKT-Aktivierung aus. Im Gegensatz zu Vemurafenib-resistenten Zellen wiesen sensible Zellen eine deutlich höhere Proteinabundanz der Kinasen ERK1,2 auf. Weiterhin fielen die resistenten Zelllinien FM-3, FM-6, GR-M, WM-1552c und UKRV-Mel14a mit Vemurafenib unbehandelten Zustand durch geringe Mengen an phosphoryliertem AKT auf. Die Aktivierung von AKT erhöhte sich jedoch bei WM-1552c und UKRV-Mel14a unter der Inkubation mit Vemurafenib deutlich (siehe 3.4.2.2). Es deutet somit darauf hin, dass diese Zellen ihre Vemurafenib-Resistenz möglicherweise über die Aktivierung alternativer Signalwege wie den PI3K-AKT-Signalweg erreichen. Insgesamt zeigte sich ein heterogenes Zellprofil der 25 Melanomzelllinien ohne einheitliche pathognomische Erkennungsmuster in Zellbiologie, Molekulargenetik und Chemosensitivität. Die Komplexität der Kanzerogenese sowie die engen Verknüpfungen einzelner Signalwege erschwert das Verständnis über die Pathophysiologie des Melanoms. Jedoch lassen sich unter Berücksichtigung verschiedenster Aspekte einige erkennbare Cluster innerhalb des untersuchten Melanomzelllinienkollektivs finden, die mögliche Zusammenhänge und Erklärungen für noch nicht vollständig erfasste Sachverhalte widerspiegeln könnten.

## 4 Diskussion

Das maligne Melanom ist die aggressivste Form bösartiger Neubildungen der Haut und somit für circa 80% der Todesfälle in Folge von Hauttumoren verantwortlich (Gesundheitsberichterstattung der Länder, 2012). Die Überlebenszeit und -rate für maligne Melanome sinkt drastisch, sobald es zu einer metastatischen Aussaat im Körper kommt (SEER: Surveillance, 2012). Folglich wird deutlich, dass vor allem die Vermeidung sowie die Behandlung von Metastasen ein wichtiger Bestandteil der Therapie des malignen Melanoms ist. Vielversprechende Ergebnisse im klinischen Gebrauch erbrachte hierbei der selektive BRAF-Inhibitor Vemurafenib (McArthur et al., 2016). Jedoch kam es bei den meisten Patienten trotz primären Ansprechens zu einem Tumorprogress, während andere Patienten primär überhaupt nicht auf die Therapie mit Vemurafenib ansprachen (Chapman et al., 2011). Hierfür werden zum einen intrinsische als auch erworbene Resistenzmechanismen verantwortlich gemacht. Bezüglich der Entstehung sowie Funktionsweise dieser Mechanismen existieren verschiedene Erklärungsansätze (Nazarian et al., 2010; Poulikakos et al., 2011; Villanueva et al., 2010; Wagle et al., 2014). Hier sollte diese Arbeit anknüpfen und versuchen, die Komplexität der zellulären Vorgänge weiter aufzuklären. Aufbauend auf der molekularen Charakterisierung, die in den letzten Jahren die Pathogenese des Melanoms verständlicher gemacht hat, sollten hier die verschiedenen Aspekte des pathologischen Expressionsmusters von Melanomzelllinien überprüft werden. Aus diesem Grund erfolgte die Analyse der Zelllinien zu Beginn auf genomischer Ebene. Die Sequenzierungen der Zelllinien in dieser Arbeit zeigen ein gehäuftes auftreten der Mutation (76%) *BRAF* V600E (c.1799T>A), was die Daten von Davies bestätigt (Davies et al., 2002). Er zeigte, dass circa 60% der Melanome eine Punktmutation im Codon 600 des *BRAF*-Gens aufweisen, die zu einem Austausch der Aminosäure Valin gegen Glutaminsäure führt (*BRAF* V600E (c.1799T>A)). Im Melanom liegt diese *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutation zu 80% bei Mutationen in diesem Codon vor (Brose et al., 2002; Davies et al., 2002). Weitere weniger häufig vorkommende, ebenfalls Kinase aktivierende Mutationen im *BRAF*-Gen sind p.V600K, p.V600R oder p.K601E (Davies et al., 2002; Guan et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch in den analysierten Genabschnitt keine dieser Anomalien festgestellt werden. Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass bei 60% der untersuchten Melanomzelllinien eine heterozygote *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutation vorlag. In 16% der Zelllinien wurde eine homozygote *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutationen nachgewiesen. Eine ähnliche Verteilung von Hetero- und Homozygotie von *BRAF* V600E (c.1799T>A) wurde schon von Sigalotti und Koautoren in 35 Melanommetastasen beschrieben (Sigalotti et al., 2011). In früheren Expressionsanalysen wurde bisher keine genaue Unterscheidung der mutierten Zellen nach Hetero- bzw. Homozygotie der *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutationen vorgenommen.

Des Weiteren fielen bei den Mutationsanalysen die verschieden stark ausgeprägten Bandenintensitäten der allelspezifischen PCR sowie die unterschiedlich ausgeprägten Amplituden in der Sequenzierung der heterozygoten Zelllinien auf. Diese könnten für das Vorliegen eines Mosaiks innerhalb einer Zelllinie sprechen. Obwohl die Zellen einer Zelllinie Klone und damit nahezu identisch untereinander sein sollten, erwerben sie speziell im Zellkern über verschiedene Passagen zusätzliche Mutationen und chromosomale Veränderungen (Maitra et al., 2005). Ein weiterer Aspekt könnte die intratumorale Heterogenität sein. Die verwendeten Zelllinien wurden aus Tumoren oder Metastasen von Patienten isoliert. Seit Rizos weiß man, dass Melanome eine stark ausgeprägte Tumorerheterogenität besitzen. Diese kann sich zwischen den verschiedenen Metastasen eines Patienten oder sogar innerhalb einer Tumorerläsion ausprägen (intra- bzw. interindividuelle Tumorerheterogenität) (Rizos et al., 2014), sodass isolierte Zellen aus diesen Läsionen ebenso heterogen sein können. So konnten auch aus Metastasen eines Nierenzellkarzinoms tetraploide Chromosomensätze isoliert werden, während der Ursprungstumor einen diploiden aufwies (Gerlinger et al., 2012). Des Weiteren könnten Unterschiede im DNA- und RNA-Status für die unterschiedlichen Bandenintensitäten in der allelspezifischen PCR verantwortlich sein. So können Veränderungen in nicht untersuchten Genabschnitten zu einer Modifikation beispielsweise des Splicens oder zu einem Stopcodon-vermittelten Abbau der mRNA (*NMD - nonsense-mediated mRNA decay*) führen. Um die genaue Genexpression der mutierten Allele des *BRAF*-Gens zu quantifizieren und so ein Mosaik oder eine Hemizygotie zu erkennen, würden sich in Fortsetzung dieser Arbeit molekulargenetische Untersuchungen zur Kopiezahlenanalyse, wie z.B. quantitative PCR, FISH- (*fluorescence in situ hybridization*) und MLPA- (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) Analysen, anschließen müssen.

Weiterhin wurden in den hier untersuchten Melanomzelllinien die drei Codons mit der höchsten Mutationsfrequenz im *NRAS*-Gen analysiert - 12, 13 und 61. Es verfügte eine Zelllinie von 25 über die Koexpression von *BRAF* V600E (c.1799T>A) sowie *NRAS* Q61K (c.181C>A). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass ein simultanes Auftreten von mutiertem *BRAF* und mutiertem *NRAS* im Melanom nahezu ausgeschlossen ist (Bloethner et al., 2005; Edlundh-Rose et al., 2006; Goel et al., 2006). Das gleichzeitige Vorliegen von *BRAF* V600E (c.1799T>A) sowie *NRAS* Q61R (c.182A>G) führte in zuvor untersuchten Zelllinien zu einem Wachstumsstopp durch Aktivierung zellulärer Seneszenz (Petti et al., 2006). In der in dieser Arbeit analysierten Melanomzelllinie konnte jedoch weder bei der Untersuchung der Wachstumsrate noch bei den Analysen zur Zellvitalität eine besonders ausgeprägte langsame Wachstumstendenz erkannt werden. Entscheidend hierbei ist zu erwähnen, dass bei Petti und Koautoren schon nach der zehnten in-vitro-Passage eine Verlangsamung des Wachstums auffiel. Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien lag eine viel höhere Passageanzahl vor, durch die zusätzliche genomische Alterationen begünstigt werden, sodass eine Konstellation zustande kommt, die eben

diese Koexistenz ermöglichen kann. Weiterhin konnte im Gegensatz zu Petti und Koautoren keine duale Aktivierung des MAPK-Kinase-Signalwegs sowie des PI3K-Akt-Signalwegs in dieser Zelle nachgewiesen werden (Petti et al., 2006).

Eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Melanoms stellt vor allem die *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutation dar. Durch die veränderte Molekularstruktur wird die Kinasefunktion von BRAF verändert. Die Aktivität der Kinasedomäne wird hierdurch bis zu 500-fach erhöht und führt so zu einer konsekutiven Aktivierung der nachfolgenden Zieltranskripte des MAP-Kinase-Signalwegs (Davies et al., 2002; Satyamoorthy et al., 2003; Wan et al., 2004) und letztendlich zu einer gesteigerten Stimulation von Proliferations- und Differenzierungsprozessen in der Zelle (McCubrey et al., 2007). Wellbrock und Koautoren zeigten, dass *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutante Zelllinien melanozytären Ursprungs eine circa 5-fach gesteigerte Proliferationsrate besitzen als *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypische Zellen (Wellbrock et al., 2004). Ähnliche Veränderungen in der Zellaktivität wurden in *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zelllinien für Kolon- und Schilddrüsenkarzinome gefunden (Liu et al., 2007; Preto et al., 2008). Im Gegensatz zu diesen Arbeiten konnte in den untersuchten Melanomzelllinien der hier vorliegenden Arbeit weder eine verstärkte Zellvitalität noch eine gesteigerte Proliferationsrate der *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zellen festgestellt werden. Ebenso wurde im Gegensatz zu Wellbrock und Koautoren kein signifikanter Unterschied zwischen *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen und *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zellen im Soft-Agar-Kolonietest ermittelt. Ursache dieser Diskrepanz könnte der Ursprung der verwendeten Zelllinien sein. Wellbrock und Koautoren analysierten Zelllinien melanoblastären Ursprungs und somit noch ursprünglich benigne Zellen (Wellbrock et al., 2004). Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind aus malignen Melanomen isoliert. Während der Entwicklung des malignen Melanoms kommt es zu einer Vielzahl pathologischer Aberrationen, die die Kanzerogenese fördern. Im Jahr 2003 zeigten Pollock und Koautoren, dass circa 80 % der benignen Nevi eine Mutation im *BRAF*-Gen aufweisen (Pollock et al., 2003). Daher scheint die genetische Veränderung *BRAF* V600E (c.1799T>A) zwar ein entscheidender Schritt in der Tumorgenese, jedoch als alleiniger Initiator für die Entstehung des malignen Melanoms nicht hinreichend zu sein. Die verschiedenen molekularen Veränderungen tragen zur Aktivierung der Signalwege im Melanom bei (Glitza und Davies, 2014). Somit kann unabhängig von *BRAF* V600E (c.1799T>A) und dem damit konsekutiv aktivierten MAP-Kinase-Weg die Proliferationsrate und Zellaktivität im Melanom gesteigert sein. *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypische Melanomzellen können daher ebenso einen verstärkten zellulären Metabolismus aufweisen wie die *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Zellen.

Einen entscheidenden Durchbruch in der Behandlung des malignen Melanoms wurde mit dem klinischen Einsatz des selektiven BRAF-Inhibitors Vemurafenib erreicht. In der BRIM-3-Studie wurde ein signifikanter Vorteil von Vemurafenib gegenüber der Standardtherapie mit Dacarbazine im

Bezug auf Ansprechrate, Überlebensrate sowie progressionsfreiem Intervall bei malignen Melanomen mit *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutation ermittelt (Chapman et al., 2011). Einen entsprechenden Effekt des Chemotherapeutikums auf die Zellvitalität wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen. Die meisten der *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zelllinien reagierten mit einer drastischen Reduktion der Zellaktivität unter der Behandlung mit Vemurafenib. Hingegen ließ sich bei den *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen kaum eine Hemmung der Zellaktivität nachweisen. Nur ab der Behandlung mit Konzentrationen von über 3  $\mu$ M Vemurafenib waren erste zellvitalitätshemmende Wirkungen auch bei *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen zu verzeichnen. Durch die Erhöhung der Konzentration von Vemurafenib bei den *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zelllinien zeigte sich zwar eine weitere Hemmung der Proliferation, jedoch war diese bei weitem nicht so stark wie bei der anfänglichen Konzentration von 1  $\mu$ M Vemurafenib. Präklinischen Studien zeigten, dass sich der antiproliferative Effekt von Vemurafenib auf *BRAF* V600 (c.1799T>A)-mutierte Zellen konzentrierte. Damit schien es für die Mehrzahl der malignen Melanome eine spezifische Therapie zu geben (Yang et al., 2010). Hatzivassiliou und Koautoren wiesen nach, dass *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypische Zellen, die eine *KRAS*-Mutation besaßen, unter dem Einfluss von selektiven BRAF-Inhibitoren eine paradoxe Steigerung der Zellproliferationsrate zeigten (Hatzivassiliou et al., 2010). In der hier vorliegenden Arbeit besaß nur die Zelllinie GR-M eine *KRAS*-Mutation, war jedoch wildtypisch für *BRAF* V600 (c.1799T). Unter der Behandlung mit Vemurafenib zeigte diese Zelllinie kein abweichendes Verhalten von den anderen *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen. Insgesamt konnte kein Einfluss des *RAS*-Mutationsstatus auf die Chemosensitivität gegenüber Vemurafenib festgestellt werden. In der Arbeit von Hatzivassiliou und Koautoren wurde jedoch der BRAF-Inhibitor GDC-0879 verwendet, der zwar ebenso selektiv für die mutierte Kinase *BRAF* V600E ist, sich jedoch strukturchemisch von Vemurafenib unterscheidet (Hoeflich et al., 2009; Wong et al., 2009). So könnte diese Strukturverschiedenheit ein Grund für die paradoxe Wirkung des BRAF-Inhibitors bei *RAS*-mutierten Zellen sein. Zu beachten ist weiterhin, dass sowohl bei *BRAF* als auch bei *RAS* nur Mutations-Hotspots analysiert wurden, jedoch nicht die kompletten Gene. Somit sind weitere Mutationen in nicht untersuchten Sequenzbereichen sowie *gene copy number variants* (CNV), komplexere Änderungen und exonüberspannende Deletionen nicht ausgeschlossen sind.

Trotz der vielversprechenden Therapieerfolge von Vemurafenib, weisen viele Patienten nach circa sechs Monaten Behandlung einen Tumorprogress auf (Chapman et al., 2011). Des Weiteren wurde beschrieben, dass circa 20-28 % der mit Vemurafenib behandelten Melanompatienten trotz vorliegender *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutation kein Ansprechen auf die Therapie zeigten (Chapman et al., 2011; Flaherty et al., 2010; Van Allen et al., 2014). Es scheint somit verschiedene Mechanismen zu geben, die eine Resistenz gegen Vemurafenib verursachen. Zum einen entwickelt sich die Resistenz gegen den Inhibitor nach anfänglicher Wirkung (erworbene Resistenz) und zum

anderen liegen bereits intrinsische Resistenzwege vor, die ein Ansprechen von Beginn an verhindern können. Ein weiterer Grund für ein verzögertes Versagen der klinischen Therapie könnte die Selektion der nicht *BRAF* V600E (c.1799T>A)-tragenden Tumorzellen sein. Der Großteil der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zelllinien zeigte eine deutliche Ansprechrate auf die Behandlung mit Vemurafenib. Lediglich bei zwei der *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zelllinien konnte kein signifikanter antiproliferativer Effekt im Vergleich zu den *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen verzeichnet werden. Die errechneten  $IC_{50}$ -Werte für diese Zelllinien waren circa 12-mal so hoch wie die der restlichen *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zellen. Bislang gibt es eine Vielzahl an Erklärungen für die verschiedenen Resistenzmechanismen, die vor allem auf eine Reaktivierung des MAP-Kinase-Wegs oder einer Mehraktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs beruhen (Nazarian et al., 2010; Poulikakos et al., 2011; Villanueva et al., 2010; Wagle et al., 2014). Paraiso und Koautoren zeigten, dass die Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs eine Möglichkeit der intrinsischen Resistenz von *BRAF* V600E (1799T>A)-mutierten Zellen darstellt. Eine entscheidende Rolle hierbei spielt der Tumorsuppressor PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*), der unter normalen Bedingungen, die Dephosphorylierung von AKT fördert und so die Aktivierung von AKT hemmt (Stambolic et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass Zellen, die kein PTEN exprimieren, unter der Behandlung mit Vemurafenib eine gesteigerte Aktivierung von AKT und auch eine deutlich geringere Apoptoserate aufweisen (Paraiso et al., 2011). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Vemurafenib-resistenten *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zelllinien zeigten ebenfalls eine deutlich erhöhte Expression von pAKT unter der Behandlung mit Vemurafenib. Da circa 20 % der Melanome (Van Allen et al., 2014) sowie 44 % der Melanome mit *BRAF* V600E (1799T>A)-Mutation eine *PTEN*-Mutation aufweisen (Hodis et al., 2012), ist es naheliegend, den Mutations- sowie Expressionsstatus von PTEN in diesen Zelllinien in weiterführenden Untersuchungen zu analysieren, um die Ergebnisse von Paraiso und Koautoren zu bestätigen oder gegebenenfalls zu widerlegen. Entscheidend hierbei wäre die Ermittlung von inaktivierenden Mutationen sowie dem Verlust von PTEN, die in Folge zu einem Expressionsdefizit von PTEN führen (Paraiso et al., 2011). Eine weitere Ursache für die Überaktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs im Zusammenhang mit der Resistenz gegenüber BRAF-Inhibitoren ist die vermehrte Expression sowie Phosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), die ihre Signal in das Zellinnere weiterleiten (Fattore et al., 2013; Shi et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Expression von verschiedenen RTKs sowie deren vermehrte Aktivierung Bestandteil der Resistenzentstehung gegenüber Vemurafenib ist. Neben cKIT, cMET und PDGFR $\beta$  scheinen hierbei die Vertreter der ErbB-Familie eine entscheidende Rolle zu spielen (Fattore et al., 2013; Nazarian et al., 2010). Insbesondere die RTK Erbb3 ist an der Resistenzentwicklung beteiligt. Fattore und Koautoren zeigten 2013, dass die Phosphorylierung von Erbb3 nach 24 h Vemurafenib-Behandlung um das 50 bis 100fache in

*BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zellen anstieg. Die erhöhten pErbB3-Level führten in den untersuchten Zellen zu einer gesteigerten Aktivierung von AKT sowie zu einer Abschwächung der Wirkung von Vemurafenib. Ein eingesetzter Antikörper gegen ErbB3 führte zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Phosphorylierung von ErbB3 sowie AKT in Vemurafenib-behandelten Zellen und verstärkte die wachstumshemmende Wirkung von Vemurafenib deutlich (Fattore et al., 2013). Ähnliche Ergebnisse lieferten die Untersuchungen von Abel und Tiwary. Abel und Koautoren zeigten, dass nicht nur der Aktivierungsgrad von ErbB3 unter der Behandlung mit Vemurafenib steigt, sondern auch die mRNA-Level (Abel et al., 2013). Die Analysen von Tiwary und Koautoren konnten darlegen, dass die Höhe der ErbB3-Expressionslevel deutlich mit einer schlechteren Prognose für Patienten korreliert. In einem weiteren Schritt wurde gezeigt, dass ein ErbB3-*knockdown* sowohl in BRAF-Inhibitor-sensitiven als auch in resistenten Zellen zu einer Reduktion von Metastasen führen kann (Tiwary et al., 2014). In diesem Zusammenhang fällt bei den in dieser Arbeit untersuchten Zellen eine Besonderheit im Expressionsmuster der RTKs auf. Die mRNA-Level von *ErbB3* sind vorrangig in den Zellen erhöht, die sensibel auf die Behandlung mit Vemurafenib reagieren. Hingegen die zwei *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zelllinien, die resistent gegenüber Vemurafenib sind, sowie zwei wildtypische *BRAF* V600 (c.1799T)-Zelllinien, die jedoch *RAS*-mutiert sind, weisen eine erhöhte Expression von ErbB1 auf. Es wurde in einer weiteren Arbeit gezeigt, dass es in Vemurafenib-resistenten Melanomzelllinien zu einer verstärkten Aktivierung von ErbB1 kommt. In Folge dessen wird die EGFR-SFR-STAT3-Signal-Achse aktiviert und so eine resistenzfördernde Signaltransduktion initiiert, die vorrangig die Invasivität sowie das Metastasierungspotenzial und weniger die Proliferation der Zellen fördert (Girotti et al., 2013). Weiter wurde nachgewiesen, dass insbesondere die Hochregulierung von ErbB1 sowie dessen Genamplifizierung mit maligner Progression, Metastasierungspotenzial, Tumordicke sowie schlechter Überlebensprognose für Patienten korreliert (Rakosy et al., 2007). In 89% der malignen Melanome sowie in 91% der Metastasen wurden ErbB1-Expressionen nachgewiesen (de Wit et al., 1992). Es wurde postuliert, dass sich die Expression von ErbB1 während der Tumorprogression erhöht (de Wit et al., 1992; Rakosy et al., 2007). Entscheidender Unterschied zwischen den Arbeiten, die eine erhöhte ErbB3-Expression als resistenz-entscheidenden Faktor ansehen und denen, die eine verstärkte ErbB1-Expression als wichtigen Faktor für die Resistenzentwicklung herausstellten, war die unterschiedliche Behandlungsdauer mit Vemurafenib. Die erhöhte ErbB3-Expression wurde bei Zellen gefunden, die circa 24 h unter Inkubation waren (Fattore et al., 2013; Tiwary et al., 2014). Eine verstärkte ErbB1-Expression wurde bei Zellen nachgewiesen, die zwei Monate mit dem Chemotherapeutikum behandelt wurden (Girotti et al., 2013). Letztendlich steht hier die Langzeitentwicklung einer erworbenen Vemurafenib-Resistenz im Vordergrund, wobei die Expression von ErbB3 eher als kurzfristiger, intrinsischer Resistenzmechanismus gewertet werden kann. In beiden Arbeiten wurde die Expression der jeweiligen RTKs nur nach der Behandlung mit

Vemurafenib untersucht und im Gegensatz dazu wurden in der hier vorliegenden Arbeit die basalen Expressionsspiegel der RTKs vor Behandlung mit Vemurafenib analysiert, um mögliche Marker zu eruieren, die schon vor Beginn der Chemotherapie einen prädiktiven Wert für das Ansprechverhalten der Zellen besitzen. Hier heben sich vor allem die Vemurafenib-sensiblen Zellen hervor, deren Mehrheit eine erhöhte Expression von ErbB3 aufweisen - hingegen sich die Mehrheit der resistenten Zellen durch eine erhöhte Expression von ErbB1 kennzeichnen. Gross und Koautoren postulierten im Jahr 2015, dass der basale Expressionsspiegel von ErbB1 ein Marker für die Vorhersage der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Vemurafenib ist und die Aktivierung dieser RTK in einer Untergruppe von Melanomzellen einen entscheidenden Resistenzmechanismus darstellt (Gross et al., 2015). Diese Annahme sollte in weiterführenden Studien noch ergänzend untersucht werden. Hierzu wären zum Beispiel Phosphorylierungs-Assays der untersuchten RTKs vor und nach der Behandlung mit Vemurafenib hilfreich. Weiterhin zeigt die hier vorliegende Arbeit, dass Zellen, die weder eine erhöhte ErbB1- noch ErbB3-Expression aufweisen, verstärkt c-KIT exprimieren. Das legt nahe, dass das RTK-Expressionsmuster der Melanomzellen einen entscheidenden Einfluss auf das Ansprechverhalten der Zellen gegenüber Vemurafenib hat. In welcher Form die Signalwege der einzelnen RTKs im komplexen Zusammenhang stehen und so die Resistenzmechanismen fördern, muss jedoch in nachfolgenden Studien geklärt werden.

Zwei weitere Parameter, die im Zuge der Charakterisierung der 25 Melanomzelllinien in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden, rücken seit einigen Jahren immer mehr in den Fokus der Melanomforschung - MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*) und MIA (*melanoma inhibitory activity*). MITF ist ein Onkogen, das im Melanom häufig amplifiziert ist (Garraway et al., 2005). In verschiedenen Publikationen wurde eine Korrelation der Expression von MITF mit dem Resistenzverhalten gegenüber Vemurafenib beschrieben. So wurde ein erhöhter MITF-Spiegel in Vemurafenib-sensiblen Melanomzellen nachgewiesen, während eine verminderte MITF-Expression in den resistenten Zellen vorlag (Konieczkowski et al., 2014). Die Überexpression von MITF führte in einer Arbeit von Van Allen und Koautoren zu einer 30- bis 80-fachen Erhöhung der IC<sub>50</sub>-Werte von Vemurafenib (Van Allen et al., 2014). In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass die Amplifikation von MITF in Melanomzellen eine erhöhte Sensitivität der Zellen gegenüber Vemurafenib und einem MEK-Inhibitor verursacht. In diesen Zellen wurde eine verminderte Expression von ErbB1 sowie ein komplettes Fehlen der Phosphorylierung von ErbB1 registriert. Ein Verlust der MITF-Expression führte bei den Zelllinien zu einer verstärkten Aktivierung von ErbB1. Diese Zellen erwiesen sich als resistent gegenüber Vemurafenib (Ji et al., 2015). Ähnliche Ergebnisse zeigten ebenso die Arbeiten von Konieczkowski und Koautoren sowie Capaldo und Koautoren (Capaldo et al., 2015; Konieczkowski et al., 2014). Es scheint somit eine enge Beziehung zwischen dem Transkriptionsfaktor MITF und dem ErbB1-Signalweg zu geben, die eine Resistenzentstehung gegenüber Vemurafenib verursacht. Die hier vorliegende Arbeit bestätigt diese. Die vier Zelllinien

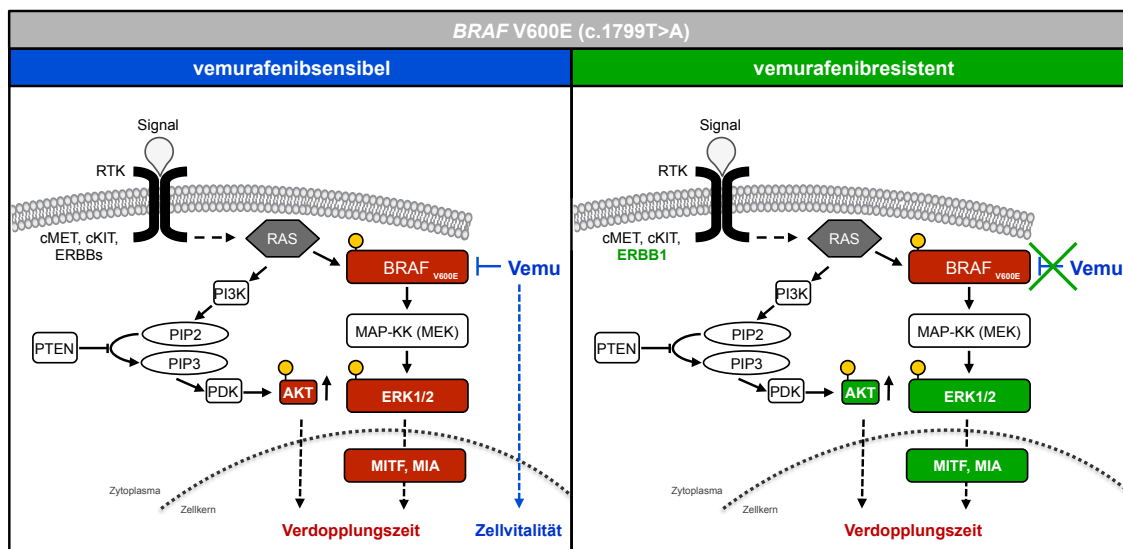


mit einer sehr geringen Expression von MITF stellten die Zellen dar, die als einzige eine erhöhte Expression der RTK ErbB1 aufwiesen. Die restlichen untersuchten Zelllinien waren durch erhöhte MITF-Level gekennzeichnet. Des Weiteren wurde von Capaldo und Koautoren 2015 gezeigt, dass insbesondere das MITF-Expressionslevel vom *BRAF* V600E (1799T>A)-Mutationsstatus abhängt. Die ermittelten MITF-Level waren in *BRAF* V600E (c.1799T>A)-homozygoten Zellen niedriger als in den *BRAF* V600E (c.1799T>A)-heterozygoten Zellen (Capaldo et al., 2015). Die in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten zwei *BRAF* V600E (c.1799T>A)-homozygoten Zelllinien konnten diese Daten nicht bestätigen, jedoch schränkt die geringe Probenzahl (n=2) die Aussagekraft ein.

Inwiefern die Expression von MIA im Zusammenhang mit der Resistenzentwicklung von Melanomzellen gegenüber Vemurafenib steht, ist noch weitgehend unbekannt. Laut der Arbeit von Tatzel und Koautoren fehlt in den Zellen, die MITF exprimieren, die Bildung von MIA (Tatzel et al., 2005). Die in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien zeigen diese Assoziation jedoch nicht. MIA wurde in den Zellen geringer exprimiert, in denen es kaum eine Expression von ErbB3 gab. Ansonsten wiesen nahezu alle Zellen mit MIA-Expression ebenso MITF auf. Des Weiteren wurde MIA als prognostischer Marker im Melanomprogress vorgeschlagen. Hohe MIA-Werte im Serum von Patienten korrelierten mit einem kurzem krankheitsfreien Überlebensintervall sowie mit einer deutlich geringeren Überlebensrate (Sandru et al., 2014). Die Überexpression von MIA scheint eine entscheidende Rolle für die Invasivität sowie das Metastasierungspotential von Melanomen zu spielen (Guba et al., 2000). Schmidt und Koautoren zeigten, dass es durch die funktionelle Hemmung von MIA zu einer verminderten Metastasen-Bildung kommt (Schmidt et al., 2012). MIA könnte somit ebenfalls ein Ansatzpunkt sein, um Melanome erfolgreich zu behandeln. Inwiefern die Expression und Signalübertragung von MIA an der Resistenzentwicklung beteiligt ist, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die mRNA-Expressionen nicht proportional zur Proteinexpression von BRAF und NRAS sowohl in *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten als auch in nicht *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Zellen ist und somit beispielsweise posttranskriptionell verändert sein könnte. Weiterhin konnte belegt werden, dass in *BRAF* V600E (c.1799T>A)-homozygoten Zellen die Verdopplungszeit signifikant erhöht ist, obwohl zugleich die Zellvitalität nicht verändert war.

Abb. 32 schematisiert die verschiedenen Faktoren im MAP-Kinase- und PI3k-AKT-Signalweg, die während der Analysen besonders auffällig waren.



**Abb. 32: Model der auffälligen Komponenten des MAP-Kinase- und PI3K-AKT-Signalwegs in *BRAF V600E (c.1799T>A)*-mutierten Zellen.** Veränderungen in Vemurafenib-sensiblen Zellen sind rot gekennzeichnet und spezifische Auffälligkeiten in Vemurafenib-resistenten Zellen grün.

So ist der Gehalt an phosphoryliertem AKT in Vemurafenib-sensiblen Zelllinien vor der Behandlung im Vergleich zu Vemurafenib-resistenten Zellen höher. Jedoch konnte ein deutlicher Anstieg der Phosphorylierung von AKT nach der Behandlung mit Vemurafenib in den resistenten Zellen festgestellt werden, sodass hier von einer verstärkten Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs durch Vemurafenib ausgegangen werden kann. Ein signifikanter Abfall der Phosphorylierung von ERK konnte nach der Behandlung mit Vemurafenib in den Vemurafenib-sensiblen Zelllinien registriert werden, sowie eine deutliche Reduzierung der Zellaktivität, was die Wirksamkeit von Vemurafenib in *BRAF V600E (c.1799T>A)*-mutierten Zelllinien beweist. Insbesondere die Expression der RTKs ErbB1 und ErbB3 zeigen vielversprechende Ergebnisse im Bezug auf mögliche Resistenzmechanismen. So konnte für das gesamte untersuchte Zelllinienkollektiv nachgewiesen werden, dass ErbB1-exprimierende Zelllinien keine ErbB3-Expression aufweisen und *vice versa*. Ebenfalls ist die Expression von MITF in ErbB1-exprimierenden Zelllinien deutlich vermindert im Vergleich zu den restlichen Zelllinien. Auffällig hierbei ist, dass die Vemurafenib-resistenten Zelllinien eben dieses spezielle ErbB1-Expressionsmuster zeigten, wohingegen MIA, als prognostisch ungünstiger Faktor, in diesen Zelllinien vermindert exprimiert wurde.

MITF, MIA und die RTKs ErbB1 und ErbB3 weisen in der vorliegenden Arbeit ein spezielles Expressionsmuster auf, welches möglicherweise einen Resistenzmechanismus in Melanomzellen begünstigt. Da diese Faktoren nur auf mRNA-Ebene analysiert wurden, sollten sich weitere Untersuchungen insbesondere auf Proteinebene anschließen. Hierzu sind zum einen Analysen zur realen Oberflächenexpression der RTKs sowie ihre Aktivierungsgrade wichtig. Weiterführend könnten spezifische Kinase-inhibierende Antikörper gegen ErbB1 und ErbB3 verwendet werden, um einen möglichen Einfluss auf die Expression von MITF und MIA nachzuweisen, sodass eine eindeutigere Verbindung zwischen den RTKs und den Faktoren MITF und MIA hergestellt werden

kann. In klinischen Studien könnten Proben von Tumorpatienten gewonnen werden und diese im zeitlichen Verlauf unter der Behandlung mit Vemurafenib auf das Vorliegen der verschiedenen RTKs analysiert werden. So könnte ein eventueller Klassen-Switch von ErbB3 zu ErbB1 während der Entwicklung von Resistenzen beurteilt und so als möglicher Resistenzfaktor evaluiert werden. Das könnten zum Beispiel die Basis für die Entwicklung von Screening-Methoden sein, die einen frühzeitigen Wechsel der Therapie anzeigen könnten, wenn sich Resistenzmechanismen bemerkbar machen.

Es bleiben somit noch vielversprechende Ansatzpunkte für weiterführende Analysen offen, die ihre Anwendung nicht nur in der Grundlagenforschung finden, sondern zukünftig auch zum Einsatz im klinischen Gebrauch kommen und zu weitreichenden Veränderungen in der Behandlung von Melanompatienten beitragen könnten.

## 5 Zusammenfassung

Bislang sind die molekularen Vorgänge bei Resistenzmechanismen gegenüber Chemotherapeutika im malignen Melanom noch nicht eindeutig geklärt. Zur Zeit existieren verschiedene Ansätze, die einen Erklärungsversuch zur Entstehung liefern. Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag zum Verständnis der pathologischen Prozesse auf zellulärer Ebene im malignen Melanomen geleistet werden.

Es wurden 25 Melanomzelllinien des Institutes für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg auf molekularbiologischer Ebene analysiert. Zu Beginn wurden die Melanomzellen auf zellbiologische und molekulargenetische Auffälligkeiten untersucht. Hauptaugenmerk lag hierbei vor allem auf den verschiedenen Mutationen der Zelllinien und ihrer spezifischen Zellbiologie und Expressionsmuster. Anhand der ermittelten Daten konnten keine signifikanten Unterschiede der untersuchten zellbiologischen Parameter in Abhängigkeit des *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutationsstatus der analysierten Melanomzellen gefunden werden. In weiteren Analysen der Melanomzellen unter dem Einfluss verschiedener Inhibitoren wurden zellbiologische Expressionsmuster und Zellverhalten untersucht. Hier konnte das bereits bekannte Ansprechen von *BRAF* V600E (c.1799T>A)-mutierten Melanomzellen auf die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Vemurafenib bestätigt werden. Einige Zellen, die trotz dieser *BRAF* V600E (c.1799T>A)-Mutation resistent gegenüber Vemurafenib waren, wiesen ein spezielles Expressionsmuster der untersuchten Rezeptortyrosinkinasen auf. Es konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein des Rezeptors ErbB1 die Expression des verwandten Rezeptors ErbB3 ausschloß. Diese Nihilierung der Koexistenz galt im Umkehrschluss auch für ErbB3. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei fehlender Expression von ErbB3 auch der wichtige prognostische Faktor MIA nur im geringen Maße exprimiert wird. Hingegen besaßen Zellen, die verstärkt die Rezeptortyrosinkinase ErbB1 exprimieren, nahezu keinen Transkriptionsfaktor MITF. Es scheint somit einen unentdeckten Zusammenhang zwischen dem Expressionsmuster von ErbB1 und ErbB3 sowie der Expression von MITF und MIA zugeben. Hier sollten weitere Analysen mit großen Fallzahlen anschließen, um den komplexen Kontext dieser Zieltranskripte im Entstehungsmechanismus der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zu ermitteln. Die in diesem Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit geschaffene Basis für die Charakterisierung der verschiedenen 25 Melanomzelllinien bietet die Möglichkeit für vielversprechende weiterführende Untersuchungen, die zum Verständnis der Kanzerogenese des Melanoms sowie der Resistenzmechanismen gegenüber Vemurafenib beitragen.

## 6 Referenzen

- Abdel-Naser MB (1999). Differential effects on melanocyte growth and melanization of low vs. high calcium keratinocyte-conditioned medium. *The British Journal of Dermatology* *140*, 50-55.
- Abel EV, Basile KJ, Kugel CH, 3rd, Witkiewicz AK, Le K, Amaravadi RK, Karakousis GC, Xu X, Xu W, Schuchter LM, *et al.* (2013). Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. *The Journal of Clinical Investigation* *123*, 2155-2168.
- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, und Walter P: *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. 3. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, 2005, S. 593 ff., S. 773 ff.
- Ascierto PA, McArthur GA, Dreno B, Atkinson V, Liskay G, Di Giacomo AM, Mandala M, Demidov L, Stroyakovskiy D, Thomas L, *et al.* (2016). Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* *17*, 1248-1260.
- Ascierto PA, Schadendorf D, Berking C, Agarwala SS, van Herpen CM, Queirolo P, Blank CU, Hauschild A, Beck JT, St-Pierre A, *et al.* (2013). MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. *The Lancet Oncology* *14*, 249-256.
- Baines AT, Xu D, and Der CJ (2011). Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Medicinal Chemistry* *3*, 1787-1808.
- Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, *et al.* (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of Clinical Oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *27*, 6199-6206.
- Meyers M L, and Balch C M: *Diagnosis and Treatment of Metastatic Melanoma*. In: Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, and Soong SJ (editor): *Cutaneous Melanoma*. Quality Medical Publishing, St. Louis, Missouri, 1998.
- Balch CM, Soong SJ, Atkins MB, Buzaid AC, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A, Jr., Kirkwood JM, *et al.* (2004). An evidence-based staging system for cutaneous melanoma. *CA: A CancerJournal for Clinicians* *54*, 131-149; quiz 182-134.
- Bald T, Quast T, Landsberg J, Rogava M, Glodde N, Lopez-Ramos D, Kohlmeyer J, Riesenberger S, van den Boorn-Konijnenberg D, Homig-Holzel C, *et al.* (2014). Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiogenesis and metastasis in melanoma. *Nature* *507*, 109-113.
- Berenblum I, and Shubik P (1947). A new, quantitative, approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. *British Journal of Cancer* *1*, 383-391.
- Blackburn JS, Liu I, Coon CI, and Brinckerhoff CE (2009). A matrix metalloproteinase-1/protease activated receptor-1 signaling axis promotes melanoma invasion and metastasis. *Oncogene* *28*, 4237-4248.
- Bloethner S, Chen B, Hemminki K, Muller-Berghaus J, Ugurel S, Schadendorf D, and Kumar R (2005). Effect of common B-RAF and N-RAS mutations on global gene expression in melanoma cell lines. *Carcinogenesis* *26*, 1224-1232.
- Bolognia JL, Jorizz JL, Rapini RP, Callen JP, Horn TD, Mancini AJ, Salasche SJ, Schaffer JV, Schwarz T, Stingl G, *et al.*: *Dermatology*. 2nd edition. Mosby Elsevier, 2008, p. 903.
- Bosserhoff AK, Echtenacher B, Hein R, and Buettner R (2001). Functional role of melanoma inhibitory activity in regulating invasion and metastasis of malignant melanoma cells in vivo. *Melanoma Research* *11*, 417-421.
- Boursault L, Haddad V, Vergier B, Cappellen D, Verdon S, Bellocq JP, Jouary T, and Merlio JP (2013). Tumor homogeneity between primary and metastatic sites for BRAF status in metastatic melanoma determined by immunohistochemical and molecular testing. *PloS One* *8*, e70826.
- Breslow A (1970). Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Annals of Surgery* *172*, 902-908.
- Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, Einhorn E, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, *et al.* (2002). BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Research* *62*, 6997-7000.
- Schmid K W, Thomas C, und Büttner R: *Tumoren*. In: Büttner R, und Thomas C (Hersg.): *Allgemeine Pathologie*. Schattauer GmbH, Stuttgart, 2003, S. 181.

- Capaldo BJ, Roller D, Axelrod MJ, Koepfel AF, Petricoin EF, Slingluff CL, Jr., Weber MJ, Mackey AJ, Gioeli D, and Bekiranov S (2015). Systems Analysis of Adaptive Responses to MAP Kinase Pathway Blockade in BRAF Mutant Melanoma. *PLoS One* *10*, e0138210.
- Castellano E, and Downward J (2011). RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes & Cancer* *2*, 261-274.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, *et al.* (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England Journal of Medicine* *364*, 2507-2516.
- Cheung M, Sharma A, Madhunapantula SV, and Robertson GP (2008). Akt3 and mutant V600E B-Raf cooperate to promote early melanoma development. *Cancer Research* *68*, 3429-3439.
- Clark WH, Jr., Ainsworth AM, Bernardino EA, Yang CH, Mihm CM, Jr., and Reed RJ (1975). The developmental biology of primary human malignant melanomas. *Seminars in Oncology* *2*, 83-103.
- Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry Dt, Epstein MN, Greene MH, and Van Horn M (1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathology* *15*, 1147-1165.
- Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, and Mihm MC (1969). The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Research* *29*, 705-727.
- Cohen C, Zavala-Pompa A, Sequeira JH, Shoji M, Sexton DG, Cotsonis G, Cerimele F, Govindarajan B, Macaron N, and Arbiser JL (2002). Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clinical Cancer Research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *8*, 3728-3733.
- Cohen SM, and Ellwein LB (1991). Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. *Cancer Research* *51*, 6493-6505.
- Colombino M, Capone M, Lissia A, Cossu A, Rubino C, De Giorgi V, Massi D, Fonsatti E, Staibano S, Nappi O, *et al.* (2012). BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *Journal of Clinical Oncology* *30*, 2522-2529.
- Cormier JN, Panelli MC, Hackett JA, Bettinotti MP, Mixon A, Wunderlich J, Parker LL, Restifo NP, Ferrone S, and Marincola FM (1999). Natural variation of the expression of HLA and endogenous antigen modulates CTL recognition in an in vitro melanoma model. *International journal of Cancer* *80*, 781-790.
- COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer (August 2014) Cancer Browser. Skin. Online: [http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue#sn=skin&ss=all&hn=malignant\\_melanoma&sh=all&in=t&src=tissue&all\\_data=n](http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue#sn=skin&ss=all&hn=malignant_melanoma&sh=all&in=t&src=tissue&all_data=n) [29.03.2016]
- Crews CM, Alessandrini A, and Erikson RL (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* *258*, 478-480.
- Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Brocker EB, LeBoit PE, *et al.* (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *The New England Journal of Medicine* *353*, 2135-2147.
- Dai DL, Martinka M, and Li G (2005). Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *23*, 1473-1482.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, *et al.* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* *417*, 949-954.
- De Luca M, D'Anna F, Bondanza S, Franzi AT, and Cancedda R (1988). Human epithelial cells induce human melanocyte growth in vitro but only skin keratinocytes regulate its proper differentiation in the absence of dermis. *The Journal of Cell Biology* *107*, 1919-1926.
- de Vries E, Bray FI, Coebergh JW, and Parkin DM (2003). Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *International Journal of Cancer* *107*, 119-126.
- de Wit PE, Moretti S, Koenders PG, Weterman MA, van Muijen GN, Gianotti B, and Ruiter DJ (1992). Increasing epidermal growth factor receptor expression in human melanocytic tumor progression. *The Journal of Investigative Dermatology* *99*, 168-173.
- Edlundh-Rose E, Egyhazi S, Omholt K, Mansson-Brahme E, Platz A, Hansson J, and Lundeberg J (2006). NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Research* *16*, 471-478.
- Eggermont AM, Chiarion-Sileni V, Grob JJ, Dummer R, Wolchok JD, Schmidt H, Hamid O, Robert C, Ascierto PA, Richards JM, *et al.* (2015). Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection

- of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 16, 522-530.
- El Ghissassi F, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, *et al.* (2009). A review of human carcinogens--part D: radiation. *The Lancet Oncology* 10, 751-752.
- Elder DE, Clark WH, Jr., Elenitsas R, Guerry Dt, and Halpern AC (1993). The early and intermediate precursor lesions of tumor progression in the melanocytic system: common acquired nevi and atypical (dysplastic) nevi. *Seminars in Diagnostic Pathology* 10, 18-35.
- Ellerhorst JA, Greene VR, Ekmekcioglu S, Warneke CL, Johnson MM, Cooke CP, Wang LE, Prieto VG, Gershenwald JE, Wei Q, *et al.* (2011). Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clinical Cancer Research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 229-235.
- EMBL-EBI (2016) IPD-ESTDAB. Online: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/estdab/> [10.04.2016]
- EMBL-EBI, and Institute WTS (2016) Browse a Genome. Online: <http://www.ensembl.org/index.html> [15.11.2016]
- European Commission of European Medicines Agency (Januar 2012) Zelboraf. Vemurafenib. Online: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002409/human\\_med\\_001544.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002409/human_med_001544.jsp&mid=WC0b01ac058001d124) [29.03.2016]
- Faller A, und Schünke M: *Der Körper des Menschen*. 14. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2004, S. 740 ff.
- Fattore L, Marra E, Pisanu ME, Noto A, de Vitis C, Belleudi F, Aurisicchio L, Mancini R, Torrisi MR, Ascierio PA, *et al.* (2013). Activation of an early feedback survival loop involving phospho-ErbB3 is a general response of melanoma cells to RAF/MEK inhibition and is abrogated by anti-ErbB3 antibodies. *Journal of Translational Medicine* 11, 180.
- Fernandez-Medarde A, and Santos E (2011). Ras in cancer and developmental diseases. *Genes & Cancer* 2, 344-358.
- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, *et al.* (2010). Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine* 363, 809-819.
- Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, Demidov LV, Hassel JC, Rutkowski P, Mohr P, *et al.* (2012). Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *The New England Journal of Medicine* 367, 107-114.
- Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith AI, and SI K: *Fitzpatrick's Dermatology in general Medicine*. 7th edition. MC Graw Hill Medical Publishing Division, 2003, p. 361 ff., p. 920.
- Friedman RJ, and Rigel DS (1985). The clinical features of malignant melanoma. *Dermatologic Clinics* 3, 271-283.
- Fritsch P: *Dermatologie und Venerologie für das Studium*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2009, S.16.
- Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, and Melchi CF (2005a). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *European Journal of Cancer* 41, 28-44.
- Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, Boyle P, and Melchi CF (2005b). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *European Journal of Cancer* 41, 2040-2059.
- Garbe C, Leiter U, Ellwanger U, Blaheta HJ, Meier F, Rassner G, and Schittek B (2003). Diagnostic value and prognostic significance of protein S-100beta, melanoma-inhibitory activity, and tyrosinase/MART-1 reverse transcription-polymerase chain reaction in the follow-up of high-risk melanoma patients. *Cancer* 97, 1737-1745.
- Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, Beroukhim R, Milner DA, Granter SR, Du J, *et al.* (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 436, 117-122.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, *et al.* (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England Journal of Medicine* 366, 883-892.
- Gesundheitsberichterstattung der Länder (2012) Epidemiologie und Früherkennung häufiger Krebserkrankungen in Deutschland. Online: [http://www.gbe-bund.de/gbe10/ergebnisse.prc\\_tab?fid=15230&suchstring=&query\\_id=&sprache=D&fund\\_typ=TXT](http://www.gbe-bund.de/gbe10/ergebnisse.prc_tab?fid=15230&suchstring=&query_id=&sprache=D&fund_typ=TXT)

- &methode=&vt=&verwandte=1&page\_ret=0&seite=1&p\_lfd\_nr=1&p\_news=&p\_sprachkz=D&p\_uid=gastd&p\_aid=19820446&hlp\_nr=2&p\_janein=J#hk
- Girotti MR, Pedersen M, Sanchez-Laorden B, Viros A, Turajlic S, Niculescu-Duvaz D, Zambon A, Sinclair J, Hayes A, Gore M, *et al.* (2013). Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Discovery* 3, 158-167.
- Glitza IC, and Davies MA (2014). Genotyping of cutaneous melanoma. *Chinese clinical oncology* 3, 27.
- Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, and Haluska FG (2006). Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *The Journal of Investigative Dermatology* 126, 154-160.
- Goetz CA, O'Neil JJ, and Farrar MA (2003). Membrane localization, oligomerization, and phosphorylation are required for optimal raf activation. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 51184-51189.
- Gross A, Niemetz-Rahn A, Nonnenmacher A, Tucholski J, Keilholz U, and Fusi A (2015). Expression and activity of EGFR in human cutaneous melanoma cell lines and influence of vemurafenib on the EGFR pathway. *Targeted Oncology* 10, 77-84.
- Guan J, Gupta R, and Filipp FV (2015). Cancer systems biology of TCGA SKCM: efficient detection of genomic drivers in melanoma. *Scientific Reports* 5, 7857.
- Guba M, Bosserhoff AK, Steinbauer M, Abels C, Anthuber M, Buettner R, and Jauch KW (2000). Overexpression of melanoma inhibitory activity (MIA) enhances extravasation and metastasis of A-mel 3 melanoma cells in vivo. *British Journal of Cancer* 83, 1216-1222.
- Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, Ludlam MJ, Stokoe D, Gloor SL, Vigers G, *et al.* (2010). RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 464, 431-435.
- Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, Rutkowski P, Blank CU, Miller WH, Jr., Kaempgen E, *et al.* (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet Oncology* 380, 358-365.
- Hocker T, and Tsao H (2007). Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Human Mutation* 28, 578-588.
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, *et al.* (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine* 363, 711-723.
- Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, *et al.* (2012). A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 150, 251-263.
- Hoeflich KP, Herter S, Tien J, Wong L, Berry L, Chan J, O'Brien C, Modrusan Z, Seshagiri S, Lackner M, *et al.* (2009). Antitumor efficacy of the novel RAF inhibitor GDC-0879 is predicted by BRAFV600E mutational status and sustained extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway suppression. *Cancer Research* 69, 3042-3051.
- Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, and Herlyn M (1996). Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *The Journal of Investigative Dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research* 1, 188-194.
- Inamdar GS, Madhunapantula SV, and Robertson GP (2010). Targeting the MAPK pathway in melanoma: why some approaches succeed and other fail. *Biochemical Pharmacology* 80, 624-637.
- Institute for Biomedical Research, Rozen S, Remm M, Koressaar T, and Skaletsky H (2012) Primer3. Online: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>
- Ji Z, Erin Chen Y, Kumar R, Taylor M, Jenny Njauw CN, Miao B, Frederick DT, Wargo JA, Flaherty KT, Jonsson G, *et al.* (2015). MITF Modulates Therapeutic Resistance through EGFR Signaling. *The Journal of Investigative Dermatology* 135, 1863-1872.
- Katz M, Amit I, and Yarden Y (2007). Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773, 1161-1176.
- Kong Y, Kumar SM, and Xu X (2010). Molecular pathogenesis of sporadic melanoma and melanoma-initiating cells. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 134, 1740-1749.
- Konieczkowski DJ, Johannessen CM, Abudayyeh O, Kim JW, Cooper ZA, Piris A, Frederick DT, Barzily-Rokni M, Straussman R, Haq R, *et al.* (2014). A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. *Cancer Discovery* 4, 816-827.
- Kwong LN, and Davies MA (2013). Navigating the therapeutic complexity of PI3K pathway inhibition in melanoma. *Clinical Cancer Research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 5310-5319.



- Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, and Avruch J (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358, 417-421.
- Larkin J, Ascierto PA, Dreno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, Mandala M, Demidov L, Stroyakovskiy D, Thomas L, *et al.* (2014). Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *The New England Journal of Medicine* 371, 1867-1876.
- Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA, *et al.* (2013). Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499, 214-218.
- Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E, Pham T, Munroe X, Hoeflich KP, Sliwkowski MX, and Stern HM (2008). A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Research* 68, 5878-5887.
- Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF DKeVuDKeV (01.01.2013) Malignes Melanom. S3-Leitlinie "Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms". Online: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/032-024OL.html> [29.03.2016]
- Lito P, Rosen N, and Solit DB (2013). Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nature Medicine* 19, 1401-1409.
- Liu D, Liu Z, Condouris S, and Xing M (2007). BRAF V600E maintains proliferation, transformation, and tumorigenicity of BRAF-mutant papillary thyroid cancer cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92, 2264-2271.
- Livak KJ, and Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, Garbe C, Jouary T, Hauschild A, Grob JJ, *et al.* (2015). Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet Oncology* 386, 444-451.
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M, und Myrtek D: *Der Experimentator: Immunologie*. 4. Auflage. vollständig überarbeitete und korrigierte Springer-Verlag, Berlin, 2014, S. 199-200.
- Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N, Ikeda M, Stastny V, Kassaei K, Sui G, Cutler DJ, Liu Y, Brimble SN, *et al.* (2005). Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nature Genetics* 37, 1099-1103.
- Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, and Marshall CJ (1997). Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 4378-4383.
- Matallanas D, Birtwistle M, Romano D, Zebisch A, Rauch J, von Kriegsheim A, and Kolch W (2011). Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes & Cancer* 2, 232-260.
- McArthur GA, Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Dummer R, Ribas A, Hogg D, Hamid O, Ascierto PA, *et al.* (2014). Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *The Lancet Oncology* 15, 323-332.
- McArthur GA, Maio M, Arance A, Nathan P, Blank C, Avril MF, Garbe C, Hauschild A, Schadendorf D, Hamid O, *et al.* (2016). Vemurafenib in Metastatic Melanoma Patients with Brain Metastases: An Open-Label, Single-Arm, Phase 2, Multicentre Study. *Annals of Oncology* : official journal of the European Society for Medical Oncology.
- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, *et al.* (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773, 1263-1284.
- Mebratu Y, and Tesfagzi Y (2009). How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 8, 1168-1175.
- Mendoza MC, Er EE, and Blenis J (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in Biochemical Sciences* 36, 320-328.
- Meyers RA: *Cancer From Mechanisms to therapeutic Approaches*. 1st edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, 2007, p. 82 ff., p.161 ff.
- Hauswirth U: *Maligne Tumore*. In: Moll I (Hersg.): *Dermatologie*. 7. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2010, S. 318 ff.
- Nandan MO, and Yang VW (2011). An Update on the Biology of RAS/RAF Mutations in Colorectal Cancer. *Current Colorectal Cancer Reports* 7, 113-120.

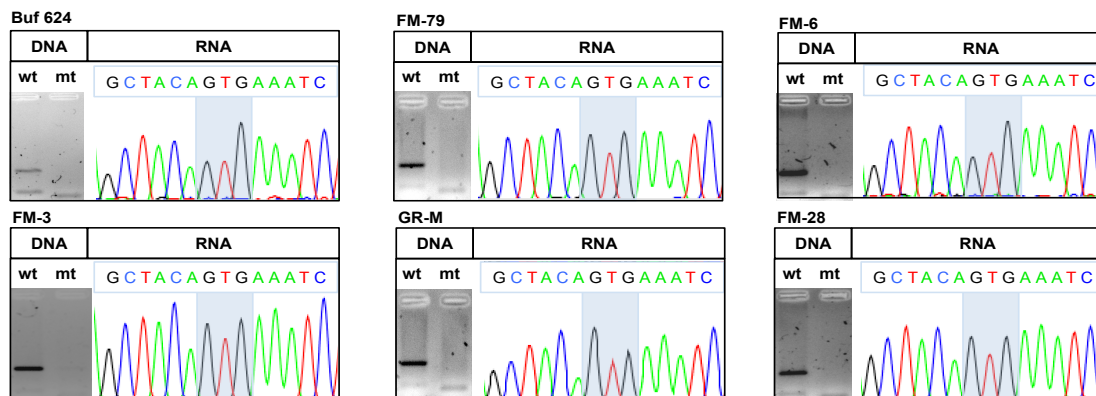
- Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, Chen Z, Lee MK, Attar N, Sazegar H, *et al.* (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* *468*, 973-977.
- Ng YK, Lee JY, Supko KM, Khan A, Torres SM, Berwick M, Ho J, Kirkwood JM, Siegfried JM, and Stabile LP (2014). Pan-erbB inhibition potentiates BRAF inhibitors for melanoma treatment. *Melanoma Research* *24*, 207-218.
- Papin C, Denouel A, Calothy G, and Eychene A (1996). Identification of signalling proteins interacting with B-Raf in the yeast two-hybrid system. *Oncogene* *12*, 2213-2221.
- Paraiso KH, Xiang Y, Rebecca VW, Abel EV, Chen YA, Munko AC, Wood E, Fedorenko IV, Sondak VK, Anderson AR, *et al.* (2011). PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer Research* *71*, 2750-2760.
- Pawelec G, and Marsh SG (2006). ESTDAB: a collection of immunologically characterised melanoma cell lines and searchable databank. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* *55*, 623-627.
- Perna D, Karreth FA, Rust AG, Perez-Mancera PA, Rashid M, Iorio F, Alifrangis C, Arends MJ, Bosenberg MW, Bollag G, *et al.* (2015). BRAF inhibitor resistance mediated by the AKT pathway in an oncogenic BRAF mouse melanoma model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *112*, E536-545.
- Petti C, Molla A, Vegetti C, Ferrone S, Anichini A, and Sensi M (2006). Coexpression of NRASQ61R and BRAFV600E in human melanoma cells activates senescence and increases susceptibility to cell-mediated cytotoxicity. *Cancer Research* *66*, 6503-6511.
- Pitot HC (1996). Stage-specific gene expression during hepatocarcinogenesis in the rat. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* *122*, 257-265.
- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, *et al.* (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature genetics* *33*, 19-20.
- Posch C, and Ortiz-Urda S (2013). NRAS mutant melanoma--undrugable? *Oncotarget* *4*, 494-495.
- Poulidakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, Shi H, Atefi M, Titz B, Gabay MT, *et al.* (2011). RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* *480*, 387-390.
- Pratilas CA, Taylor BS, Ye Q, Viale A, Sander C, Solit DB, and Rosen N (2009). (V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 4519-4524.
- Preto A, Figueiredo J, Velho S, Ribeiro AS, Soares P, Oliveira C, and Seruca R (2008). BRAF provides proliferation and survival signals in MSI colorectal carcinoma cells displaying BRAF(V600E) but not KRAS mutations. *The Journal of Pathology* *214*, 320-327.
- Prior IA, Lewis PD, and Mattos C (2012). A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Research* *72*, 2457-2467.
- Pschyrembel W, Hildebrandt H, und Dornblüth O: Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 257. Auflage. neu bearb. de Gruyter, Berlin, 1994, S. 955.
- Rakosy Z, Vizkeleti L, Ecsedi S, Voko Z, Begany A, Barok M, Krekk Z, Gallai M, Szentirmay Z, Adany R, *et al.* (2007). EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis. *International Journal of Cancer* *121*, 1729-1737.
- Reschke M, Mihic-Probst D, van der Horst EH, Knyazev P, Wild PJ, Hutterer M, Meyer S, Dummer R, Moch H, and Ullrich A (2008). HER3 is a determinant for poor prognosis in melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *14*, 5188-5197.
- Rizos H, Menzies AM, Pupo GM, Carlino MS, Fung C, Hyman J, Haydu LE, Mijatov B, Becker TM, Boyd SC, *et al.* (2014). BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: spectrum and clinical impact. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *20*, 1965-1977.
- Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel JC, Rutkowski P, McNeil C, Kalinka-Warzocha E, *et al.* (2015a). Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *The New England Journal of Medicine* *372*, 320-330.
- Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, Daud A, Carlino MS, McNeil C, Lotem M, *et al.* (2015b). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England Journal of Medicine* *372*, 2521-2532.
- Robert-Koch-Institut ZfKZd (17.12.2015) Datenbankabfrage - Malignes Melanom der Haut (C43). Online: [www.krebsdaten.de/abfrage](http://www.krebsdaten.de/abfrage) [25.03.2016]

- Roumiantsev S, Shah NP, Gorre ME, Nicoll J, Brasher BB, Sawyers CL, and Van Etten RA (2002). Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 10700-10705.
- Sandru A, Panaitescu E, Voinea S, Bolovan M, Stanciu A, Cinca S, and Blidaru A (2014). Prognostic value of melanoma inhibitory activity protein in localized cutaneous malignant melanoma. *Journal of Skin Cancer* 2014, 843214.
- Sanlorenzo M, Choudhry A, Vujic I, Posch C, Chong K, Johnston K, Meier M, Osella-Abate S, Quaglino P, Daud A, *et al.* (2014). Comparative profile of cutaneous adverse events: BRAF/MEK inhibitor combination therapy versus BRAF monotherapy in melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* 71, 1102-1109 e1101.
- Satyamoorthy K, Li G, Gerrero MR, Brose MS, Volpe P, Weber BL, Van Belle P, Elder DE, and Herlyn M (2003). Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Research* 63, 756-759.
- Schadendorf D, Dummer R, Hauschild A, Robert C, Hamid O, Daud A, van den Eertwegh A, Cranmer L, O'Day S, Puzanov I, *et al.* (2016). Health-related quality of life in the randomised KEYNOTE-002 study of pembrolizumab versus chemotherapy in patients with ipilimumab-refractory melanoma. *European Journal of Cancer* 67, 46-54.
- Schmidt J, Riechers A, Stoll R, Amann T, Fink F, Spruss T, Gronwald W, Konig B, Hellerbrand C, and Bosserhoff AK (2012). Targeting melanoma metastasis and immunosuppression with a new mode of melanoma inhibitory activity (MIA) protein inhibition. *PLoS One* 7, e37941.
- Scott GA, and Haake AR (1991). Keratinocytes regulate melanocyte number in human fetal and neonatal skin equivalents. *The Journal of Investigative Dermatology* 97, 776-781.
- SEER: Surveillance E, and End Results Program of the National Cancer (2012) SEER Stat Fact Sheets: Melanoma of the Skin. Online: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html> [12.04.2014]
- Sekulic A, Haluska P, Jr., Miller AJ, Genebriera De Lamo J, Ejadi S, Pulido JS, Salomao DR, Thorland EC, Vile RG, Swanson DL, *et al.* (2008). Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clinic Proceedings* 83, 825-846.
- Shi H, Hugo W, Kong X, Hong A, Koya RC, Moriceau G, Chodon T, Guo R, Johnson DB, Dahlman KB, *et al.* (2014). Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discovery* 4, 80-93.
- Shi H, Kong X, Ribas A, and Lo RS (2011). Combinatorial treatments that overcome PDGFRbeta-driven resistance of melanoma cells to V600EB-RAF inhibition. *Cancer Research* 71, 5067-5074.
- Shi H, Moriceau G, Kong X, Lee MK, Lee H, Koya RC, Ng C, Chodon T, Scolyer RA, Dahlman KB, *et al.* (2012). Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nature Communications* 3, 724.
- Siegenthaler W, und Blum HE: *Klinische Pathophysiologie*. 9. Auflage. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2006, S. 55 ff.
- Sigalotti L, Fratta E, Parisi G, Coral S, and Maio M (2011). Stability of BRAF V600E mutation in metastatic melanoma: new insights for therapeutic success? *British journal of cancer* 105, 327-328.
- Solus JF, and Kraft S (2013). Ras, Raf, and MAP kinase in melanoma. *Advances in Anatomic Pathology* 20, 217-226.
- Spagnolo F, Ghiorzo P, Orgiano L, Pastorino L, Picasso V, Tornari E, Ottaviano V, and Queirolo P (2015). BRAF-mutant melanoma: treatment approaches, resistance mechanisms, and diagnostic strategies. *OncoTargets and Therapy* 8, 157-168.
- Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, and Mak TW (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29-39.
- Tatzel J, Poser I, Schroeder J, and Bosserhoff AK (2005). Inhibition of melanoma inhibitory activity (MIA) expression in melanoma cells leads to molecular and phenotypic changes. *Pigment Cell Research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 18, 92-101.
- The European Bioinformatics Institute (2016) The European Searchable Tumour Line Database (ESTDAB). Online: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/estdab/> [03.07.2016]
- The Skin Cancer Foundation (2014) Beyond the ABCDEs. Online: <http://www.skincancer.org/publications/sun-and-skin-news/late-fall-2014-31-3/beyond> [02.01.2016]

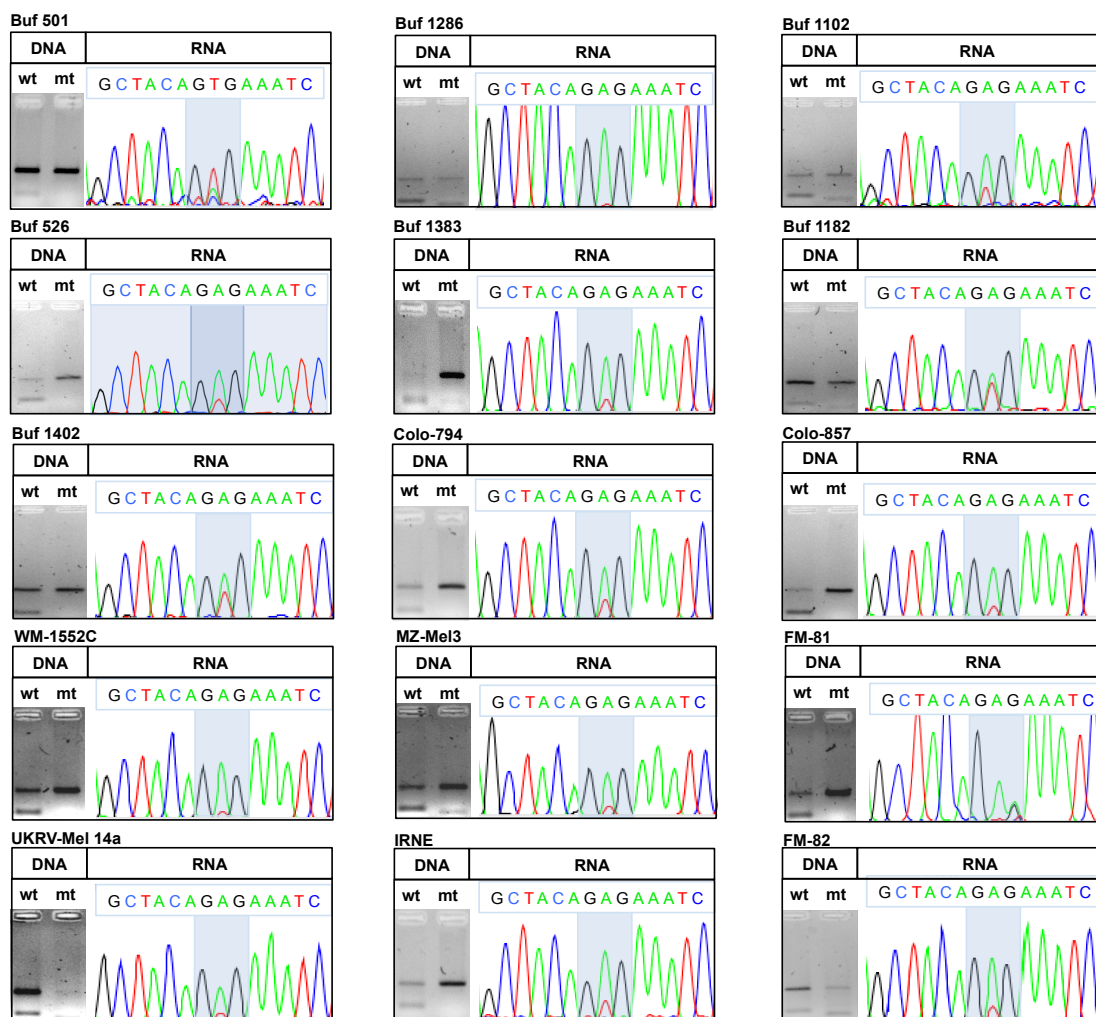
- Thews G, Mutschler E, und Vaupel P: Anatomie Physiologie und Pathophysiologie des Menschen. 5. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1999, S. 751 ff.
- Setzke E, und Nitschiko H: Isolierung von Nukleinsäuren. In: Thieman F, Cullen PM, und Klein H-G (Hersg.): Molekulare Diagnostik. Grundlagen der Molekularbiologie, Genetik und Analytik. 2. Auflage. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2015.
- Tiwary S, Preziosi M, Rothberg PG, Zeitouni N, Corson N, and Xu L (2014). ERBB3 is required for metastasis formation of melanoma cells. *Oncogenesis* 3, e110.
- Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goetz EM, Place CS, Taylor-Weiner A, Whittaker S, Kryukov GV, *et al.* (2014). The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discovery* 4, 94-109.
- Venepureddy A, Thumallapally N, Motilal Nehru V, Atallah JP, and Terjanian T (2016). Novel Drugs and Combination Therapies for the Treatment of Metastatic Melanoma. *Journal of Clinical Medicine Research* 8, 63-75.
- Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, Wubbenhorst B, Xu X, Gimotty PA, Kee D, *et al.* (2010). Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* 18, 683-695.
- Wagle N, Van Allen EM, Treacy DJ, Frederick DT, Cooper ZA, Taylor-Weiner A, Rosenberg M, Goetz EM, Sullivan RJ, Farlow DN, *et al.* (2014). MAP kinase pathway alterations in BRAF-mutant melanoma patients with acquired resistance to combined RAF/MEK inhibition. *Cancer Discovery* 4, 61-68.
- Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, *et al.* (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116, 855-867.
- Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, Pauls K, Thomas N, Schildhaus HU, Heinicke T, Speidel N, Pietsch T, Buettner R, Pink D, *et al.* (2006). Polyclonal evolution of multiple secondary KIT mutations in gastrointestinal stromal tumors under treatment with imatinib mesylate. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 1743-1749.
- Weber GF: Molecular Mechanisms of Cancer. Springer Verlag, Dordrecht (Netherlands), 2007, p. 110 ff.
- Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D, Karasarides M, Martin J, Niculescu-Duvaz D, Springer CJ, and Marais R (2004). V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Research* 64, 2338-2342.
- Wong H, Belvin M, Herter S, Hoeflich KP, Murray LJ, Wong L, and Choo EF (2009). Pharmacodynamics of 2-[4-[(1E)-1-(hydroxyimino)-2,3-dihydro-1H-inden-5-yl]-3-(pyridine-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl]ethan-1-ol (GDC-0879), a potent and selective B-Raf kinase inhibitor: understanding relationships between systemic concentrations, phosphorylated mitogen-activated protein kinase kinase 1 inhibition, and efficacy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 329, 360-367.
- Wortzel I, and Seger R (2011). The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes & Cancer* 2, 195-209.
- Yancovitz M, Litterman A, Yoon J, Ng E, Shapiro RL, Berman RS, Pavlick AC, Darvishian F, Christos P, Mazumdar M, *et al.* (2012). Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E) mutations in primary and metastatic melanoma. *PLoS One* 7, e29336.
- Yang H, Higgins B, Kolinsky K, Packman K, Go Z, Iyer R, Kolis S, Zhao S, Lee R, Grippo JF, *et al.* (2010). RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. *Cancer Research* 70, 5518-5527.

## 7. Anhang

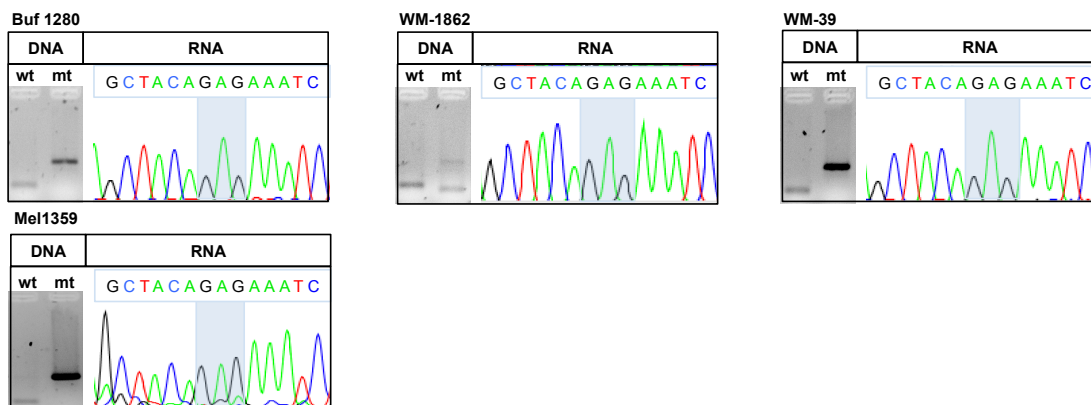
### 7.1 Abbildungen



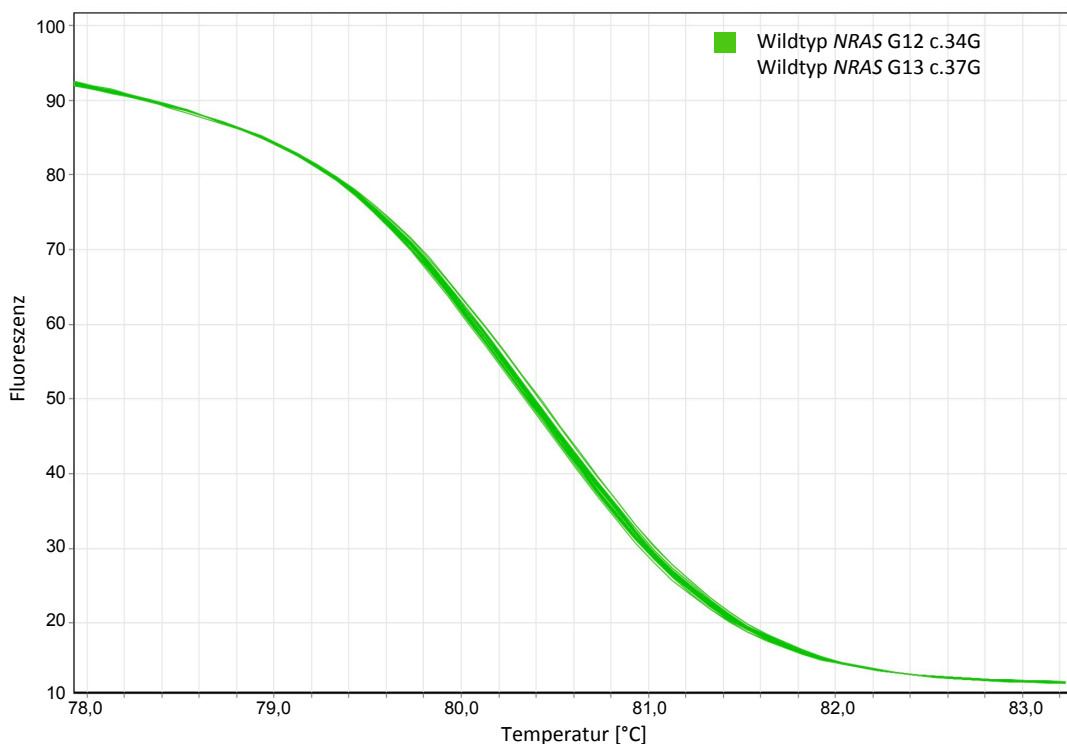
**Abb. A: *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypische Melanomzelllinien.** Analyse der 25 Zelllinien auf DNA- und RNA-Ebene mittels Sequenzierung sowie allelspezifischer PCR. Abbildung der mutationsrelevanten Chromatogrammausschnitte und der auf Agarosegel aufgetragenen PCR-Produkte der allelspezifischen PCR.



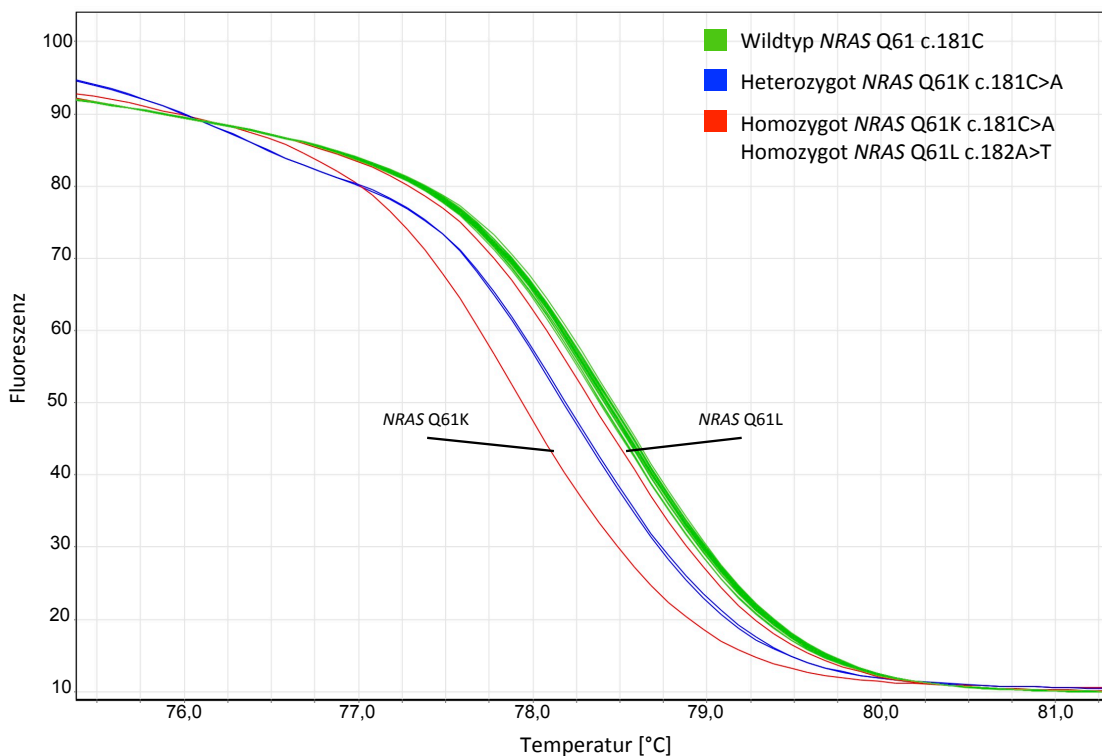
**Abb. B: *BRAF* V600E (c.1799T>A)-heterozygote Melanomzelllinien.** Analyse der 25 Zelllinien auf DNA- und RNA-Ebene mittels Sequenzierung sowie allelspezifischer PCR. Abbildung der mutationsrelevanten Chromatogrammausschnitte und der auf Agarosegel aufgetragenen PCR-Produkte der allelspezifischen PCR.



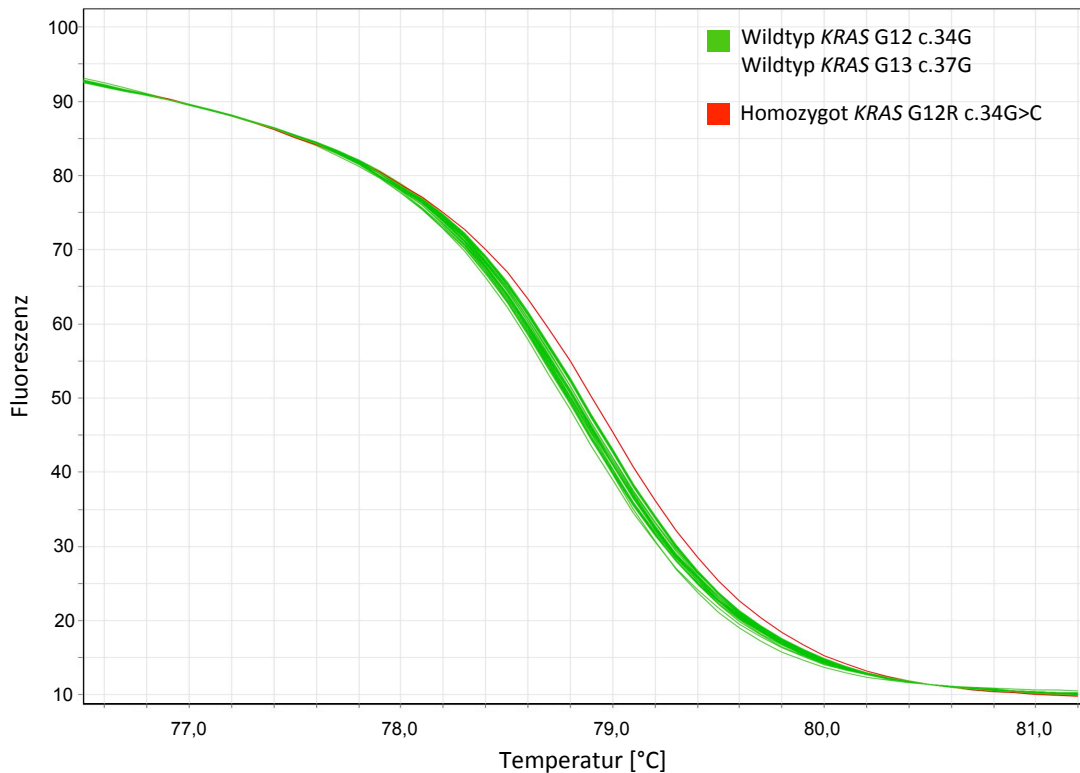
**Abb. C: BRAF V600E (c.1799T>A)-homozygote Melanomzelllinien.** Analyse der 25 Zelllinien auf DNA- und RNA-Ebene mittels Sequenzierung sowie allelspezifischer PCR. Abbildung der mutationsrelevanten Chromatogrammausschnitte und der auf Agarosegel aufgetragenen PCR-Produkte der allelspezifischen PCR.



**Abb. D: HRM-Schmelzkurvenverlauf zur Detektion von Mutationen in den Hotspots NRAS G12 und NRAS G13.** Abgebildet ist der Schmelzkurvenverlauf der 25 Melanomzelllinien. Die Graphen zeigen eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz, sobald die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen wird. Grün = wildtypisch.



**Abb. E: HRM-Schmelzkurvenverlauf zur Detektion von Mutationen im Hotspot NRAS Q61.** Abgebildet ist der Schmelzkurvenverlauf der 25 Melanomzelllinien. Die Graphen zeigen eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz, sobald die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen wird. Die verschiedenen Kurvenverläufe zeigen dabei die verschiedenen Mutationsstatus. **Grün** = wildtypisch, **Blau** = heterozygot, **Rot** = homozygot.



**Abb. F: HRM-Schmelzkurvenverlauf zur Detektion von Mutationen in den Hotspots KRAS G12 und G13.** Abgebildet ist der Schmelzkurvenverlauf der 25 Melanomzelllinien. Die Graphen zeigen eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz, sobald die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen wird. Die verschiedenen Kurvenverläufe zeigen dabei die verschiedenen Mutationsstatus. **Grün** = wildtypisch, **Rot** = homozygot.

## 7.2 Thesen

1. Die Mutation V600E (c.1799T>A) im *BRAF*-Gen ist eine der häufigsten genetischen Veränderung im Melanom.
2. *KRAS* und *NRAS* weisen im Melanom in bestimmten Hotspots ebenfalls eine erhöhte Mutationsfrequenz auf.
3. Melanome besitzen eine ausgeprägte Tumorerheterogenität im molekularen Expressionsmuster und zellbiologischen Verhaltensweisen.
4. Der Mutationsstatus von *BRAF* V600E (c.1799T>A) ist entscheidend für die Chemosensitivität gegenüber Vemurafenib.
5. *KRAS*- und *NRAS*-Mutationen haben keine Auswirkung auf die Chemosensitivität gegenüber Vemurafenib.
6. Durch die Behandlung der Melanomzellen mit Vemurafenib erfolgt in den meisten *BRAF* V600 (c.1799T)-wildtypischen Zellen eine Aktivierung des alternativen Signalwegs PI3K-Akt-Signalweg. Über diese Signaltransduktion können Resistenzmechanismen aktiviert werden, die eine erfolgreiche Therapie mit Vemurafenib verhindern.
7. Das Expressionsmuster der Rezeptortyrosinkinasen ErbB1 und ErbB3 zeigt spezifische Ausprägungen bei Vemurafenib-sensiblen Zellen.
8. Es lassen sich Auffälligkeiten in der Expression des Transkriptionsfaktors MITF und des prognostischen Faktors MIA erkennen.



### **7.3 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Dissertationsarbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt. Die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Mit der vorliegenden Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle (Saale), Juni 2018

Juliane Mech, geb. Kaltenborn

## 7.5 Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name:	Juliane Mech, geb. Kaltenborn
Geburtsdatum:	14.09.1989
Geburtsort:	Halle (Saale)
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Anschrift (privat):	Pfännerhöhe 37, 06110 Halle (Saale)

### Ausbildung

1996 - 2000	Grundschule Diesterweg, Halle (Saale)
2000 - 2008	Kooperative Gesamtschule „Ulrich von Hutten“, Halle (Saale), Abschluss: Abitur
2008 - 2016	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss: Staatsexamen
2009 - 2013	Studentische AG „MSV – mit Sicherheit verliebt“ der Fachschaft Medizin der MLU Halle-Wittenberg, Aufklärungsprojekt im Bereich Sexualität, sexuell übertragbare Erkrankungen und HIV/AIDS
2009 - 2014	BG Kliniken Bergmannstrost Halle, studentische Aushilfskraft
2011 - 2012	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie
03/16 - 12/17	Assistenzärztin im Institut für Radiologie am Martha-Maria Krankenhaus Halle-Dölau
seit 01/18	Assistenzärztin in der Klinik für bildgebende Diagnostik und Interventionsradiologie im BG Klinikum Bergmannstrost Halle
2009 - heute	Anfertigung der Dissertation am Institut für Medizinische Immunologie in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle (Saale), Juni 2018

Juliane Mech, geb. Kaltenborn

## 7.4 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Frau Prof. med. habil. Dr. rer. nat. Barbara Seliger, Leiterin des Instituts für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, und Frau Prof. Dr. med. Katrin Hoffmann, Leiterin des Instituts für Humangenetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben haben, diese Arbeit durchzuführen.

Vielen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die nette Arbeitsatmosphäre und die vielen wertvollen Anregungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Hierbei geht mein besonderer Dank an Katharina Biehl für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Bianca Busch danke ich für die zahlreichen und unermüdlichen Gespräche, Ratschläge und Denkanstöße, die mich auf dem Weg zur fertigen Arbeit immer wieder neue Aspekte entdecken ließen. Auch die vielen nicht-wissenschaftlichen und motivierenden Gespräche haben meine Arbeit unterstützt.

Besonders möchte ich an dieser Stelle auch meiner Familie, hier insbesondere meiner Mama und meinem Freund, für die unermüdliche Stärkung und Motivierung danken, sowie für das stets offene Ohr.