

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie - Plastische  
Operationen  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

In vitro Analyse zum Zusammenhang zwischen dem RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg und  
dem Hedgehog-Signalweg im malignen Melanom

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Zahnmedizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Michelle Blaumeiser  
aus Koblenz

Mainz, 2021

Tag der Promotion: 07.12.2021

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis.....	IX
1. Einleitung .....	1
2. Literaturdiskussion .....	3
2.1 Das maligne Melanom.....	3
2.2 Therapie des malignen Melanoms .....	5
2.2.1 Der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg.....	7
2.3 Der Hedgehog-Signalweg.....	13
2.4 Ziel der Arbeit.....	19
3. Material und Methoden.....	20
3.1 Material.....	20
3.1.1 Zellmaterial.....	20
3.1.2 Verwendete Medien, Chemikalien und Medikamente .....	21
3.1.3 verwendete Geräte.....	22
3.1.4 verwendete Software .....	23
3.2 Methoden.....	23
3.2.1 Zellkultivierung.....	23
3.2.2 Versuchsablauf .....	24
3.2.3 MTT-Assay .....	26
3.2.4 Polymerasekettenreaktion (real-time quantitative PCR).....	27
4. Ergebnisse .....	30
4.1 MTT-Test .....	30
4.1.1 Messwerte insgesamt.....	30
4.1.2 Vergleich der medikamentösen Therapie mit der Kontrollgruppe bei NRAS- mutierten Zellen.....	30
4.1.3 Vergleich der medikamentösen Therapie mit der Kontrollgruppe bei BRAF- mutierten Zellen.....	31
4.1.4 Vergleich der medikamentösen Therapie mit der Kontrollgruppe bei Wildtyp-Zellen .....	32
4.1.5 Vergleich der NRAS-mutierten, BRAF-mutierten und Wildtyp-Zelllinien.....	33
4.2 Auswertung der PCR .....	34
4.2.1 Vergleich der medikamentösen Therapie mit der Kontrollgruppe bei NRAS- mutierten Zellen.....	34

4.2.2 Vergleich der medikamentösen Therapie mit der Kontrollgruppe bei BRAF-mutierten Zellen.....	41
4.2.3 Vergleich der medikamentösen Therapie mit der Kontrollgruppe bei Wildtyp-Zellen .....	46
4.2.4 Vergleich der NRAS-mutierten, BRAF-mutierten und Wildtyp-Zelllinien.....	49
5. Diskussion .....	50
5.1 Beeinflussung der Viabilität der Melanomzellen durch einen Hedgehog-Inhibitor .....	50
5.2 Beeinflussung der Proteine des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweges durch einen Hedgehog-Inhibitor im malignen Melanom .....	52
5.3 Relevanz des Hedgehog-Signalweges für das maligne Melanom.....	54
6. Zusammenfassung .....	56
7. Literaturverzeichnis.....	58
8. Danksagung.....	68
9. Tabellarischer Lebenslauf.....	69

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Adh	Adhesion
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKAP13	A-kinase anchoring protein 13
AKT	Protein kinase B
ATCC	American Type Culture Collection
BCL2	B-cell lymphoma 2
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CCND2	Cyclin D2
CCNE1	Cyclin E1
cDNA	Komplementäre DNA
CNK	Connector enhancer of kinase suppressor of Ras
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
Dhh	Desert Hedgehog
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMA	European Medicines Agency/ Europäische Arzneimittel-Agentur
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FoxO	Forkhead box O
FTI	Farnesyltransferase-Inhibitor
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDC-0449	Vismodegib

GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
Gli	Gli-Zinkfingerprotein
GliA	Gli activator
GliR	Gli repressor
Grb	Growth-factor-receptor-bound-protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HCl	Chlorwasserstoffsäure/ Salzsäure
Hh	Hedgehog
Hhip	Hedgehog interacting protein
HRAS	V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
Ihh	Indian Hedgehog
IQGAP-1	IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1 (Scaffold protein)
K	Kontrollgruppe
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KSR	Kinase suppressor of RAS
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAP3K	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MEK (MAP2K)	Mitogen-activated protein kinase kinase
MORG1	MAPK-organizer 1 (Scaffold protein)
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
MYCN	V-myc avian myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NVP-LDE-225	Sonidegib
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-Waschpuffer
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	Programmed cell death 1
PD-L	PD-Ligand
PDE-delta	Phosphodiesterase, Untereinheit delta
PI3K	Phosphoinositid 3 kinase

PKA	Proteinkinase A
Ptch	Patched
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma protein
RAS	Rat sarcoma protein
RBD	Ras binding domain
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
SOS	Son of sevenless
SUFU	Suppressor of fused
T-Zelle	T(hymus)-Lymphozyt
Tab	Tabelle
TGF-beta	Transforming growth factor-beta
Tis	Tumor in situ
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Vismodegibgruppe
Wildtyp	Hier: BRAF/NRAS-Wildtyp
Wnt	Wnt-Signalweg, Wntless Gen (aus Wingless + Int-1)



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1, Seite 10:

Schematisch vereinfachte Darstellung des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweges, modifiziert nach Montagut und Settleman [40]

Abbildung 2, Seite 14:

Schematisch vereinfachte Darstellung des Hedgehog-Signalweges bei Abwesenheit des Hedgehog-Liganden modifiziert nach Scales und Sauvage [97]

Abbildung 3, Seite 16:

Schematische vereinfachte Darstellung des Hedgehog-Signalweges bei Anwesenheit des Hedgehog-Liganden modifiziert nach Scales und Sauvage [97]

Abbildung 4, Seite 25:

Anordnung der Ansätze der ersten 6-Well-Platte (für PCR)

Abbildung 5, Seite 25:

Anordnung der Ansätze der zweiten 6-Well-Platte (für MTT-Test)

Abbildung 6, Seite 26:

Anordnung der Ansätze der dritten 6-Well-Platte (für MTT-Test)

Abbildung 7, Seite 30:

Boxplots für die vier NRAS-mutierten Zelllinien Ma-Mel-5, UKRV-Mel-15a, MM415 und MM127, jeweils Vismodegibgruppe (rot) im Vergleich zur Kontrollgruppe (grün), signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Vismodegibgruppe der jeweiligen Zelllinie sind mit einem orangenen Balken dargestellt

Abbildung 8, Seite 31:

Boxplots für die drei BRAF-mutierten Zelllinien Ma-Mel-19, Ma-Mel-59a und A375, jeweils Vismodegibgruppe (rot) im Vergleich zur Kontrollgruppe (grün), signifikante

Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Vismodegibgruppe der jeweiligen Zelllinie sind mit einem orangenen Balken dargestellt

Abbildung 9, Seite 32:

Boxplots für die zwei Wildtyp-Zelllinien HS.895.T und Ma-Mel-15a, jeweils Vismodegibgruppe (rot) im Vergleich zur Kontrollgruppe (grün)

Abbildung 10, Seite 34:

Genanalyse für BRAF und NRAS bei der Zelllinie MM415; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 11, Seite 34:

Genanalyse für BRAF und NRAS bei der Zelllinie MM127; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 12, Seite 35:

Genanalyse für BRAF und NRAS bei der Zelllinie UKRV-Mel-15a (UKRV); Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 13, Seite 35:

Genanalyse für BRAF und NRAS bei der Zelllinie Ma-Mel-5; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 14, Seite 36:

Genanalyse für MEK bei der Zelllinie MM415; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 15, Seite 36:

Genanalyse für MEK bei der Zelllinie MM127; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 16, Seite 37:

Genanalyse für MEK bei der Zelllinie UKRV-Mel-15a (UKRV); Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 17, Seite 37:

Genanalyse für MEK bei der Zelllinie Ma-Mel-5; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 18, Seite 38:

Genanalyse für ERK1 und ERK2 bei der Zelllinie MM415; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 19, Seite 38:

Genanalyse für ERK1 und ERK2 bei der Zelllinie MM127; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 20, Seite 39:

Genanalyse für ERK1 und ERK2 bei der Zelllinie UKRV-Mel-15a (UKRV); Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 21, Seite 39:

Genanalyse für ERK1 und EKR2 bei der Zelllinie Ma-Mel-5; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 22, Seite 41:

Genanalyse für BRAF und NRAS bei der Zelllinie Ma-Mel-19; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 23, Seite 41:

Genanalyse für BRAF und NRAS bei der Zelllinie Ma-Mel-59; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 24, Seite 42:

Genanalyse für BRAF und NRAS bei der Zelllinie A375; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 25, Seite 42:

Genanalyse für MEK bei der Zelllinie Ma-Mel-19; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 26, Seite 43:

Genanalyse für MEK bei der Zelllinie Ma-Mel-59; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 27, Seite 43:

Genanalyse für MEK bei der Zelllinie A375; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 28, Seite 44:

Genanalyse für ERK1 und ERK2 bei der Zelllinie Ma-Mel-19; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 29, Seite 44:

Genanalyse für ERK1 und ERK2 bei der Zelllinie Ma-Mel-59; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 30, Seite 45:

Genanalyse für ERK1 und ERK2 bei der Zelllinie A375; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 31, Seite 46:

Genanalyse für BRAF und NRAS bei der Zelllinie HS.895.T; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 32, Seite 46:

Genanalyse für BRAF und NRAS bei der Zelllinie Ma-Mel-15; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 33, Seite 47:

Genanalyse für MEK bei der Zelllinie HS.895.T; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 34, Seite 47:

Genanalyse für MEK bei der Zelllinie Ma-Mel-15; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 35, Seite 48:

Genanalyse für EKR1 und ERK2 bei der Zelllinie HS.895.T; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Abbildung 36, Seite 48:

Genanalyse für ERK1 und ERK2 bei der Zelllinie Ma-Mel-15; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1, Seite 20:

Verwendete Zelllinien (BRAF-mutiert)

Tabelle 2, Seite 20:

Verwendete Zelllinien (NRAS-mutiert)

Tabelle 3, Seite 20:

verwendete Zelllinien (Wildtyp)

Tabelle 4, Seite 21:

Verwendete Medien, Medikamente und Chemikalien

Tabelle 5, Seite 22:

Verwendete Geräte

Tabelle 6, Seite 23:

Verwendete Software

Tabelle 7, Seite 29:

Verwendete Primer

## 1. Einleitung

Etwa 3-5% aller Hauttumore sind maligne Melanome. Trotz der geringen Anzahl ist dieser Tumor für die meisten Todesfälle innerhalb der Hauttumore verantwortlich. Dies hat sich trotz vieler Neuerungen sowohl in der Früherkennung, wobei hier besonders die 2008 eingeführten Screening-Untersuchungen als Leistung der gesetzlichen Krankenkassen anzuführen sind, als auch in der Therapie, besonders im Bereich der targeted therapy bei BRAF-mutierten Melanomzellen sowie im Bereich der Immuntherapie mit CTLA-4- und PD-1-Antikörpern, bislang noch nicht grundlegend verändert. Einer der Hauptgründe dafür ist sicherlich, dass das maligne Melanom zu einer, im Vergleich zu anderen Hautkrebsarten wie beispielsweise dem Basalzellkarzinom, frühen Metastasierung neigt. Auch wenn mit diesen genannten neuen Therapiemethoden bereits wesentliche Fortschritte in der Therapierbarkeit und vor allem auch der Überlebensrate vieler betroffener Patienten erreicht werden konnten, so besteht doch weiterhin die Problematik, dass nur bestimmte Patientenkollektive auf die Therapie ansprechen oder es aufgrund von Resistenzen nach vorübergehender Verbesserung wieder zu einer drastischen Verschlechterung des Zustandes dieser Patienten kommt. Dies ist vor allem mit der Art der Mutation der Melanomzelllinie assoziiert, wobei hier Mutationen in Genen bestimmter Signalwege eine besonders große Rolle spielen.

Als ein wichtiger Signalweg im malignen Melanom ist hier besonders der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg zu nennen. Über die Hälfte aller Melanome trägt eine Mutation im BRAF V600E (ca. 50%) oder NRAS-Gen (ca.15%), weshalb dieser Signalweg im Fokus vieler Forschungen lag. Deshalb existieren speziell für die BRAF-mutierten Melanome bereits Medikamente wie beispielsweise Vemurafenib, die BRAF spezifisch inhibieren. Problematisch ist allerdings auch hier, dass nur Patienten mit einer BRAF-mutierten Melanomzelllinie auf die Therapie ansprechen, sowie, dass sich häufig Resistenzen entwickeln, weshalb diese Medikamente nicht als Monotherapie empfohlen werden. Dies wiederum zeigt, dass weiterhin ein großer Bedarf besteht, die Signalwege innerhalb des malignen Melanoms sowie deren Verknüpfungen genauer zu erforschen.

Ein bereits bekannter und erforschter Signalweg in anderen Malignomen ist der Hedgehog-Signalweg. Benannt nach der Form, welche die Fliegenlarven der

Fruchtfliegenart *Drosophila melanogaster* bei Mutation des Hedgehog-Genes aufweisen, wurde dieser erstmals von Frau Professor Christiane Nüsslein-Volhard und Herrn Professor Eric F. Wieschaus beschrieben. Er spielt sowohl in der Embryonalentwicklung, also auch in der Karzinomentstehung eine wichtige Rolle. Besonders gut untersucht ist er unter anderem im Zusammenhang mit dem Basalzellkarzinom. Es konnten auch Zusammenhänge zu der Entstehung vieler weiterer Malignome wie Gehirn- und Lungentumoren hergestellt werden. Für das fortgeschrittene oder metastasierte Basalzellkarzinom wurde mit Vismodegib 2013 erstmals ein spezifischer Inhibitor dieses Signalweges zugelassen.

Ein Zusammenhang dieses Hedgehog-Signalweges mit dem Wachstum des malignen Melanoms wurde bereits in einigen Studien untersucht, wobei mehrfach ein möglicher Zusammenhang diskutiert wurde. Besonders hervorzuheben ist hier, dass eine mögliche Korrelation zwischen dem vermehrten Auftreten von Komponenten des Hedgehog-Signalweges und einer schlechteren Prognose hergestellt wurde, wodurch dieser sowohl im Hinblick auf die Einschätzung der Prognose als auch auf die Therapie eine wichtige Rolle spielen könnte.

Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, ob sich das Ansprechen der Melanomzelllinien auf den Inhibitor des Hedgehog-Signalweges, Vismodegib, zwischen BRAF-, NRAS- und BRAF-/NRAS-Wildtyp-Melanomzelllinien unterscheidet und somit, ob eine direkte Korrelation zwischen diesen beiden Signalwegen vorherrscht.



## 2. Literaturdiskussion

### 2.1 *Das maligne Melanom*

Das maligne Melanom, umgangssprachlich auch der schwarze Hautkrebs genannt, gehört zu den aggressivsten malignen Hauterkrankungen mit hoher regionaler und Fernmetastasierungsrate [1]. Dies macht das maligne Melanom im Gegensatz zu vielen anderen Hautkrebsarten so gefährlich und führt dazu, dass es trotz seiner im Vergleich zu anderen Hautkrebsarten niedrigen Inzidenz die mit Abstand höchste Mortalität besitzt [2-4].

Trotz verbesserter Vorsorge und Therapiemethoden steigt die Inzidenz weiter an [5]. Im Jahr 2014 war das maligne Melanom der Haut sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen auf Platz 5 der häufigsten Tumorentitäten aller Krebsneuerkrankungen des Jahres in Deutschland (ausgenommen: Nicht-melanotischer Hautkrebs) [4]. Ausgenommen der epithelialen Hauttumore zeigt kein anderer solider Tumor einen Anstieg der Inzidenz in dem Maße, wie es in den letzten Jahrzehnten bei dem malignen Melanom der Fall war [6].

Dabei lag die geschätzte Zahl der Neuerkrankungen 2014 in Deutschland mit 10.910 bei den Männern und 10.310 bei den Frauen im Geschlechtervergleich bei den Männern minimal höher [4]. Zurückzuführen ist dies auf verschiedene Aspekte, unter anderem auf die verminderte Anwendung von Sonnenschutz wie Sonnencreme im Vergleich zu Frauen, auf eine seltenere Überprüfung der Haut, aber auch auf biologische Unterschiede der Melanome [7, 8].

Dieses Verhältnis ist in etwa auch bei den Melanom-assoziierten Todesfällen im Jahr 2014 in Deutschland erkennbar: Hier lag die Anzahl der Sterbefälle bei den Männern bei 1.804 und bei den Frauen bei 1.270 [4].

Vor allem in den ersten Jahren nach der Einführung des Hautkrebs-Screenings als Leistung der gesetzlichen Krankenkassen 2008 ließ sich ein sprunghafter Anstieg der Erkrankungsraten verzeichnen, der höchstwahrscheinlich zu großen Teilen auf die frühere Diagnosestellung durch die Vorsorgeuntersuchungen zurückzuführen ist [9, 10]. Dafür spricht auch, dass im Vergleich vor allem die Inzidenz kleiner Melanome (Tis, T1) zugenommen hat [9, 10]. Als weitere Gründe für den Anstieg der

Erkrankungsraten werden die demographische Alterung der Gesellschaft und die Veränderung der Freizeitgewohnheiten wie das vermehrte Bräunen in der Sonne und der Besuch von Solarien angenommen, wobei besonders häufiger Sonnenbrand als großer Risikofaktor gilt [7, 9, 11, 12].

Durch eine hohe Dosis an ultravioletter Strahlung bedingt, welche vor allem für hellhäutige Menschen gefährlich ist, kommt es zu einer malignen Transformation von Melanozyten und somit im Weiteren zur Entstehung eines malignen Melanoms [12].

In Versuchen mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass sowohl UVB als auch UVA mit der Entstehung von Melanomen assoziiert sind, aber auch andere Risikofaktoren wie familiäre genetische Prädisposition eine Rolle spielen [11]. Durch diese Entwicklung der vermehrten Sonnenexposition hat sich auch die Lokalisation des malignen Melanoms verändert: Immer häufiger werden Melanome auch an Stellen gefunden, an denen sie früher im Normalfall nicht auftraten.

Nichtsdestotrotz können auch positive Entwicklungen in Bezug auf die Therapie und vor allem auch die Prognose der Patienten verzeichnet werden: Aufgrund der häufig frühen Detektion des Melanoms können viele Läsionen bereits in einem Frühstadium therapiert werden, was mit einer sehr guten Prognose einhergeht [13]. Aber auch für das inoperable metastasierte Melanom konnten neue Entwicklungen die Überlebensrate signifikant steigern: Lag früher die mediane Überlebensdauer zwischen acht und zwölf Monaten, so liegt sie mittlerweile dank neuer Entwicklungen wie Checkpoint-Inhibitoren bei über 24 Monaten [14]. Erfreulicherweise ist auch die Sterblichkeit im Gegensatz zur Inzidenz in den letzten Jahrzehnten kaum angestiegen, allerdings auch nicht zurückgegangen [2, 9]. Dementsprechend können eine langfristige Kontrolle und Beschwerdefreiheit für viele Patienten vor allem mit Metastasen trotz dieser positiven Tendenzen häufig nicht erreicht werden.

## **2.2 Therapie des malignen Melanoms**

Im Januar 2017 erschien die 8. Fassung der AJCC-Klassifikation, welche laut der S3-Leitlinie „Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms“ auch „Standard für die histopathologische Befundung des malignen Melanoms“ [6] sein soll. Die überarbeitete Form beinhaltet nun eine wesentlich feinere Einteilung auch innerhalb der einzelnen Klassifikationsnummern, welche eine wichtige Rolle für die Therapieentscheidung spielen.

Besteht der begründete Verdacht auf ein malignes Melanom, wird primär eine komplette Exzision mit kleinem Sicherheitsabstand empfohlen, um einerseits die histologische Begutachtung des Gesamttumors zu ermöglichen, andererseits aber das spätere Auffinden des Wächterlymphknotens nicht zu erschweren [6, 15, 16]. Dies dient vor allem der Diagnose des malignen Melanoms, sowie der T-Klassifikation des Tumors und gibt einen Anhaltspunkt, inwiefern eine weitere Behandlung, z.B. eine Lymphknotenentfernung, notwendig ist [17, 18]. Im Regelfall wird zur kurativen Intervention ein Sicherheitsabstand von 1-2cm je nach Größe und Ausbreitung des Primärtumors (Stadium pT1,pT2 sowie Tumordicke nach Breslow  $\leq 1-2$ mm: 1cm, Stadium pT3,pT4 und Tumordicke nach Breslow 2,01->4,00mm: 2cm) mit einer Exzision bis in das subkutane Fettgewebe empfohlen [6, 19, 20]. Sowohl Patienten mit einem kleinen Befund (T1), als auch besonders in frühen Stadien mit einem schnellen Behandlungsbeginn scheinen eine bessere Prognose zu haben [21].

Unabhängig von Größe und anderen Faktoren ist ein histologisches Staging sowie eine Ganzkörperuntersuchung obligat. Zudem ist ab Stadium Ib eine Lymphknoten-Sonographie sowie gegebenenfalls zusätzlich eine Bestimmung des Tumormarkers S100B empfehlenswert [6, 22, 23]. Eine Wächterlymphknotenbiopsie sollte ab einer Tumordicke von 1,0mm oder bei dünneren malignen Melanomen mit Risikofaktoren wie Ulzerationen, erhöhte Mitoserate oder einem jungen Alter durchgeführt werden [6, 24]. Sie ist ein wichtiger prognostischer Faktor, da ein positiver Wächterlymphknoten mit einer signifikant schlechteren Prognose korreliert [25-27]. In diesem Fall kann eine therapeutische Lymphknotenadenektomie besonders bei großem Metastasendurchmesser sinnvoll sein [25, 28].

Ab Stadium IIC und höher werden zudem weiterführende Untersuchungen wie Schnittbildgebungen empfohlen. Primär ist immer eine R0-Resektion anzustreben, wenn diese allerdings nicht erreichbar ist und auch mit einer Nachresektion nicht erreichbar wäre, ist der Einsatz von anderen lokalen Therapiemaßnahmen angeraten [6].

Bei nicht R0-resezierbaren Melanomen, besonders Lentigo-maligna-Melanomen mit ungünstiger Lage, oder bei inoperablen R1 und R2-Melanomen besteht die Möglichkeit einer Radiotherapie [29, 30]. Als adjuvante Maßnahme wird diese bei drei befallenen Lymphknoten, Kapseldurchbruch, einer Lymphknotenmetastase >3cm oder einem lymphogenen Rezidiv angeraten [6, 31].

Eine weitere mögliche adjuvante Therapie ab Stadium IIA ist die Interferon-alpha-Therapie [32, 33]. Eine Interferon-alpha-Therapie kann größtenteils über indirekt immunmodulierende Effekte zu einem verlängerten rezidivfreien Überleben führen, sowie einen geringen, aber signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben haben [6, 34].

Ab Stadium III sollte je nach genetischem Profil des Tumors eine anti-PD1-Antikörper-Therapie oder bei einer V600E- oder V600K-Mutation eine Therapie mit einem BRAF- und einem MEK-Inhibitor angeboten werden [6, 35, 36]. Bei PD-1 handelt es sich um einen Immun-Checkpoint, welcher besonders auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird und bei Bindung des Liganden PD-L, der sich unter anderem auf Tumorzellen befinden kann, die T-Zell-Aktivierung unterdrückt [37]. Durch die Expression des PD-Liganden haben Tumore die Möglichkeit, die Immunantwort herunterzuregulieren und somit eine Immunsuppression in der Umgebung des Tumors hervorzurufen [38]. Eine Therapie mit einem monoklonalen PD-1-Antikörper wie Nivolumab und Pembrolizumab verhindert diese Interaktion, wodurch bei adjuvanter Gabe ein längeres progressionsfreies Überleben und bei alleiniger Gabe ein verlängertes medianes Gesamtüberleben sowie Stand 2019 bereits ein verbessertes 3-Jahres-Gesamtüberleben im Vergleich zu Dacarbazin festgestellt werden konnte [35, 39]. Da der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg Gegenstand dieser Arbeit ist, wird im nachfolgenden Abschnitt näher darauf eingegangen.

### 2.2.1 Der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg

Bei dem RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg handelt es sich um einen MAP-Kinase-Weg, bei dem ein extrazelluläres Signal durch eine Kaskade von Signalen intrazellulär bis in den Zellkern weitergeleitet wird [40]. Dieser wird auch ERK (extracellular signal-regulated kinase)-Kaskade genannt. Die Aktivierung hat Einfluss auf die Zellproliferation und das Zellüberleben sowie das Zellwachstum und die Differenzierung [41, 42]. In den Fokus der Forschungen ist dieser Signalweg vor allem geraten, da er stark mit der Entstehung von Tumoren wie dem malignen Melanom assoziiert ist [43]. Circa 50-70% aller malignen Melanome bei Kaukasiern weisen eine Mutation im BRAF auf, sowie circa 15(-30%) im NRAS [43, 44]. Damit sind über zwei Drittel der Melanome in ihrer Entstehung mit diesem Signalweg assoziiert, weshalb dieser bei der Therapie einen erfolgsversprechenden Angriffspunkt darstellt.

Ein MAP-Kinase-Signalweg ist allgemein aus drei Bausteinen aufgebaut: Eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K), eine MAP-Kinase-Kinase (MAP2K) und eine MAP-Kinase (MAPK) [40]. MAP-Kinase steht dabei für mitogen-activated-protein Kinase [40]. In diesem Fall handelt es sich bei der MAP3K um RAF, bei der MAP2K um MEK und bei der MAPK um ERK [45]. Der Signalweg kann durch verschiedene Substanzen aktiviert werden, wie beispielsweise durch Wachstumsfaktoren oder Hormone. Typischerweise stellt eine Rezeptortyrosinkinase wie beispielsweise EGFR die Verbindung zwischen dem Extra- und dem Intrazellularraum dar [40]. Die phosphorylierten Tyrosinreste einer aktivierten Rezeptortyrosinkinase dienen nun intrazellulär als Andockstelle für Grb2 (growth-factor-receptor-bound-protein), welches mit seiner SH2-Domäne mit diesen phosphorylierten Tyrosinresten interagiert [46]. Die SH3-Domäne des Grb2 hingegen kann mit dem SOS (son of sevenless)-Protein in Interaktion treten [46]. Bei SOS handelt es sich um einen GTP-Austauschfaktor (Guanine nucleotide exchange factor (GEF)), welcher bei dem G-Protein RAS einen Austausch von GDP zu GTP induziert [45]. Dadurch wird das inaktive RAS in seine aktive, GTP-gebundene Form überführt [46]. Bei RAS handelt es sich um eine kleine GTPase, welche als molekularer Schalter agiert [47]. Es existieren drei Isoformen von RAS: HRAS, NRAS und KRAS [48]. Während NRAS-Mutationen in malignen Melanomen keine Seltenheit sind, werden Mutationen in HRAS und KRAS kaum beschrieben [43]. KRAS-Mutationen treten allgemein in Tumoren allerdings sogar

häufiger als NRAS-Mutationen auf und sind unter anderem in den für viele Todesfälle verantwortlichen Tumoren der Lunge, des Darms und des Pankreas zu finden [41, 49].

RAS ist Plasmamembran-gebundenes Protein, welches allerdings auch auf intrazellulären Membranen wie dem Golgi-Apparat oder dem endoplasmatischen Retikulum vorkommt [48]. Die Plasmamembranbindung geschieht durch Isoprenylierung [50].

Das aktivierte RAS ist in der Lage mit RAF über die RAS-binding-Domain (RBD) von RAF zu interagieren. Dabei ist höchstwahrscheinlich nicht die Interaktion selbst, sondern die dadurch bedingte Lageveränderung von RAF an die Plasmamembran der entscheidende Faktor [42]. Bei RAF handelt es sich um die erste Kinase im MAP-Kinase-Weg. Es existieren 3 Formen: ARAF, BRAF und CRAF (auch RAF-1) [48]. Besonders die BRAF-Form ist dabei vergleichsweise häufig mutiert, wobei in bis zu 90% der Fälle eine Mutation in V600E im Aktivierungssegment der Kinase betroffen ist, wo es zu einer Substitution von Valin zu Glutaminsäure kommt [41, 51].

Ohne Aktivierung durch RAS liegt das inaktive RAF in einem autoinhibierten Zustand vor, bei dem die N-terminale Region die katalytische Domäne unterdrückt [52]. Durch die Bindung von RAS wird neben der Lokationsveränderung eine Dimerisierung induziert, wobei sowohl Homo- als auch Heterodimere entstehen können [52]. Dieser Schritt ist essenziell für einen physiologischen Ablauf des Signalweges [53]. Beachtenswert ist hier, dass Heterodimere eine höhere Kinaseaktivität zeigen als Homodimere [54]. Für die katalytische Aktivierung von RAF muss dieses an 3 Stellen phosphoryliert werden [52].

Der MAP-Kinase-Weg ist eingebettet in ein Gerüst aus Proteinen (Scaffold Proteins), die RAF mit den weiteren Komponenten des Signalweges verbinden [52]. Zu diesen Gerüstproteinen gehören CNK, SUR-8,  $\beta$ -arrestin, paxillin, MORG1, AKAP13 und IQGAP1 [52].

Ein wichtiges Protein ist auch der Kinase suppressor of RAS (KSR), über dessen Rolle in der Literatur unterschiedliche Auffassungen herrschen und die noch nicht abschließend geklärt ist. Einige Autoren sind der Meinung, dass es sich um ein Scaffold Protein handelt, welches den Ablauf des Signalweges vereinfacht, aber höchstwahrscheinlich für diesen nicht zwingend notwendig ist [55]. Andere Autoren

vertreten die Auffassung, dass KSR nicht alleine eine passive Gerüstfunktion ausübt, sondern aktiv die katalytische Aktivität von RAF steigert [50]. Vielfach belegt ist jedoch, dass es eine wichtige Rolle innerhalb des Signalweges spielt [45, 56, 57]. Es existieren zwei Formen in menschlichen Zellen (KSR1 & KSR2), welche beide eine starke sequentielle Homologie zu RAF aufweisen [42].

Das aktivierte und dimerisierte RAF ist in der Lage, beide Formen von MEK (MEK1 und MEK2) zu phosphorylieren und damit zu aktivieren [58]. Hierzu bildet es gemeinsam mit MEK und KSR einen Komplex, wobei es Hinweise gibt, dass sowohl RAF als auch MEK stimulierend auf diesen Schritt einwirken können [56, 57]. Das aktivierte MEK ist seinerseits in der Lage wiederum über Phosphorylierung ERK1 und ERK2 zu aktivieren [41]. ERK selbst ist in der Lage mit verschiedensten Proteinen wie beispielsweise zytoplasmatischen, nukleären, Membran- oder auch Signalproteinen zu interagieren, wodurch ein breit gefächertes Wirkungsspektrum von ERK entsteht und ERK multiple unterschiedliche zelluläre Antworten hervorrufen kann [59]. Ünal et al. listen im Jahre 2017 659 direkte ERK-Targets, insgesamt sogar über 2500 [59]. Als wichtige Targets werden beispielsweise der Zellzyklus, die Apoptose, TGF-beta signalling, PI3K-Akt signalling, Ras signalling, FoxO signalling, Focal adh., ErbB signalling, MAPK signalling, mTOR signalling und Insulin signalling genannt [59].

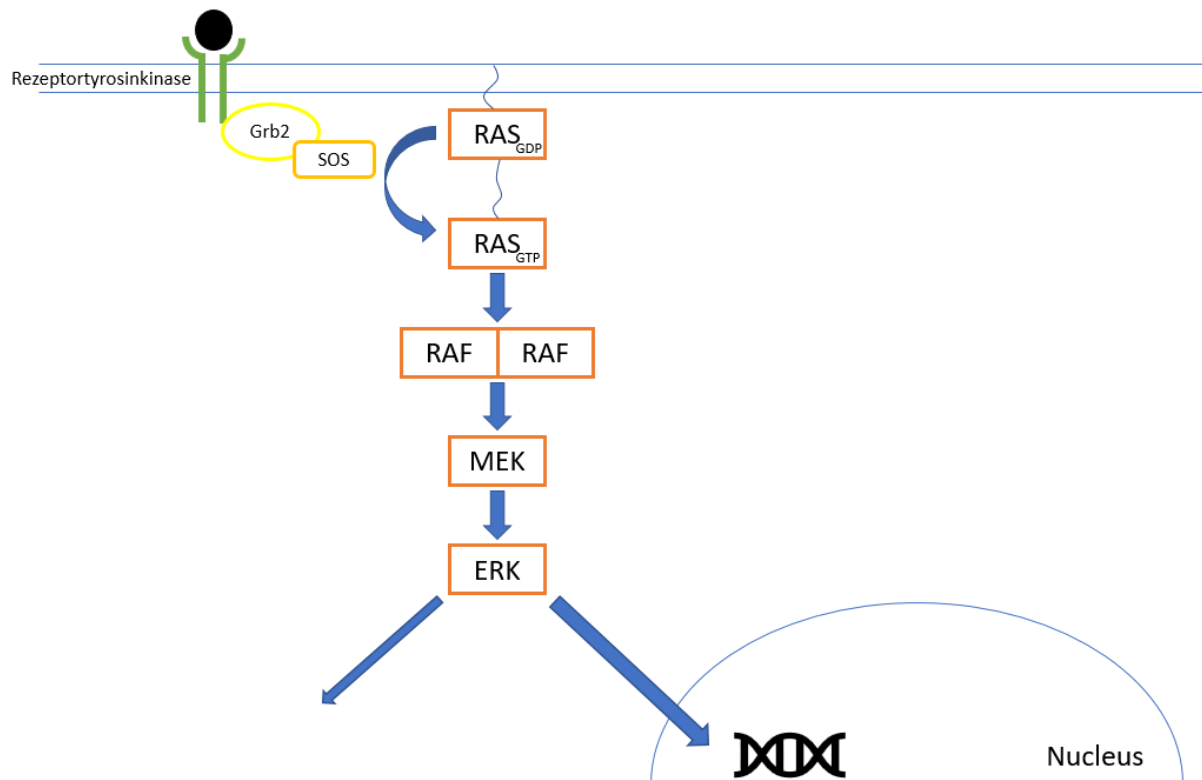


Abb. 1: Schematisch vereinfachte Darstellung des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweges, modifiziert nach Montagut und Settleman [40]

Aufgrund dieser vielfältigen Auswirkungen auf unterschiedlichste Proteine ist es nicht verwunderlich, dass der ERK-Signalweg eine wichtige Rolle innerhalb der Zelle spielt und deshalb einer der am besten untersuchten Signalwege ist. Die Kinasen der RAF-Familie waren unter den Ersten, die vor über 30 Jahren als Onkoproteine beschrieben worden sind [52]. Nachdem deutlich wurde, dass dieser Signalweg in vielen Tumorarten überaktiviert ist, wurde er als Ziel von targeted therapies und die entsprechende Entwicklung von Checkpoint-Inhibitoren interessant [41].

Dabei war RAS das erste Protein, welches in den Fokus der Forschungen geriet, da Mutationen in diesem Gen mit 33% aller menschlichen Krebsformen assoziiert sind, wobei KRAS mit ca. 21,6% Mutationen in allen menschlichen Krebsformen die am häufigsten mutierte Isoform von RAS ist, gefolgt von NRAS (8%) und HRAS (3,3%) [49]. Durch die Mutation bleibt GTP lange gebunden und RAS somit fast dauerhaft aktiviert [41, 60].

Aufgrund von Studien, die auf eine hohe Affinität von RAS zu GTP und fehlende allosterische Regulierungsstellen, an die die kleinen Inhibitormoleküle binden könnten,



hinwiesen, waren Forschungen, die RAS direkt anzielen, zunächst nicht von Erfolg gekrönt [60]. Versuche, die Farnesylierung von RAS mit Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTIs) zu unterbinden, waren aufgrund der Modifikation einer Geranylgeranyltransferase bei RAS (abgesehen von HRAS) wenig erfolgreich [61, 62]. Es bestehen allerdings Hinweise darauf, dass eine Modifikation der FTIs bessere Erfolge bei KRAS bringen könnte [62]. Spätere Studien fokussierten das Prenylbindende Protein PDE-delta (Phosphodiesterase 6, Untereinheit Delta), welches die Bindung von RAS an die Zellmembran unterstützt [63]. In diesem Zuge entdeckte Moleküle sind in der Lage mit diesem Protein zu interferieren, wodurch in Labortests die Aktivierung verhindert und die Lokalisation von KRAS verändert wird [64].

Eine weitere Möglichkeit ist das Anzielen des SOS-RAS-Komplexes. Da SOS für den Austausch von GDP zu GTP bei RAS und damit für dessen Aktivierung verantwortlich ist, soll die Interaktion dieser beiden Moleküle verhindert werden [65]. Aufgrund der geringen Größe der Bindungsstelle ist allerdings die Affinität zum Erreichen von klinisch relevanten Ergebnissen noch zu verbessern [41]. Vielversprechend erscheint das selektive Anzielen von der Cystein-Mutation im Codon 12, wodurch ganz spezifisch RAS(G12C) angesteuert werden kann [66]. Zur klinisch bestätigten effektiven Inhibition von RAS besteht allerdings weiterhin Forschungsbedarf.

Im Gegensatz dazu existieren für RAF bereits klinisch erprobte und zugelassene Inhibitoren. Das wichtigste Target ist dabei BRAF, da es sich bei diesem um die am häufigsten mutierte Isoform im malignen Melanom handelt [43]. Fast immer findet sich dabei eine Mutation in V600E (74-90%), seltener in V600K (16-29%) [43, 51]. BRAF besitzt eine hohe basale Aktivität, wodurch bereits eine Mutation ausreichend ist, um dieses in ein starkes Onkogen zu konvertieren [67]. Deshalb begann man nach dieser Erkenntnis mit der Entwicklung von spezifischen BRAF(V600E)-Inhibitoren. Der erste RAF-Inhibitor, dessen Phase-3-Ergebnisse bei metastasiertem Melanom positiv ausfielen und welcher darauffolgend zugelassen wurde, war Vemurafenib, kurz darauf gefolgt von Dabrafenib [41]. Anders als zunächst aufgrund von in vitro-Ergebnissen angenommen wirken beide in vivo hauptsächlich nur auf BRAF(V600E)-Mutationen, nicht aber gleichermaßen auch auf BRAF-Wildtyp oder CRAF [68].

Auch wenn die Inhibitoren in vivo gute Ergebnisse zeigen, bestehen zwei große Probleme: Zum einen musste man feststellen, dass es bei der Gabe von diesen bei

einigen Patienten zu einer paradoxen Aktivierung des MAPK-Signalweges kam, sowie zum anderen, dass sich Resistenzen entwickelten, wodurch die Inhibitoren unwirksam wurden.

Während zwar das progressionsfreie Überleben der Patienten im Vergleich zu einer Therapie mit Dacarbazin verlängert war, kam es doch trotz der primären Regression im weiteren Verlauf zu einem Fortschreiten des Tumorwachstums [69, 70]. Dies scheint auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen zu sein: Die MAPK-Reaktivierung beispielsweise durch weitere Mutationen oder alternatives Splicing, die Hochregulierung anderer Signalwege wie des PI3K/PTEN/AKT-Signalweges und die Tumorheterogenität werden dabei als wichtige Faktoren beschrieben [70, 71].

Die paradoxe Aktivierung des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweges durch einen BRAF-Inhibitor manifestiert sich in BRAF-Wildtyp-Zellen [72]. Bei einigen Patienten wurde das Wachstum von kutanen Plattenepithelkarzinomen und Keratoakanthomen unter der Gabe von BRAF-Inhibitoren beobachtet, in weiteren Studien auch Wachstum von anderen Krebsarten wie der RAS-mutierten Leukämie [71, 73]. Aufgrund der hohen Inzidenz von RAS-Mutationen in diesen Tumorformen wurde deshalb vermutet, dass durch die Inhibitorgabe das Wachstum von Tumoren, welche eine RAS-Mutation aufweisen, beschleunigt wird [43, 71]. Neuste Entwicklungen von „paradox-breaking inhibitors“ sollen nicht zu dieser Aktivierung führen und auch eine mögliche Alternative bei BRAF-Inhibitor-resistenten Tumoren darstellen [71, 74].

Eine bereits bestehende Therapieoption ist die Kombination eines BRAF-Inhibitors mit einem MEK-Inhibitor. MEK selbst zeigt selten Mutationen, stellt aber als RAS und RAF nachgelagertes Enzym einen möglichen Angriffspunkt dar [41, 75]. Auch hier existieren bereits mehrere zugelassene Medikamente wie Trametinib und Cobimetinib, die in Kombination mit einem RAF-Inhibitor eine signifikante Verbesserung des Überlebens der Patienten zeigen konnten [76, 77]. Trotz dieser Fortschritte bleibt auch bei dieser Therapie die Problematik der Resistenzbildung, sowie der teilweise starken Nebenwirkungen bestehen [71].

Auch das letzte Enzym des Signalweges, ERK, ist bereits in den Fokus der Forschung in Bezug auf die Entwicklung von Inhibitoren gelangt. Zurzeit existiert noch kein zugelassener ERK-Inhibitor. Einige Studien zeigen allerdings bereits Ergebnisse, die auf einen Benefit hinweisen [78, 79].

### **2.3 Der Hedgehog-Signalweg**

Der Genlocus Hedgehog (Hh) wurde erstmals 1980 von Frau Professor Christiane Nüsslein-Volhard und Herrn Professor Eric F. Wieschaus beschrieben [80]. Namensgebend ist dabei das Erscheinungsbild der Larve der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, die bei Mutation des Hedgehog-Genes ein stachelähnliches Aussehen aufweist [81].

Der Hedgehog-Signalweg spielt eine essenzielle Rolle in der Embryonalentwicklung und beeinflusst viele wichtige Abläufe wie die Organogenese, die Polarität des Organismus und die Regulation von Stammzellen [82, 83]. In adulten Zellen ist dieser Signalweg zumeist inaktiv, er ist allerdings ein wichtiger Faktor für die Gewebe-Homöostase und kann bei der Wundheilung aktiviert werden [84]. Bei unphysiologischer dauerhafter Aktivierung führt er hingegen zur Entstehung und zum Wachstum einer Vielzahl von Tumoren. Meist sind diese entweder durch eine Mutation von Ptch oder Smo bedingt, wie es häufig bei Basalzellkarzinomen oder Medulloblastomen der Fall ist, oder durch eine ligandenabhängige Aktivierung, welche beispielsweise zu Tumoren des Gastrointestinaltraktes oder der Lunge führen kann [85-88].

Zur Aktivierung des Signalweges sind drei Proteine entscheidend: der Hedgehog-Ligand (Hh), Patched (Ptch) und Smoothened (Smo) [89]. Anders als bei *Drosophila melanogaster* wurden in Wirbeltieren nicht nur ein, sondern drei Mitglieder der Hedgehog-Familie entdeckt: Sonic Hedgehog (Shh), Desert Hedgehog (Dhh) und Indian Hedgehog (Ihh), welche alle drei den Hedgehog-Signalweg aktivieren können und teilweise in den gleichen, aber teilweise auch in unterschiedlichen Geweben vorkommen [90]. Während Shh, die bisher am besten untersuchte Form, hauptsächlich für die Zelltypspezifikation im Nervensystem sowie die Extremitätenentwicklung zuständig ist, spielt das ihm ähnliche Ihh eine wichtige Rolle in der skelettalen Entwicklung [82]. Dhh kommt hingegen hauptsächlich in den Gonaden vor [91]. Alle drei Formen können sowohl autokrin als auch parakrin wirken [83]. Eine wichtige Organelle für den Signalweg stellt dabei das primäre Zilium dar [92]. Nachfolgende Ausführung bezieht sich soweit bereits bekannt auf den Ablauf des Signalweges in Säugetieren, welcher sich in manchen Aspekten von dem der *Drosophila* unterscheidet.

Bei Abwesenheit des Hedgehog-Liganden liegt der Signalweg in einem inaktiven Zustand vor, während dem es zu einer Akkumulation des zwölfgliedrigen Transmembranproteins Patched 1 (Ptch1) in und um das primäre Zilium kommt [93]. Ptch1 inhibiert in diesem Zustand Smoothened (Smo), ein siebengliedriges Protein, welches zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört [82, 94]. Ptch existiert in zwei Formen, Ptch1 und das teilweise strukturell homologe Ptch2, wobei Ptch1 der Hauptregulator von Smo zu sein scheint [95]. Die beiden inhibitorischen Proteine suppressor of fused (SUFU) und die Proteinkinase A (PKA) führen in diesem Zustand zu einer Einschränkung der Transkriptionsaktivität der Zinkfingerproteine der Gli-Familie, welche durch partielle Proteolyse zu Repressoren (Gli-R) werden und die Transkription ihrer Zielgene im Nucleus unterdrücken [96]. Ohne diese inhibitorische Wirkung von Ptch wäre Smo und somit der Signalweg dauerhaft aktiv.

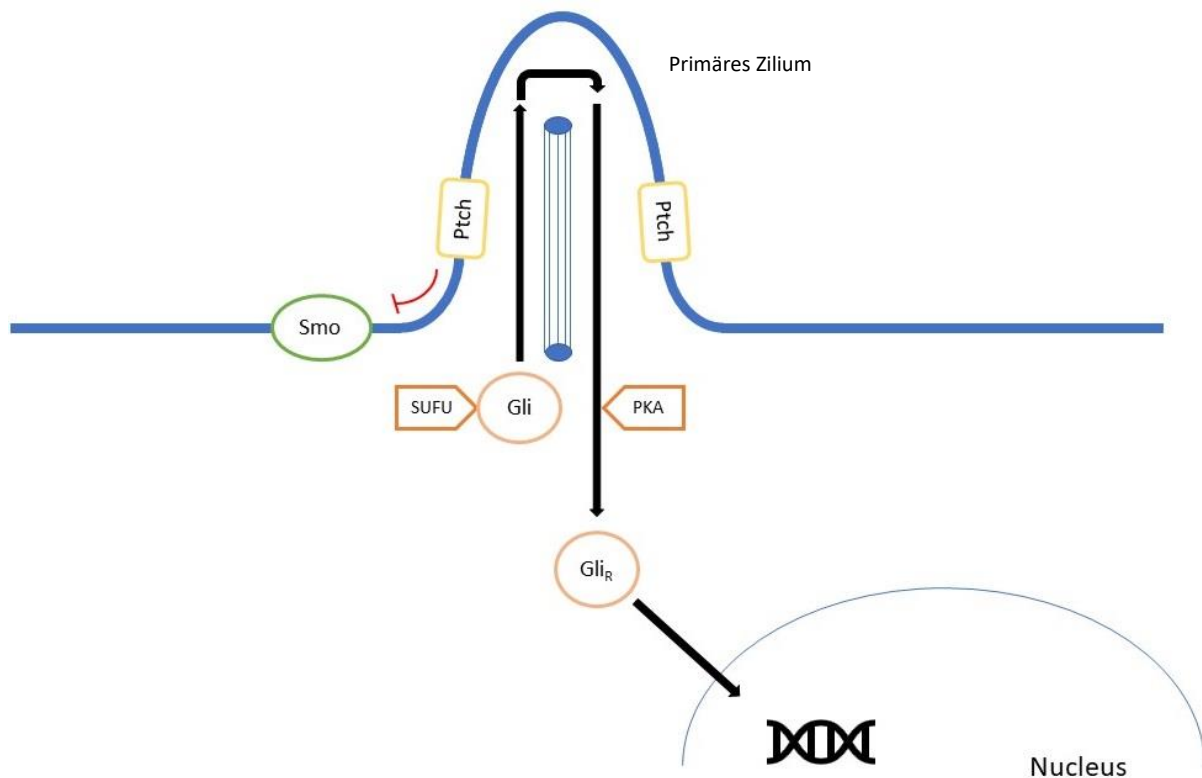


Abb. 2: Schematisch vereinfachte Darstellung des Hedgehog-Signalweges bei Abwesenheit des Hedgehog-Liganden modifiziert nach Scales und Sauvage [97]

Bevor eine Aktivierung des Hedgehog-Signalweges über einen Hedgehog-Liganden stattfinden kann, muss dieser zunächst aktiviert und freigesetzt werden [81]. In diesem Zuge geschehen der Translation folgend einige Prozessierungsschritte, zu denen eine Spaltung des Moleküls, die Modifikation mit Cholesterol und das Anhängen einer

Palmitinsäureeinheit durch die Hedgehog-Acyltransferase (Skinny Hedgehog homology in humans) gehören [98-100]. Dadurch entsteht ein vollständig aktives Hedgehog-Signalmolekül. Nach der Freisetzung kann es sowohl in der Nähe als auch in der Entfernung wirken.

Es existieren zwei Wege zur Aktivierung des Signalweges: Erstens der kanonische, Liganden-abhängige oder Rezeptor-induzierte, und zweitens der nicht-kanonische, Liganden-unabhängige Weg [101].

Der kanonische Signalweg beginnt mit der Bindung des Hedgehog-Liganden an das Transmembranprotein Patched und die daraus folgende Inaktivierung von Ptch [82]. Infolgedessen kommt es zu einer Abwanderung von Ptch aus dem primären Zilium und darauffolgend zu einer Einwanderung des nun nicht weiter inhibierten Smo [93]. Bei dieser Lokationsänderung scheint es sich um einen wichtigen Schritt zur Aktivierung des Signalweges zu handeln [102]. Smo seinerseits leitet das Signal weiter und wirkt als Antagonist auf SUFU und PKA [96]. Dies wiederum hat Einfluss auf die Gli-Proteine, von denen drei verschiedene, nämlich Gli1, Gli2 und Gli3, bekannt sind [103]. Gli1 ist, anders als zunächst erwartet, nicht essenziell für den Ablauf des Signalweges und wirkt hauptsächlich als Aktivator im Sinne eines positiven Feedback-loops, welcher das erhaltene Hedgehog-Signal amplifiziert [96, 104]. Gli2 und Gli3 hingegen sind die primären Mediatoren und können in 3 verschiedenen Formen vorkommen: Zunächst als Repressoren (GliR), zu denen sie in Abwesenheit des Hedgehog-Liganden proteolytisch verändert werden, zweitens als inaktive Transkriptionsfaktoren in voller Länge, sowie drittens als Transkriptionsaktivatoren (GliA) in voller Länge [105]. Studien fanden allerdings heraus, dass Gli2 primär als Transkriptionsaktivator wirkt, wohingegen Gli3 vorrangig eine Repressorfunktion ausübt [105]. Smo verhindert die Proteolyse der Gli-Proteine durch die Proteinkinase A, wodurch das nun vorhandene GliA in den Nucleus wandern und die Transkription der Zielgene aktivieren kann [106]. Der Hedgehog-Signalweg ist in der Lage, eine Vielzahl von Genen zu aktivieren, zu denen sowohl Gene gehören, welche universell in der Mehrheit der Zellen aktiviert werden, als auch Gene, welche nur in spezifischen Kontexten angesteuert werden [105]. Zu den wichtigen Zielen zählen unter anderem Ptch1, Ptch2 und auch das Hedgehog-interacting-protein (Hhip), welche im Sinne eines negativen Feedback loops den Signalweg inhibieren, sowie das aktivierend wirkende Gli1 [107]. Der Hedgehog-Signalweg wirkt allerdings auch auf viele weitere

Prozesse wie den Zellzyklus (über CCND2, CCNE1), die Zellproliferation (über MYCN), die Apoptose (über BCL2) und auch auf den Wnt-Signalweg [107].

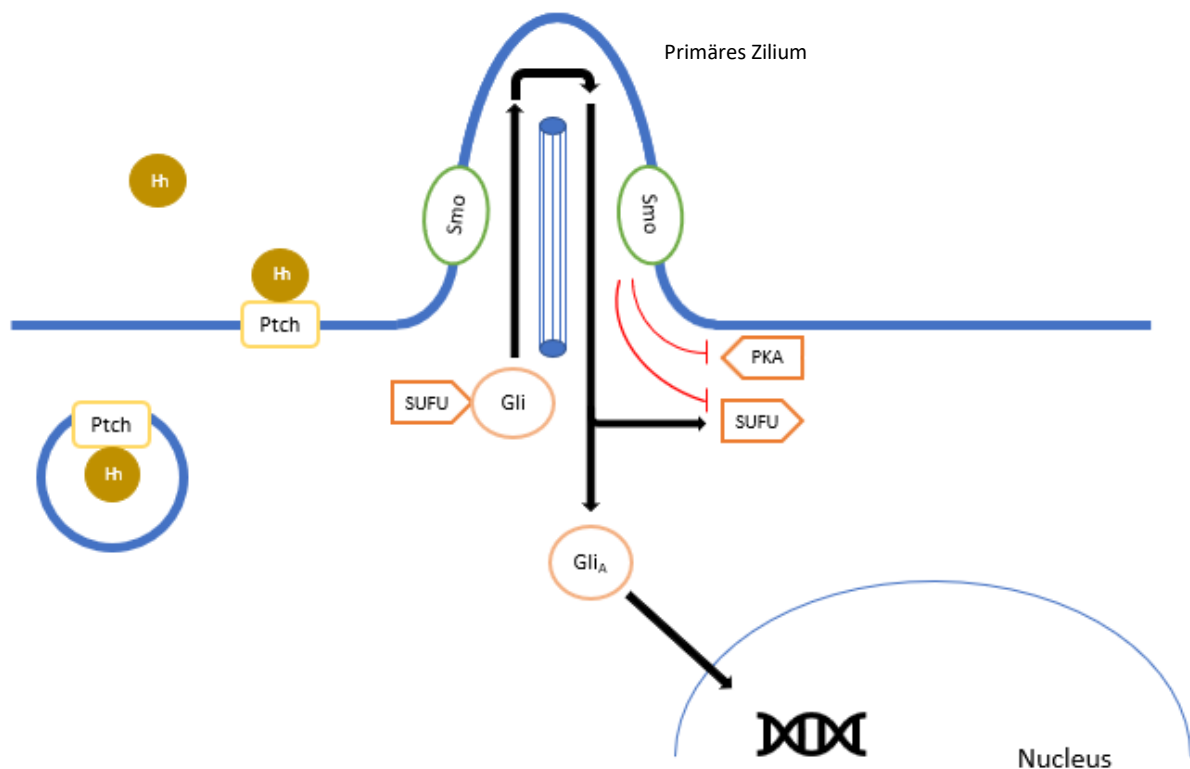


Abb. 3: Schematische vereinfachte Darstellung des Hedgehog-Signalweges bei Anwesenheit des Hedgehog-Liganden modifiziert nach Scales und Sauvage [97]

Neben der klassischen Route vom Liganden ausgehend über Ptch und Smo zu Gli, dem kanonischen Signalweg, häufen sich Evidenzen zu weiteren Aktivierungs- und Funktionsmechanismen, welche von diesem klassischen Weg abweichen und als nicht-kanonischer Signalweg zusammengefasst werden [108]. Die genauen Definitionen variieren je nach Autor. Jenkins geht von drei möglichen Szenarien aus: Erstens die Involvierung von Hedgehog-Signalweg-Komponenten, aber ohne Einbeziehung von Gli-vermittelter Transkription, zweitens die direkte Interaktion einer Komponente mit anderen Signalwegen, und drittens atypische Interaktion der Komponenten untereinander, was beispielsweise beim Überspringen der Fall wäre [108]. Gonnissen et al. fassen den nicht-kanonischen Weg als entweder Liganden- und von der Gli-vermittelten Transkription unabhängige Signalwegaktivierung, ausgelöst durch Ptch (Typ I) oder Smo (Typ II), oder als Ptch/Smo-unabhängige Aktivierung durch direkte Stimulation der Gli-Proteine zusammen [109]. Zu einer Vielzahl dieser möglichen nicht-kanonischen Aktivierungsmöglichkeiten existieren bereits Studien,

wobei diese besonders deshalb einen hohen Stellenwert besitzen, da sie einen Einfluss auf in den Hedgehog-Signalweg eingreifende Medikamente haben können. Smo-unabhängige Gli-Aktivierung beispielsweise kann dazu führen, dass Smo-Antagonisten in ihrer Wirksamkeit herabgesetzt werden [106].

Dies ist vor allem deshalb von Bedeutung, da Smo-Antagonisten eine Therapieoption bei dem fortgeschrittenen Basalzellkarzinom darstellen, da bei diesem der Hedgehog-Signalweg über das physiologische Maß hinaus aktiviert ist. Seit der Entdeckung des Zusammenhangs des Hedgehog-Signalweges mit der Entstehung von Basalzellkarzinomen sind mittlerweile eine Vielzahl von Tumoren bekannt, die mit einem deregulierten Hedgehog-Signalweg assoziiert sind. Dazu gehören unter anderem Gehirntumore wie das Medulloblastom [110], Tumore des Gastrointestinaltraktes wie Magen- und Lebertumore [87, 111] Prostatakarzinome [112] sowie das kleinzellige Lungenkarzinom [88], wobei auch bei diesen teilweise bereits Studien zur Wirksamkeit eines Hedgehog-Inhibitors stattgefunden haben [113, 114].

Erstmalig wurde 2012 durch die FDA und 2013 durch die EMA der Smo-Antagonist Vismodegib als Medikament zur Behandlung des fortgeschrittenen oder metastasierten Basalzellkarzinoms zugelassen. Bereits früher war ein Smo-Antagonist, das natürlich vorkommende Alkaloid Cyclopamin, durch ein vermehrtes Auftreten von Lämmern mit einem zyklischen Auge in den 1950er Jahren bekannt geworden [115]. Erst später wurde allerdings die genaue Wirkweise sowie die zur Verwendung als Medikament schlecht einzustufenden Eigenschaften wie die schlechte Wasserlöslichkeit deutlich [116]. Deshalb wurden neue, „small-molecule“ Inhibitoren wie Vismodegib und Sonidegib entwickelt, welche Smo und damit den Hedgehog-Signalweg ähnlich wie Cyclopamin inhibieren, aber durch eine gänzlich andere Struktur bessere pharmakologische Eigenschaften aufweisen [117, 118]. Da über zwei Drittel aller sporadischen Basalzellkarzinome eine Ptch-Mutation sowie circa 10% eine Mutation von Smo aufweisen, ist es theoretisch möglich, mit Smo-Antagonisten die überwiegende Mehrheit dieser Tumore anzuzielen [119, 120].

Problematisch ist allerdings die Resistenzentwicklung, welche den Zusatznutzen von Vismodegib stark einschränkt: Zum einen besteht in manchen Fällen eine primäre Resistenz. Jacobsen et al. geben in einer gepoolten Analyse einen gewichteten

Mittelwert der Ansprechrate von 62,1% an [121]. Eine mögliche Ursache für die primäre Resistenz kann beispielsweise eine Smo-Mutation sein, durch die das Erreichen der Bindungsstelle für Vismodegib erschwert wird [122]. Zum anderen entwickeln Basalzellkarzinome nach primärem Ansprechen teilweise eine sekundäre Resistenz. Auch hier stehen Mutationen in Smo oder Ptch unter Verdacht, diese auszulösen, sowie eine übermäßige Aktivierung von Signalwegkomponenten, die Smo nachgeschaltet sind (beispielsweise Gli2) [123, 124].

Eine große Rolle in der Resistenzentwicklung wird auch der nicht-kanonischen Signalwegaktivierung zugesprochen [125]. Die Beziehungen zu anderen Signalwegen haben dabei einen hohen Stellenwert. Auch zum bereits beschriebenen RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg bestehen Verbindungen: An den Gli-Proteinen wurde beispielsweise eine Andockstelle für ERK2 entdeckt [126].

Eine Verbindung der beiden Signalwege scheint auch in die entgegengesetzte Richtung zu existieren: Faião-Flores et al. beispielsweise konnten zeigen, dass Vemurafenib-resistente Melanomzellen durch eine Blockade der Gli-Transkriptionsfaktoren wieder auf Vemurafenib ansprachen [127]. Zudem wurde in einer Studie von Jalili et al. nachgewiesen, dass das Wachstum von Melanomen in vitro und in vivo durch die Hemmung des Hedgehog-Signalweges mit einem smoothed-Antagonisten reduziert werden kann [128]. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass GLI1 in BRAF-mutierten Melanomzelllinien stärker exprimiert wurde als in BRAF-Wildtyp-Zelllinien und der Einsatz eines BRAF-Inhibitors die Expression von GLI1 verringerte, was die Hypothese bezüglich der gegenseitigen Beeinflussung der beiden Signalwege untermauert. Trotz dieses beobachteten Zusammenhangs mit der BRAF-Mutation wurde ein Ansprechen auf den smoothed-Inhibitor sowohl bei BRAF-mutierten Zellen als auch bei BRAF-Wildtyp-Zellen ermittelt [128]. Anders verhielt es sich in einer Studie von O'Reilly et al.: Auch hier wurde nachgewiesen, dass eine Inhibition des Zellwachstums durch eine Hedgehog-Blockade möglich ist, allerdings vorwiegend bei BRAF-mutierten Zellen und besonders bei moderater SMO und GLI2 Expression [129]. Besonders anzumerken ist hier, dass bei Melanompatienten auch ein Zusammenhang zwischen erhöhten Spiegeln an Hedgehog-Signalweg-Komponenten und einer schlechteren Überlebensrate aufgezeigt wurde [129]. Eine genauere Untersuchung zu dem Zusammenhang dieser beiden Signalwege erscheint vor diesem Hintergrund sinnvoll.



## **2.4 Ziel der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen dem RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg sowie dem Hedgehog-Signalweg zu untersuchen. Hierzu sollte das Ansprechverhalten unterschiedlich mutierter Zelllinien auf einen spezifischen Hedgehog-Signalweg-Inhibitor analysiert werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Zellmaterial

Für die Versuche wurden neun Zelllinien humaner maligner Melanome verwendet:

- BRAF-mutierte Zelllinien:

Name	Nummer	Erworben bei:
Ma-Mel-19	CVCL_A156	Hautklinik Mainz
Ma-Mel-59a	CVCL_A194	Hautklinik Mainz
A375	ATCC CRL-1619	ATCC

Tab.1: Verwendete Zelllinien (BRAF-mutiert)

- NRAS-mutierte Zelllinien:

Name	Nummer	Erworben bei:
MM415	100923 Lot-Nr: 13510610S	Sigma-Aldrich/ Cell Bank Australia
MM127	10092314-1VL / Lot-Nr: 13440210G	Sigma-Aldrich / Cell Bank Australia
UKRV-Mel-15a	CVCL_A713	Hautklinik Mainz
Ma-Mel-5	CVCL_A118	Hautklinik Mainz

Tab.2: Verwendete Zelllinien (NRAS-mutiert)

- Wildtyp-Zelllinien (BRAF-/NRAS-Wildtyp):

Name	Nummer	Erworben bei:
Hs.895.T	ATCC CRL-7637	ATCC
Ma-Mel-15	CVCL_A151	Hautklinik Mainz

Tab. 3: verwendete Zelllinien (Wildtyp)

### 3.1.2 Verwendete Medien, Chemikalien und Medikamente

Name	Hersteller	Verwendung für
RPMI 1640	SIGMA gibco	Zellkultur, MTT
RPMI 1640 phenolrotfrei	gibco	Zellkultur, MTT
Medium DMEM	ATCC	Zellkultur, MTT
Accutase Solution	SIGMA	Zellkultur
Dulbecco's phosphate buffered saline	SIGMA	Zellkultur, Versuche
GDC-0449 (Vismodegib)	Sellekchem	Zellkultur Tag 2
DMSO	SIGMA	Zur Lösung von GDC-0449
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	SIGMA	Für MTT-Ansatz
MTT	eigener Ansatz	MTT-Versuch
Isopropylalkohol GMP	Hedinger	MTT-Lysepuffer
Salzsäure 2N	PanReac Applichem ITW Reagents	MTT-Lysepuffer
RNEasy Mini-Kit	Qiagen	RNA-Extraktion
RPE-Puffer	Qiagen	
RLT-Puffer	Qiagen	
RW1-Puffer	Qiagen	
RNAse free DNase Set	Qiagen	
Alkohol	Honeywell	
Beta-Mercaptoethanol	SIGMA	
RNAse free Water	Quiagen	RNA-Extraktion, cDNA, PCR
iScript cDNA Synthesis Kit	BioRad	cDNA
iSYBR	BioRad	PCR

Tab. 4: Verwendete Medien, Medikamente und Chemikalien

### 3.1.3 verwendete Geräte

Name	Hersteller	Beschreibung
Heraeus Fresco21 centrifuge	Thermo Scientific	Zentrifuge klein
Megafuge 16 centrifuge	Thermo Scientific	Zentrifuge groß
Cellometer Auto T4	Nexcelom BioScience	Zellzähler
Cellometer Cell counting chambers	Nexcelom	Zählplatten
HERA Safe	Heraeus	Werkbank
Cellstar 6-well Zellkulturplatte	Greiner Bio-One	Well-Platten
Genesys 20	Thermo Spectronic	Spektrometer
Light-duty Tissue wipers	VWR	Tücher
Pipetman Classic	Gilson	Pipette manuell
Accu-Jet pro	Brand	Pipette elektrisch
PCR-Workstation pro	peqlab	PCR-Werkbank
Hardshell PCR plates	BioRad	PCR-Platten
CFX Connect	BioRad	PCR-Maschine
Nanodrop Spectrophotometer	peqlab	Nanodrop
Nanodrop One	Thermo-Scientific	Nanodrop
Leica DMIL	LEICA	Mikroskop
Einmal-Küvetten PMMA	Brand	Messzylinder MTT
R553	Heraeus	Kulturschrank
Zellkulturflasche 550ml Cellstar	Greiner Bio-One	Kulturflaschen
Zellkulturflasche 250ml Cellstar	Greiner Bio-One	Kulturflaschen
	BOSCH	Kühlschrank
Standard analog shaker	VWR	Gyrator
	LIEBHERR	Gefrierschrank
Cellstar Tubes 50ml	Greiner Bio-One	Tube
Eppendorf Safe-Lock Tube	Eppendorf	Tube
peqSTAR Thermocycler	peqlab	cDNA-Gerät

Tab. 5: Verwendete Geräte

### 3.1.4 verwendete Software

Name	Version	Hersteller
CFX-Manager	3.1.1517.0823	BioRad
SPSS Statistics	23.0.0.3	IBM
Office Excel 2016	16.0.11328.20492	Microsoft
Office Word 2016	16.0.11328.20492	Microsoft
Office Power Point 2016	16.0.11929.20436	Microsoft
Cellometer Auto Counter	3.3.3	Nexcelom Bioscience LLC
NanoDrop One	1.4.2	Thermo-Scientific

Tab. 6: Verwendete Software

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultivierung

Die Zellkultivierung geschah abhängig von der Zelllinie mit verschiedenen Medien. Für die Zelllinien MM127 und MM415 wurde ein RPMI 1640-Medium zusammen mit 25mM HEPES, 50ml fetalem Kälberserum (10%) und 5ml L-Glutamin (1%) angesetzt. Für die Zelllinie Ma-Mel-15 wurde ein RPMI-Medium ohne Phenolrot in Kombination mit 50ml fetalem Kälberserum (10%) und 5ml L-Glutamin (1%) genutzt, ebenso für Ma-Mel-5, UKRV-Mel-15a, Ma-Mel-59a und Ma-Mel-19 mit zusätzlicher Zugabe von Penicillin-Streptomycin-Neomycin (1%). Die Zelllinien A375 und Hs.895.T wurden in DMEM mit 10% fetalem Kälberserum kultiviert.

Die Zellen wurden in Kulturflaschen mit der jeweils passenden Menge Medium überführt und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80% wurden die Zellen auf neue Kulturflaschen gesplittet. Dafür wurden sie zunächst unter dem Mikroskop kontrolliert. Zum Splitten wurde das Medium verworfen und die Kulturflaschen je nach Größe mit 7 oder 10ml PBS Waschpuffer gewaschen. Nach der Zugabe von 4ml bzw. bei größeren Flaschen 6ml Accutase erfolgte eine Inkubation von fünf Minuten im Brutschrank. Es erfolgte daraufhin eine Kontrolle unter dem Mikroskop, ob die Zellen gelöst sind. Nach dieser Kontrolle wurden die Zellen auf neue Kulturflaschen mit frischem Medium aufgeteilt.

### 3.2.2 Versuchsablauf

Für die Zellversuche wurden je drei Tage angesetzt:

- 1. Tag: Ansetzen der definierten Zellzahl
- 2. Tag: Zugabe des Medikamentes
- 3. Tag: Auswertung MTT, PCR

#### 1. Tag

Am ersten Tag erfolgte das Ansetzen der Zellen. Hierzu wurde zunächst das Medium verworfen und die Zellen wurden mit dem Phosphat-Waschpuffer gewaschen. Es wurden 4ml Accutase hinzugegeben und die Zellen wurden für fünf Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach der Kontrolle, ob die Zellen ordnungsgemäß gelöst sind, wurden sie zusammen mit 10ml frischem Medium aufgenommen und in Zentrifugierröhrchen überführt. Nach dem Zentrifugieren bei 1100 Umdrehungen für fünf Minuten erfolgte das Verwerfen des Überstandes und das Lösen der Zellen in 10ml frischem Medium. Daraufhin wurde mit dem Cellometer die Zellzahl pro Milliliter bestimmt. Daraus wurde die benötigte Menge des Zellansatzes für 100.000 Zellen berechnet. Diese wurde dann zusammen mit je 2ml des passenden Mediums auf jedes Well von drei 6-Well-Platten verteilt, sodass final jedes Well 2ml Medium und 100.000 Zellen enthielt.

#### 2. Tag

Nach 24 Stunden wurden allen Wells die Zusätze bzw. Medikamente hinzugegeben. Dabei wurde zunächst bei allen drei 6-Well-Platten das Medium von der Seite her abpipettiert und jedes Well vorsichtig mit 2ml Phosphat-Waschpuffer gewaschen. Es erfolgte die Herstellung der Stammlösung von Vismodegib aus 5mg Vismodegib gelöst in 1,1868ml DMSO.

Auf die erste 6-Well-Platte wurde in drei Wells jeweils 2ml Medium gegeben (Kontrollgruppe) und in drei Wells je 2ml Medium mit 40µM Vismodegib. Diese Konzentration hatte sich in vorherigen Versuchen als optimal erwiesen.

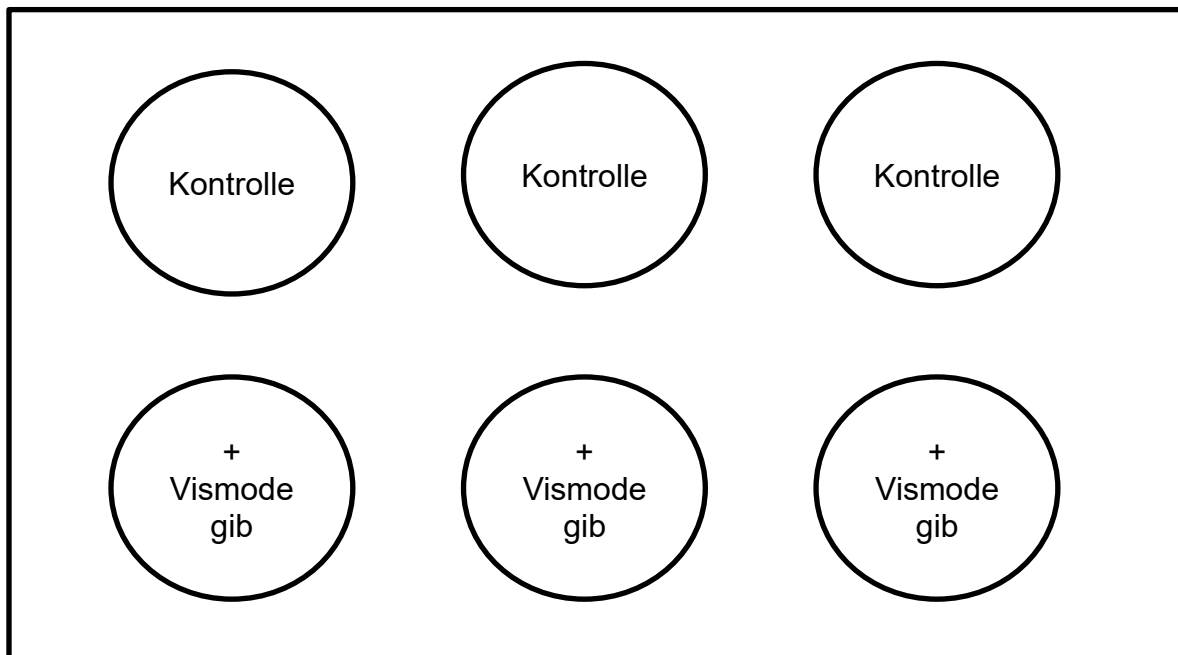


Abb. 4: Anordnung der Ansätze der ersten 6-Well-Platte (für PCR)

In der zweiten und dritten 6-Well-Platte wurde jeweils ein Well mit 12 $\mu$ l DMSO und 2ml Medium befüllt, während die verbleibenden fünf Wells der ersten Platte nur mit Medium (Kontrolle) und die verbleibenden fünf Wells der zweiten Platte mit Medium und je 40 $\mu$ M Vismodegib gefüllt wurden.

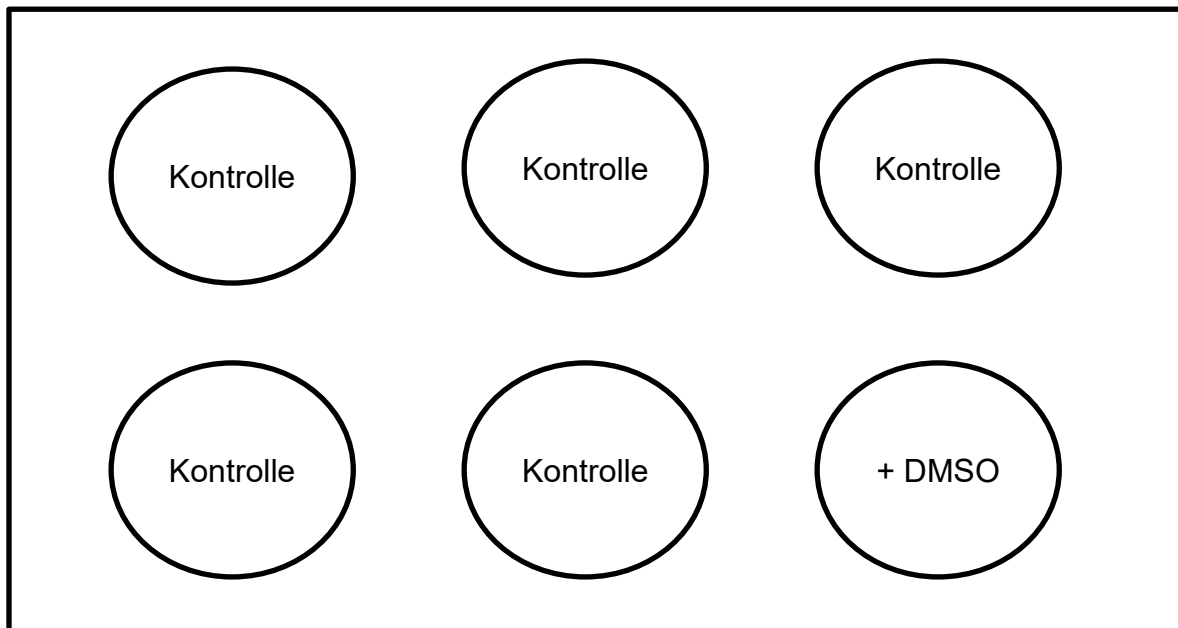


Abb. 5: Anordnung der Ansätze der zweiten 6-Well-Platte (für MTT-Test)

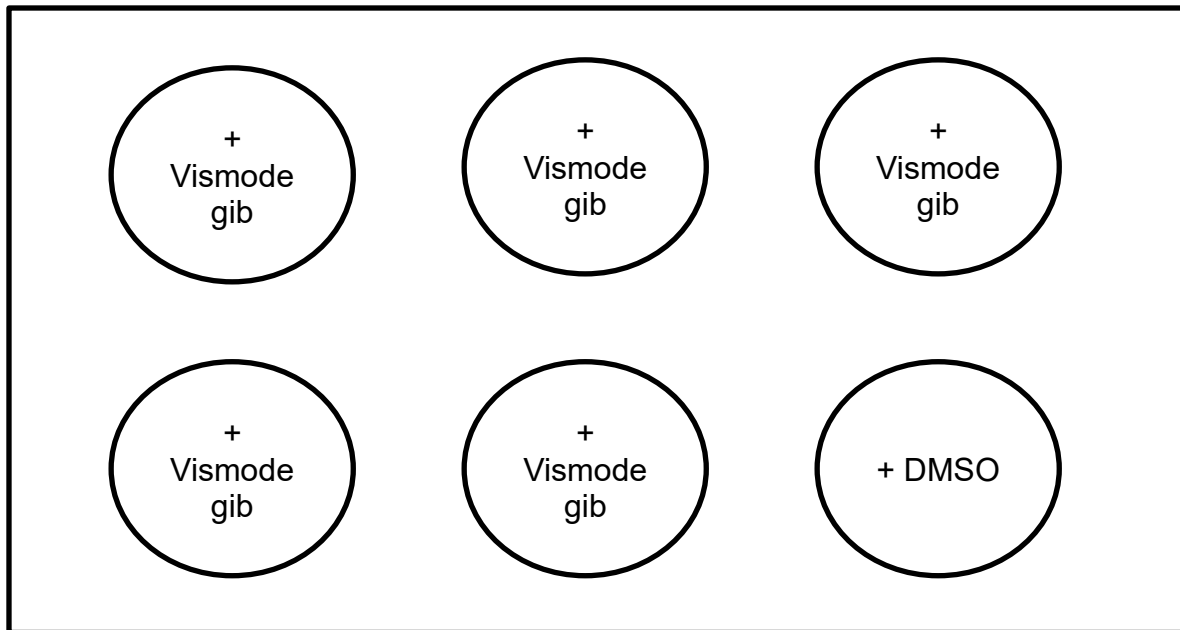


Abb. 6: Anordnung der Ansätze der dritten 6-Well-Platte (für MTT-Test)

Alle Platten wurden nach dem Ansetzen wieder zurück in den Brutschrank gestellt.

### 3. Tag

Am dritten Tag wurden die Auswertungen durchgeführt. Die Well-Platten wurden zunächst unter dem Mikroskop kontrolliert und danach abhängig von dem durchgeführten Test behandelt.

#### **3.2.3 MTT-Assay**

Der MTT-Test dient zur Bestimmung der metabolischen Aktivität und der Viabilität der Zellen. Man kann somit mit diesem Test herausfinden, inwiefern bestimmte Medikamente Einfluss auf die Viabilität der Zellen nehmen. Hierzu wird 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) verwendet. Dieses ist ein wasserlöslicher, membrangängiger, gelblicher Stoff, der durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen zu Formazan reduziert wird, welches sich als wasserunlöslich und stark blau darstellt. Formazan ist kristallin und kann die Zelle nicht wieder verlassen. Durch die Lyse der Zellen mithilfe eines Lysepuffers aus Isopropanol und Salzsäure werden diese Kristalle freigesetzt und der Farbstoff kann nun fotometrisch bei 570nm gemessen werden. Dabei besteht eine Proportionalität zwischen der Menge an Formazan-Kristallen und der Anzahl der vitalen Zellen.



Der MTT-Test wurde mit der zweiten und dritten 6-Well-Platte durchgeführt. Dazu wurde zu jedem Well 200µl MTT hinzu pipettiert. Es folgte eine Inkubationszeit von vier Stunden bei 37°C im Brutschrank.

Nach dieser Inkubationszeit erfolgte das Verwerfen des Überstandes beider 6-Well-Platten sowie das vorsichtige Waschen der Wells mit 1ml Phosphat-Waschpuffer. Je Well wurden 2ml Lysepuffer aus Isopropanol und HCl hinzugegeben. Es folgte ein 30-minütiges Lysieren bei Raumtemperatur.

Die Messung erfolgte mithilfe des Fotometers bei 570nm. Eine Messung geschah zunächst mit einer mit 2ml Lysepuffer gefüllten Kürette, um den Leerwert zu definieren. Die weiteren Messungen aller Ansätze wurden dementsprechend auch mit je 2ml Ansatz pro Kürette durchgeführt.

### **3.2.4 Polymerasekettenreaktion (real-time quantitative PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion dient zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Sequenzen, die durch den gezielten Einsatz bestimmter Primer definiert werden. Dabei ist auch bereits die Vervielfältigung sehr kleiner Mengen DNA möglich. Der Ablauf ist dabei wie folgt: Zunächst wird die doppelsträngige DNA auf 94°C erhitzt, was zur Denaturierung und somit zur Trennung der beiden Stränge über das Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen führt. Als zweiter Schritt erfolgt das Annealing. Dabei wird der Versuchsansatz schnell auf zumeist zwischen 55-65°C (abhängig von der optimalen Schmelztemperatur der Primer) abgekühlt, um zu verhindern, dass sich die Stränge wieder zusammenlagern, und um die komplementäre Anlagerung der im Überschuss vorhandenen Primer zu ermöglichen. Die Anlagerung der Primer erfolgt am 3'-Ende. Von dort beginnend kommt es dann im nächsten Schritt zur Elongation. Bei der optimalen Arbeitstemperatur der thermostabilen DNA-Polymerase (meist bei ca. 72°C) synthetisiert diese von dem Primer ausgehend aus den auch im Ansatz enthaltenen Nukleotiden (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) einen komplementären Strang. Dies führt somit zur Verdopplung der DNA-Menge. Während des Prozesses werden meistens ca. 20-50 dieser Zyklen durchlaufen, während derer sich die Anzahl der Stränge exponentiell erhöht.

Eine real-time Polymerase chain reaction ist eine neuere Form der PCR. Die Besonderheit bei dieser Methode liegt darin, dass die DNA nicht nur vervielfältigt,

sondern auch gleichzeitig in Echtzeit quantifiziert wird. Somit wird die Notwendigkeit von weiteren Nachweisen z.B. mittels Gel-Elektrophorese überflüssig. Der Nachweis erfolgt mit Hilfe der Zugabe von Farbstoffen wie SYBR-Green. Hierbei werden die Fluoreszenzsignale während der exponentiellen Phase gemessen und die DNA quantifiziert. Dabei verhalten sich die Fluoreszenz und die Menge an amplifizierten DNA-Fragmenten proportional zueinander. In dem Versuch soll nachgewiesen werden, inwiefern und in welchem Maße bestimmte Gene exprimiert werden, um Rückschlüsse auf den Effekt der Vismodegibzugabe ziehen zu können.

### **3.2.4.1 RNA-Extraktion**

Für die PCR wurde die erste Well-Platte genutzt. Hier wurde zunächst der Überstand abpipettiert. Dann wurden die Wells mit PBS gewaschen, mit RLT/ $\beta$ -Mercaptoethanol lysiert und das entstandene Lysat auf eine Schreddersäule pipettiert. Nach dem Zentrifugieren für zwei Minuten bei 13.000 Umdrehungen wurde die Säule verworfen und 70 prozentiges Ethanol hinzugefügt und gemischt. Dem Aufpipettieren des Lysates auf eine RNase Säule folgte das Zentrifugieren bei 10.000 Umdrehungen für 15 Sekunden. Das Eluat wurde verworfen, 350 $\mu$ l RW 1 Puffer auf die Säule pipettiert und bei 10.000 Umdrehungen 15 Sekunden zentrifugiert. Auf das erneute Verwerfen des Eluats folgte das Hinzupipettieren von 78 $\mu$ l Dnase-Gemisch, welches frisch aus 10 $\mu$ l Dnase I stock solution und 70 $\mu$ l RDD Puffer angesetzt worden war. Nach einer Ruhezeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden 350 $\mu$ l RW 1 Puffer auf die Säule pipettiert und das Ganze bei 10.000 Umdrehungen für 15 Sekunden zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Eluats folgte das Aufpipettieren von 500 $\mu$ l RPE Puffer sowie das Zentrifugieren für 15 Sekunden bei 10.000 Umdrehungen. Das Eluat wurde verworfen und es wurden erneut 500 $\mu$ l RPE Puffer hinzu pipettiert, woraufhin bei 13.000 Umdrehungen für zwei Minuten zentrifugiert wurde. Die Säule wurde nun eine Minute bei 10.000 Umdrehungen zentrifugiert. Daraufhin wurde die nun trockene Säule in ein Eppendorf tube überführt und 30 $\mu$ l RNA free H<sub>2</sub>O hinzugegeben. Nach dem Zentrifugieren von einer Minute bei 10.000 Umdrehungen wurde die Säule verworfen.

### **3.2.4.2 Messung der RNA**

Die Messung der RNA erfolgte mithilfe des Nanodrops. Nach bestimmten des Blanks mit RNase freiem Wasser wurde jede Probe zunächst gevortext und darauffolgend 1,5 $\mu$ l je Probe zur Messung aufpipettiert.

### 3.2.4.3 Umschreiben von RNA in cDNA

Zunächst erfolgte die Berechnung der benötigten Probenmenge. Als Einsatz wurden 150ng RNA gewählt. Nacheinander wurden die berechnete Menge des RNase freien Wassers sowie der jeweiligen RNA-Probe in die Tubes pipettiert, sodass nach diesem Schritt in jedem Röhrchen 15µl vorlagen. Daraufhin erfolgte das Ansetzen des Mastermixes, pro Ansatz bestehend aus 4µl iScript 5x sowie 1µl Reverse Transkriptase der Firma BioRad. Diese 5µl wurden zu dem RNase freien Wasser und der RNA hinzupipettiert, sodass sich final 20µl in jedem Tube befanden. Es erfolgte das Umschreiben mithilfe des Thermocyclers der Firma Peqlab nach vorprogrammiertem Protokoll.

### 3.2.4.4 Polymerasekettenreaktion

Für die PCR wird nach Festlegung des Belegungsplanes der PCR-Platte für jeden genutzten Primer ein Eppendorf Tube bereitgestellt. Genutzt wurden Primer für BRAF, NRAS, MEK, ERK1, ERK2, Actin und GAPDH. Abhängig von der pro Primerpaar vorgesehenen Anzahl an zu befüllenden Wells wurde in diesem Tube die passende Menge Mastermix vorgelegt. Für die Herstellung des Mastermixes für ein Primerpaar wurden nacheinander 5µl RNA-freies Wasser, 1µl Primer sense, 1µl Primer antisense und 11µl iSYBR in das Tube pipettiert. Auf Eis gelagert wurden dann die Wells der PCR-Platte jeweils mit 18µl des passenden Mastermixes und 2µl der zu untersuchenden cDNA gefüllt. Nach vollständiger Befüllung wurde die Platte mit einer Klebefolie verschlossen und die PCR gestartet.

Gen	Primer sense	Primer antisense
BRAF	tgc gtt tcc tgt cca ctg aa	cga ctg cca act tct cac ct
NRAS	aac tgg cca aga gtt acg gg	gca gag gtg tgt ttg tgc tg
MEK	gag agc ctc aca gca tct cg	gcc ggc aaa atc cac ttc tt
ERK1	act cca aag ccc ttg acc tg	ctt cag ccg ctc ctt agg ta
ERK2	tct gta ggc tgc att ctg gc	gat gtc tga gca cgt cca gt

Tab. 7: Verwendete Primer

## 4. Ergebnisse

### 4.1. MTT-Test

#### 4.1.1 Messwerte insgesamt

Die Messwerte wurden mittels der oben genannten Methodik erhoben. Der Vergleich der Versuchsreihen zeigte homogene und reproduzierbare Ergebnisse.

#### 4.1.2 Vergleich der medikamentösen Therapie mit der Kontrollgruppe bei NRAS-mutierten Zellen

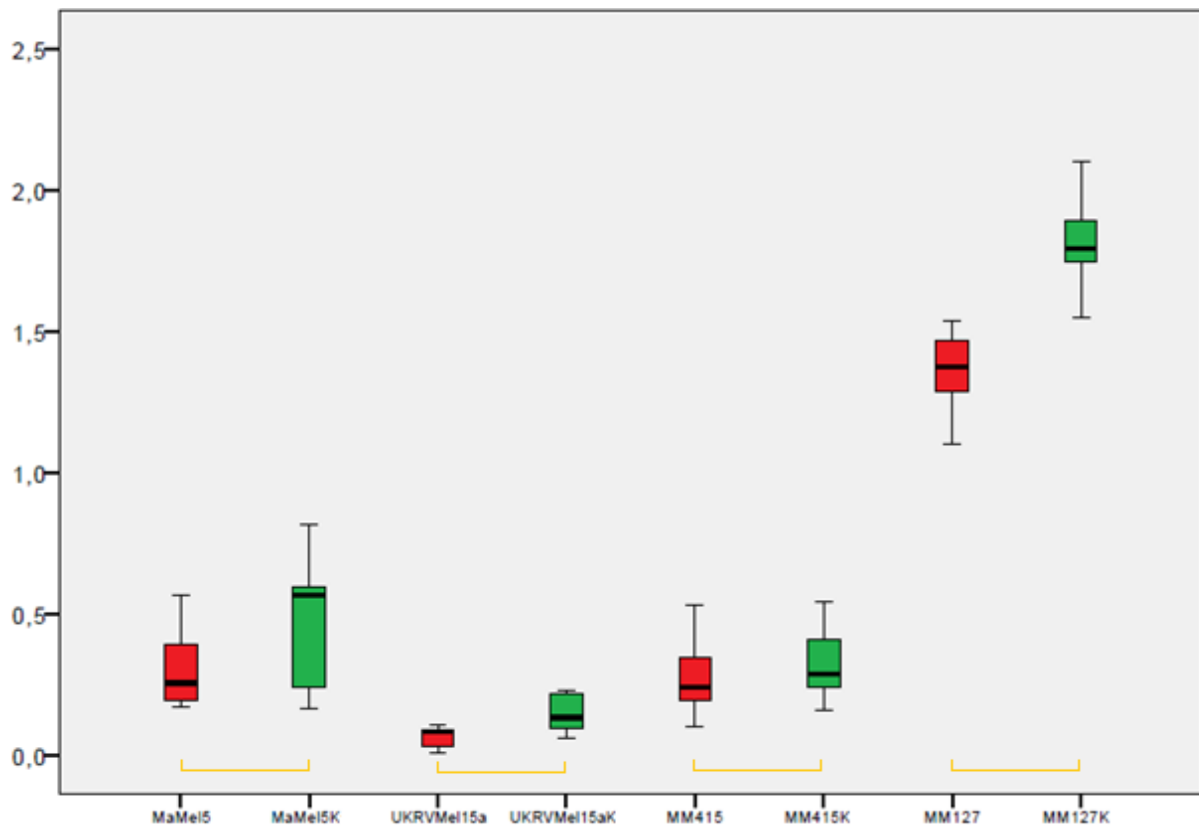


Abb.7: Boxplots für die vier NRAS-mutierten Zelllinien Ma-Mel-5, UKRV-Mel-15a, MM415 und MM127, jeweils Vismodegibgruppe (rot) im Vergleich zur Kontrollgruppe (K, grün), signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Vismodegibgruppe der jeweiligen Zelllinie sind mit einem orangenen Balken dargestellt

Es wurden für alle vier NRAS-mutierten Zelllinien (Ma-Mel-5, UKRV-Mel-15a, MM415 und MM127) signifikante Unterschiede innerhalb der Zellreihen zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe und der mit Vismodegib behandelten Gruppe festgestellt. Alle Zellreihen zeigten in der Kontrollgruppe eine erhöhte Viabilität im

Vergleich zur medikamentenbehandelten Gruppe. Besonders stark scheint der Effekt bei MM127 zu sein, bei dem es sich zudem um ein statistisch hochsignifikantes Testergebnis handelt ( $p < 0,01$ ). Eine statistisch hohe Signifikanz zeigen auch die Zelllinien UKRV-Mel-15a ( $p < 0,01$ ) und Ma-Mel-5 ( $p < 0,01$ ), wohingegen die Ergebnisse der Zelllinie MM415 nur knapp signifikant sind ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.3 Vergleich der medikamentösen Therapie mit der Kontrollgruppe bei BRAF-mutierten Zellen

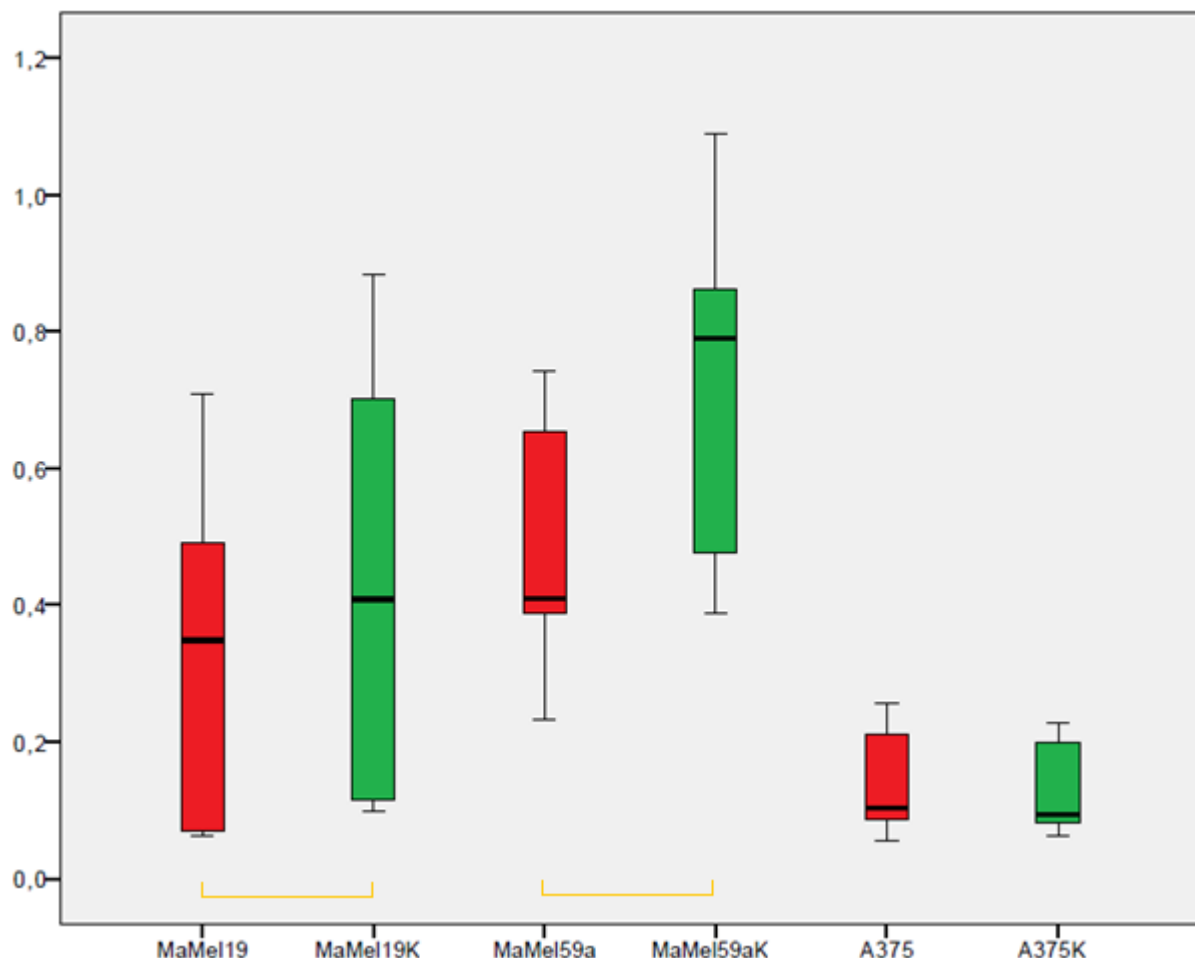


Abb. 8: Boxplots für die drei BRAF-mutierten Zelllinien Ma-Mel-19, Ma-Mel-59a und A375, jeweils Vismodegibgruppe (rot) im Vergleich zur Kontrollgruppe (K, grün), signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Vismodegibgruppe der jeweiligen Zelllinie sind mit einem orangenen Balken dargestellt

Die zwei BRAF-mutierten Zelllinien Ma-Mel-19 und Ma-Mel-59a zeigen unter Vismodegibbehandlung im Vergleich zur unbehandelten Gruppe eine verminderte Viabilität. Zudem sind die Testergebnisse beider Zelllinien hochsignifikant ( $p < 0,01$ ). Anders verhält es sich mit der auch BRAF-mutierten Zelllinie A375: Hier liegt zwar kein

signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Vismodegibgruppe vor ( $p=0,079$ ), allerdings zeigt sich dennoch ein leichter Trend in dieselbe Richtung, da auch bei dieser Zelllinie die Kontrollgruppe eine etwas höhere Viabilität zeigt. Die Zugabe von Vismodegib zeigt somit nur bei zwei der drei getesteten BRAF-mutierten Zelllinien eine signifikant niedrigere Viabilität.

#### 4.1.4 Vergleich der medikamentösen Therapie mit der Kontrollgruppe bei Wildtyp-Zellen

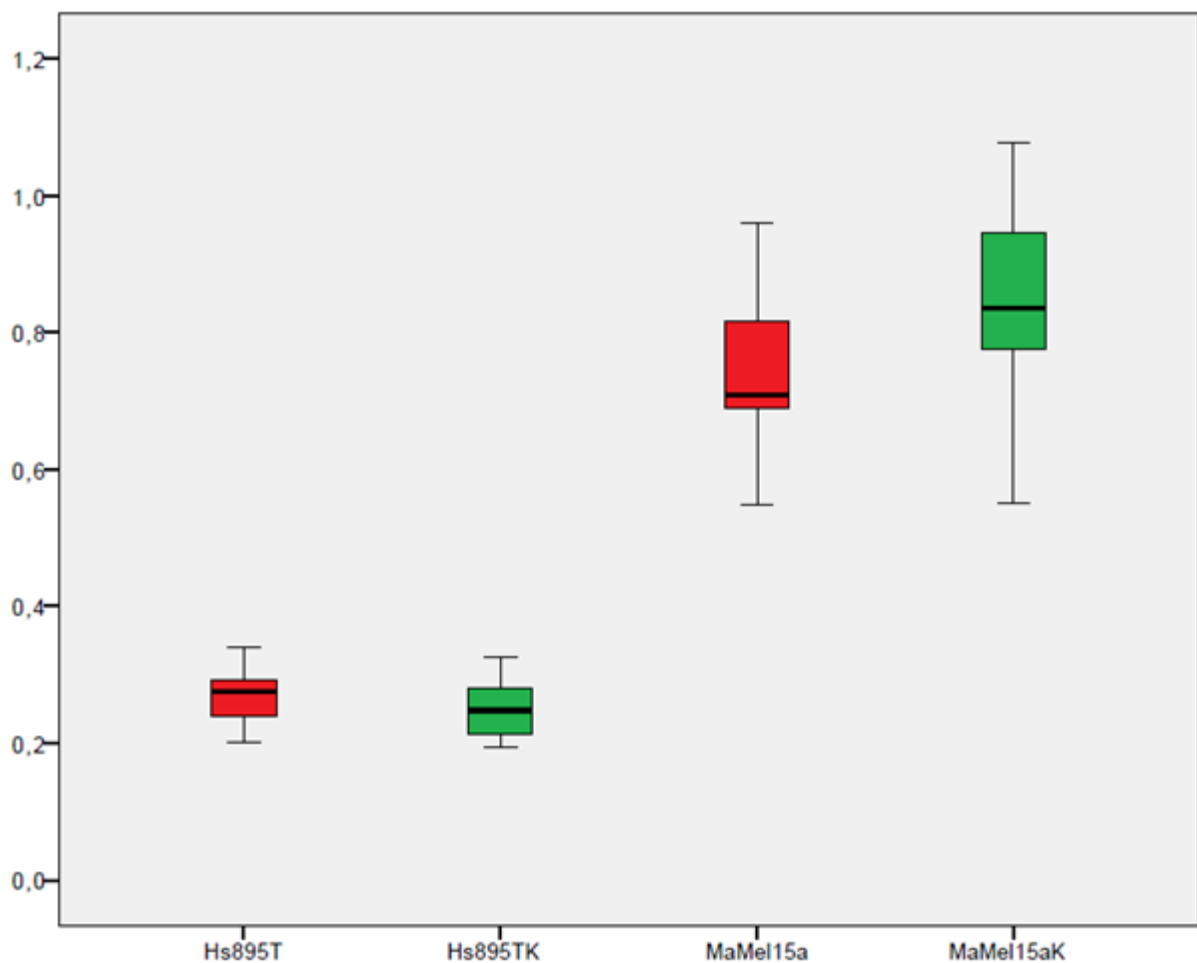


Abb. 9: Boxplots für die zwei Wildtyp-Zelllinien HS.895.T und Ma-Mel-15a, jeweils Vismodegibgruppe (rot) im Vergleich zur Kontrollgruppe (K, grün)

Die Wildtyp-Zelllinie HS.895.T zeigt weder einen deutlichen Unterschied hinsichtlich der Viabilität zwischen den Vergleichsgruppen, noch hat dieser Unterschied statistische Signifikanz ( $p=0,426$ ). Ein Effekt von Vismodegib auf diese Zelllinie ist somit bei diesem Versuch nicht festzustellen. Im Vergleich dazu zeigt die Wildtyp-Zelllinie Ma-Mel-15a zwar eine leicht erhöhte Viabilität bei der Kontrollgruppe,

allerdings ist auch diese nicht signifikant ( $p=0,089$ ). Somit existiert bei beiden Wildtypzelllinien kein signifikanter Unterschied zwischen der medikamentenbehandelten und der unbehandelten Gruppe.

#### **4.1.5 Vergleich der NRAS-mutierten, BRAF-mutierten und Wildtyp-Zelllinien**

Die NRAS-Mutanten zeigen mit statistisch signifikanten Unterschieden bei vier der vier getesteten Zelllinien das höchste Ansprechen. Bei den BRAF-mutierten Zelllinien kann ein signifikantes Ergebnis bei zwei der drei getesteten Zelllinien festgestellt werden, wohingegen die Ergebnisse beider Wildtyp-Zelllinien nicht signifikant sind.

## 4.2 Auswertung der PCR

Mittels der PCR war es möglich, die getesteten Gene BRAF, NRAS, MEK, ERK1 und ERK2 bei allen Zelllinien nachzuweisen. Im Folgenden werden die Zelllinien nach Mutation sortiert und die Gene dem Ablauf des Signalweges entsprechend nacheinander behandelt.

### 4.2.1 Vergleich der medikamentösen Therapie mit der Kontrollgruppe bei NRAS-mutierten Zellen

#### 4.2.1.1 BRAF und NRAS

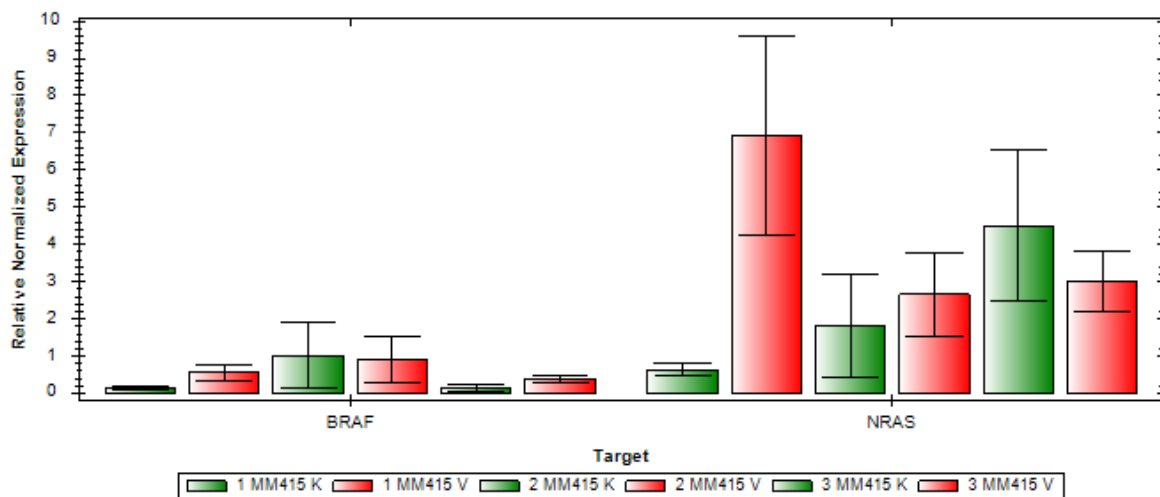


Abb. 10: Genanalyse für BRAF und NRAS bei der Zelllinie MM415; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

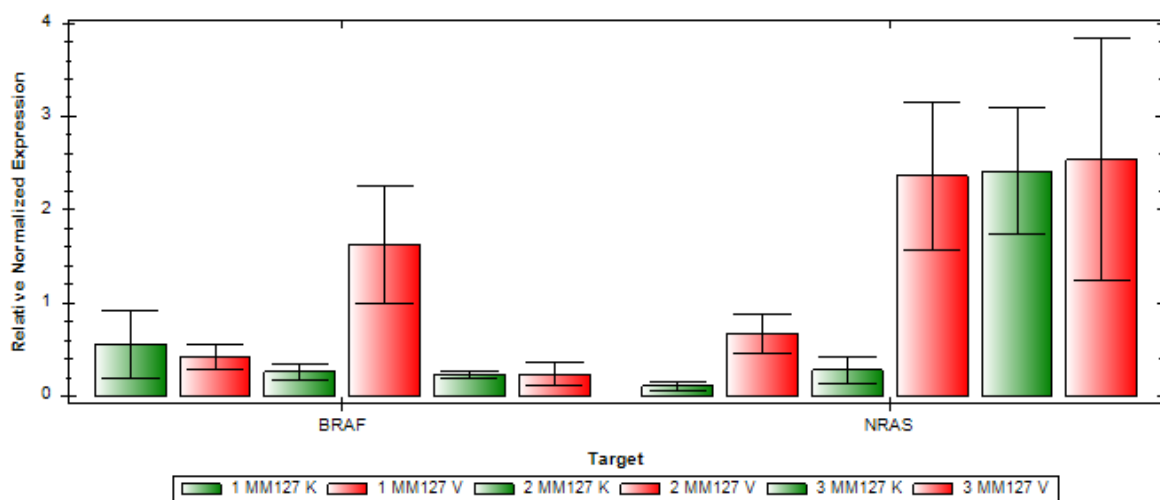


Abb. 11: Genanalyse für BRAF und NRAS bei der Zelllinie MM127; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)



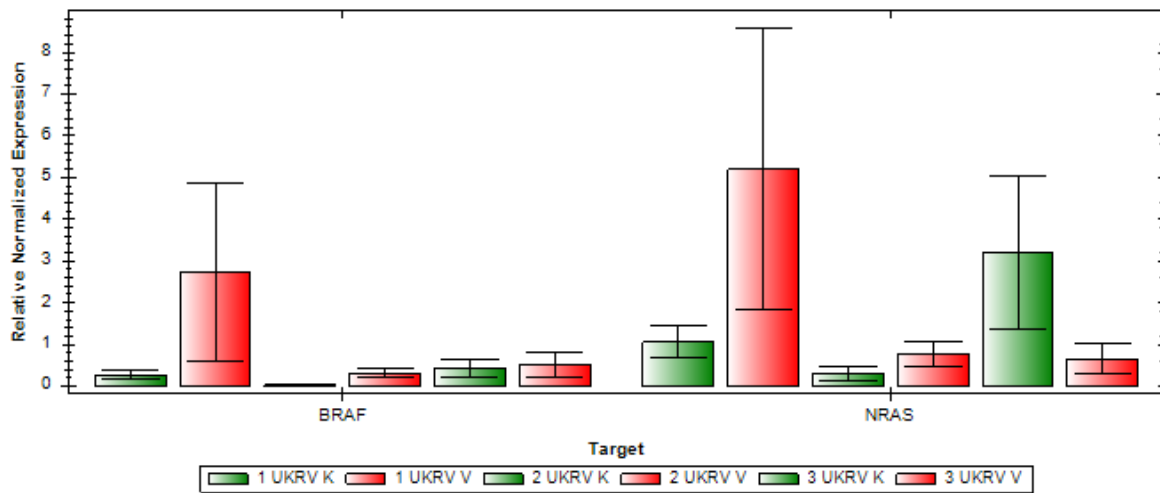


Abb. 12: Genanalyse für BRAF und NRAS bei der Zelllinie UKRV-Mel-15a (UKRV); Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

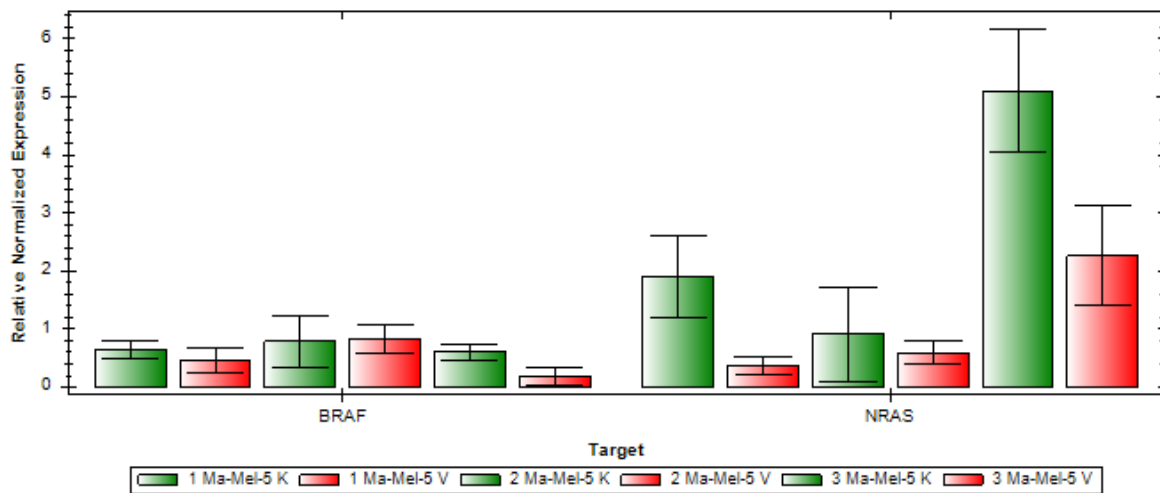


Abb. 13: Genanalyse für BRAF und NRAS bei der Zelllinie Ma-Mel-5; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Die Gene BRAF und NRAS konnten beide bei allen vier NRAS-mutierten Zelllinien amplifiziert werden. Eine verminderte Expression von BRAF und NRAS bei der vismodegibbehandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte allein bei der Zelllinie Ma-Mel-5 nachgewiesen werden. Alle weiteren Zelllinien hingegen zeigten eine Tendenz zur vermehrten Expression von BRAF und NRAS in der Vismodegibgruppe.

### 4.2.1.2 MEK

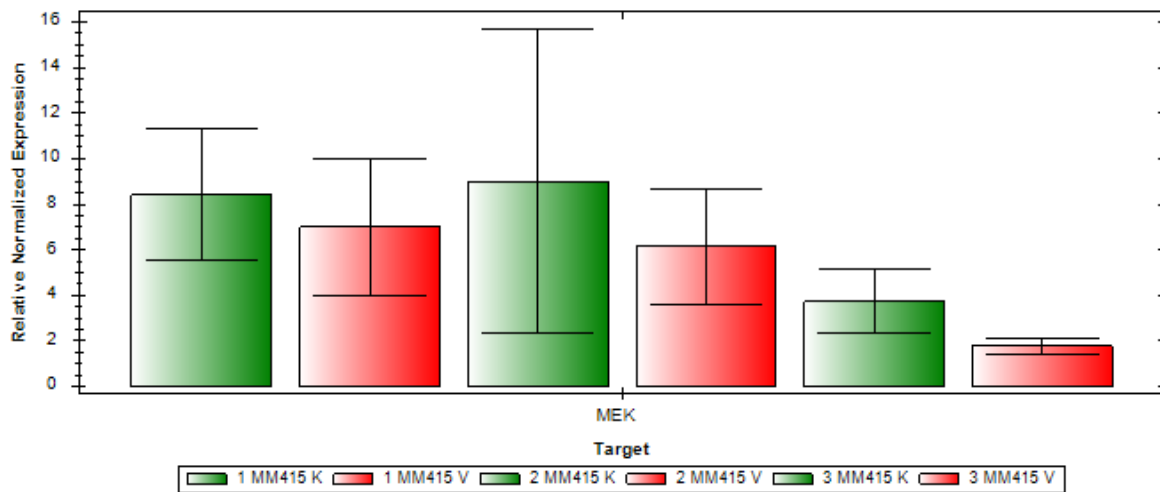


Abb. 14: Genanalyse für MEK bei der Zelllinie MM415; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

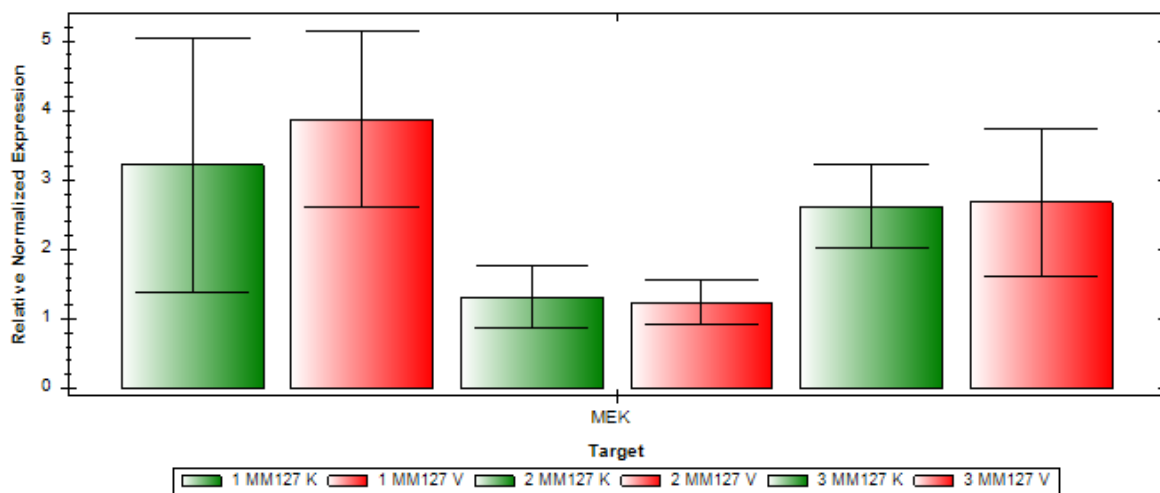


Abb. 15: Genanalyse für MEK bei der Zelllinie MM127; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

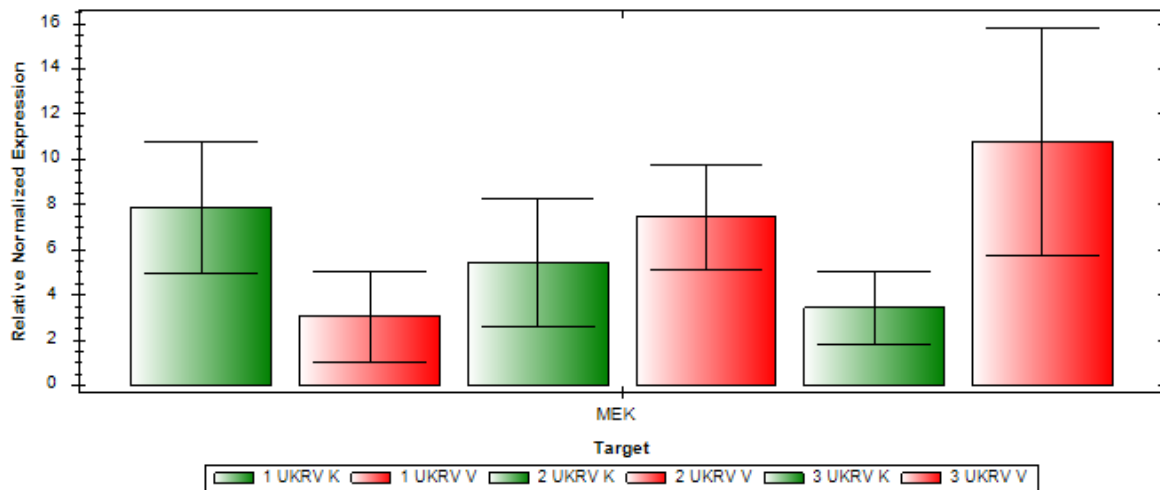


Abb. 16: Genanalyse für MEK bei der Zelllinie UKRV-Mel-15a (UKRV); Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

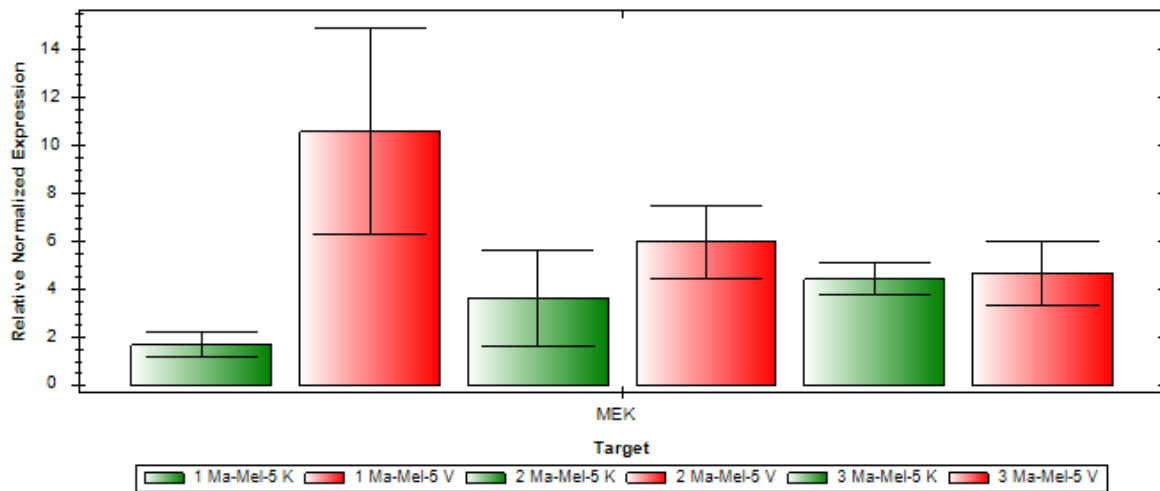


Abb. 17: Genanalyse für MEK bei der Zelllinie Ma-Mel-5; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Auch das Enzym MEK konnte bei allen vier Zelllinien nachgewiesen werden. Hier zeigte nur die Zelllinie MM415 eine deutliche und reproduzierbare verminderte Expression von MEK bei der vismodegibbehandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Alle weiteren Zelllinien zeigten entweder eine relativ ähnliche Expression, beispielsweise MM127, oder sogar eine leicht erhöhte Expression von MEK, wie bei Ma-Mel-5 zu erkennen ist.

### 4.2.1.3 ERK 1 und ERK 2

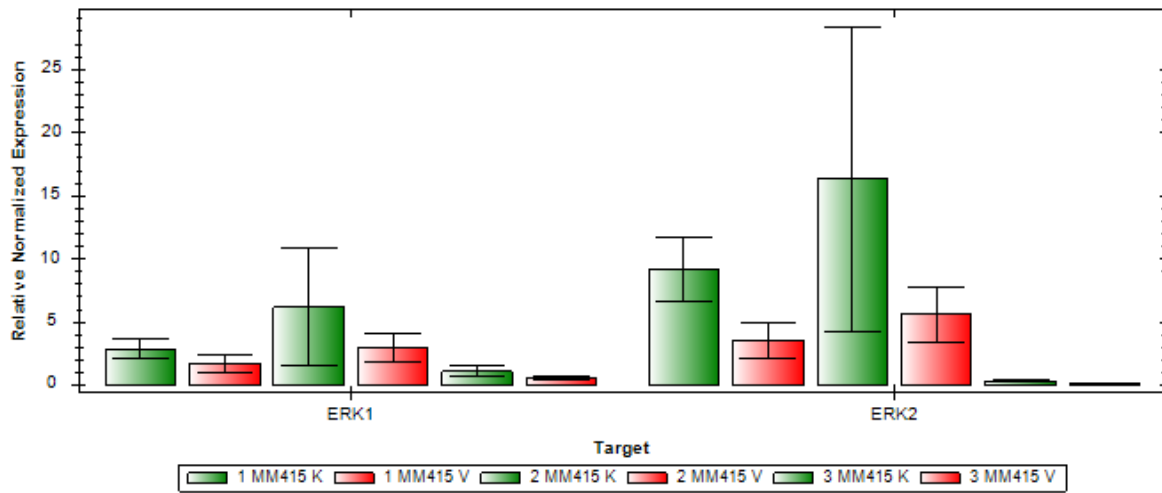


Abb. 18: Genanalyse für ERK1 und ERK2 bei der Zelllinie MM415; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

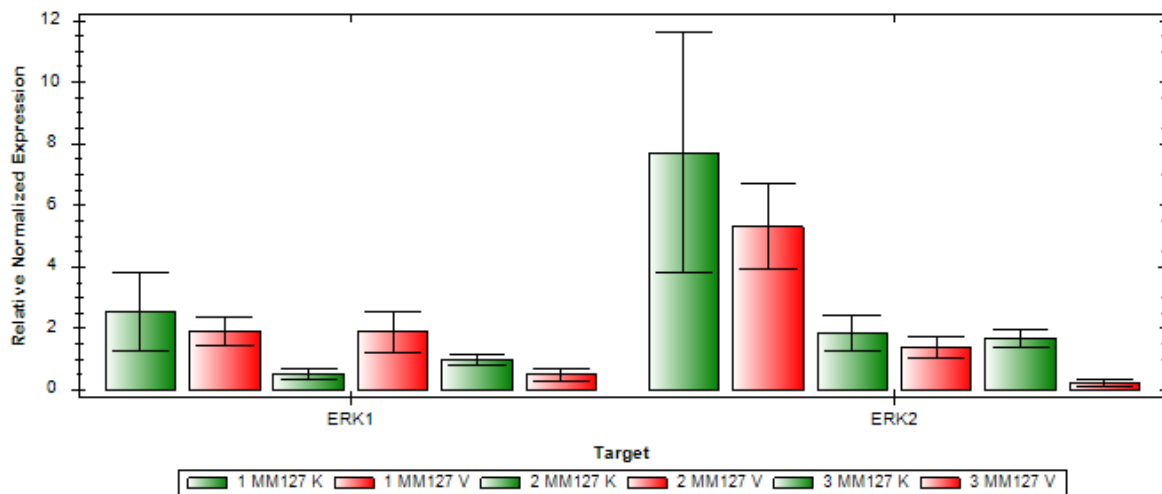


Abb. 19: Genanalyse für ERK1 und ERK2 bei der Zelllinie MM127; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

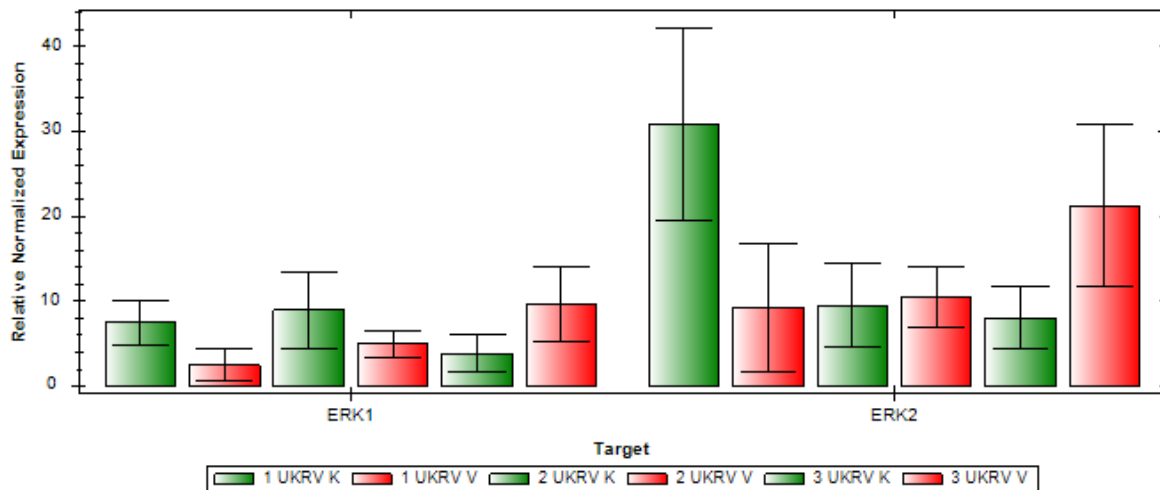


Abb. 20: Genanalyse für ERK1 und ERK2 bei der Zelllinie UKRV-Mel-15a (UKRV); Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

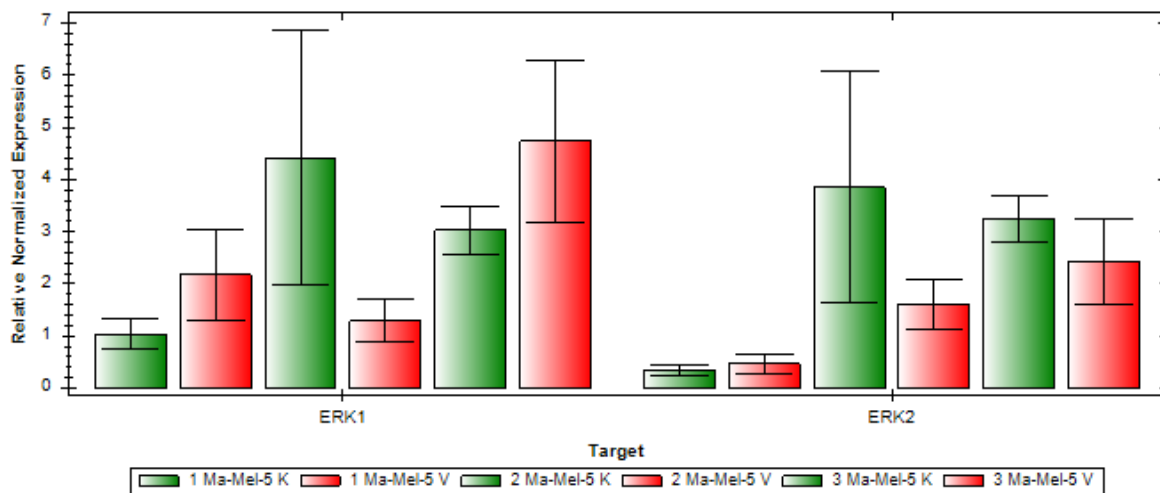


Abb. 21: Genanalyse für ERK1 und ERK2 bei der Zelllinie Ma-Mel-5; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Sowohl ERK1 als auch ERK2 konnten bei allen vier Zelllinien nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den anderen, ERK1 und ERK2 vorgeschalteten Bestandteilen des Signalweges, zeichnet sich hier ein deutlicheres Bild ab. Bei der Zelllinie MM415 zeigte sich in allen Versuchsdurchläufen eine verminderte Expression sowohl von ERK1 als auch von ERK2 bei der Vismodegibgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei MM127: abgesehen von einer Abweichung bei ERK1 wurde auch hier eine verminderte Expression von ERK1 und ERK2 bei der vismodegibbehandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen. UKRV-Mel-15a und Ma-Mel-5 zeigen sich allerdings erneut nicht eindeutig: Zwar ist

bei UKRV-Mel-15a bei ERK1 und bei Ma-Mel-5 bei ERK2 eine Tendenz zu einer verminderten Expression bei der Vismodegibgruppe zu erkennen, bei dem jeweils anderen Enzym zeigt sich allerdings eher eine gegenteilige Tendenz.

## 4.2.2 Vergleich der medikamentösen Therapie mit der Kontrollgruppe bei BRAF-mutierten Zellen

### 4.2.2.1 BRAF und NRAS

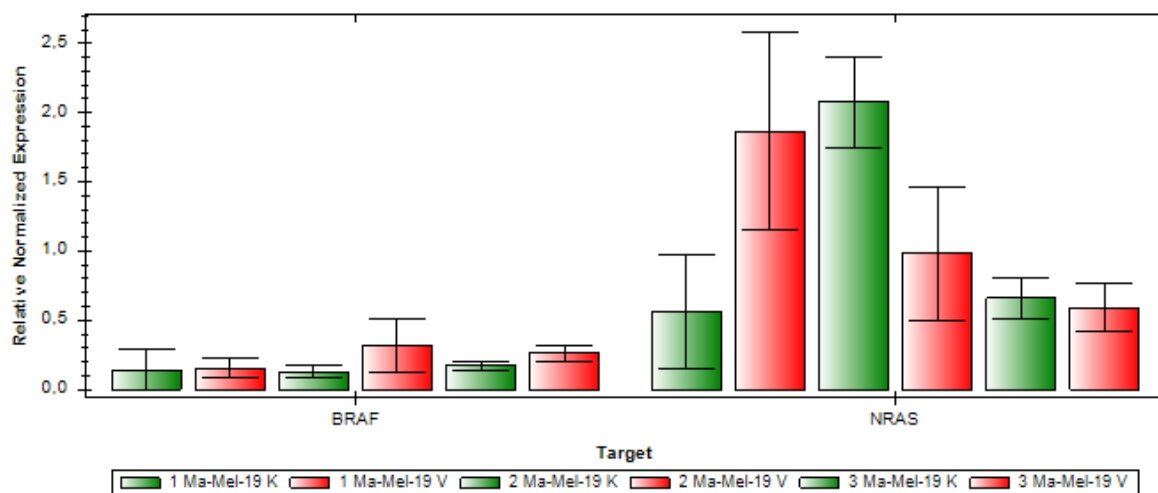


Abb. 22: Genanalyse für BRAF und NRAS bei der Zelllinie Ma-Mel-19; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

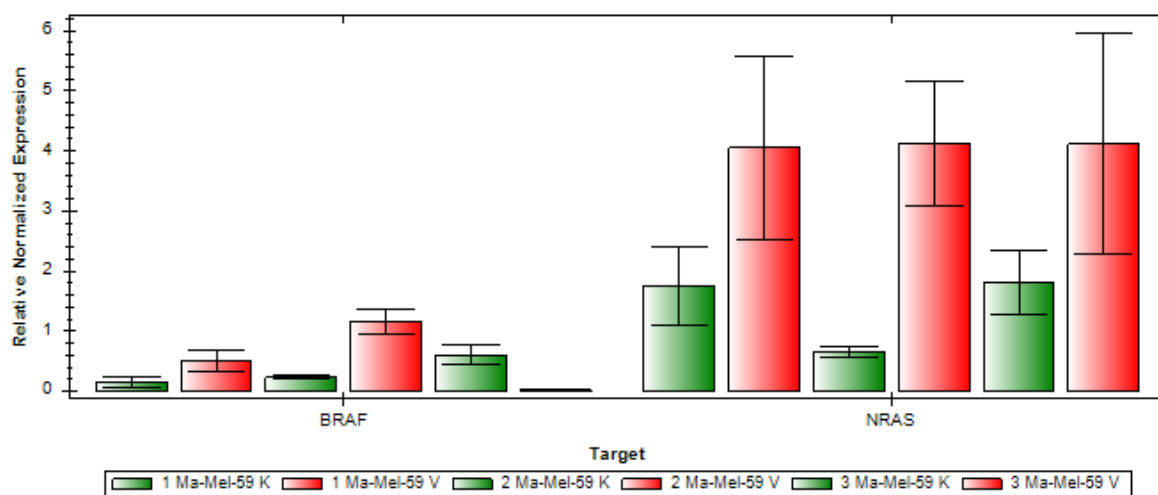


Abb. 23: Genanalyse für BRAF und NRAS bei der Zelllinie Ma-Mel-59; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

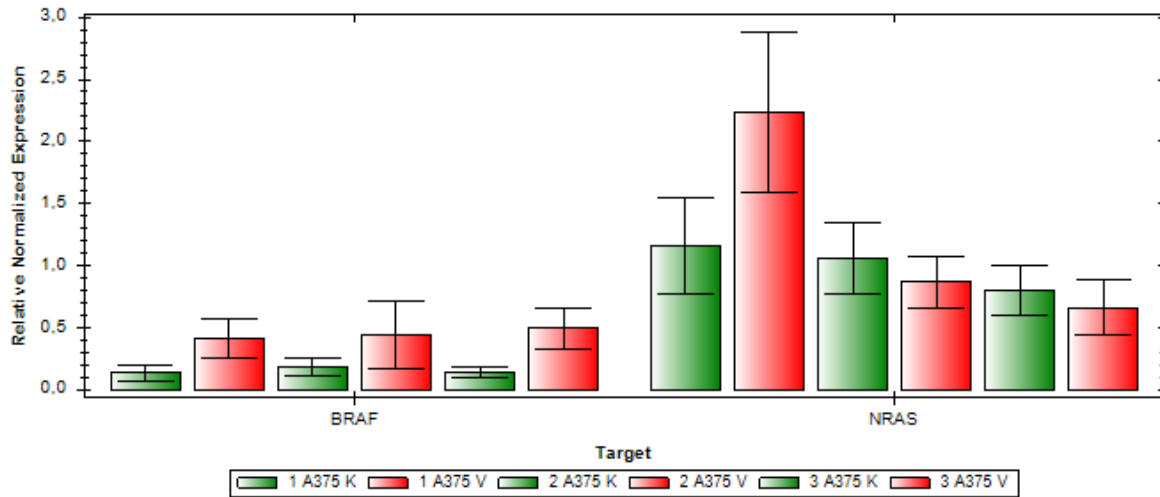


Abb. 24: Genanalyse für BRAF und NRAS bei der Zelllinie A375; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

BRAF und NRAS konnten auch bei den drei Zelllinien Ma-Mel-19, Ma-Mel-59 und A375 amplifiziert werden. Alle drei Zelllinien zeigen tendenziell eine vermehrte Expression von BRAF bei der Vismodegibgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Gleiches kann auch bei der Zelllinie Ma-Mel-59 für NRAS nachgewiesen werden. Bei Ma-Mel-19 und A375 zeigt sich eher eine Tendenz zur verminderten Expression von NRAS bei der vismodegibbehandelten Gruppe.

#### 4.2.2.2 MEK

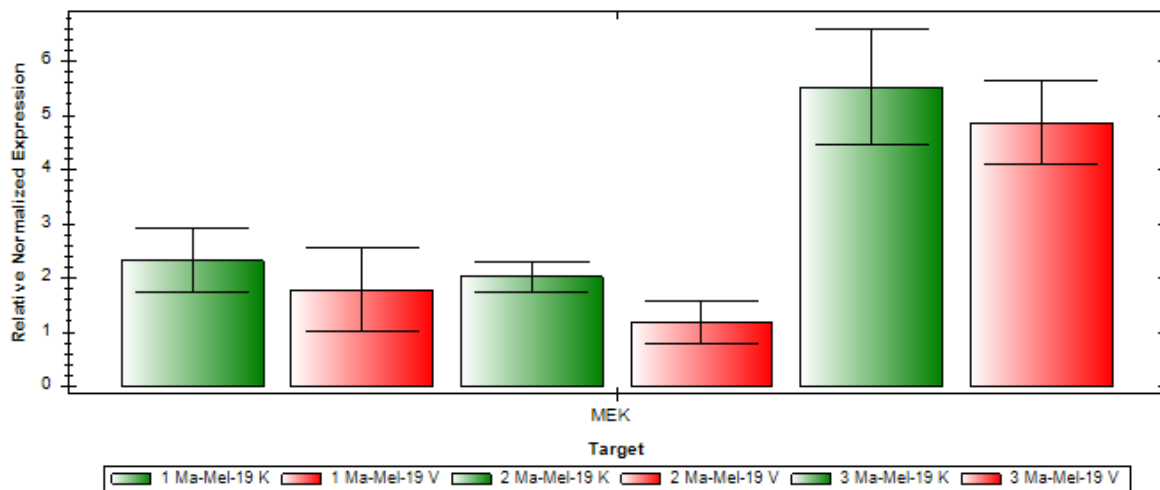


Abb. 25: Genanalyse für MEK bei der Zelllinie Ma-Mel-19; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)



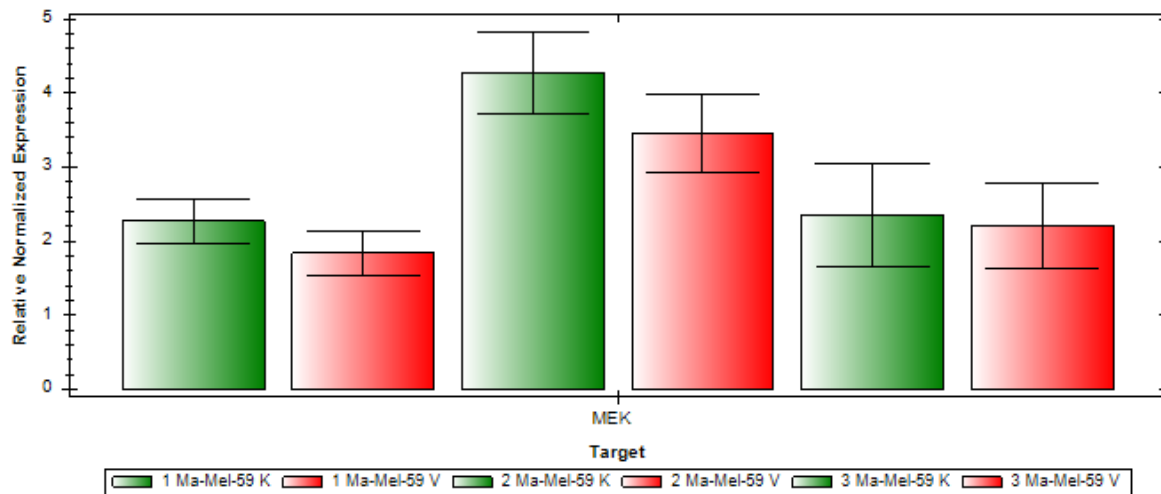


Abb. 26: Genanalyse für MEK bei der Zelllinie Ma-Mel-59; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

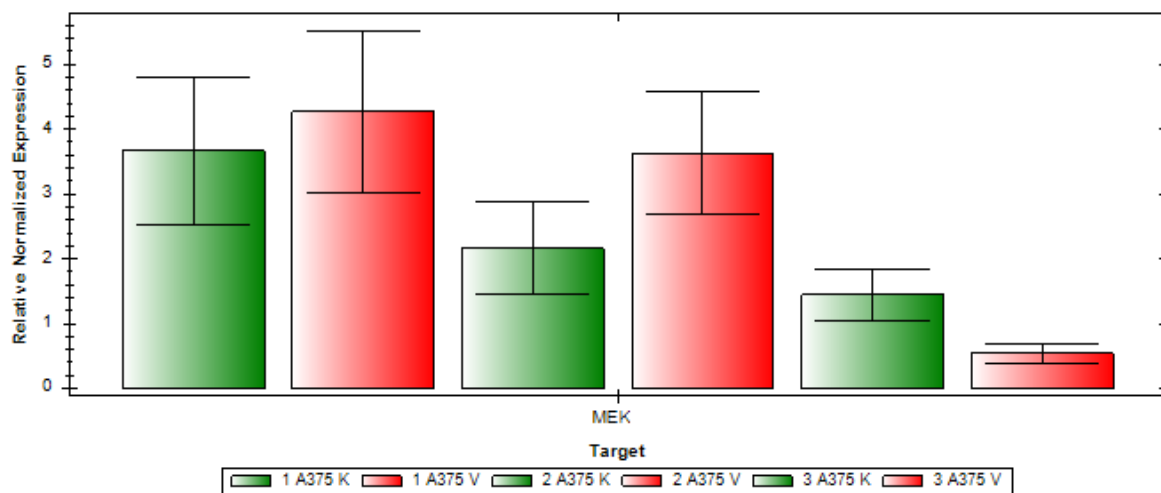


Abb. 27: Genanalyse für MEK bei der Zelllinie A375; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Der Nachweis von MEK gelang bei allen drei Zelllinien. Die Zelllinien Ma-Mel-19 und Ma-Mel-59 zeigen eine deutliche, reproduzierbare geringere Expression von MEK bei der Vismodegibgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. A375 zeigt hingegen eine Tendenz zu einer vermehrten Expression von MEK bei der vismodegibbehandelten Gruppe.

### 4.2.2.3 ERK 1 und ERK 2

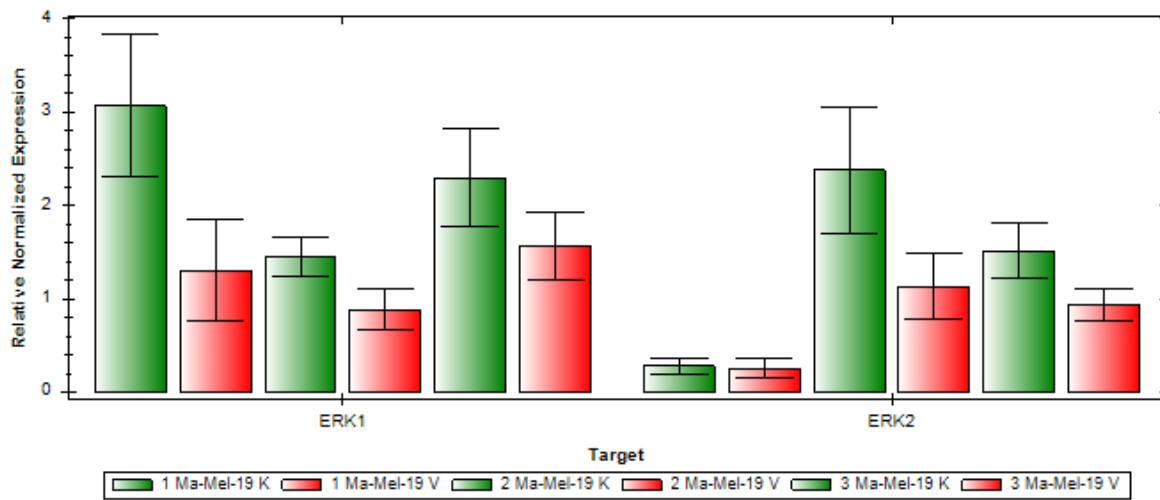


Abb. 28: Genanalyse für ERK1 und ERK2 bei der Zelllinie Ma-Mel-19; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

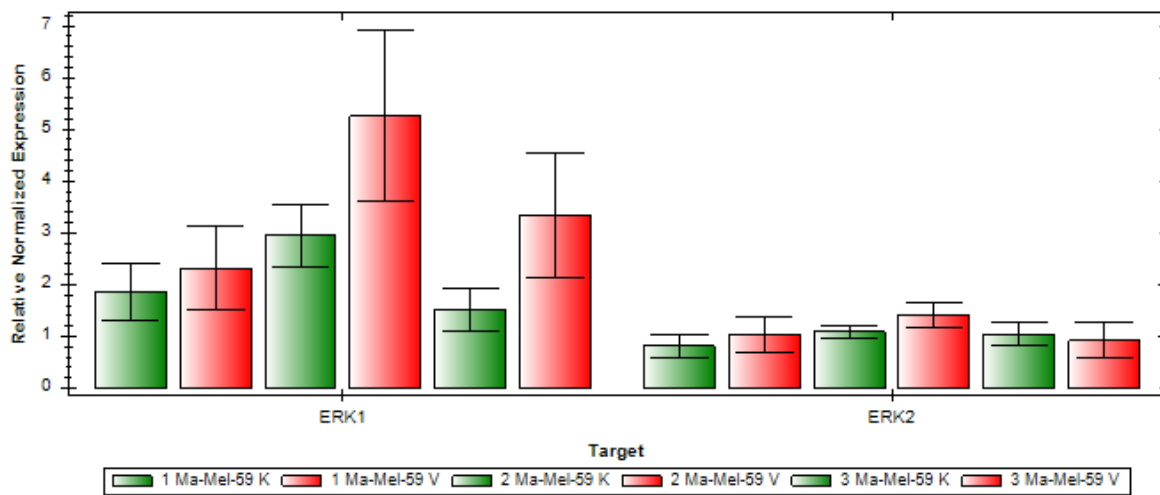


Abb. 29: Genanalyse für ERK1 und ERK2 bei der Zelllinie Ma-Mel-59; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

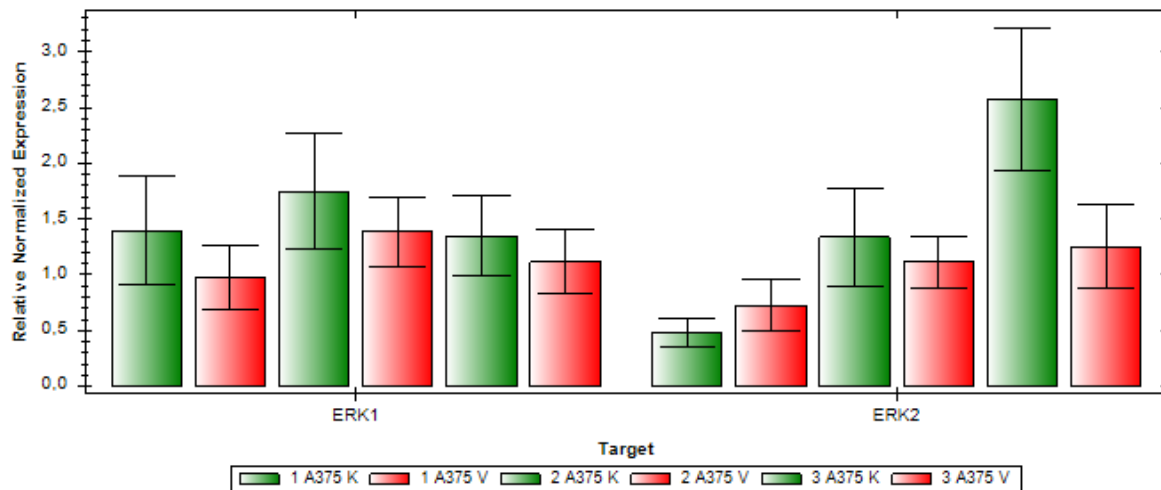


Abb. 30: Genanalyse für ERK1 und ERK2 bei der Zelllinie A375; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Die Zelllinie Ma-Mel-19 zeigt bei ERK1 und ERK2 ein ähnliches Bild wie bei MEK: Auch hier lässt sich eine reproduzierbare verminderte Expression der beiden Enzyme bei der Vismodegibgruppe erkennen. Ma-Mel-59 hingegen zeigt tendenziell eine erhöhte Expression von ERK1 bei der Vismodegibgruppe und bei ERK2 eine vergleichbare Expression bei der vismodegibbehandelten Gruppe und der Kontrollgruppe. Bei der Zelllinie A375 konnte eine verminderte Expression von ERK1 und auch eine tendenziell verminderte Expression von ERK2 bei der Vismodegibgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

## 4.2.3 Vergleich der medikamentösen Therapie mit der Kontrollgruppe bei Wildtyp-Zellen

### 4.2.3.1 BRAF und NRAS

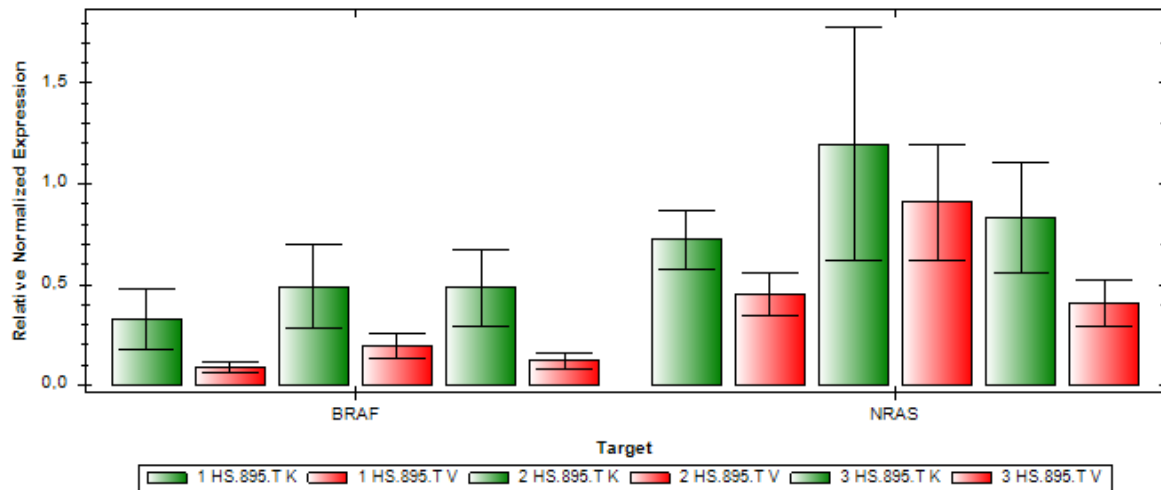


Abb. 31: Genanalyse für BRAF und NRAS bei der Zelllinie HS.895.T; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

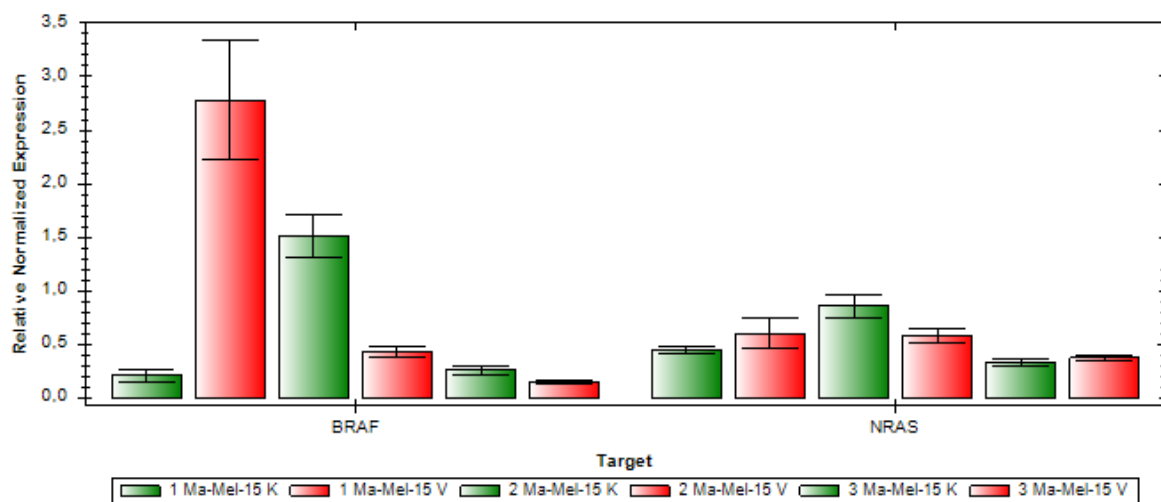


Abb. 32: Genanalyse für BRAF und NRAS bei der Zelllinie Ma-Mel-15; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Bei der Wildtyp-Zelllinie HS.895.T wurden sowohl BRAF als auch NRAS in der Vismodegibgruppe vermindert exprimiert. Die Zelllinie Ma-Mel-15 hingegen zeigt ein eher inhomogenes Bild mit einer tendenziell verminderten Expression von BRAF in der Vismodegibgruppe und einer eher ähnlichen Expression von NRAS in der Vismodegib- und der Kontrollgruppe.

### 4.2.3.2 MEK

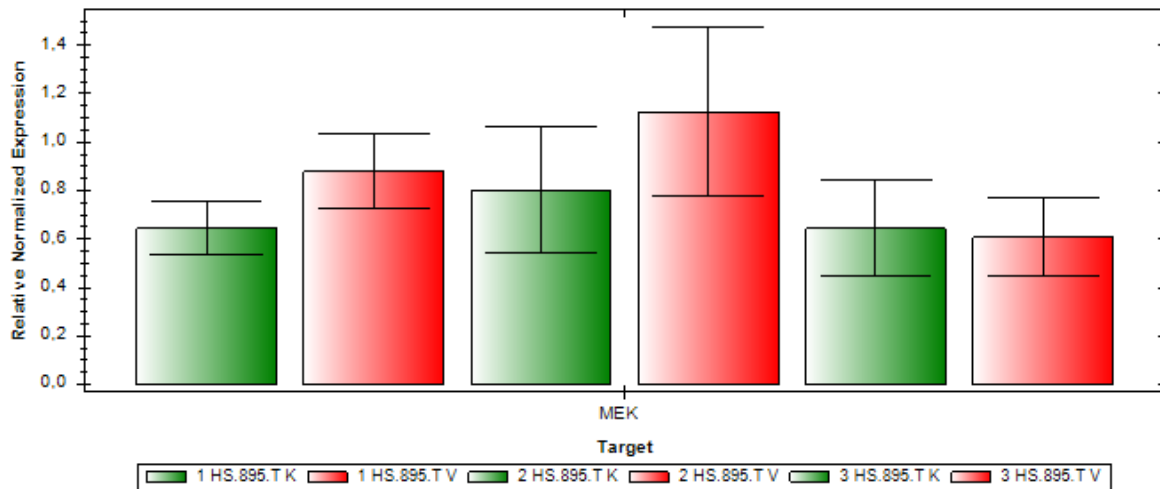


Abb. 33: Genanalyse für MEK bei der Zelllinie HS.895.T; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

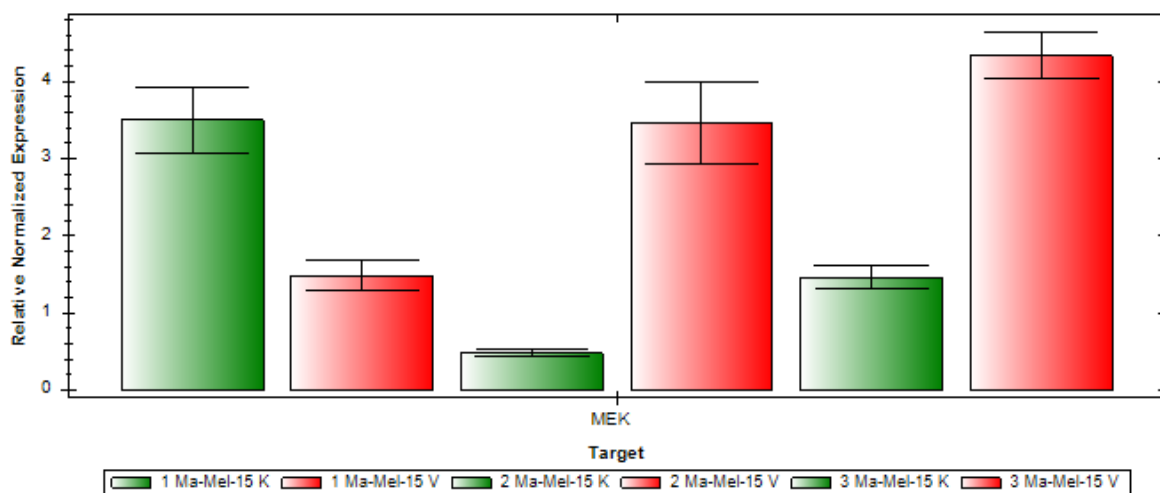


Abb. 34: Genanalyse für MEK bei der Zelllinie Ma-Mel-15; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

MEK konnte bei beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Beide Zelllinien zeigen tendenziell eine vermehrte Expression von MEK in der vismodegibbehandelten Gruppe.

### 4.2.3.3 ERK 1 und ERK 2

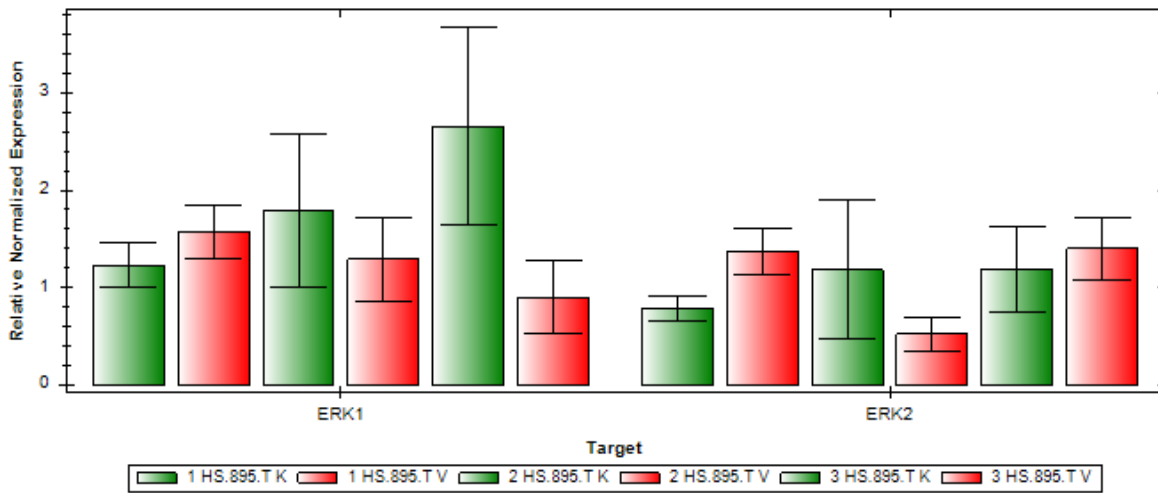


Abb. 35: Genanalyse für EKR1 und ERK2 bei der Zelllinie HS.895.T; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

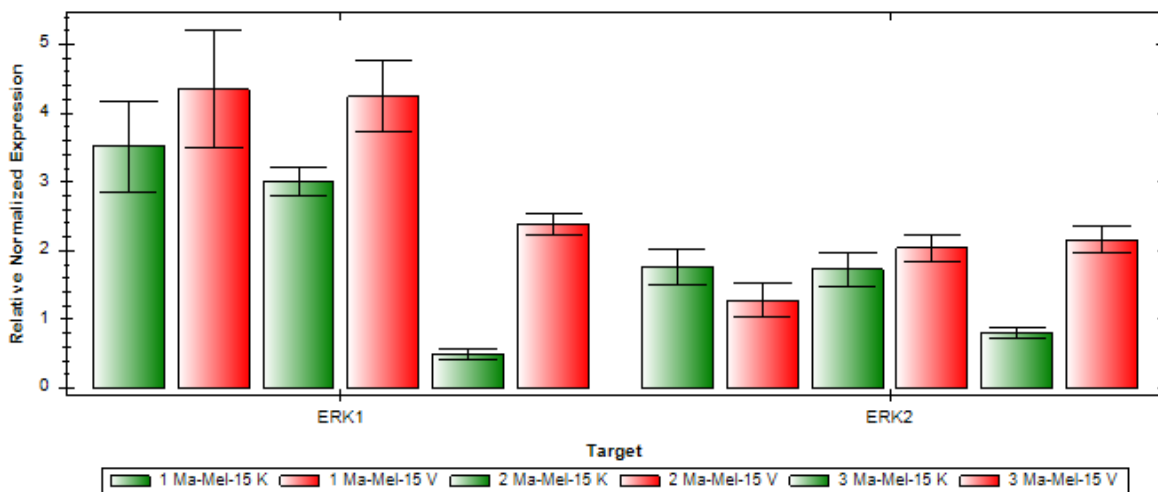


Abb. 36: Genanalyse für ERK1 und ERK2 bei der Zelllinie Ma-Mel-15; Kontrollgruppe (K, grün) im Vergleich zur vismodegibbehandelten Gruppe (V, rot)

Bei ERK1 konnte für die Zelllinie HS.895.T eine tendenziell verminderte Expression in der Vismodegibgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Bei ERK1 und ERK2 bei der Zelllinie Ma-Mel-15 sowie bei ERK2 bei der Zelllinie HS.895.T zeigt sich eine vermehrte Expression in der Vismodegibgruppe.

#### **4.2.4 Vergleich der NRAS-mutierten, BRAF-mutierten und Wildtyp-Zelllinien**

Die Zugabe von Vismodegib zu den BRAF- und NRAS-mutierten Zelllinien führte, abgesehen von Ma-Mel-5, zu einer erhöhten Expression von BRAF. Eine Zugabe zu den Wildtyp-Zelllinien hingegen führte tendenziell zu einer niedrigeren Expression von BRAF.

Bei NRAS zeigte sich bei den NRAS-mutierten Zelllinien ein ähnliches Bild: Auch hier zeigte nur Ma-Mel-5 eine verminderte Expression bei Vismodegibzugabe. Bei den BRAF-mutierten Zelllinien hingegen zeigten zwei der drei tendenziell ein Ansprechen auf Vismodegib, bei den Wildtyp-Zelllinien eine von zwei Zelllinien.

MEK wurde durch Zugabe von Vismodegib in der Gruppe der NRAS-mutierten Zelllinien nur von einer der vier Zelllinien tendenziell vermindert exprimiert, in der Gruppe der BRAF-mutierten Zelllinien von zwei der drei Zelllinien und in den Wildtyp-Zelllinien eher erhöht.

Für ERK1 und ERK2 konnte bei den NRAS-mutierten Zelllinien bei je drei der vier Zelllinien eine tendenziell verminderte Expression in der Vismodegibgruppe festgestellt werden, bei den BRAF-mutierten Zelllinien bei zwei der drei Zelllinien. Bei den Wildtyp-Zelllinien zeigte nur eine Zelllinie bei ERK1 tendenziell eine verminderte Expression, bei ERK2 keine der beiden.

Somit erscheint es so, als ob Vismodegib bei den Wildtyp-Zelllinien tendenziell eher die Expression von den Proteinen, die am Anfang des Signalweges stehen, vermindert, bei den BRAF- und NRAS-mutierten Zelllinien hingegen die Expression der Proteine am Ende des Signalweges.

## 5. Diskussion

Diese Arbeit hatte zum Ziel, den Zusammenhang zwischen dem RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg und dem Hedgehog-Signalweg im malignen Melanom zu untersuchen. Dabei war vor allem von Interesse, inwiefern sich die Reaktionen auf die Behandlung mit Vismodegib zwischen den NRAS-, BRAF-mutierten und Wildtyp-Zelllinien unterscheiden. Untersucht wurden in dem Zusammenhang die Zellviabilität und die Expression der verschiedenen Bestandteile des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweges im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und vismodegibbehandelter Gruppe in jeder Zelllinie.

### ***5.1 Beeinflussung der Viabilität der Melanomzellen durch einen Hedgehog-Inhibitor***

Neben der quantitativen Ausprägung der beteiligten Bestandteile des Signalweges wurde untersucht, inwiefern sich die Zugabe von Vismodegib zu den Zelllinien direkt auf die Viabilität der Zellen auswirkt. Hier zeigte sich ein Unterschied in der Reaktion der Zelllinien abhängig von deren Mutation.

Alle vier untersuchten NRAS-mutierten Zelllinien zeigten eine signifikant verminderte Viabilität in der Vismodegibgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein ähnliches Bild konnte bei den BRAF-mutierten Zelllinien nachgewiesen werden: Hier zeigte nur eine Zelllinie keine signifikant verminderte Viabilität.

Ganz anders verhält es sich mit den Wildtyp-Zelllinien: Bei diesen konnte bezüglich ihrer Viabilität kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Vismodegibgruppe nachgewiesen werden.

Dies deckt sich größtenteils mit den Erkenntnissen aus anderen Studien. Zum einen wurden in einigen Arbeiten bereits Nachweise dafür erbracht, dass die Hemmung des Hedgehog-Signalweges zu einer verminderten Viabilität von malignen Melanomzellen führen kann. Geng et al. untersuchten unter anderem den Einfluss des SMO-Antagonisten Cyclopamin auf murine maligne Melanomzellen und konnten feststellen, dass es durch Cyclopamin zu einer verringerten Vaskularisierung und auch zu einer verminderten Zellproliferation kam [130]. Eine Studie von Duan et al. kam bei der



Untersuchung von uvealen Melanomzelllinien zu einem ähnlichen Ergebnis: Das auch hier eingesetzte Cyclopamin führte auch in dieser Studie zu einer verringerten Zellproliferation sowie zu einer verminderten Zellviabilität und einer vermehrten Apoptose [131]. In diesen Studien wurde der Einfluss eines Hedgehog-Signalweg-Inhibitors allerdings ohne besonderes Augenmerk auf die Mutation der malignen Melanomzellen untersucht beziehungsweise kein Unterschied herausgearbeitet.

Es existieren zum anderen aber auch einige Arbeiten, die spezifischer die typischen Mutationen betrachten. In einer Studie von Stecca et al. wird neben allgemeinen Effekten durch eine SMO-Hemmung, wie beispielweise proliferativem Arrest, Tumorregression und verstärkter Apoptose, dargestellt, dass besonders RAS-induzierte maligne Melanome auf den Hedgehog-Signalweg angewiesen sind [132]. Eine Inhibition des Hedgehog-Signalweges könnte sich daher besonders durch die mögliche Interaktion mit RAS-mutierten Melanomen als sinnvoll erweisen. Diese Hypothese deckt sich mit unseren Ergebnissen: Alle vier untersuchten NRAS-mutierten Zelllinien zeigten eine signifikant verminderte Viabilität bei der Zugabe von Vismodegib im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Während Jalili et al. nach Behandlung mit dem SMO-Inhibitor NVP-LDE-225 ein Ansprechen sowohl von BRAF(V600E)-mutierte Zelllinien als auch von Wildtyp-Zelllinien nachweisen konnten, konnten O'Reilly et al. durch eine SMO-Inhibition neben verringertem Zellwachstum in vitro und in vivo Unterschiede bezüglich des Ansprechens zwischen den Zelllinien abhängig von deren Mutation feststellen [128, 129]. Es konnte eine antiproliferative Wirkung vor allem auf BRAF-mutierte, aber auch auf NRAS-mutierte Zelllinien nachgewiesen werden, wohingegen der Inhibitor bei BRAF-Wildtyp Zelllinien kaum einen Effekt erzielte [129]. Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich somit mehr mit den Erkenntnissen der Arbeit von O'Reilly et al.: Keine der untersuchten BRAF-Wildtyp-Zelllinien zeigte einen signifikanten Einfluss von Vismodegib auf deren Viabilität, wohingegen neben den untersuchten NRAS-mutierten Zelllinien auch zwei der drei untersuchten BRAF-mutierten Zelllinien eine signifikant verminderte Viabilität aufwiesen. Dies könnte einerseits auf die Einwirkzeit von Vismodegib zurückzuführen sein: Duan et al. beschreibt beispielsweise einen maximalen Einfluss auf die Viabilität nach drei Tagen [131]. Andererseits fanden O'Reilly et al. einen Zusammenhang zwischen dem Ansprechen und der Expression der Komponenten des Hedgehog-Signalweges: Dabei war der Effekt der Inhibition des Hedgehog-Signalweges bei Zelllinien mit moderater Expression der Komponenten des

Signalweges am besten, besonders eine erhöhte Expression führte eher zur Resistenz [129].

## ***5.2 Beeinflussung der Proteine des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweges durch einen Hedgehog-Inhibitor im malignen Melanom***

Mithilfe der PCR konnten die fünf Proteine RAS, RAF, MEK, ERK1 und ERK2 sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Vismodegibgruppe in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Betrachtet man die Stärke der Expression der einzelnen Proteine, stellte diese sich als sowohl von dem nachzuweisenden Protein als auch von der Zelllinie abhängig dar.

Allgemein zeigte sich interessanterweise die Tendenz, dass sich die Expression nicht nur zwischen, sondern auch innerhalb der verschiedenen Zelllinien abhängig von dem nachzuweisenden Protein unterschiedlich verhielt. Es konnte festgestellt werden, dass BRAF- und NRAS-mutierte Zelllinien unter Vismodegibeinwirkung eine tendenziell vermehrte Amplifikation der frühen Bestandteile des Signalweges, vor allem BRAF aber auch NRAS, zeigten, zum Ende des Signalweges hin allerdings das Gegenteil: Beide Gruppen zeigten bei der überwiegenden Mehrheit der Zelllinien (jeweils drei der vier bzw. zwei der drei) eine tendenziell verminderte Expression von ERK1 und ERK2 in der Vismodegibgruppe.

Im Vergleich erkennt man bei den Wildtyp-Zelllinien eine gegenteilige Tendenz: Hier konnte bei den frühen Bestandteilen des Signalweges eher eine verminderte Amplifikation von BRAF und teilweise auch NRAS unter Vismodegibeinwirkung aufgezeigt werden, welche gegen Ende des Signalweges bei ERK in eine tendenziell vermehrte Amplifikation umschwang.

Dies unterstützt allgemein die Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen dem Hedgehog-Signalweg und dem RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg besteht und es möglich ist, letzteren durch Inhibition von Komponenten des Hedgehog-Signalweges zu beeinflussen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben zudem einen Hinweis darauf, dass diese Beeinflussung scheinbar entweder nicht nur an einer Stelle des Signalweges stattfinden kann oder an unterschiedlichen Stellen möglicherweise unterschiedliche Auswirkungen hat.

Zudem ist auch hier zu erkennen, dass sich Wildtyp-Zelllinien bei Vismodegibbehandlung anders verhalten als BRAF-/NRAS-mutierte Zelllinien, was sich mit den Ergebnissen des MTT-Tests bezüglich der Abhängigkeit der Viabilität der Zelllinien von deren Mutation deckt.

Aber auch die untersuchten BRAF- und NRAS-mutierten Zelllinien verhalten sich nicht identisch: Während zwar ein Großteil ein ähnliches Ansprechen aufweist, zeigen vereinzelte Zelllinien abweichende Ergebnisse.

Dies könnte einerseits mit den bereits erwähnten Ergebnissen aus der Studie von O'Reilly et al. zusammenhängen, die einen Zusammenhang zwischen der Expression der Komponenten des Hedgehog-Signalweges und dem Ansprechen der Zellen auf die Inhibition dessen sehen [129].

Ein weiterer Ansatzpunkt könnte sein, dass nicht in jeder Zelllinie der Hedgehog-Signalweg durch Vismodegib in gleichem Maße beeinflusst wird: Ähnlich der primären Resistenz, die teilweise in den mit vismodegibbehandelten Basalzellkarzinomen vorliegt, könnte auch hier das Problem in dem verminderten Ansprechen des Hedgehog-Signalweges liegen [121, 122].

Bezugnehmend auf die Studienlage ist außerdem davon auszugehen, dass nicht nur die Mutationen der Komponenten des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweges einen Einfluss auf die Reaktion der Melanomzellen auf Vismodegib haben, sondern auch andere Mutationen oder Signalwege einen wichtigen Faktor darstellen.

Zum einen weisen Melanomzellen im Normalfall nicht nur eine, sondern eine Vielzahl von Mutationen auf, die sich positiv oder auch negativ auf das Ansprechen der Zelllinie auf den Inhibitor auswirken könnten.

Zum anderen sind heute bereits eine große Zahl anderer Moleküle und Signalwege bekannt, auf die der Hedgehog-Signalweg Einfluss ausüben kann. Ein Beispiel dafür stellt der WNT-Signalweg dar. Dieser hat zum einen Funktionen in der Organogenese und in der Stammzellregeneration, zum anderen konnte er in einigen Malignomen wie beispielsweise colorektalen Tumoren nachgewiesen werden, wobei eine Überaktivierung des Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweges zur Progression des Tumors führte [133]. Zudem wurde bereits beschrieben, dass über eine Verminderung von SMO auch

Wnt herunterreguliert und somit die Tumorgenese unterdrückt werden kann [134]. Dabei scheint dem Wnt-Signalweg auch eine Rolle beim Wachstum und der Metastasierung des malignen Melanoms zuzukommen [135].

Andererseits hat der Hedgehog-Signalweg auch Einfluss auf Proteine wie MYCN, ein Protoonkogen, das sowohl in der Lage ist, Zellproliferation und Zellwachstum, als auch die Apoptose voranzutreiben [136].

Dies sind nur zwei Beispiele aus der langen Liste von Targets des Hedgehog-Signalweges, die aufzeigen, wie komplex das Zusammenspiel der vielen Signalwege und Moleküle ist und dass dementsprechend davon auszugehen ist, dass die Beeinflussung eines Proteins auch eine Vielzahl von Effekten mit sich bringt.

### ***5.3 Relevanz des Hedgehog-Signalweges für das maligne Melanom***

Die aktuelle Datenlage zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit lässt vermuten, dass die Beeinflussung des Hedgehog-Signalweges zumindest in bestimmten Melanomzelllinien eine mögliche sinnvolle zusätzliche Therapieoption darstellen kann, auch wenn naturgemäß vorher weitere in vitro und besonders auch in vivo Studien vonnöten sind, um das genaue Ausmaß des Effektes darzustellen.

Sinnvoll wäre es dabei sicherlich, ein genaues Augenmerk darauf zu legen, welche Patientengruppen speziell von einer zusätzlichen Therapie mit einem Hedgehog-Signalweg-Inhibitor profitieren würden. Zwar konnten bereits einige Einflussfaktoren auf das Ansprechen beziehungsweise die Resistenz dargelegt werden, allerdings scheinen dies nicht die einzigen wichtigen Faktoren zu sein.

Neben diesem allgemeinen Einfluss der Inhibition des Hedgehog-Signalweges auf die Melanomzellen, der das Potential birgt, direkt in die Viabilität und Proliferation des malignen Melanoms einzugreifen, zeichnen sich allerdings auch weitere mögliche Therapieeffekte ab, von denen möglicherweise eine größere Patientengruppe profitieren kann. In einigen Studien wurde nämlich neben den oben genannten Ergebnissen auch ein Einfluss auf die Metastasierung festgestellt, welche immer noch eines der größten Probleme des malignen Melanoms darstellt. Gunarta et al. konnte in seiner Studie eine dosisabhängige Verringerung der Invasionsaktivität bei Behandlung mit Cyclopamin sowie eine verringerte Anzahl an Lungenmetastasen bei Gli-Knockdown-Mäusen feststellen [137]. Andere Autoren kamen zu ähnlichen

Ergebnissen, auch Duan et al. konnten eine Verminderung der Migration feststellen und Stecca et al. eine verringerte Anzahl an Lungenmetastasen [131, 132].

Der Hedgehog-Signalweg scheint damit zudem in die Tumorumgebung einzugreifen, denn auch die Vaskularisierung und die Permeabilität der Blutgefäße scheinen durch eine Inhibition verringert werden zu können [130].

Eine sinnvolle Einsatzmöglichkeit scheint außerdem besonders eine Kombination mit einem BRAF-Inhibitor wie Vemurafenib zu sein. Mehrere Studien konnten nachweisen, dass der Einsatz eines Hedgehog-Signalweg-Inhibitors bei einer BRAF-Inhibitor-Resistenz die Sensitivität gegenüber dem BRAF-Inhibitor wiederherstellen konnte [127, 138, 139].

Nichtsdestotrotz erscheint es immer wieder so, dass nicht nur einzelne Faktoren, sondern häufig eine Vielzahl von Molekülen und Signalwegen einen Einfluss aufweisen, sodass besonders der Untersuchung der Zusammenhänge der unterschiedlichen Signalwege weiterhin ein großer Stellenwert in der Forschung zugeteilt werden sollte.

## 6. Zusammenfassung

Diese Arbeit hatte zum Ziel, zu untersuchen, inwiefern sich die Reaktionen von BRAF-/NRAS-mutierten Zelllinien und Wildtyp-Zelllinien auf die Gabe eines Hedgehog-Signalweg-Inhibitors unterscheiden. Es wurde zum einen auf molekularer Ebene mithilfe der PCR betrachtet, welchen Einfluss die Behandlung mit Vismodegib auf die Komponenten des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweges in den verschiedenen Zelllinien aufweist. Zum anderen wurde untersucht, wie sich Vismodegib auf die Viabilität der unterschiedlichen Zelllinien auswirkt.

Es konnte mithilfe der PCR gezeigt werden, dass durch Vismodegibeinwirkung in den BRAF- und NRAS-mutierten Zelllinien frühe Komponenten des Signalweges wie BRAF tendenziell vermehrt, späte Elemente wie ERK hingegen tendenziell vermindert exprimiert werden. Die Wildtyp-Zelllinien zeigten ein gegenteiliges Bild: Hier wurden frühe Elemente tendenziell vermindert und späte Elemente tendenziell vermehrt amplifiziert. Die Ergebnisse zeigten sich zwar nicht für alle Zelllinien einer Gruppe identisch, allerdings folgte die Mehrheit der Zelllinien diesem Schema.

Auch hinsichtlich der Viabilität zeigten die Wildtyp-Zelllinien eine von den BRAF- und NRAS-mutierten Zelllinien differierende Reaktion: Während nahezu alle BRAF- und NRAS-mutierten Zelllinien eine signifikant verminderte Viabilität der vismodegibbehandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten, konnte bei beiden untersuchten Wildtyp-Zelllinien keine signifikante Veränderung der Viabilität zwischen der Vismodegibgruppe und der Kontrollgruppe gefunden werden.

Somit zeigen die Wildtyp-Zelllinien sowohl beim MTT-Test als auch bei der PCR eine von den beiden anderen Gruppen abweichende Reaktion.

Diese Erkenntnisse decken sich mit einigen anderen Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Wirkung einer Hemmung des Hedgehog-Signalweg und dem Vorhanden- oder Nichtvorhandensein einer RAS- oder RAF-Mutation der Melanomzelllinien untersucht haben.

Es erscheint allerdings so, dass nicht nur die NRAS- oder BRAF-Mutation der Melanomzelllinie einen Einfluss hat, sondern auch weitere Faktoren beeinflussen, inwiefern sich die Inhibition des Hedgehog-Signalweges auf die Zellen auswirkt. Dies ist vor dem Hintergrund der Vielzahl der Targets des Hedgehog-Signalweges nicht verwunderlich. Trotzdem stellt sich die Hemmung des Hedgehog-Signalweges als Möglichkeit einer vielversprechenden zusätzlichen Therapie dar, die zwar

höchstwahrscheinlich nicht allein, aber in Kombination mit anderen Therapeutika möglicherweise das Potential besitzt, das Fortschreiten der Tumorerkrankung zu vermindern. Dabei sollten zukünftige Studien die Zusammenhänge der Signalwege und der Einflussfaktoren auf die Reaktion der malignen Melanomzellen weiter untersuchen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Leiter, U., F. Meier, B. Schittek, C. Garbe. The natural course of cutaneous melanoma. *J Surg Oncol*. 2004; 86(4): 172-8.
2. Guy, G.P., Jr., C.C. Thomas, T. Thompson, M. Watson, G.M. Massetti, L.C. Richardson, C. Centers for Disease, Prevention. Vital signs: melanoma incidence and mortality trends and projections - United States, 1982-2030. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2015; 64(21): 591-6.
3. Siegel, R., J. Ma, Z. Zou, A. Jemal. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014; 64(1): 9-29.
4. Robert Koch-Institut, Hrsg., Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Hrsg. Krebs in Deutschland für 2013/2014 [E-Book]. 11. Ausgabe. Berlin; 2017.DOI: 10.17886/rkipubl-2017-007.
5. Siegel, R.L., K.D. Miller, A. Jemal. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017; 67(1): 7-30.
6. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF). Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 3.1. 2018. AWMF Registernummer: 032/024OL. <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leit-linien/melanom/> (abgerufen am: 25.03.2019).
7. Karimkhani, C., A.C. Green, T. Nijsten, M.A. Weinstock, R.P. Dellavalle, M. Naghavi, C. Fitzmaurice. The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease Study 2015. *Br J Dermatol*. 2017; 177(1): 134-140.
8. Swetter SM, C.C., Keegan THM. Why do men have worse melanoma survival than women? Is it behavior, biology, or both? *The Melanoma Letter*. 2014; 32(2).
9. Barnes, B., K. Kraywinkel, E. Nowossadeck, I. Schönfeld, A. Starker, A. Wienecke, U. Wolf. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut. 2016; DOI: 10.17886/rkipubl-2016-014.
10. Brunssen, A., A. Waldmann, N. Eisemann, A. Katalinic. Impact of skin cancer screening and secondary prevention campaigns on skin cancer incidence and mortality: A systematic review. *J Am Acad Dermatol*. 2017; 76(1): 129-139 e10.
11. Sample, A., Y.Y. He. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2018; 34(1): 13-24.
12. Lo, J.A., D.E. Fisher. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science*. 2014; 346(6212): 945-9.
13. Gimotty, P.A., D.E. Elder, D.L. Fraker, J. Botbyl, K. Sellers, R. Elenitsas, M.E. Ming, L. Schuchter, F.R. Spitz, B.J. Czerniecki, D. Guerry. Identification of high-risk patients among those diagnosed with thin cutaneous melanomas. *J Clin Oncol*. 2007; 25(9): 1129-34.
14. Ugurel, S., J. Rohmel, P.A. Ascierto, K.T. Flaherty, J.J. Grob, A. Hauschild, J. Larkin, G.V. Long, P. Lorigan, G.A. McArthur, A. Ribas, C. Robert, D. Schadendorf, C. Garbe. Survival of patients with advanced metastatic melanoma: the impact of novel therapies-update 2017. *Eur J Cancer*. 2017; 83: 247-257.
15. Tran, K.T., N.A. Wright, C.J. Cockerell. Biopsy of the pigmented lesion--when and how. *J Am Acad Dermatol*. 2008; 59(5): 852-71.
16. Bichakjian, C.K., A.C. Halpern, T.M. Johnson, A. Foote Hood, J.M. Grichnik, S.M. Swetter, H. Tsao, V.H. Barbosa, T.Y. Chuang, M. Duvic, V.C. Ho, A.J. Sober, K.R. Beutner, R. Bhushan, W. Smith Begolka, D. American Academy of. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma.



- American Academy of Dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 2011; 65(5): 1032-47.
17. Leilabadi, S.N., A. Chen, S. Tsai, V. Soundararajan, H. Silberman, A.K. Wong. Update and Review on the Surgical Management of Primary Cutaneous Melanoma. *Healthcare (Basel).* 2014; 2(2): 234-49.
  18. Zuluaga-Sepulveda, M.A., I. Arellano-Mendoza, J. Ocampo-Candiani. Actualizacion en el tratamiento quirurgico del melanoma cutaneo primario y metastasico. *Cir Cir.* 2016; 84(1): 77-84.
  19. Kenady, D.E., B.W. Brown, C.M. McBride. Excision of underlying fascia with a primary malignant melanoma: effect on recurrence and survival rates. *Surgery.* 1982; 92(4): 615-8.
  20. Hunger, R.E., S.M. Seyed Jafari, S. Angermeier, M. Shafighi. Excision of fascia in melanoma thicker than 2 mm: no evidence for improved clinical outcome. *Br J Dermatol.* 2014; 171(6): 1391-6.
  21. Conic, R.Z., C.I. Cabrera, A.A. Khorana, B.R. Gastman. Determination of the impact of melanoma surgical timing on survival using the National Cancer Database. *J Am Acad Dermatol.* 2018; 78(1): 40-46 e7.
  22. Bafounta, M.L., A. Beauchet, S. Chagnon, P. Saiag. Ultrasonography or palpation for detection of melanoma nodal invasion: a meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2004; 5(11): 673-80.
  23. Mocellin, S., G. Zavagno, D. Nitti. The prognostic value of serum S100B in patients with cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2008; 123(10): 2370-6.
  24. Mays, M.P., R.C. Martin, A. Burton, B. Ginter, M.J. Edwards, D.S. Reintgen, M.I. Ross, M.M. Urist, A.J. Stromberg, K.M. McMasters, C.R. Scoggins. Should all patients with melanoma between 1 and 2 mm Breslow thickness undergo sentinel lymph node biopsy? *Cancer.* 2010; 116(6): 1535-44.
  25. Morton, D.L., J.F. Thompson, A.J. Cochran, N. Mozzillo, O.E. Nieweg, D.F. Roses, H.J. Hoekstra, C.P. Karakousis, C.A. Puleo, B.J. Coventry, M. Kashani-Sabet, B.M. Smithers, E. Paul, W.G. Kraybill, J.G. McKinnon, H.J. Wang, R. Elashoff, M.B. Faries, M. Group. Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. *N Engl J Med.* 2014; 370(7): 599-609.
  26. Kunte, C., T. Geimer, J. Baumert, B. Konz, M. Volkenandt, M. Flaig, T. Ruzicka, C. Berking, M.H. Schmid-Wendtner. Prognostic factors associated with sentinel lymph node positivity and effect of sentinel status on survival: an analysis of 1049 patients with cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* 2010; 20(4): 330-7.
  27. Testori, A., G.L. De Salvo, M.C. Montesco, G. Trifiro, S. Mocellin, G. Landi, G. Macripo, P. Carcoforo, G. Ricotti, G. Giudice, F. Picciotto, D. Donner, F. Di Filippo, J. Soteldo, D. Casara, M. Schiavon, A. Vecchiato, S. Pasquali, F. Baldini, G. Mazzarol, C.R. Rossi, I. Italian Melanoma. Clinical considerations on sentinel node biopsy in melanoma from an Italian multicentric study on 1,313 patients (SOLISM-IMI). *Ann Surg Oncol.* 2009; 16(7): 2018-27.
  28. Delgado, A.F., A.F. Delgado. Complete Lymph Node Dissection in Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Anticancer Res.* 2017; 37(12): 6825-6829.
  29. Stevens, G., J.F. Thompson, I. Firth, C.J. O'Brien, W.H. McCarthy, M.J. Quinn. Locally advanced melanoma: results of postoperative hypofractionated radiation therapy. *Cancer.* 2000; 88(1): 88-94.
  30. Farshad, A., G. Burg, R. Panizzon, R. Dummer. A retrospective study of 150 patients with lentigo maligna and lentigo maligna melanoma and the efficacy of radiotherapy using Grenz or soft X-rays. *Br J Dermatol.* 2002; 146(6): 1042-6.

31. Gojkovic-Horvat, A., B. Jancar, M. Blas, B. Zumer, K. Karner, M. Hocevar, P. Strojjan. Adjuvant radiotherapy for palpable melanoma metastases to the groin: when to irradiate? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012; 83(1): 310-6.
32. Ives, N.J., S. Suci, A.M.M. Eggermont, J. Kirkwood, P. Lorigan, S.N. Markovic, C. Garbe, K. Wheatley, G. International Melanoma Meta-Analysis Collaborative. Adjuvant interferon-alpha for the treatment of high-risk melanoma: An individual patient data meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2017; 82: 171-183.
33. Mocellin, S., S. Pasquali, C.R. Rossi, D. Nitti. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102(7): 493-501.
34. Di Trolino, R., E. Simeone, G. Di Lorenzo, C. Buonerba, P.A. Ascierto. The use of interferon in melanoma patients: a systematic review. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015; 26(2): 203-12.
35. Eggermont, A.M.M., C.U. Blank, M. Mandala, G.V. Long, V. Atkinson, S. Dalle, A. Haydon, M. Lichinitser, A. Khatkhat, M.S. Carlino, S. Sandhu, J. Larkin, S. Puig, P.A. Ascierto, P. Rutkowski, D. Schadendorf, R. Koornstra, L. Hernandez-Aya, M. Maio, A.J.M. van den Eertwegh, J.J. Grob, R. Gutzmer, R. Jamal, P. Lorigan, N. Ibrahim, S. Marreaud, A.C.J. van Akkooij, S. Suci, C. Robert. Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. *N Engl J Med.* 2018; 378(19): 1789-1801.
36. Long, G.V., A. Hauschild, M. Santinami, V. Atkinson, M. Mandala, V. Chiarion-Sileni, J. Larkin, M. Nyakas, C. Dutriaux, A. Haydon, C. Robert, L. Mortier, J. Schachter, D. Schadendorf, T. Lesimple, R. Plummer, R. Ji, P. Zhang, B. Mookerjee, J. Legos, R. Kefford, R. Dummer, J.M. Kirkwood. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med.* 2017; 377(19): 1813-1823.
37. Iwai, Y., J. Hamanishi, K. Chamoto, T. Honjo. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J Biomed Sci.* 2017; 24(1): 26.
38. Iwai, Y., M. Ishida, Y. Tanaka, T. Okazaki, T. Honjo, N. Minato. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(19): 12293-7.
39. Ascierto, P.A., G.V. Long, C. Robert, B. Brady, C. Dutriaux, A.M. Di Giacomo, L. Mortier, J.C. Hassel, P. Rutkowski, C. McNeil, E. Kalinka-Warzocho, K.J. Savage, M.M. Hernberg, C. Lebbe, J. Charles, C. Mihalciou, V. Chiarion-Sileni, C. Mauch, F. Cognetti, L. Ny, A. Arance, I.M. Svane, D. Schadendorf, H. Gogas, A. Sazi, J. Jiang, J. Rizzo, V. Atkinson. Survival Outcomes in Patients With Previously Untreated BRAF Wild-Type Advanced Melanoma Treated With Nivolumab Therapy: Three-Year Follow-up of a Randomized Phase 3 Trial. *JAMA Oncol.* 2019; 5(2): 187-194.
40. Montagut, C., J. Settleman. Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Lett.* 2009; 283(2): 125-34.
41. Samatar, A.A., P.I. Poulikakos. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2014; 13(12): 928-42.
42. Terrell, E.M., D.K. Morrison. Ras-Mediated Activation of the Raf Family Kinases. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019; 9(1): a033746.
43. Furue, M., T. Kadono. Melanoma therapy: Check the checkpoints. *J Dermatol.* 2016; 43(2): 121-4.
44. Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(1): 11-22.

45. Kolch, W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochemical Journal*. 2000; 351(2): 289-305.
46. McCormick, F. Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature*. 1993; 363(6424): 15-6.
47. Dhillon, A.S., S. Hagan, O. Rath, W. Kolch. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007; 26(22): 3279-90.
48. Hancock, J.F. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4(5): 373-84.
49. Baines, A.T., D. Xu, C.J. Der. Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Med Chem*. 2011; 3(14): 1787-808.
50. Rajakulendran, T., M. Sahmi, M. Lefrancois, F. Sicheri, M. Therrien. A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature*. 2009; 461(7263): 542-5.
51. Dhomen, N., R. Marais. New insight into BRAF mutations in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2007; 17(1): 31-9.
52. Lavoie, H., M. Therrien. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015; 16(5): 281-98.
53. Freeman, A.K., D.A. Ritt, D.K. Morrison. The importance of Raf dimerization in cell signaling. *Small GTPases*. 2013; 4(3): 180-5.
54. Rushworth, L.K., A.D. Hindley, E. O'Neill, W. Kolch. Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol Cell Biol*. 2006; 26(6): 2262-72.
55. Nguyen, A., W.R. Burack, J.L. Stock, R. Kortum, O.V. Chaika, M. Afkarian, W.J. Muller, K.M. Murphy, D.K. Morrison, R.E. Lewis, J. McNeish, A.S. Shaw. Kinase suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation in vivo. *Mol Cell Biol*. 2002; 22(9): 3035-45.
56. Lavoie, H., M. Sahmi, P. Maisonneuve, S.A. Marullo, N. Thevakumaran, T. Jin, I. Kurinov, F. Sicheri, M. Therrien. MEK drives BRAF activation through allosteric control of KSR proteins. *Nature*. 2018; 554(7693): 549-553.
57. Brennan, D.F., A.C. Dar, N.T. Hertz, W.C. Chao, A.L. Burlingame, K.M. Shokat, D. Barford. A Raf-induced allosteric transition of KSR stimulates phosphorylation of MEK. *Nature*. 2011; 472(7343): 366-9.
58. Yaeger, R., R.B. Corcoran. Targeting Alterations in the RAF-MEK Pathway. *Cancer Discov*. 2019; 9(3): 329-341.
59. Unal, E.B., F. Uhlitz, N. Bluthgen. A compendium of ERK targets. *FEBS Lett*. 2017; 591(17): 2607-2615.
60. O'Bryan, J.P. Pharmacological targeting of RAS: Recent success with direct inhibitors. *Pharmacol Res*. 2019; 139: 503-511.
61. Whyte, D.B., P. Kirschmeier, T.N. Hockenberry, I. Nunez-Oliva, L. James, J.J. Catino, W.R. Bishop, J.K. Pai. K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J Biol Chem*. 1997; 272(22): 14459-64.
62. Novotny, C.J., G.L. Hamilton, F. McCormick, K.M. Shokat. Farnesyltransferase-Mediated Delivery of a Covalent Inhibitor Overcomes Alternative Prenylation to Mislocalize K-Ras. *ACS Chem Biol*. 2017; 12(7): 1956-1962.
63. Chandra, A., H.E. Grecco, V. Pisupati, D. Perera, L. Cassidy, F. Skoulidis, S.A. Ismail, C. Hedberg, M. Hanzal-Bayer, A.R. Venkitaraman, A. Wittinghofer, P.I. Bastiaens. The GDI-like solubilizing factor PDEdelta sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins. *Nat Cell Biol*. 2011; 14(2): 148-58.
64. Zimmermann, G., B. Papke, S. Ismail, N. Vartak, A. Chandra, M. Hoffmann, S.A. Hahn, G. Triola, A. Wittinghofer, P.I. Bastiaens, H. Waldmann. Small

- molecule inhibition of the KRAS-PDEdelta interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature*. 2013; 497(7451): 638-42.
65. Sun, Q., J.P. Burke, J. Phan, M.C. Burns, E.T. Olejniczak, A.G. Waterson, T. Lee, O.W. Rossanese, S.W. Fesik. Discovery of small molecules that bind to K-Ras and inhibit Sos-mediated activation. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2012; 51(25): 6140-3.
66. Ostrem, J.M., U. Peters, M.L. Sos, J.A. Wells, K.M. Shokat. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature*. 2013; 503(7477): 548-51.
67. Emuss, V., M. Garnett, C. Mason, R. Marais. Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF. *Cancer Res*. 2005; 65(21): 9719-26.
68. Bollag, G., P. Hirth, J. Tsai, J. Zhang, P.N. Ibrahim, H. Cho, W. Spevak, C. Zhang, Y. Zhang, G. Habets, E.A. Burton, B. Wong, G. Tsang, B.L. West, B. Powell, R. Shellooe, A. Marimuthu, H. Nguyen, K.Y. Zhang, D.R. Artis, J. Schlessinger, F. Su, B. Higgins, R. Iyer, K. D'Andrea, A. Koehler, M. Stumm, P.S. Lin, R.J. Lee, J. Grippo, I. Puzanov, K.B. Kim, A. Ribas, G.A. McArthur, J.A. Sosman, P.B. Chapman, K.T. Flaherty, X. Xu, K.L. Nathanson, K. Nolop. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*. 2010; 467(7315): 596-9.
69. Chapman, P.B., A. Hauschild, C. Robert, J.B. Haanen, P. Ascierto, J. Larkin, R. Dummer, C. Garbe, A. Testori, M. Maio, D. Hogg, P. Lorigan, C. Lebbe, T. Jouary, D. Schadendorf, A. Ribas, S.J. O'Day, J.A. Sosman, J.M. Kirkwood, A.M. Eggermont, B. Dreno, K. Nolop, J. Li, B. Nelson, J. Hou, R.J. Lee, K.T. Flaherty, G.A. McArthur, B.-S. Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011; 364(26): 2507-16.
70. Shi, H., W. Hugo, X. Kong, A. Hong, R.C. Koya, G. Moriceau, T. Chodon, R. Guo, D.B. Johnson, K.B. Dahlman, M.C. Kelley, R.F. Kefford, B. Chmielowski, J.A. Glaspy, J.A. Sosman, N. van Baren, G.V. Long, A. Ribas, R.S. Lo. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov*. 2014; 4(1): 80-93.
71. Zhang, C., W. Spevak, Y. Zhang, E.A. Burton, Y. Ma, G. Habets, J. Zhang, J. Lin, T. Ewing, B. Matusow, G. Tsang, A. Marimuthu, H. Cho, G. Wu, W. Wang, D. Fong, H. Nguyen, S. Shi, P. Womack, M. Nespi, R. Shellooe, H. Carias, B. Powell, E. Light, L. Sanftner, J. Walters, J. Tsai, B.L. West, G. Visor, H. Rezaei, P.S. Lin, K. Nolop, P.N. Ibrahim, P. Hirth, G. Bollag. RAF inhibitors that evade paradoxical MAPK pathway activation. *Nature*. 2015; 526(7574): 583-6.
72. Poulidakos, P.I., C. Zhang, G. Bollag, K.M. Shokat, N. Rosen. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature*. 2010; 464(7287): 427-30.
73. Oberholzer, P.A., D. Kee, P. Dziunycz, A. Sucker, N. Kamsukom, R. Jones, C. Roden, C.J. Chalk, K. Ardlie, E. Palescandolo, A. Piris, L.E. MacConaill, C. Robert, G.F. Hofbauer, G.A. McArthur, D. Schadendorf, L.A. Garraway. RAS mutations are associated with the development of cutaneous squamous cell tumors in patients treated with RAF inhibitors. *J Clin Oncol*. 2012; 30(3): 316-21.
74. Hartsough, E.J., C.H. Kugel, 3rd, M.J. Vido, A.C. Berger, T.J. Purwin, A. Goldberg, M.A. Davies, M.J. Schiewer, K.E. Knudsen, G. Bollag, A.E. Aplin. Response and Resistance to Paradox-Breaking BRAF Inhibitor in Melanomas In Vivo and Ex Vivo. *Mol Cancer Ther*. 2018; 17(1): 84-95.

75. Murugan, A.K., J. Dong, J. Xie, M. Xing. MEK1 mutations, but not ERK2 mutations, occur in melanomas and colon carcinomas, but none in thyroid carcinomas. *Cell Cycle*. 2009; 8(13): 2122-4.
76. Ascierto, P.A., G.A. McArthur, B. Dreno, V. Atkinson, G. Liskay, A.M. Di Giacomo, M. Mandalà, L. Demidov, D. Stroyakovskiy, L. Thomas, L. de la Cruz-Merino, C. Dutriaux, C. Garbe, Y. Yan, M. Wongchenko, I. Chang, J.J. Hsu, D.O. Koralek, I. Rooney, A. Ribas, J. Larkin. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016; 17(9): 1248-60.
77. Long, G.V., Z. Eroglu, J. Infante, S. Patel, A. Daud, D.B. Johnson, R. Gonzalez, R. Kefford, O. Hamid, L. Schuchter, J. Cebon, W. Sharfman, R. McWilliams, M. Sznol, S. Redhu, E. Gasal, B. Mookerjee, J. Weber, K.T. Flaherty. Long-Term Outcomes in Patients With BRAF V600-Mutant Metastatic Melanoma Who Received Dabrafenib Combined With Trametinib. *J Clin Oncol*. 2018; 36(7): 667-673.
78. Smalley, I., K.S.M. Smalley. ERK Inhibition: A New Front in the War against MAPK Pathway-Driven Cancers? *Cancer Discov*. 2018; 8(2): 140-142.
79. Morris, E.J., S. Jha, C.R. Restaino, P. Dayananth, H. Zhu, A. Cooper, D. Carr, Y. Deng, W. Jin, S. Black, B. Long, J. Liu, E. Dinunzio, W. Windsor, R. Zhang, S. Zhao, M.H. Angagaw, E.M. Pinheiro, J. Desai, L. Xiao, G. Shipps, A. Hruza, J. Wang, J. Kelly, S. Paliwal, X. Gao, B.S. Babu, L. Zhu, P. Daublain, L. Zhang, B.A. Lutterbach, M.R. Pelletier, U. Philippar, P. Siliphaivanh, D. Witter, P. Kirschmeier, W.R. Bishop, D. Hicklin, D.G. Gilliland, L. Jayaraman, L. Zavel, S. Fawell, A.A. Samatar. Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer Discov*. 2013; 3(7): 742-50.
80. Nusslein-Volhard, C., E. Wieschaus. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980; 287(5785): 795-801.
81. Varjosalo, M., J. Taipale. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev*. 2008; 22(18): 2454-72.
82. Carballo, G.B., J.R. Honorato, G.P.F. de Lopes, T. Spohr. A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun Signal*. 2018; 16(1): 11.
83. Skoda, A.M., D. Simovic, V. Karin, V. Kardum, S. Vranic, L. Serman. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci*. 2018; 18(1): 8-20.
84. Le, H., R. Kleinerman, O.Z. Lerman, D. Brown, R. Galiano, G.C. Gurtner, S.M. Warren, J.P. Levine, P.B. Saadeh. Hedgehog signaling is essential for normal wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008; 16(6): 768-73.
85. Gailani, M.R., M. Stahle-Backdahl, D.J. Leffell, M. Glynn, P.G. Zaphiropoulos, C. Pressman, A.B. Uden, M. Dean, D.E. Brash, A.E. Bale, R. Toftgard. The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat Genet*. 1996; 14(1): 78-81.
86. Goodrich, L.V., L. Milenkovic, K.M. Higgins, M.P. Scott. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science*. 1997; 277(5329): 1109-13.
87. Berman, D.M., S.S. Karhadkar, A. Maitra, R. Montes De Oca, M.R. Gerstenblith, K. Briggs, A.R. Parker, Y. Shimada, J.R. Eshleman, D.N. Watkins, P.A. Beachy. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*. 2003; 425(6960): 846-51.

88. Watkins, D.N., D.M. Berman, S.G. Burkholder, B. Wang, P.A. Beachy, S.B. Baylin. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*. 2003; 422(6929): 313-7.
89. Cross, S., J. Bury. The Hedgehog signalling pathways in human pathology. *Current Diagnostic Pathology*. 2004; 10(2): 157-168.
90. Echelard, Y., D.J. Epstein, B. St-Jacques, L. Shen, J. Mohler, J.A. McMahon, A.P. McMahon. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*. 1993; 75(7): 1417-30.
91. Bitgood, M.J., L. Shen, A.P. McMahon. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol*. 1996; 6(3): 298-304.
92. Bangs, F., K.V. Anderson. Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017; 9(5): a028175.
93. Rohatgi, R., L. Milenkovic, M.P. Scott. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science*. 2007; 317(5836): 372-6.
94. Taipale, J., M.K. Cooper, T. Maiti, P.A. Beachy. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature*. 2002; 418(6900): 892-7.
95. Fleet, A.J., P.A. Hamel. The protein-specific activities of the transmembrane modules of Ptch1 and Ptch2 are determined by their adjacent protein domains. *J Biol Chem*. 2018; 293(43): 16583-16595.
96. Kong, J.H., C. Siebold, R. Rohatgi. Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. *Development*. 2019; 146(10): dev.166892.
97. Scales, S.J., F.J. de Sauvage. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2009; 30(6): 303-312.
98. Lee, J.J., S.C. Ekker, D.P. von Kessler, J.A. Porter, B.I. Sun, P.A. Beachy. Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science*. 1994; 266(5190): 1528-37.
99. Porter, J.A., K.E. Young, P.A. Beachy. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science*. 1996; 274(5285): 255-9.
100. Buglino, J.A., M.D. Resh. Hhat is a palmitoyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog. *J Biol Chem*. 2008; 283(32): 22076-88.
101. Blotta, S., J. Jakubikova, T. Calimeri, A.M. Roccaro, N. Amodio, A.K. Azab, U. Foresta, C.S. Mitsiades, M. Rossi, K. Todoerti, S. Molica, F. Morabito, A. Neri, P. Tagliaferri, P. Tassone, K.C. Anderson, N.C. Munshi. Canonical and noncanonical Hedgehog pathway in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*. 2012; 120(25): 5002-13.
102. Lee, R.T., Z. Zhao, P.W. Ingham. Hedgehog signalling. *Development*. 2016; 143(3): 367-72.
103. Hui, C.C., D. Slusarski, K.A. Platt, R. Holmgren, A.L. Joyner. Expression of three mouse homologs of the *Drosophila* segment polarity gene *cubitus interruptus*, *Gli*, *Gli-2*, and *Gli-3*, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development. *Dev Biol*. 1994; 162(2): 402-13.
104. Bai, C.B., W. Auerbach, J.S. Lee, D. Stephen, A.L. Joyner. *Gli2*, but not *Gli1*, is required for initial *Shh* signaling and ectopic activation of the *Shh* pathway. *Development*. 2002; 129(20): 4753-61.
105. Hui, C.C., S. Angers. *Gli* proteins in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011; 27: 513-37.

106. Pietrobono, S., S. Gagliardi, B. Stecca. Non-canonical Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: Activation of GLI Transcription Factors Beyond Smoothened. *Front Genet.* 2019; 10: 556.
107. Katoh, Y., M. Katoh. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med.* 2009; 9(7): 873-86.
108. Jenkins, D. Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. *Cell Signal.* 2009; 21(7): 1023-34.
109. Gonnissen, A., S. Isebaert, K. Haustermans. Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer: beyond Smoothened. *Oncotarget.* 2015; 6(16): 13899-913.
110. Berman, D.M., S.S. Karhadkar, A.R. Hallahan, J.I. Pritchard, C.G. Eberhart, D.N. Watkins, J.K. Chen, M.K. Cooper, J. Taipale, J.M. Olson, P.A. Beachy. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science.* 2002; 297(5586): 1559-61.
111. Huang, S., J. He, X. Zhang, Y. Bian, L. Yang, G. Xie, K. Zhang, W. Tang, A.A. Stelter, Q. Wang, H. Zhang, J. Xie. Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis.* 2006; 27(7): 1334-40.
112. Karhadkar, S.S., G.S. Bova, N. Abdallah, S. Dhara, D. Gardner, A. Maitra, J.T. Isaacs, D.M. Berman, P.A. Beachy. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature.* 2004; 431(7009): 707-12.
113. Romer, J.T., H. Kimura, S. Magdaleno, K. Sasai, C. Fuller, H. Baines, M. Connelly, C.F. Stewart, S. Gould, L.L. Rubin, T. Curran. Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice. *Cancer Cell.* 2004; 6(3): 229-40.
114. Lee, S.J., I.G. Do, J. Lee, K.M. Kim, J. Jang, I. Sohn, W.K. Kang. Gastric cancer (GC) patients with hedgehog pathway activation: PTCH1 and GLI2 as independent prognostic factors. *Target Oncol.* 2013; 8(4): 271-80.
115. Keeler, R.F., W. Binns. Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand). V. Comparison of cyclopien effects of steroidal alkaloids from the plant and structurally related compounds from other sources. *Teratology.* 1968; 1(1): 5-10.
116. Winkler, J.D., A. Isaacs, L. Holderbaum, V. Tatard, N. Dahmane. Design and synthesis of inhibitors of Hedgehog signaling based on the alkaloid cyclopamine. *Org Lett.* 2009; 11(13): 2824-7.
117. LoRusso, P.M., C.M. Rudin, J.C. Reddy, R. Tibes, G.J. Weiss, M.J. Borad, C.L. Hann, J.R. Brahmer, I. Chang, W.C. Darbonne, R.A. Graham, K.L. Zerivitz, J.A. Low, D.D. Von Hoff. Phase I trial of hedgehog pathway inhibitor vismodegib (GDC-0449) in patients with refractory, locally advanced or metastatic solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(8): 2502-11.
118. Rodon, J., H.A. Tawbi, A.L. Thomas, R.G. Stoller, C.P. Turttschi, J. Baselga, J. Sarantopoulos, D. Mahalingam, Y. Shou, M.A. Moles, L. Yang, C. Granvil, E. Hurh, K.L. Rose, D.D. Amakye, R. Dummer, A.C. Mita. A phase I, multicenter, open-label, first-in-human, dose-escalation study of the oral smoothened inhibitor Sonidegib (LDE225) in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2014; 20(7): 1900-9.
119. Reifenberger, J., M. Wolter, C.B. Knobbe, B. Kohler, A. Schonicke, C. Scharwachter, K. Kumar, B. Blaschke, T. Ruzicka, G. Reifenberger. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol.* 2005; 152(1): 43-51.

120. Jayaraman, S.S., D.J. Rayhan, S. Hazany, M.S. Kolodney. Mutational landscape of basal cell carcinomas by whole-exome sequencing. *J Invest Dermatol.* 2014; 134(1): 213-220.
121. Jacobsen, A.A., A.S. Aldahan, O.B. Hughes, V.V. Shah, J. Strasswimmer. Hedgehog Pathway Inhibitor Therapy for Locally Advanced and Metastatic Basal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Pooled Analysis of Interventional Studies. *JAMA Dermatol.* 2016; 152(7): 816-24.
122. Pricl, S., B. Cortelazzi, V. Dal Col, D. Marson, E. Laurini, M. Fermeiglia, L. Licitra, S. Pilotti, P. Bossi, F. Perrone. Smoothened (SMO) receptor mutations dictate resistance to vismodegib in basal cell carcinoma. *Mol Oncol.* 2015; 9(2): 389-97.
123. Dijkgraaf, G.J., B. Alicke, L. Weinmann, T. Januario, K. West, Z. Modrusan, D. Burdick, R. Goldsmith, K. Robarge, D. Sutherlin, S.J. Scales, S.E. Gould, R.L. Yauch, F.J. de Sauvage. Small molecule inhibition of GDC-0449 refractory smoothened mutants and downstream mechanisms of drug resistance. *Cancer Res.* 2011; 71(2): 435-44.
124. Metcalfe, C., F.J. de Sauvage. Hedgehog fights back: mechanisms of acquired resistance against Smoothened antagonists. *Cancer Res.* 2011; 71(15): 5057-61.
125. Peer, E., S. Tesanovic, F. Aberger. Next-Generation Hedgehog/GLI Pathway Inhibitors for Cancer Therapy. *Cancers (Basel).* 2019; 11(4): 538.
126. Whisenant, T.C., D.T. Ho, R.W. Benz, J.S. Rogers, R.M. Kaake, E.A. Gordon, L. Huang, P. Baldi, L. Bardwell. Computational prediction and experimental verification of new MAP kinase docking sites and substrates including Gli transcription factors. *PLoS Comput Biol.* 2010; 6(8): e1000908.
127. Faiao-Flores, F., D.K. Alves-Fernandes, P.C. Pennacchi, S. Sandri, A.L. Vicente, C. Scapulatempo-Neto, V.L. Vazquez, R.M. Reis, J. Chauhan, C.R. Goding, K.S. Smalley, S.S. Maria-Engler. Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells. *Oncogene.* 2017; 36(13): 1849-1861.
128. Jalili, A., K.D. Mertz, J. Romanov, C. Wagner, F. Kalthoff, A. Stuetz, G. Pathria, M. Gschaidler, G. Stingl, S.N. Wagner. NVP-LDE225, a potent and selective SMOOTHENED antagonist reduces melanoma growth in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2013; 8(7): e69064.
129. O'Reilly, K.E., E.V. de Miera, M.F. Segura, E. Friedman, L. Poliseno, S.W. Han, J. Zhong, J. Zavadil, A. Pavlick, E. Hernando, I. Osman. Hedgehog pathway blockade inhibits melanoma cell growth in vitro and in vivo. *Pharmaceuticals (Basel).* 2013; 6(11): 1429-50.
130. Geng, L., K.C. Cuneo, M.K. Cooper, H. Wang, K. Sekhar, A. Fu, D.E. Hallahan. Hedgehog signaling in the murine melanoma microenvironment. *Angiogenesis.* 2007; 10(4): 259-67.
131. Duan, F., M. Lin, C. Li, X. Ding, G. Qian, H. Zhang, S. Ge, X. Fan, J. Li. Effects of inhibition of hedgehog signaling on cell growth and migration of uveal melanoma cells. *Cancer Biol Ther.* 2014; 15(5): 544-59.
132. Stecca, B., C. Mas, V. Clement, M. Zbinden, R. Correa, V. Piguat, F. Beermann, A. Ruiz i Altaba. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(14): 5895-900.
133. Song, L., Z.Y. Li, W.P. Liu, M.R. Zhao. Crosstalk between Wnt/beta-catenin and Hedgehog/Gli signaling pathways in colon cancer and implications for therapy. *Cancer Biol Ther.* 2015; 16(1): 1-7.



134. Arimura, S., A. Matsunaga, T. Kitamura, K. Aoki, M. Aoki, M.M. Taketo. Reduced level of smoothed suppresses intestinal tumorigenesis by down-regulation of Wnt signaling. *Gastroenterology*. 2009; 137(2): 629-38.
135. Kaur, A., M.R. Webster, A.T. Weeraratna. In the Wnt-er of life: Wnt signalling in melanoma and ageing. *Br J Cancer*. 2016; 115(11): 1273-1279.
136. Ruiz-Perez, M.V., A.B. Henley, M. Arsenian-Henriksson. The MYCN Protein in Health and Disease. *Genes (Basel)*. 2017; 8(4): 113.
137. Gunarta, I.K., R. Li, R. Nakazato, R. Suzuki, J. Boldbaatar, T. Suzuki, K. Yoshioka. Critical role of glioma-associated oncogene homolog 1 in maintaining invasive and mesenchymal-like properties of melanoma cells. *Cancer Sci*. 2017; 108(8): 1602-1611.
138. Sabbatino, F., Y. Wang, X. Wang, K.T. Flaherty, L. Yu, D. Pepin, G. Scognamiglio, S. Pepe, J.M. Kirkwood, Z.A. Cooper, D.T. Frederick, J.A. Wargo, S. Ferrone, C.R. Ferrone. PDGFRalpha up-regulation mediated by sonic hedgehog pathway activation leads to BRAF inhibitor resistance in melanoma cells with BRAF mutation. *Oncotarget*. 2014; 5(7): 1926-41.
139. Signetti, L., N. Elizarov, M. Simsir, A. Paquet, D. Douguet, F. Labbal, D. Debayle, A. Di Giorgio, V. Biou, C. Girard, M. Duca, L. Bretillon, C. Bertolotto, B. Verrier, S. Azoulay, I. Mus-Veteau. Inhibition of Patched Drug Efflux Increases Vemurafenib Effectiveness against Resistant Braf(V600E) Melanoma. *Cancers (Basel)*. 2020; 12(6): 1500.

## **8. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich beim Verfassen selbst und auch in der Zeit während des Verfassens dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Ich möchte mich daher zunächst für die Betreuung der Arbeit, die freundliche Unterstützung sowie für die Bereitstellung der Materialien und Geräte im Labor bedanken. Zudem gilt mein Dank besonders auch meinem Betreuer, der mich bei der Planung, bei der Durchführung und auch bei allen Fragen, die aufkamen, intensiv unterstützt hat.

Neben der direkten Hilfe beim Erstellen der Arbeit möchte ich auch nicht verpassen, denjenigen Danke zu sagen, die mich anderweitig unterstützt und motiviert haben. Dazu zählen vor allem meine Eltern, mein Bruder, meine Großeltern, mein Freund und natürlich meine Freundinnen und Freunde, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.

## 9. Tabellarischer Lebenslauf

### Allgemein

Name	Blaumeiser
Vorname	Michelle

05.12.2021, Frankfurt