



universität
wien

MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Mechanistische Konsequenz der BAY293 induzierten Hemmung des MAPkinase Signalwegs auf humane Melanomzellen unterschiedlicher Wachstumsphasen

verfasst von | submitted by

Razia Mirzahi BSc

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra pharmaciae (Mag. pharm.)

Wien | Vienna, 2024

Studienkennzahl lt. Studienblatt |
Degree programme code as it appears on the
student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree pro-
gramme as it appears on the student record
sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von | Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Dr. Martin Hohenegger

Danksagung

Ich möchte meinen aufrichtigen Dank an Professor Dr. Martin Hohenegger richten, der mir die Möglichkeit gegeben hat an diesem spannenden Thema an der Medizinischen Universität Wien am Department für Pharmakologie zu arbeiten. Ich bedanke mich sehr herzlich für die fachkundige Betreuung und Begutachtung meiner Masterarbeit. Die wertvollen Ratschläge, die viele Geduld und Zeit für Fragen schätze ich sehr.

Des Weiteren möchte ich mich an meine Kollegin Nadine Szorger bedanken, die mich immer unterstützt und motiviert hat. Der gemeinsame Austausch über die Arbeit im Labor hat mir sehr viel Freude bereitet und mich stets ermutigt.

Ich möchte meiner Familie und meinen Freunden danken, die auf diesem langen Weg durch das Studium immer für mich da waren und mich in schwierigen Zeiten aufgemuntert haben.

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2	ABSTRACT	2
3	EINLEITUNG.....	3
3.1	DAS MELANOM	3
3.2	EPIDEMIOLOGIE	3
3.3	RISIKOFAKTOREN:.....	3
3.4	DIAGNOSTIK.....	4
3.5	SIGNALWEGE UND MUTATIONEN	5
3.5.1	MAP-KINASE-SIGNALWEG	5
3.6	THERAPIE	9
3.6.1	BRAF ^{V600E} INHIBITOREN	10
3.6.2	MEK INHIBITOREN	10
3.6.3	SOS-RAS INHIBITOREN.....	10
3.7	APOPTOSE	11
3.7.1	VERLAUF DER APOPTOSE.....	11
3.7.2	CASPASE-AKTIVITÄT	12
3.7.3	DIE BEDEUTUNG DER APOPTOSE BEI KREBSERKRANKUNGEN.....	12
4	ZIELE DER ARBEIT	14
5	MATERIAL UND METHODEN	15
5.1	ZELLINIEN.....	15
5.2	SUBSTANZEN	15
5.3	MEDIEN	16

5.4	GERÄTE.....	16
5.5	ZELLKULTUR	17
5.5.1	ZELLINIEN	17
5.5.2	ZELLEN SPLITTEN	17
5.5.3	PROTEINISOLIERUNG FÜR DEN CASPASE-ASSAY	18
5.5.4	PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG NACH BRADFORD.....	19
5.6	MTT ASSAY	20
5.7	CASPASE ASSAY	21
5.8	WOUND HEALING ASSAY	21
5.9	STATISTISCHE AUSWERTUNG	22
6	<u>RESULTATE</u>	<u>23</u>
6.1	MTT ASSAY	23
6.1.1	WM278.....	23
6.1.2	WM35.....	26
6.1.3	A375.....	29
6.1.4	518A2.....	32
6.2	WOUND-HEALING ASSAY	35
6.2.1	WM278.....	35
6.2.2	WM35.....	36
6.2.3	A375.....	38
6.2.4	518A2.....	40
6.3	CASPASE ASSAY	42
6.3.1	WM278.....	42
6.3.2	WM35.....	44
6.3.3	A375.....	47
6.3.4	518A2.....	49

7	<u>DISKUSSION</u>	<u>53</u>
7.1	AUSWIRKUNGEN VON BAY293 AUF DIE VIABILITÄT DER VERSCHIEDENEN ZELLINIEN	53
7.1.1	BAY293 ZEIGT IN ALLEN ZELLINIEN EINE KONZENTRATIONSABHÄNGIGE WIRKUNG	53
7.1.2	ZEITABHÄNGIGE EFFEKTE VON BAY293 IN WM278	54
7.1.3	ZEIT- UND KONZENTRATIONSABHÄNGIGE EFFEKTE VON TRAMETINIB IM VERGLEICH ZU BAY293.....	54
7.1.4	STADIENABHÄNGIGE UNTERSCHIEDE VON BAY293	55
7.1.5	BAY293 IN KOMBI MIT ANDEREN MAPK-INHIBITOREN	55
7.2	MIGRATION	57
7.2.1	BAY293 ZEIGT EINEN KONZENTRATIONSABHÄNGIGEN EFFEKT AUF DIE ZELLMIGRATION.....	58
7.2.2	BAY293 IN KOMBINATION MIT ANDEREN WIRKSTOFFEN	58
7.3	APOPTOSE	58
7.4	KONKLUSION	60
8	<u>ABKÜRZUNGEN</u>	<u>61</u>
9	<u>ABBLIDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>63</u>
10	<u>TABELLENVERZEICHNIS.....</u>	<u>64</u>
11	<u>REFERENZEN</u>	<u>65</u>

1 Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist eine der tödlichsten Formen von Hautkrebs mit steigender Inzidenzanzahl. Die Erkrankung ist durch eine frühe Metastasierung und hohe Mortalitätsrate gekennzeichnet. Ungefähr 70% der Mutationen treten im MAPkinase-Signalweg auf, wobei sie häufig in BRAF und RAS lokalisiert sind. Dadurch kommt es zur permanenten Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade, die in eine hohe Proliferationsrate der Zellen resultiert. Im fortgeschrittenen Stadium wird die Erkrankung mit MEK- und BRAF-Inhibitoren therapiert. Der neue Wirkstoff BAY293 inhibiert den MAPK-Signalweg durch die Hemmung der Interaktion von KRAS mit SOS1.

In vier verschiedenen Melanomzelllinien unterschiedlicher Wachstumsphasen (metastasierende Zelllinien A375 und 518a2, und die der radialen (WM35) und vertikalen Wachstumsphase (WM278)) wurde die Viabilität und Migration der Zellen mittels MTT-Assay sowie Woundhealing Assay untersucht. Die Zellen wurden vorher mit BAY293 allein sowie in Kombination mit anderen MAPkinase Signalweginhibitoren, wie Trametinib und Vemurafenib behandelt. Weiters wurde Apoptose mittels Caspase Assay untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass BAY293 alleine kaum Effekte auf die Viabilität hat und erst in höheren Konzentrationen diese signifikant reduziert sowie zu einer Hemmung der Migration führt. In Kombination mit Trametinib und Vemurafenib ist BAY293 in der Lage diese Effekte zu verstärken. Dabei zeigten die Zellen der frühen Wachstumsphase eine höhere Sensitivität als die metastatischen Zellen. Die Abnahme der Viabilität durch BAY293 ist mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf Apoptose zurückzuführen, da keine erhöhte Caspase 3 und 9 Aktivität nach Behandlung mit BAY293 beobachtet werden konnte.

Die Interaktionshemmung von KRAS mit SOS1 durch BAY293 stellt eine interessante Kombinationsbehandlung dar, die zum Aufdecken von Signalwegempfindlichkeiten in Melanomzellen genutzt werden kann.

2 Abstract

The malignant melanoma is one of the deadliest forms of skin cancer with an increasing incidence rate. The disease is characterized by early metastasis and a high mortality rate. Approximately 70% of mutations occur in the MAPK signaling pathway, often localized in BRAF and RAS. This leads into a permanent activation of the downstream signaling cascade, resulting in a high rate of cell proliferation. In the advanced stage of the disease patients are treated with MEK and BRAF Inhibitors. The new substance BAY293 inhibits the MAPK signaling pathway by blocking the interaction between KRAS and SOS1.

In four different melanoma cell lines from different growth phases (metastatic cell lines, (A375 and 518a2), and early-stage cells (WM35 and WM278)) viability and migration were investigated using MTT assay and wound healing assay. The cells were treated with BAY293 in a single treatment and in combination with other MAPkinase pathway inhibitors, such as trametinib and vemurafenib. Apoptosis was analyzed by caspase assays.

The results showed that BAY293 significantly reduces cell viability and leads to an inhibition of migration in the wound healing assay only at a higher concentration of the substance. Augmented BAY293 effects occur in combination with trametinib or vemurafenib. Importantly, viability of melanoma cells from the early stage was more sensitive to treatment with BAY293 than the metastatic cell lines, which was not due to increased caspase 3 and 9 activity.

Hence the KRAS/SOS1 interaction inhibitor BAY293 represents a novel option in combined treatment of melanoma cells to identify new pathway interactions.

3 Einleitung

3.1 Das Melanom

Das Melanom, auch bekannt als „schwarzer Hautkrebs“, ist eine aggressive Form des Hautkrebses. Es entsteht durch die Entartung der pigmentbildenden Zellen, den sogenannten Melanozyten (Ugurel & Gutzmer, 2023). Sie sind vor allem in der Basalschicht der Epidermis zu finden, können aber auch in Haarfollikeln, der Uvea, den Schleimhäuten und den Hirnhäuten vorkommen (Ostrowski & Fischer, 2020). Die meisten kutanen Melanome durchlaufen zwei Hauptstadien der Progression. Sie sind in der ersten Phase als Pigmentflecken oder Plaque bemerkbar und breiten sich horizontal aus. Aus diesem Grund wird diese Phase auch radiale Wachstumsphase (RGP) bezeichnet. Im nächsten Schritt bildet sich ein Tumor, der eine vertikale Wachstumsrichtung (VGP) besitzt (Clark et al., 1989). Melanome in der VGP-Phase sind öfters mit einer nachfolgenden Metastasierung verbunden (Clark et al., 1975). Die Metastasen können fast alle Organe des Körpers befallen. Eine Diagnose der Krankheit in späteren Stadien führt zu schlechteren Überlebenschancen (Houghton & Polsky, 2002).

3.2 Epidemiologie

Die Inzidenzrate hat in den Industrieländern drastisch zugenommen (Sauter & Herlyn, 1998). Die Anzahl der Neuerkrankungen ist in den letzten 50 Jahren überwiegend in den hellhäutigen Bevölkerungsgruppen angestiegen. Betroffen sind vor allem nord- und westeuropäische Länder, Australien, Neuseeland und Nordamerika (Erdmann et al., 2013). Im Jahr 2020 lag die Inzidenz weltweit bei 325 000 Fällen, wobei 57 000 Personen an der Erkrankung gestorben sind. Männer waren häufiger betroffen als Frauen (Arnold et al., 2022).

3.3 Risikofaktoren:

Einer der wichtigsten Ursachen für die Entstehung der Entartung ist die chronische UV-Exposition. Ultraviolette Strahlung kann zur Entstehung von genetischen Mutationen beitragen, wodurch Onkogene entstehen und Tumorsuppressorgene abgeschaltet werden

können. Darüber hinaus kann der Prozess der DNA-Reparatur gestört werden. Somit kann eine unkontrollierte Vermehrung der Melanozyten entstehen, die schließlich zur Bildung eines bösartigen Tumors führt (Linares, Zakaria, & Nizran, 2015). Nicht nur UV-Strahlen der Sonne, sondern auch häufige Solarienbesuche stehen in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko an Hautkrebs zu erkranken. Dies kann vor allem bei Personen nachgewiesen werden, die schon in Ihrer Jugend Solarien häufig und übermäßig lange besucht haben (International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet & skin, 2007). Zu den weiteren Risikofaktoren gehören eine helle Haut sowie eine positive Familienanamnese. Eine Vorgeschichte mit mehreren Sonnenbränden sowie eine große Anzahl an atypische Nävi stellen ebenfalls einen wesentlichen Risikofaktor dar (Bataille et al., 1996; Gandini et al., 2005)

3.4 Diagnostik

Eine frühe Diagnose der Erkrankung und entsprechende Therapie ist besonders wichtig für eine erfolgreiche Behandlung oder sogar Heilung. Für die Diagnostik wird die Dermatoskopie, ein manuelles Vergrößerungsgerät, herangezogen. Als zusätzliche unterstützende Methoden dienen die konfokale Lasermikroskopie, die Impedanzspektroskopie sowie die Kohärenztomographie. Nach dem Anfangsverdacht erfolgen chirurgische Exzisionen und deren histologische Untersuchungen um die gesamte Entfernung des Tumors zu bestätigen. Des Weiteren werden Biomarkeruntersuchungen aus Blutproben sowie bildgebende Verfahren durchgeführt, wenn der Verdacht auf Metastasierung vorliegt (Ugurel & Gutzmer, 2023). Die Eindringtiefe des Melanoms ist ein wichtiger Faktor für die Prognose der Überlebenschancen. Seit 1969 gibt es die Einteilung des Melanoms nach Clark. Das Klassifizierungssystem basiert auf die Invasion des Melanoms durch die Schichten der Haut und wird nach Clark-Level in 5 Stadien eingeteilt. Die Werte korrelieren mit der Häufigkeit von Metastasen und der Sterblichkeit der Patienten (Clark et al., 1969). Eine weitere Methode stellt die Tumordicke nach Breslow dar. Bei diesem Verfahren wird das Melanom vertikal mit einem Mikrometer in Millimetern gemessen (Balch et al., 2009; Breslow, 1970). Die aktuelle Klassifikation des Tumors in Gruppen erfolgt nach den Leitlinien des American Joint Committee on Cancer (AJCC). Hierbei wird das TNM-System angewendet, das auf der Grundlage von Tumorgröße und Invasion, Lymphknotenbeteiligung und Fernmetastasen beruht (Balch et al., 2009). Die Weltgesundheitsorganisation WHO unterscheidet beim

kutanen Melanom vier Haupttypen: superfiziell spreitendes, noduläres, akrolentiginöses und Lentigo-maligna Melanom (Elder et al., 2018). Sie basiert auf die Erweiterung der Sydney-Klassifikation von 1986 (McGovern et al., 1986).

3.5 Signalwege und Mutationen

Durch die Molekulargenetik sowie verschiedene Sequenzierungsmethoden wurden genauere Untersuchungen der Tumormutationen ermöglicht und ihre Rolle bei der Melanomentwicklung ermittelt (Ostrowski & Fischer, 2020). Eine gezielte Therapie auf Grundlage individueller Mutationen der Patienten wird angestrebt, um eine höhere Heilungsrate oder eine Verlängerung des Überlebens zu erreichen. Schätzungsweise 5-12% der Melanome sind erblich bedingt. Sie weisen im Gegensatz zu nicht erblichen Melanomen andere Mutationsmuster auf. Die meisten Melanome entstehen aber durch somatische Mutationen, die später im Leben erworben werden (Davis, Shalin, & Tackett, 2019). Ungefähr 70% der Melanome enthalten Mutationen im MAPkinase-Signalweg, wobei ca. 50% aktivierende BRAF-Mutationen aufweisen und 15-20% der Mutationen in NRAS vorkommen (Scolyer, Long, & Thompson, 2011).

3.5.1 MAP-Kinase-Signalweg

Einer der Signalwege, die am häufigsten Mutationen aufweisen, ist der MAP-Kinase-Signalweg. Dieser ist für gezielte therapeutische Zwecke besonders interessant. Der MAP-Kinase-Weg (engl. mitogen-activated protein kinase) besteht aus drei nacheinander geschalteten Proteinkinasen, die Schlüsselkomponenten von lebenswichtigen Signaltransduktionswegen sind (siehe Abb. 1). Sie regulieren die Prozesse der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und den Zelltod (Raman, Chen, & Cobb, 2007). Dabei wird zuerst die MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK), dann die MAPK-Kinase (MAPKK) und anschließend die MAPK aktiviert (Ferrell, 1996). Dadurch werden diverse Substrate im Zytosol und Zellkern phosphoryliert, die zu einer Veränderung in der Proteinfunktion und der Genaktivierung führen. Die MAP-Kinase kann in 3 Hauptgruppen eingeteilt werden: ERKs (Extrazellulärsignal-regulierte Kinase), JNKs (c-Jun N-terminale Kinase) und p38/SAPKs (Stress-aktivierte Proteinkinase) (Raman, Chen, & Cobb, 2007).

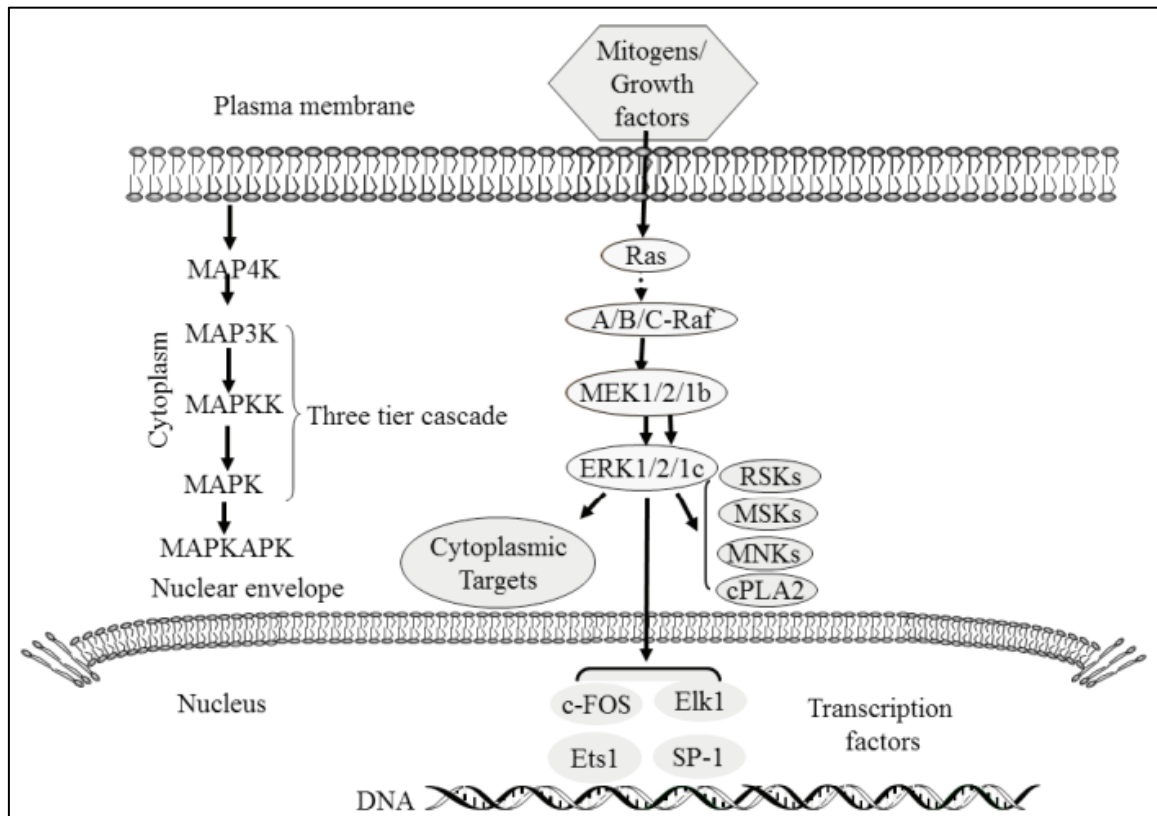


Abbildung 1: MAP-Kinase Signalweg (Guo et al., 2020)

3.5.1.1 ERK-Signalweg

Die Extrazellulärsignal-Kinase (ERK) ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase und im Zytoplasma lokalisiert. Wachstumsfaktoren, Zytokine, Viren, G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Liganden und Onkogene können den Extrazellulärsignal-Kinase (ERK)-Signalweg aktivieren (Guo et al., 2020). Durch die Stimulation der Rezeptortyrosinkinase kommt es zu einer verstärkten Autophosphorylierung der Tyrosinkinase. Die Adaptermoleküle Grb2 und Shc sind an dem Rezeptor gebunden und verbinden diesen mit einer prolinreichen Region des Guanin-Nukleotid-Austauschproteins Son of Sevenless (SOS) (Li et al., 1993). Das Grb2-Protein (Growth factor binding protein) besteht aus einer SH2 und zwei SH3 Domänen. Während die SH2-Domäne spezifisch an Phosphotyrosin-Motive bindet, hat die SH3 Domäne eine höhere Affinität an prolinreiche Regionen (Chardin et al., 1995; Lowenstein et al., 1992). Der Grb2-Sos-Komplex setzt an Ras GDP frei und ermöglicht dadurch die GTP-Bindung (siehe Abb.: 2). Somit bindet das GTP-gebundene Ras an Raf (Jelinek et al., 1996). Das aktivierte Raf phosphoryliert daraufhin die dualen Proteinkinasen MEK1 und MEK2, die ERK1 und ERK2 phosphorylieren und damit aktivieren (Cobb, 1999). ERK gelangt nach Aktivierung in den Zellkern und reguliert die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und die spezifische

Genexpression (Orton et al., 2005). Es führt zur Induktion von IEGs (immediate early genes) indem es Transkriptionsfaktoren, die an den IEG-Promotor gebunden sind positiv reguliert. Dadurch kommt es zur Aktivierung von Genprodukten der Fos-, Jun- und Myc-Transkriptionsfaktor-Familie. Die Aktivierung von IEGs führen folglich zu verschiedenen zellulären Ergebnissen wie Differenzierung, Proliferation und onkogener Transformation (Murphy, MacKeigan, & Blenis, 2004).

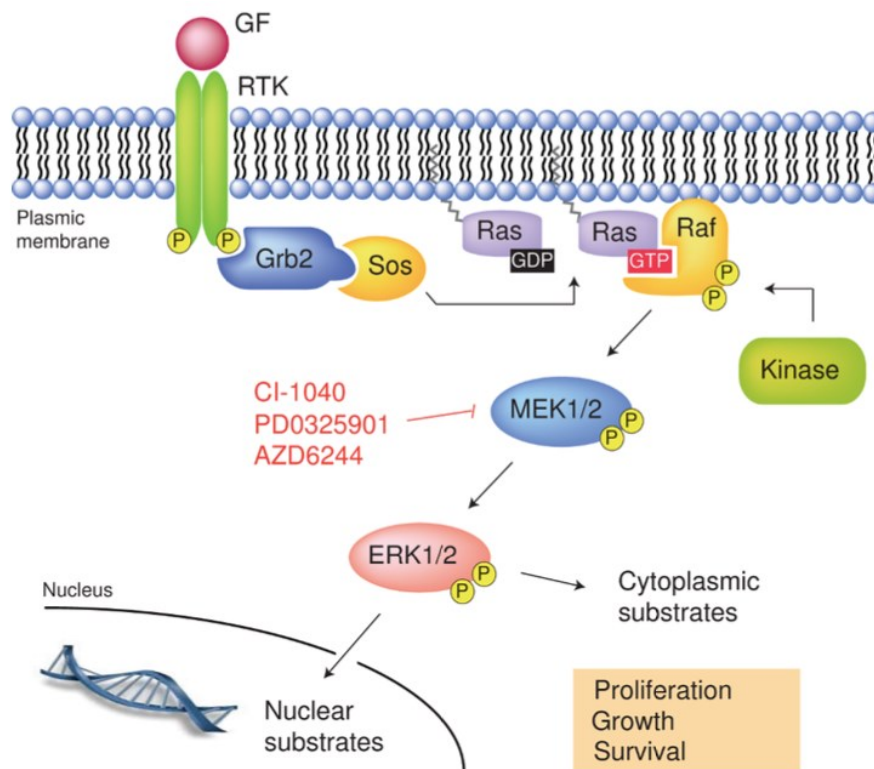


Abbildung 2: Grb2-SOS Komplex aktiviert Ras und den ERK-Signalweg (Fremin & Meloche, 2010)

3.5.1.2 SOS-RAS Interaktion

Damit Ras aktiviert werden kann, muss es zuerst in eine GTP-gebundene Form gebracht werden. Im Allgemeinen wird die GTP-gebundene Form als aktiver Zustand angesehen und die GDP-Bindung als inaktiv. Kleine GTPasen regulieren den Wechsel zwischen GDP und GTP (siehe Abb. 3) (Bourne, Sanders, & McCormick, 1990). Die Änderung von GDP zu GTP wird durch Guanin-Nukleotid Austauschfaktoren (GEFs) ausgelöst und die Hydrolyse von GTP zu GDP durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) (Milburn et al., 1990). Ein bislang gut untersuchtes GEF für RAS ist das Protein Son of Sevenless (SOS). Es tritt in zwei Isoformen, SOS1 und SOS2, auf (Bowtell et al., 1992). Des Weiteren spielen auch

Konformationumwandlungen an den Schalter I und II -Regionen der G-Domäne eine wichtige Rolle bei der Änderung von GDP zu GTP. Sie befinden sich auf der Moleküloberfläche und sind höchstwahrscheinlich wichtige Erkennungsstellen für Effektor- und Rezeptormoleküle (Milburn et al., 1990). In der aktiven GTP-gebundenen Form kann RAS durch die Bindung an Effektoren nachgeschaltete Signalwege einschalten (siehe Abb. 2) (Vetter & Wittinghofer, 2001).

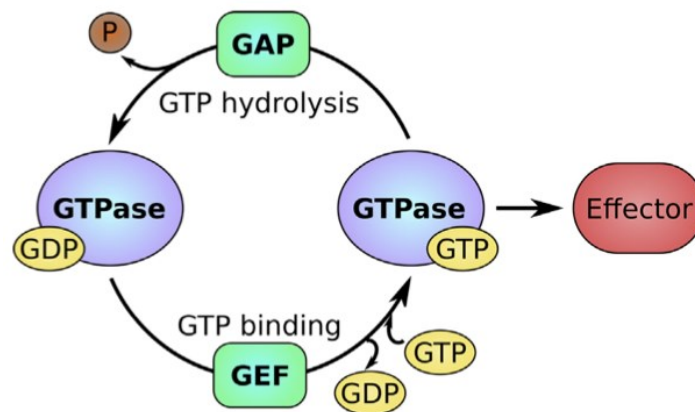


Abbildung 3: Umwandlung von der GDP- in die GTP-gebundene Form (Carvalho et al., 2015)

3.5.1.3 RAS-Mutationen

Erste Zusammenhänge der RAS- Familie mit menschlichen Tumoren wurden 1982 entdeckt und gelten seitdem als wichtige Onkogene im MAP-Kinase Signalweg (Der, Krontiris, & Cooper, 1982). Wichtige Mitglieder der RAS-Familie sind Harvey-RAS (HRAS), Kristen-RAS (KRAS) und Neuroblastom-RAS (NRAS). Eine Missense Mutation in RAS wird in 27% aller menschlicher Krebserkrankungen gefunden. Davon befinden sich 85% in der KRAS Isoform, 11% in NRAS und 4% in der HRAS Form (Hobbs, Der, & Rossman, 2016). Die meisten RAS-Mutationen erscheinen an den Codons 12, 13 oder 61 (Satyamoorthy et al., 2003). Es wird vermutet, dass ein Austausch einer beliebigen Aminosäure außer Prolin mit Glycin an den Codons 12 und 13 stattfindet. Dadurch wird eine sterische Blockade verursacht und verhindert, dass das Arginin von GAP an die GTPase-Stelle andockt. Somit wird eine Hydrolyse verhindert und RAS bleibt in der aktiven GTP-gebundenen Form. Des Weiteren kann auch eine Veränderung an Glutamin-61 eine GTP-Hydrolyse blockieren. Mutationen können auch die Affinität zum Nukleotid verringern und zu einer schnellen Dissoziation von GDP führen. All diese

Mechanismen resultieren in eine erhöhte GTP-Beladung (Simanshu, Nissley, & McCormick, 2017).

3.5.1.4 BRAF-Mutationen

BRAF- Mutationen wurden zu 66% in Melanomen und in geringeren Anteilen auch in anderen Krebsarten nachgewiesen (Davies et al., 2002). Die basale Kinaseaktivität von BRAF, das vollständig durch RAS aktiviert wird, ist höher als die von CRAF und ARAF (Marais et al., 1997). Dies könnte ein Grund für die häufige Mutationsaktivierung von BRAF in Tumoren sein (Davies et al., 2002). Eine permanente BRAF-Aktivität durch eine Mutation führt zu einer positiven Regulierung von MEK und ERK, ohne dass eine Beteiligung von RAS/RAF notwendig ist (Satyamoorthy et al., 2003). Bei einem Großteil davon (bis zu 92%) handelt es sich um eine BRAF^{V600E}-Mutation, die früher als BRAF^{V599E} bezeichnet wurde (Davies et al., 2002). Durch die Umwandlung eines Thymin in ein Adenin verändert sich an der Nukleotidposition 1799 das Valin zu Glutamat (Kebebew et al., 2007). In geringer Anzahl (8-20%) kommen Substitutionen von Valin durch Lysin vor und werden als BRAF^{V600K} bezeichnet (Cheng et al., 2018). Diese Veränderungen führen zu einer konstitutiven Aktivierung der BRAF-Kinase und einer Unempfindlichkeit gegenüber negativen Rückkopplungsmechanismen (Pratilas et al., 2009).

3.6 Therapie

Die Dicke und Eindringtiefe des Tumors sind wichtige Faktoren für die Prognose, Heilungschancen und Therapien. Nach der American Joint Committee on Cancer Klassifikation wird das kutane Melanom in vier Stadien (I, II, III, IV) eingeteilt. In den Stadien III haben die Patienten entweder in den regionalen Lymphknoten oder in intralymphatischen Lokalisationen Metastasen, wohingegen bei Stadium IV Fernmetastasen vorliegen (Balch et al., 2009). Bei Verdacht auf ein bösartiges Melanom wird zunächst eine Entfernung des Tumors (Exzision) je nach Dicke durchgeführt. Befindet sich der Tumor schon in einem fortgeschrittenen Stadium so werden adjuvante Therapien wie Strahlentherapie oder Medikamente zusätzlich herangezogen. Als mögliche medikamentöse Behandlungen zählen Immuntherapien, Checkpoint Inhibitoren und zielgerichtete Therapien. Bei Patienten mit einer BRAF-Mutation kommen in den Stadien III A-D BRAF- und MEK-Inhibitoren zum Einsatz

(Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, Deutschen Krebsgesellschaft, & Krebshilfe, 2020).

3.6.1 BRAF^{V600E} Inhibitoren

Der erste RAF-Inhibitor, der in klinischen Studien getestet wurde, war Sorafenib (BAY 43-9006). Es handelt sich hierbei um ein Breitspektrum-Kinasehemmer, der neben BRAF und CRAF auch RTKs, VEGF und PDGF hemmt (Wilhelm et al., 2004). Sorafenib hemmt bevorzugt CRAF und hat eine schwache Wirkung auf BRAF^{V600E} (Bollag et al., 2012). Aufgrund von schweren Nebenwirkungen und keinem eindeutigen Nachweis einer verbesserten Überlebenschance in einer Phase-III-Studien, scheiterte Sorafenib bei der Zulassung als Therapeutikum beim Melanom (Hauschild et al., 2009). Einen großen Erfolg hingegen zeigte Vemurafenib, ein spezifischer BRAF^{V600E}-Inhibitor, der 2011 von der FDA zugelassen wurde (Chapman et al., 2011). In den darauffolgenden Jahren erwies sich der Nachfolger Dabrafenib in einer klinischen Phase-III-Studie als effektiver BRAF-Inhibitor und wurde anschließend 2013 zugelassen (Hauschild et al., 2012).

3.6.2 MEK Inhibitoren

BRAF-Inhibitoren werden in Kombination mit MEK-Inhibitoren wie Trametinib eingesetzt, um die Effizienz zu steigern. Trametinib ist ein spezifischer Inhibitor von MEK1/2, der zu einer Hemmung der Zellproliferation bei Tumoren mit MAPK-Mutationen führt. Es verhindert die RAF-Phosphorylierung von MEK (Gilmartin et al., 2011). In einer Phase-III-Studie zeigte Trametinib ein verbessertes Gesamtüberleben im Vergleich zur Chemotherapie mit Paclitaxel an (Flaherty et al., 2012).

3.6.3 SOS-RAS Inhibitoren

Der SOS-RAS Inhibitor BAY293 verhindert selektiv die Bindung von SOS1 an KRAS und blockiert eine GTP-Beladung von KRAS. Durch die Bindung des Inhibitors an eine hydrophobe Tasche von SOS1, kommt es zu einer Konformationsverschiebung der Bindungstasche und Verhinderung der KRAS-SOS1 Interaktion. Dadurch wird die Aktivierung der nachgeschalteten Kaskade und Proliferation der Zellen gehemmt. Die Studie von 2019 untersuchte potenzielle Inhibitoren an Kristallstrukturen von KRAS mit einer G12C Mutation und SOS1. Es stellte sich heraus, dass BAY293 mit einer Konzentration von 21nM eine 50%ige Blockade des

Zielrezeptors erreichte. Somit stellt der Wirkstoff einen Ansatz für zukünftige Therapiemöglichkeiten bei RAS-mutierten Tumoren dar (Hillig et al., 2019).

3.7 Apoptose

Der Begriff Apoptose wurde erstmals 1972 von Kerr und Kollegen beschrieben und bezeichnet den programmierten Zelltod im mehrzelligen Organismus. Durch eine Vielzahl an Signalen physiologischen als auch pathologischen Ursprungs kann der Tod der Zelle aktiv ausgelöst oder gehemmt werden. Dieser Prozess ist wichtig für die Entwicklung des Organismus und das Gleichgewicht der Zellteilung. Anders als bei der Nekrose, kommt es bei der Apoptose zu keiner Lyse der Zellmembran. Der Beginn ist durch die Kondensation des Zytoplasmas und Fragmentierung des Zellkerns gekennzeichnet. Die Fragmente werden von Membranen umhüllt und bilden die sogenannten „apoptotische Körperchen“. Sie werden an die Zelloberfläche abgestoßen, wo sie von Phagozyten abgebaut werden (Kerr, Wyllie, & Currie, 1972).

3.7.1 Verlauf der Apoptose

Es gibt zwei Hauptwege, durch die die Apoptose ausgelöst wird: der extrinsische und der intrinsische Signalweg. Beide Signalkaskaden führen zur Spaltung von Pro-Caspasen und somit zu ihrer Aktivierung. Der extrinsische Weg wird durch Todesrezeptoren (TNF-Rezeptoren), an die sich die Liganden der TNF-Familie binden, eingeleitet. Daraufhin werden intrazelluläre Adapterproteine FADD rekrutiert, die an die Pro-Caspase 8 binden (siehe Abb. 4). Dieser Signalkomplex wird auch DISC genannt. Im nächsten Schritt wird die Pro-Caspase 8 zur aktiven Caspase 8 gespalten, die als Initiatorcaspase andere Effektorcaspasen aktiviert (Igney & Krammer, 2002).

Die intrinsische Signalkaskade verläuft über den mitochondrialen Weg. Dieser kann durch verschiedene Stimuli wie zum Beispiel durch den Transkriptionsfaktor p53 ausgelöst werden, der zur Aktivierung der proapoptotischen Proteine Bad und Bax führt (Igney & Krammer, 2002). Dadurch wird Cytochrom c über die mitochondriale Membran freigesetzt. Das Cytochrom c bindet an Apaf1 und Procaspase-9. Zusammen bilden sie mit anderen Cofaktoren das sogenannte Apoptosom, in dem Caspase 9 als Initiatorcaspase aktiviert wird (Kluck et al., 1997; Li et al., 1997).

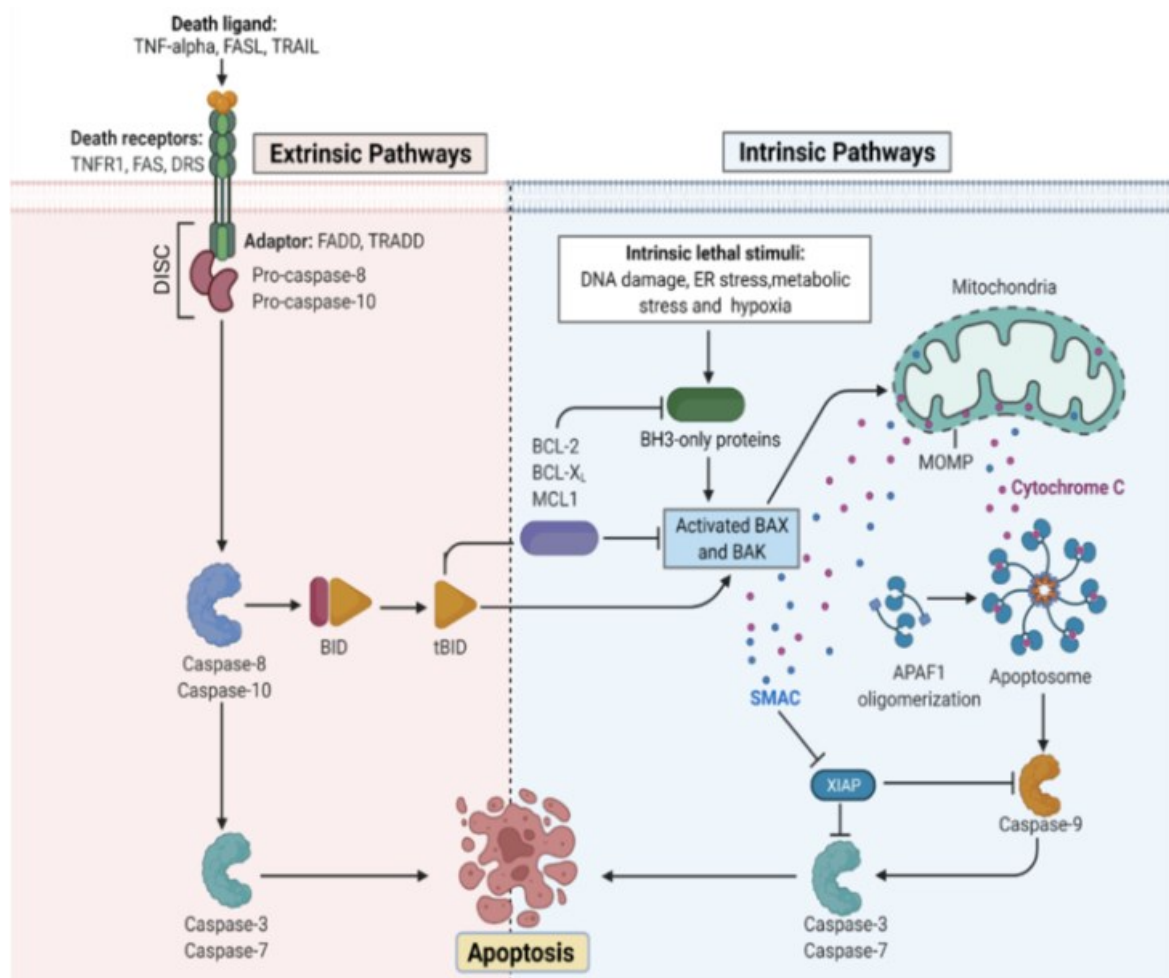


Abbildung 4: Apoptose Signalweg (Wani et al., 2023)

3.7.2 Caspase-Aktivität

Caspasen sind Cysteinproteasen, die ihre Substrate an der Carboxylseite eines Aspartatrestes spalten. In Säugtieren wurden mindestens 14 Caspasen identifiziert. Die Initiatorcaspasen 8 und 9 aktivieren eine Signalkaskade indem sie andere Effektorcaspasen spalten (siehe Abb. 4) (Strasser, O'Connor, & Dixit, 2000). Zu diesen gehören Caspase 3, 6 und 7. Sobald die Effektorcaspasen aktiviert werden, spalten sie eine große Anzahl an Zielproteinen. Dadurch werden wichtige Bestandteile der Zelle abgebaut und zelluläre Prozesse abgestellt (Nicholson & Thornberry, 1997).

3.7.3 Die Bedeutung der Apoptose bei Krebserkrankungen

Die ungehemmte Proliferation von Zellen sowie die Umgehung des Zelltods führen zur Entstehung von Tumoren. Verschiedene antiapoptotische Proteine und die Inaktivierung von proapoptotischen Effektoren können den Zelltod verhindern (Evan & Vousden, 2001). Die

Familie der Bcl-2 Proteine spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose. Sie enthält Mitglieder, die die Apoptose positiv regulieren (Bax, Bad, Bid) und welche, die eine hemmende Wirkung auf den kontrollierten Zelltod besitzen (Bcl-XL, Mcl-1). Eine Fehlfunktion oder Dysbalance dieser Proteine kann die Entwicklung von Krebskrankheiten begünstigen (Ruvolo, Deng, & May, 2001; Tkaczowa, Durlakowa, & Weber, 1977).

3.7.3.1 MAPK-Inhibitoren induzieren Apoptose

MEK-Inhibitoren können eine erhöhte Apoptoseaktivität in Melanomzellen induzieren. In den meisten Fällen wird der Zelltod über den mitochondrialen Signalweg ausgelöst. Es kommt hierbei zu einer Aktivierung von Bax und Bak. Durch die Hemmung von MEK konnte eine erhöhte Induktion von den proapoptotischen Proteinen PUMA und BIM sowie eine negative Regulierung von Mcl festgestellt werden. (Wang et al., 2007).

4 Ziele der Arbeit

BAY293 ist ein neuer Inhibitor der Interaktion von SOS1 und Ras, der an Melanomzellen noch nicht gut beschrieben ist. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Ist die Empfindlichkeit von humanen Melanomzellen gegenüber BAY293 induziertem Zelltod abhängig vom zellulären Ursprung (frühe Wachstumsphase (WM278, WM35) versus metastatisches Stadium (A375, 518a2))?
2. Wird die Migration und Viabilität durch BAY293 in der Kombination mit klassischen Inhibitoren des MAPkinase Signalwegs noch zusätzlich reguliert?
3. Induziert BAY293 in humanen Melanomzellen Apoptose, abhängig von der Wachstumsphase der Zellen?

5 Material und Methoden

5.1 Zelllinien

A375: Humane metastasierende Melanomzellen; B-RAF^{V600E} aktivierende Mutation; Krebsforschung der Medizinischen Universität Wien; Prof. Dr. Walter Berger

518a2: Humane metastasierende Melanomzellen; B-RAF^{V600E} aktivierende Mutation; Klinik für Strahlentherapie, AKH Wien, Prof. Dr.- Edgar Selzer

WM35: Humane Melanomzellen (radiales Wachstum); B-RAF (V600E) aktivierende Mutation; Coriell Institut (WC00060)

WM278: Humane Melanomzellen (vertikales Wachstum); B-RAF (V600E) aktivierende Mutation; Coriell Institut (WC00054)

Alle Zelllinien haben intaktes KRAS (wild typ).

5.2 Substanzen

BAY-293: Spezifikation: KRAS-SOS1 Inhibitor, Chemische Bezeichnung: (R)-6,7-Dimethoxy-2-methyl-N-(1-(4-(2-((methylamino) methyl) phenyl) thiophen-2-yl) ethyl) quinazolin-4-amine, Lösungsmittel: DMSO, Katalognummer: AOB17686, CAS-Nummer: 2244904-70-7, Molekulargewicht 448,59 kDa, Firma: AOBIUS

Simvastatin: Spezifikation: kompetitiver Inhibitor der HMG-CoA Reduktase, Lösungsmittel: DMSO, Artikelnummer: 10010344, Chargennummer: 0423050-58, Firma: CAYMAN Chemical

Trametinib: Spezifikation: MEK-Inhibitor, Lösungsmittel: DMSO, CAS-Nummer 1187431431, Molekulargewicht: 693.53 kDa, Firma: BLDpharm

Vemurafenib: Spezifikation: B-Raf (V600E) Inhibitor, Lösungsmittel: DMSO, Katalognummer: T2382, CAS-Nummer: 918504-65-1, Molekulargewicht: 489,92 kDa, Firma: TargetMol

Caspase 3 Substrat: Firma: Enzo Life Sciences, Sequenz: Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AFC, Molekulargewicht: 729,6 kDa, Produktnummer: ALX-260-032-M005, Lösungsmittel: DMSO

Caspase 9 Substrat: Firma: Enzo Life Sciences, Sequenz: Ac-Leu-Glu-His-Asp-AFC,
Molekulargewicht: 765,7 kDa, Produktnummer: ALX-260-116-M005, Lösungsmittel: DMSO

5.3 Medien

Es wurden zwei verschiedene Medien verwendet. Für die metastasierenden Zelllinien 518a2 und A375 wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)– High Glucose mit L-Glutamin von Capricorn Scientific verwendet. Dies wurde auf 10% fetales Rinderserum (FBS) von Catus Biotech GmbH (Eximus FBS-Standardicus, Artikelnummer: BS-2022-500) und 1% Penicillin/Streptomycin (mit 10,000 Units Penicillin und 10 mg Streptomycin/ml) von SIGMA-ALDRICH (P4333-100ML) ergänzt.

Das Medium für die WM35 und WM278 bestand aus einer 1:1 Mischung aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) und Ham's Nutrient Mixture F12. Hier wurde auf 20mmol/L Hepes (pH 7,4) von SIGMA-ALDRICH (CAS-Nummer 7365-45-9), 2% fetales Rinderserum (FBS), 20 mmol/l L-Glutamin von SIGMA (G7513-100ML) und 1% Penicillin/Streptomycin ergänzt.

5.4 Geräte

Tisch-Kühlzentrifuge BR4i Rotor: S40 mit Ausschwingrotor, Jourdan

Inkubator: BINDER CB220 CO₂, Inkubator

Ultraschallbad: Branson Typ 220

Universeller Kleinschüttler: IKA Minishaker MS1

Zentrifuge: Sigma Zentrifuge 3-30 KS, Sigma Laborzentrifugen GmbH

Photometer: Viktor3V Multilabel Plate Reader, PerkinElmer

Photometer: Tecan infinite M200 Pro

Mikroskop: Nikon ECLIPSE TS100

Analysewaage: Sartorius 1702

5.5 Zellkultur

5.5.1 Zelllinien

Insgesamt wurden vier verschiedene Zelllinien verwendet. Davon sind die A375 und 518a2 metastasierende Zellen, während die WM35 aus dem radialen Wachstum und die WM278 aus dem vertikalen Wachstum stammen. Alle vier Zelllinien besitzen eine BRAF (V600E) Mutation. Sie wurden in einer 75cm² Kulturflasche gesät und im Inkubator bei einer Temperatur von 37° Celsius, O₂ 20% [Vol.-%], CO₂ 5% [Vol.-%] und bei einer Luftfeuchtigkeit von 70% [%rH], kultiviert.

5.5.2 Zellen splitten

Die Zellen wurden stets unter dem Mikroskop auf mögliche Veränderungen der Morphologie, Kontaminationen durch Mikroorganismen sowie die Wachstumsrate beobachtet. Ab einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen gesplittet. Dazwischen wurde ca. alle 3 Tage das Medium zu 90% gewechselt. In den nicht gewechselten 10% Medium verbleiben Wachstumsfaktoren, die die Zellen selbst produzieren. Metastasierende Zellen sind durch eine viel schnellere Wachstumsgeschwindigkeit gekennzeichnet, im Vergleich zu den WM-Zelllinien der frühen Wachstumsphase. Aus diesem Grund wurden sie in der Regel häufiger gesplittet bzw. dünner ausgesät.

Die Behandlung der Zellen erfolgte in einer sterilen Reinraumwerkbank, dem Laminar Air Flow (LAF) von Steril-Polaris. Alle Schritte wurden mit Handschuhen durchgeführt und Gefäße und Oberflächen mit 70%-Ethanol desinfiziert.

Die verwendeten Medien und Trypsin-EDTA Lösung wurde im Wasserbad auf eine Temperatur von 37°C für ungefähr 10-15 Minuten erwärmt. Der Verschluss der Gefäße wurde vorher mit Parafilm abgedichtet, um eine Infektion mit Keimen zu verhindern.

Melanomzellen wurden in 96-Well Platten, 10cm Petrischalen und 75cm² Kulturflaschen gezüchtet. Die 75cm² Kulturflasche wurde vor dem Splitten senkrecht im LAF aufgestellt und anschließend das alte Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Danach wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, geschwenkt und danach erneut senkrecht aufgestellt, um das PBS abzusaugen. Zum Ablösen der adhärennten Zellen vom Flaschenboden wurden diese mit 2 ml Trypsin von Sigma-Aldrich (2,5g Trypsin mit 0,2g EDTA 4Na pro Liter Hanks' Balanced

Salzlösung mit Phenolrot) versetzt und für 5 min in den Inkubator gestellt. Anschließend wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob sich alle Zellen abgelöst haben. Mit einer Pipette wurden die abgelösten Zellen entnommen und in einem 15ml oder 50ml Falcon Röhrchen gesammelt. Die Kulturflasche wurde nochmals mit 5 ml PBS gewaschen und zum Falcon hinzugefügt. Das Falcon wurde im nächsten Schritt in einer Zentrifuge für 4 min bei 1100 rpm und 25°C zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet mit 5 ml PBS gewaschen, resuspendiert und anschließend wieder zentrifugiert. Danach wurde das überschüssige PBS abgesaugt. Zum Zellpellet wurde 2ml Medium hinzugefügt und das Ganze gründlich resuspendiert. In einer neuen 75cm² Kulturflasche wurde 10 ml Medium vorgelegt und danach die Zellsuspension ergänzt. Je nach Experiment wurden die Zellen 1:5 oder 1:10 verdünnt.

5.5.3 Proteinisolierung für den Caspase-Assay

Analog zu den 75cm² Kulturflaschen wurden Melanomzellen in 10cm Petrischalen in 10 ml Medium bis zur Konfluenz von mindestens 80% kultiviert. Vor der Behandlung wurde zuerst das Medium unter aseptischen Bedingungen in der Reinraumwerkbank gewechselt und anschließend die jeweilige Substanzbehandlung ergänzt. Die Zellen wurden dann für 24h bzw. 48h inkubiert. In der Regel wurden 10 Petrischalen für ein Experiment verwendet.

Das Verfahren der Proteinisolierung wurde außerhalb des Laminar Air Flows unter nicht sterilen Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurden zuerst die 50 ml Falcons beschriftet und vorgelegt. Die Petrischalen wurden dann vom Inkubator entnommen. Das Medium wurde mithilfe eines PipetBoy abgesaugt und in dem entsprechenden Falcon entleert. Die Zellen wurden mit 5 ml PBS gewaschen, wobei dies auch wieder in Falcons kollektiert wurde. Zu den Zellen wurden mit 1 ml Trypsin für 5 min bei 37°C inkubiert. Unter dem Mikroskop wurde danach kontrolliert, ob sich alle Zellen abgelöst haben. Die Zellen wurden danach im Falcon gesammelt und die Petrischale zweimal mit jeweils 5 ml PBS gewaschen und ebenfalls im Falcon kollektiert. Nun wurden die gesammelten Proben bei 1500 rpm für 4 min bei einer Temperatur von 24 °C zentrifugiert. Währenddessen wurde ein Behälter mit Eis vorbereitet, um die Falcons anschließend dort aufzubewahren. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert und noch einmal unter denselben Bedingungen zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde zum Caspase LYSE-Puffer (siehe Tabelle 1) die Ser/Thr-Protease Inhibitoren hinzugefügt. 2,5ml vom Caspase LYSE-Puffer wurden in einem 15 ml Falcon vorgelegt und mit jeweils 2,5 µl (1:1000 verdünnt) der Protease- (Aproteine, PMSF, Leupeptin)

sowie Phosphataseinhibitoren (Na_2VO_3 , NaF) ergänzt. Der Überstand wurde erneut anschließend abgegossen und das Pellet mit 200 μl Caspase LYSE-Puffer versetzt und resuspendiert. Nun wurden die Lysate jeweils in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß übergeführt. Mit flüssigem Stickstoff wurden die Proben schockgefroren und im Ultraschallbad für 30 Sekunden behandelt. Die Eppendorfer-Gefäße wurden danach abgetrocknet und in der Sigma 3-30 KS-Zentrifuge bei 18700 rpm/30 000 x g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit den Zellbestandteilen in einem neuen Eppendorfer-Gefäß gesammelt. Davon wurden 20 μl für die Proteinkonzentrationsbestimmung in einem separaten Behälter entnommen. Die Lysate wurden dann mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Caspase-Lysis und Caspase-Reaktions Puffer

Caspase Lysis Puffer	2 x Reaktion Puffer
25 mM HEPES, pH= 7.5 (0.6 g)	40 mM HEPES pH= 7.5 (0.48 g)
1 mM EGTA (0.038 g)	2 mM EGTA (0.038 g)
5 mM EDTA (0.19 g)	10 mM EDTA (0.19 g)
5 mM MgCl_2 (0.1 g)	5 mM MgCl_2 (0.05 g)
	20% Glycerol
Σ 100 ml M.Q.	Σ 50 ml M.Q.
	Fische Zugabe von: DTT [1 M] 1:250 → Endkonzentration: 4 mM

5.5.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Der Zellüberstand, der nach der Lyse zu 20 μl aliquotiert worden ist, wurde aus der Kühltruhe entnommen und in der Hand aufgetaut. Zu der Probe wurde 20 μl Wasser hinzugefügt um

eine 1:1 Verdünnung zu erhalten. Anschließend wurde in einem 50 ml Falcon das Biorad dye (Firma) 1:5 mit Wasser verdünnt. Pro Well wurden 10 µl Probe und 190 µl Biorad Lösung pipettiert. Für den Leerwert wurde statt der Probe einmal 10 µl Wasser und einmal 10 µl Puffer hinzugegeben. Die Platte wurde dann 10 min an einem dunklen Ort bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte mit dem Tecan infinite Plate-Reader mit einer Absorptionswellenlänge von 595 nm. In Excel wurde der Leerwert von den Werten der Proben abgezogen und die Proteinmenge in µg/µl mittels der Steilheit der zuvor erstellten Biorad-Eichkurve berechnet.

5.6 MTT Assay

Der MTT-Assay ist ein kolorimetrischer Proliferationstest, der uns die Zellviabilität anzeigt. Als Indikator dient das Tetrazoliumsalz, das in lebenden Zellen in ein intensiv gefärbtes Formazanderivat umgewandelt wird (Mosmann, 1983).

In einer 96-Well Platte werden pro Well 10 µl Zellsuspension und 90 µl Medium pipettiert und anschließen im Inkubator so lange bebrütet, bis die Zellen eine Konfluenz von 70-80% erreicht haben. Meistens wurde dies nach zwei bis drei Tagen erreicht. Zusätzlich wurden auch Wells ohne Zellen, nur mit Medium und Farbstoff als Leerwerte vorbereitet, die am Ende von den Messwerten abgezogen wurden. Im nächsten Schritt wurden die Zellen unter dem LAF mit den Substanzen behandelt. Hierbei wurde jede Behandlung dreimal durchgeführt, sodass wir am Ende jeweils drei Replikate erhielten. Je nach Experiment wurden die 96-Well-Platte 24h, 48h oder 72h im Inkubator bei 37°C kultiviert.

Für den MTT Assay wurde der EZ4U Kit (Firma: Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG) verwendet. Das Substrat wurde mit 2,5 ml Aktivator aufgelöst und anschließend mit 9 ml Wasser in einem 15 ml Falcon verdünnt. Nach dem Auflösen des Substrates lag eine strohgelbe Lösung vor. Pro Well wurden 20 µl der Farbstofflösung zu 100µl Medium (inkl. Substanzbehandlung) dazugegeben. Die restliche Lösung wurde in Aliquots in Eppendorfgefäßen bei -20 °C tiefgefroren und immer kurz vor der nächsten Anwendung aufgetaut. Die ganze 96 Well Platte wurde in einem Schüttelgerät kurz geschüttelt und für 3 Stunden in den Zell-Inkubator gegeben. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte bei 450 nm und 620 nm mit dem Viktor³V Multilabel Counter (Perkin Elmer) Detektor gemessen. Die

Werte, die bei 450 nm gemessen wurden, wurden zunächst um den Referenzwert subtrahiert und anschließend der Mittelwert der Leerwerte.

5.7 Caspase Assay

Die spezifischen Caspase Substrate sind mit einem fluorogenen Molekül, wie das 7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (AFC) konjugiert (Gurtu, Kain, & Zhang, 1997). Die Caspase Aktivität wird durch die Änderung der Fluoreszenz nach Abspaltung der Fluorophore vom Substrat gemessen.

Die Lysate wurden vom -80°C Gefrierfach entnommen und in der Hand aufgetaut. In je einem Well einer 96-Well Platte wurden 10 µl von der Proteinlösung und 40 µl Caspase LYSIS Puffer pipettiert. Jede Probe wurde doppelt aufgetragen. Die 50 µl-Substratmischung bestand jeweils aus 25 µl Caspase Reaktions-Puffer (siehe Tabelle 1), 100 µM Substrat, 4mM DTT und Wasser. Es wurden sowohl Caspase 3 (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AFC) als auch Caspase 9 (Ac-Leu-Glu-His-Asp-AFC) Substrate für die unterschiedlichen Assays verwendet. Für den Leerwert wurde statt 10 µl Proteinlösung Wasser verwendet und mit den restlichen Bestandteilen ergänzt. Das ganze Verfahren wurde im abgedunkelten Raum durchgeführt. Die Platte wurde anschließend in Alufolie eingewickelt und für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mit dem Viktor³V Multilabel Counter (Perkin Elmer) Detektor bei einer Anregungswellenlänge von 405nm und Emissionswellenlänge von 535nm. Von den resultierenden Werten wurde dann der gemittelte Leerwert subtrahiert und mit der Proteinmenge und Inkubationsdauer auf OD/µg/min umgerechnet.

5.8 Wound healing Assay

Beim Wound healing Assay, auch Scratch Assay genannt, wird die Zellmigration und Zell-Zell-Interaktion untersucht. Eine „Wunde“ wird durch Ritzen mit einer Pipettenspitze in einer Zellmonoschicht erzeugt und anschließend in regelmäßigen Zeitabständen Bilder aufgenommen. Dadurch wird die Zellmigration während der Wundheilung dokumentiert (Rodriguez, Wu, & Guan, 2005).

In einer 12-Well Platte wurden Zellen kultiviert und solange bebrütet, bis sie eine Konfluenz von mindestens 80 bis 90% erreichten. Anschließend wurde unter dem Laminar Air Flow mit

einer 20 µL Pipettenspitze der Zellrasen entlang einer geraden Linie entfernt. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Es wurde jeweils 1ml neues Medium zu jedem Well hinzugefügt und die Zellen mit den Substanzen in entsprechender Konzentration behandelt.

Zu den Zeitpunkten 0h, 6h, 24h, 30h, 48h und 54h wurden pro Well mit einem Nikon ECLIPSE TS100 Mikroskop Aufnahmen der „Wunde“ gemacht. Hierbei wurden jeweils 4 unterschiedliche Stellen entlang der zellfreien Linie aufgenommen und als Bilder (*.tif) gespeichert. Die zellfreien Stellen wurden durch das Programm TScratch in Prozent ermittelt. Der Wert der „Wunde“ zum Zeitpunkt 0h wurde auf 100% gesetzt und die Werte der übrigen Zeitpunkte dazu normalisiert.

5.9 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der Statistik wurde das Programm SigmaPlot Version 11.0 verwendet. Um einen Unterschied zwischen den Mittelwerten von mehreren Gruppen zu untersuchen, wurde der One Way ANOVA Test herangezogen. Die statistische Signifikanz wurde post hoc mit dem Bonferroni Test ermittelt und mit verschiedenen Symbolen dargestellt (*/#/\$/&: $p < 0,05$; **/##/\$\$/&&: $p < 0,01$; ***/###/\$\$\$/&&&: $p < 0,001$). Die Werte mit einem $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen. Für die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung wurde, wenn nicht anders notiert, 1-4 Versuche herangezogen.

6 Resultate

6.1 MTT Assay

Der SOS1-Ras Inhibitor BAY293 wurde in den vier verschiedenen Zelllinien (WM278, WM35, A375, 518a2) untersucht, um Unterschiede in der Viabilität zwischen den Zellen der frühen Wachstumsphase und den metastasierenden Zellen zu identifizieren. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der einzelnen Zelllinien dargestellt.

6.1.1 WM278

6.1.1.1 Konzentrationsabhängige Effekte von BAY293 und Trametinib

Zunächst wurden die Zellen mit BAY293 und Trametinib in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und jeweils für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. In der Abbildung 5 ist zu erkennen, dass BAY293 in den niedrigeren Konzentrationen 0,3 μ M bis 2,7 μ M zu allen drei Zeitpunkten keinen großen Effekt zeigt. Erst bei einer Konzentration von 8 μ M tritt eine signifikante Reduktion der Viabilität ein. Diese Reduktion wird nach 48 (Abb. 5B) sowie 72 Stunden (Abb. 5C) nochmals deutlich verstärkt und die Anzahl der lebenden Zellen geht bis auf 10-20% zurück. Die Behandlung mit Trametinib zeigt nach 24 Stunden (Abb. 5A) erst bei 3 μ M eine signifikante Reduktion. Im Gegensatz zu BAY293 erreicht Trametinib auch in den niedrigeren Konzentrationen nach 48h (Abb. 5B) und 72h (Abb. 5C) eine deutlich signifikante Abnahme der lebenden Zellen. Es ist somit eine zeitabhängige Reduktion der Viabilität unter Trametinib sowie mit 8 μ M BAY293 zu erkennen.

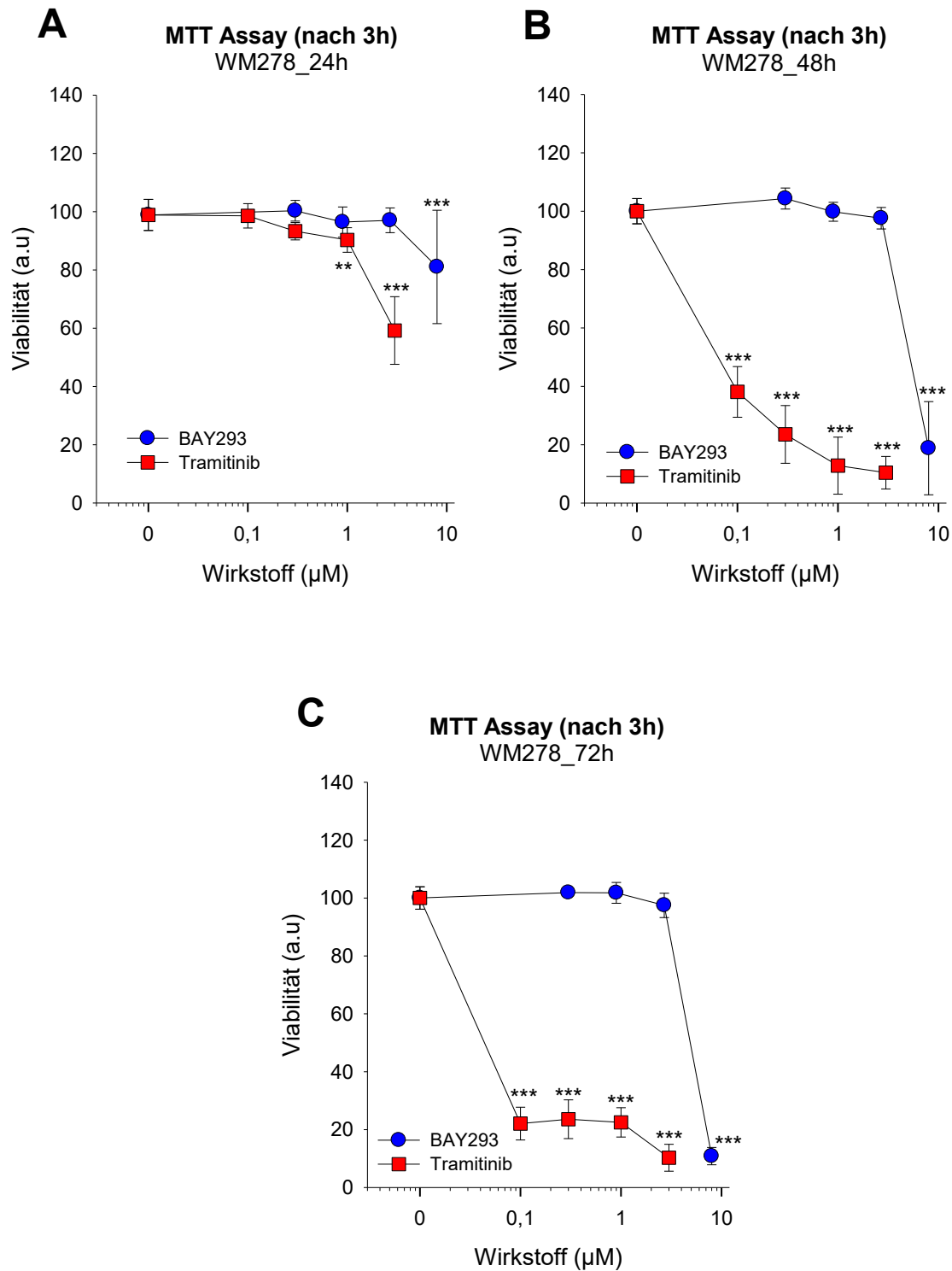


Abbildung 5: Viabilität der WM278 Zelllinie 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung mit BAY293 oder Trametinib

Die Zellen wurden in einer 96-Well Platte herangezchtet und bei einer Konfluenz von 70% behandelt. Es wurde eine Verdünnungsreihe ausgehend von der höchsten Konzentration (8 μM BAY293/ 3 μM Trametinib) durchgeführt. Anschließend wurde die Platte für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Die Messung wurde drei Stunden nach der Zugabe des MTT-Farbstoffes durchgeführt. Die Werte wurden auf die Kontrolle in Excel normalisiert und als Kurvendiagramm dargestellt. Die Symbole stellen den Mittelwert $\pm$ SD (n= 2-3). Die

Signifikanz wurde mit One Way ANOVA/ Bonferroni durchgeführt und ist gegenüber der Kontrolle mit *: $p < 0,05$ /
 : $p < 0,01$ /*: $p < 0,001$ gekennzeichnet.

6.1.1.2 Behandlung mit BAY283 in Kombination mit anderen Inhibitoren

Die WM278 Zellen wurden zusätzlich zu BAY293 mit Trametinib und Vemurafenib sowohl einzeln als auch in Kombination behandelt. In Abbildung 6A ist zu erkennen, dass Trametinib in Kombination mit dem KRAS-SOS1 Inhibitor nach 24h eine signifikante Reduktion der Viabilität im Vergleich zur Kontrolle, BAY293 und Trametinib in der Einzelbehandlung erreicht. Nach 48h (Abb. 6B) und 72h (Abb. 6C) ist der Unterschied zwischen der Zweifach- und Einfachkombination von Trametinib geringer. Vemurafenib erreicht erst nach 72h (Abb. 6C) eine höhere Wirkung als BAY293.

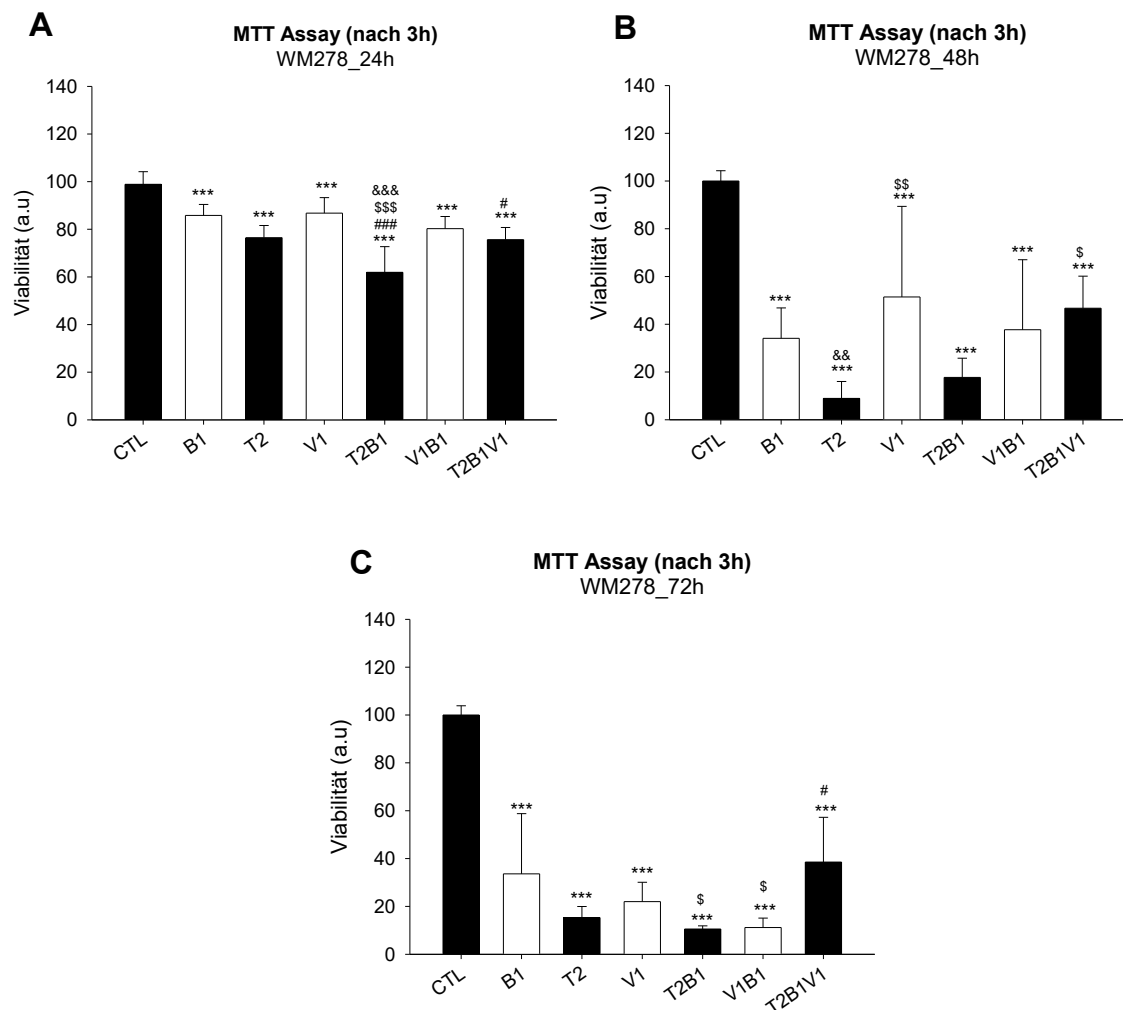


Abbildung 6: Viabilität der WM278 Zelllinie 24, 48 und 72 Stunden nach den Einzel – und Kombinationsbehandlungen

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70% mit BAY293 1 μ M (B1), Trametinib 2 μ M (T2) und Vemurafenib 1 μ M (V1) behandelt. Die Wirkstoffe wurden einzeln und in Kombination hinzugefügt und anschließend für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Die Messung erfolgte drei Stunden nach der Zugabe des MTT-Farbstoffes. Die Werte wurden in Excel auf die Kontrolle normalisiert und als Balkendiagramm mit Mittelwert und $\pm$ S.D (n= 2-3) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit One Way Anova und anschließend mit Bonferroni ermittelt. Die Signifikanz gegenüber der Kontrolle (*: $p < 0,05$ / **: $p < 0,01$ /***: $p < 0,001$), BAY293 (#: $p < 0,05$ / ##: $p < 0,01$ / ###: $p < 0,001$), Trametinib (\$: $p < 0,05$ / \$\$: $p < 0,01$ / \$\$\$: $p < 0,001$) und Vemurafenib (&: $p < 0,05$ / &&: $p < 0,01$ / &&&: $p < 0,001$) wurde dargestellt.

6.1.2 WM35

6.1.2.1 Konzentrationsabhängige Effekte von BAY293 und Trametinib

Die Zelllinie WM35 wurde zusätzlich mit einer zweiten Verdünnungsreihe (0,2 μ M/ 0,6 μ M/1,8 μ M/ 5,3 μ M) behandelt, weshalb mehr Messwerte entstanden sind. Ähnlich wie bei der Zelllinie WM278 ist auch bei WM35 zu erkennen, dass BAY293 in niedrigeren Konzentrationen keine hohe Reduktion der lebenden Zellen erreicht. Erst mit der Konzentration von 8 μ M wird die Viabilität stark erniedrigt. Ab 72h (Abb. 7C) erreicht die Konzentration von 5 μ M BAY293 eine Signifikanz von $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle. Mit Trametinib geht die Rate an lebenden Zellen schon früher und bei niedrigeren Konzentrationen zurück. Nach 48 Stunden (Abb. 7B) wird dieser Effekt noch verstärkt und zeigt nach 72 h bereits in der niedrigsten Wirkstoffkonzentration von 0,1 μ M mehr als 50% Reduktion der Viabilität, die zudem auch hochsignifikant ist.

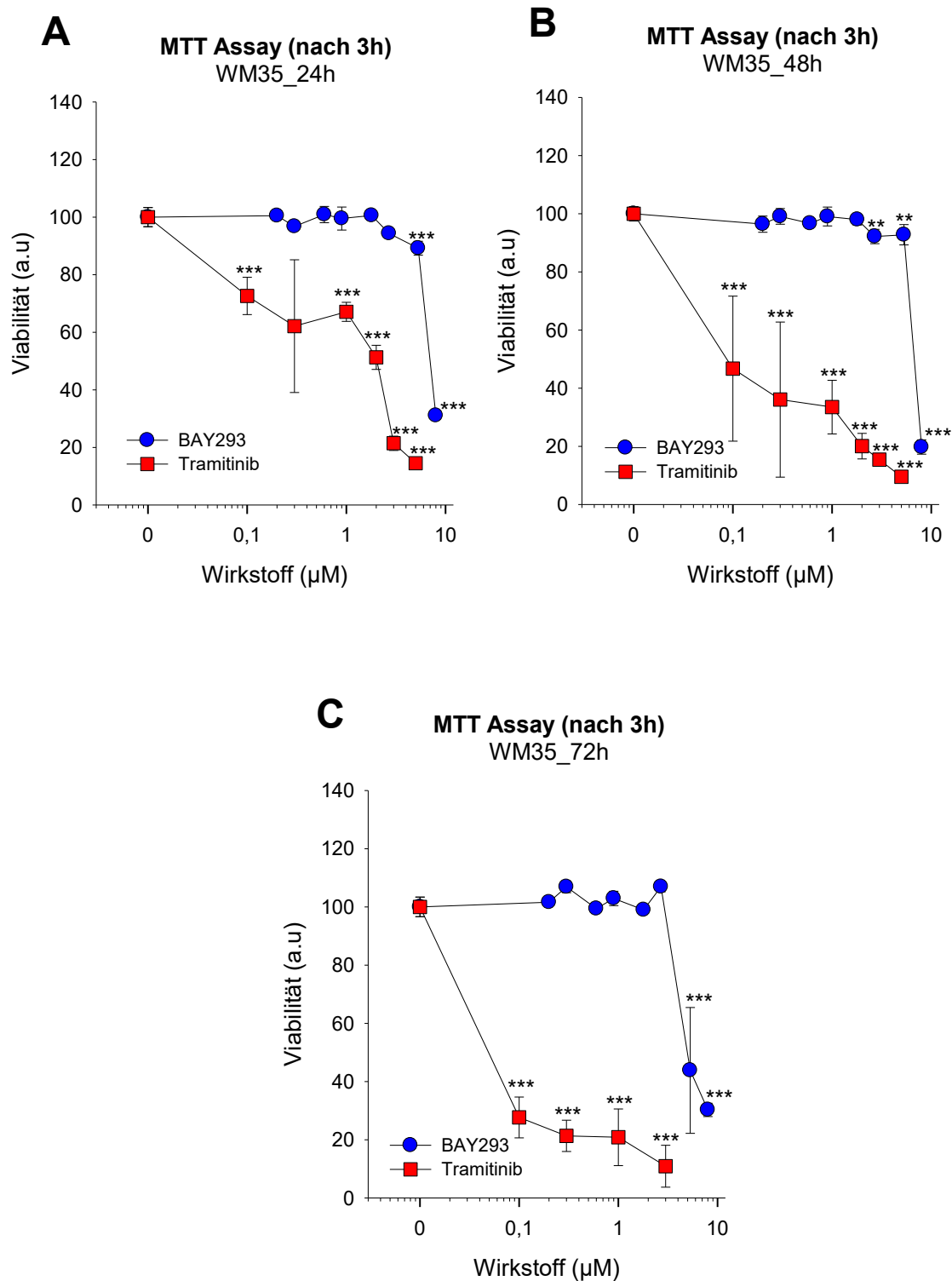


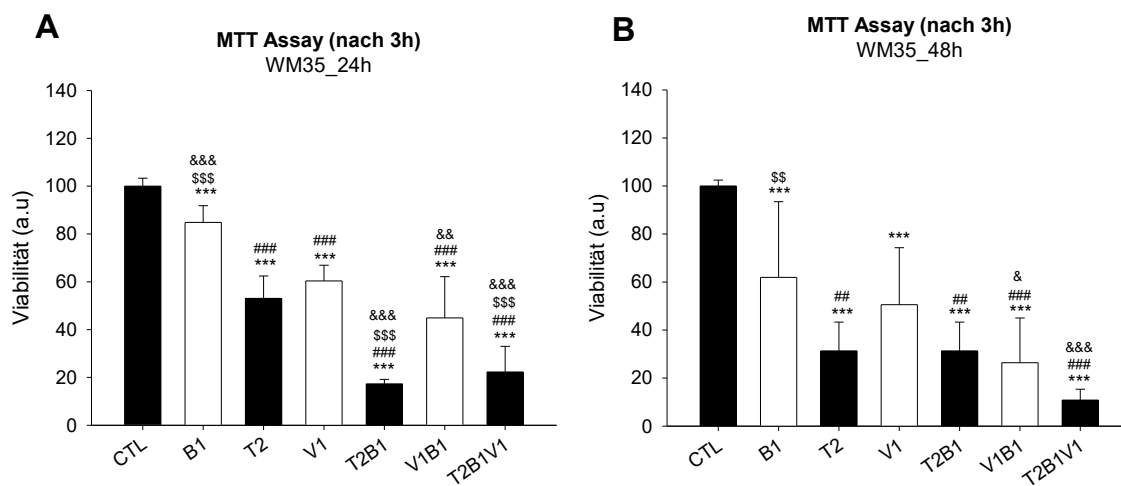
Abbildung 7: Viabilität der WM35 Zelllinie 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung mit BAY293 oder Trametinib

Die Zellen wurden in einer 96-Well Platte herangezüchtet und bei einer Konfluenz von 80-90% behandelt. BAY293 wurde in den Konzentrationen 0,2μM/0,3μM/0,6μM/0,9μM/1,8μM/2,7μM/5,3μM/8μM und Trametinib in den Konzentrationen 0,1μM/0,3μM/1μM/2μM/3μM /5μM verabreicht. Anschließend wurde die Platte für 24, 48 und

72 Stunden inkubiert. Die Messung wurde drei Stunden nach der Zugabe des MTT-Farbstoffes durchgeführt. Die Werte wurden auf die Kontrolle in Excel normalisiert und als Kurvendiagramm dargestellt. Die Symbole stellen den Mittelwert $\pm$ S.D. (n= 1-4) dar. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA/ Bonferroni durchgeführt und ist gegenüber der Kontrolle mit *: $p < 0,05$ / **: $p < 0,01$ /***: $p < 0,001$ gekennzeichnet.

6.1.2.2 Behandlung mit BAY283 in Kombination mit anderen Inhibitoren

In der Abbildung 8A ist zu erkennen, dass Trametinib zusammen mit BAY293 nach 24h im Vergleich zu der Einzelbehandlung eine deutliche Reduktion der Viabilität verursacht, die mit der Inkubationsdauer zunimmt. Vemurafenib zeigt ebenso eine erhöhte Wirksamkeit in Kombination mit dem KRAS-SOS1 Inhibitor BAY293 gegenüber der der Einzelbehandlung, die über die Inkubationszeit von 72h erhalten bleibt (Abb. 8C). Anders als in den WM278 Zellen ist die Dreifachkombination ähnlich effektiv wie die Zweifachkombination Trametinib mit BAY293 nach 24h und 72h.



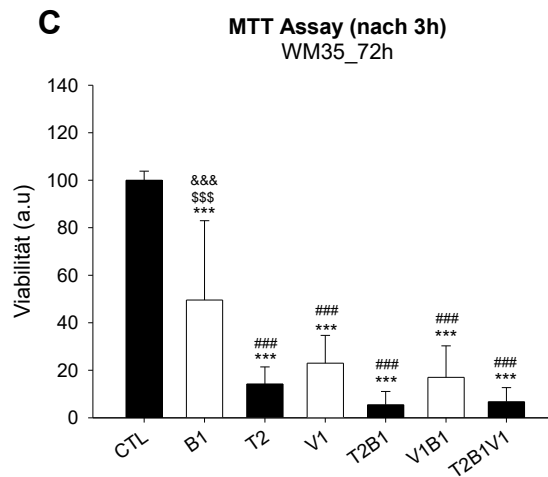


Abbildung 8: Viabilität der WM35 Zelllinie 24, 48 und 72 Stunden nach den Einzel – und Kombinationsbehandlungen

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% mit BAY293 1 μ M (B1), Trametinib 2 μ M (T2) und Vemurafenib 1 μ M (V1) behandelt. Die Wirkstoffe wurden einzeln und in Kombination hinzugefügt und anschließend für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Die Messung erfolgte drei Stunden nach der Zugabe des Farbstoffes. Die Werte wurden in Excel auf die Kontrolle normalisiert und als Balkendiagramm mit Mittelwert und $\pm$ S.D. (n= 1-4) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit One Way Anova und anschließend mit Bonferroni ermittelt. Die Signifikanz gegenüber der Kontrolle (*: p < 0,05/ **: p < 0,01/ ***: p < 0,001), BAY293 (#: p < 0,05/ ###: p < 0,01/ ####: p < 0,001), Trametinib (\$: p < 0,05/ \$\$: p < 0,01/ \$\$\$: p < 0,001) und Vemurafenib (&: p < 0,05/ &&: p < 0,01/ &&&: p < 0,001) wurde dargestellt.

6.1.3 A375

6.1.3.1 Konzentrationsabhängige Effekte von BAY293 und Trametinib

In Abbildung 9 sehen wir, dass erst bei einer Konzentration von 8 μ M BAY293 eine signifikante Reduktion der Viabilität zu allen drei Zeitpunkten besteht. Zwischen dem Zeitraum von 24h bis 48h ist kein großer Unterschied zu erkennen, womit sich diese metastatische Zelllinie deutlich von den WM-Zelllinien unterscheidet. Nach 72h (Abb. 9C) geht die Viabilität bei der höchsten Konzentration von BAY293 unter 60% zurück. In Abbildung 9A ist auch zu erkennen, dass Trametinib 0,1-1 μ M in A375 weniger wirksam ist die Viabilität signifikant zu reduzieren. Dies ändert sich aber nach 72h (Abb. 9C), wenn Trametinib auch in den niedrigeren Konzentrationen eine signifikante Hemmung der Viabilität zeigt. Im Gegensatz dazu sehen wir bei BAY293 keinen großen Rückgang der Viabilität über die Zeit.

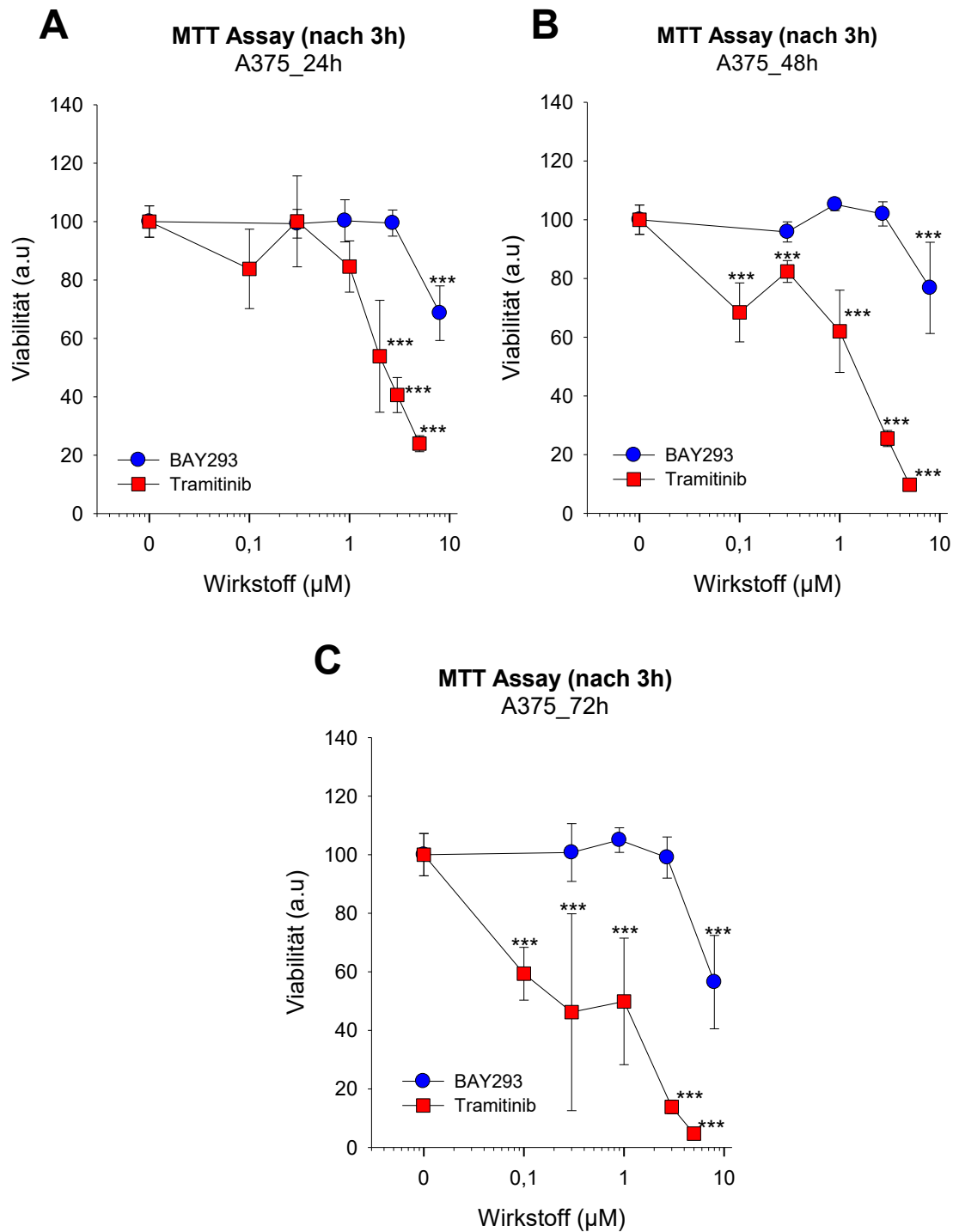


Abbildung 9: Viabilität der A375 Zelllinie 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung mit BAY293 oder Trametinib

Die Zellen wurden in einer 96-Well Platte herangezüchtet und bei einer Konfluenz von 80% behandelt. BAY293 wurde in den Konzentrationen 0,3μM/0,9μM/2,7μM/8μM und Trametinib in den Konzentrationen 0,1μM/0,3μM/1μM/3 μM hinzugefügt. Anschließend wurde die Platte für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Die Messung wurde drei Stunden nach der Zugabe des MTT-Farbstoffes durchgeführt. Die Werte wurden auf die Kontrolle in Excel normalisiert und als Kurvendiagramm dargestellt. Die Symbole stellen den Mittelwert $\pm$ S.D.

(n= 1-3) dar. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA/ Bonferroni durchgeführt und ist gegenüber der Kontrolle mit *: $p < 0,05$ / **: $p < 0,01$ /***: $p < 0,001$ gekennzeichnet.

6.1.3.2 Behandlung mit BAY283 in Kombination mit anderen Inhibitoren

In der Abbildung 10 ist zu erkennen, dass die Viabilität mit Trametinib in der Einzelbehandlung über die Zeit sehr stark sinkt. Die Zweifachkombination des MEK-Inhibitors mit BAY293 zeigt nach 24h (Abb. 10A) einen größeren Effekt als die Einzelbehandlungen. Ab 48h (Abb. 10B) ist die hemmende Wirkung von Trametinib alleine viel stärker. Die Kombination von T2B1 und V1B1 sind ihrer Wirkung sehr ähnlich und zeigen keinen großen Unterschied zu der Dreifachkombination auf.

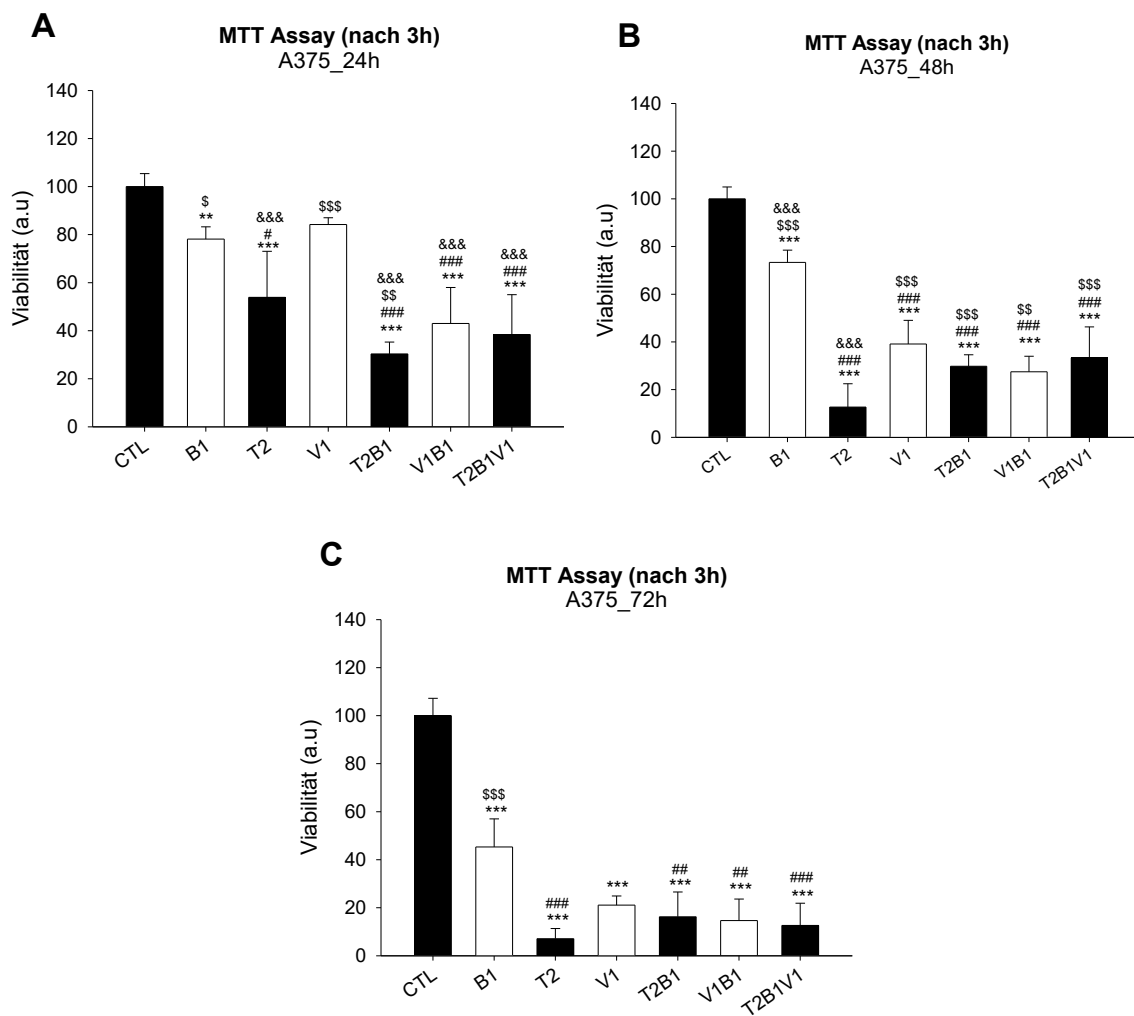


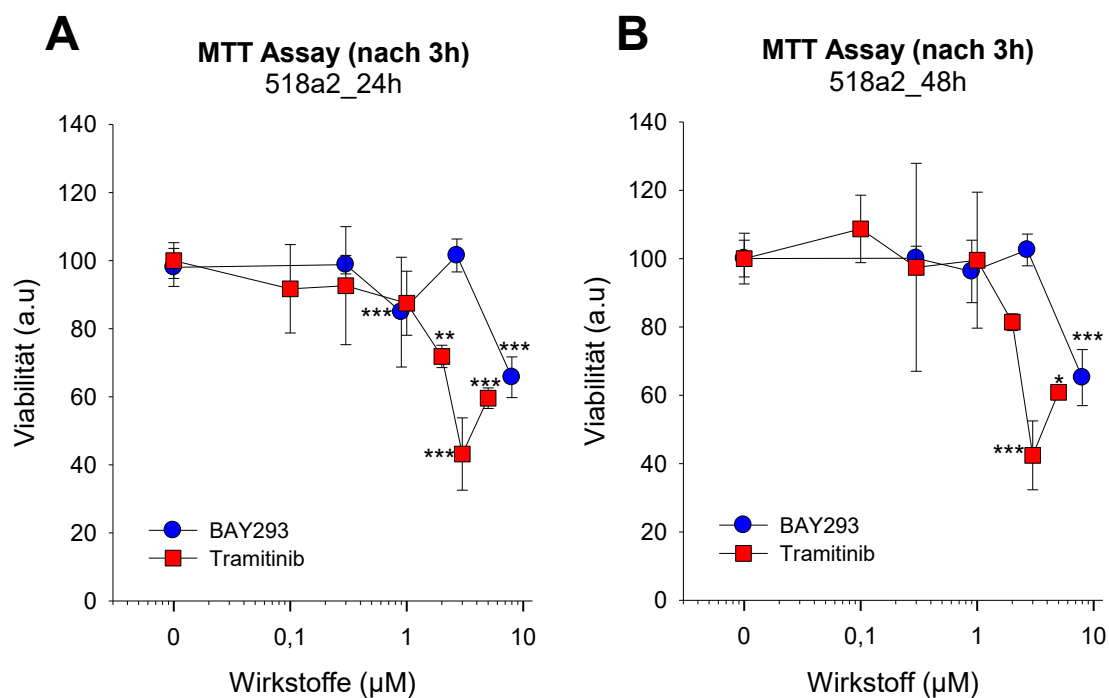
Abbildung 10: Viabilität der A375 Zelllinie 24, 48 und 72 Stunden nach den Einzel – und Kombinationsbehandlungen

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80% mit BAY293 1µM (B1), Trametinib 2µM (T2) und Vemurafenib 1µM (V1) behandelt. Die Wirkstoffe wurden einzeln und in Kombination hinzugefügt und anschließend für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Die Messung erfolgte drei Stunden nach der Zugabe des Farbstoffes. Die Werte wurden in Excel auf die Kontrolle normalisiert und als Balkendiagramm mit Mittelwert und $\pm$ S.D. (n= 1-3). dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit One Way Anova und anschließend mit Bonferroni ermittelt. Die Signifikanz gegenüber der Kontrolle (*: $p < 0,05$ / **: $p < 0,01$ /***: $p < 0,001$), BAY293 (#: $p < 0,05$ / ##: $p < 0,01$ / ###: $p < 0,001$), Trametinib (\$: $p < 0,05$ / \$\$: $p < 0,01$ / \$\$\$: $p < 0,001$) und Vemurafenib (&: $p < 0,05$ / &&: $p < 0,01$ / &&&: $p < 0,001$) wurde dargestellt.

6.1.4 518a2

6.1.4.1 Konzentrationsabhängige Effekte von BAY293 und Trametinib

Auf Abbildung 11 ist zu sehen, dass BAY293 in der höchsten Konzentration zu allen drei Zeitpunkten eine signifikante Reduktion der Zellen zeigt. Die Viabilität sinkt aber nicht weiter als um 50%. Mit Trametinib in den niedrigeren Konzentrationen (0,1-2 µM) findet keine signifikante Abnahme der Zellviabilität statt. Erst mit einer Konzentration von 3 µM Trametinib kommt es zu allen drei Zeitpunkten zu einer signifikanten Reduktion. Die Behandlung mit BAY293 (8 µM) erreicht einen ähnlichen Effekt wie Trametinib (5 µM).



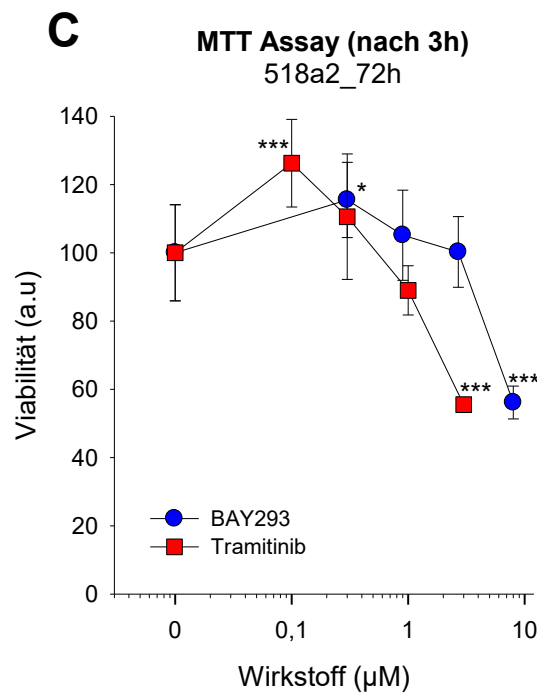


Abbildung 11: Viabilität der WM35 Zelllinie 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung mit BAY293 oder Trametinib

Die Zellen wurden in einer 96-Well Platte herangezüchtet und bei einer Konfluenz von 60-70% behandelt. BAY293 wurde in den Konzentrationen 0,3μM/0,9μM/2,7μM/8μM und Trametinib in den Konzentrationen 0,1μM/0,3μM/1μM/2μM/3μM/5μM hinzugefügt. Anschließend wurde die Platte für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Die Messung wurde drei Stunden nach der Zugabe des MTT-Farbstoffes durchgeführt. Die Werte wurden auf die Kontrolle in Excel normalisiert und als Kurvendigramm dargestellt. Die Symbole stellen den Mittelwert $\pm$ S.D. (n= 1-3) dar. Die Signifikanz wurde mit One Way ANOVA/ Bonferroni durchgeführt und ist gegenüber der Kontrolle mit *: $p < 0,05$ / **: $p < 0,01$ /***: $p < 0,001$ gekennzeichnet.

6.1.4.2 Behandlung mit BAY283 in Kombination mit anderen Inhibitoren

Im Vergleich zu den anderen Zelllinien hat die Dreifachbehandlung in den 518a2 Zellen zu jedem Zeitpunkt den größten Effekt auf die Viabilität. In der Abbildung 12 ist zu erkennen, dass BAY293, ähnlich wie Trametinib die Viabilität reduziert. Die Zweifachkombination T2B1 zeigt nach 24h und 48h eine höhere Absterberate der Zellen als Trametinib, hat aber nach 72h eine vergleichbare Wirkung.

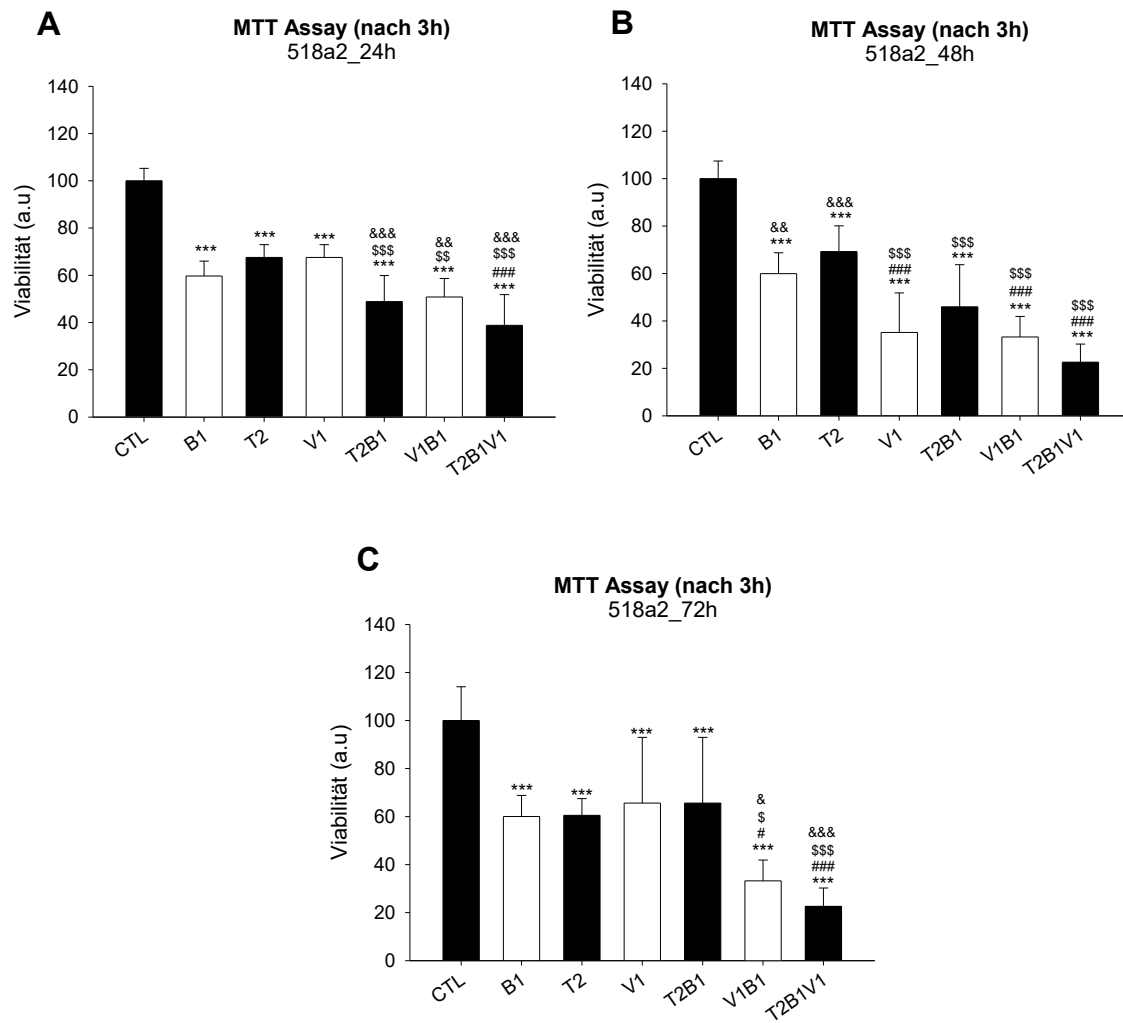


Abbildung 12: Viabilität der WM35 Zelllinie 24, 48 und 72 Stunden nach Einzel – und Kombinationsbehandlungen

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 60-70 % mit BAY293 1 μ M (B1), Trametinib 2 μ M (T2) und Vemurafenib 1 μ M (V1) behandelt. Die Wirkstoffe wurden einzeln und in Kombination hinzugefügt und anschließend für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Die Messung erfolgte drei Stunden nach der Zugabe des MTT-Farbstoffes. Die Werte wurden in Excel auf die Kontrolle normalisiert und als Balkendiagramm mit Mittelwert und $\pm$ S.D. (n= 1-3) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit One Way Anova und anschließend mit Bonferroni ermittelt. Die Signifikanz gegenüber der Kontrolle (*: p < 0,05/ **: p < 0,01/***: p < 0,001), BAY293 (#: p < 0,05/ ##: p < 0,01/ ###: p < 0,001), Trametinib (\$: p < 0,05/ \$\$: p < 0,01/ \$\$\$: p < 0,001) und Vemurafenib (&: p < 0,05/ &&: p < 0,01/ &&&: p < 0,001) wurde dargestellt.

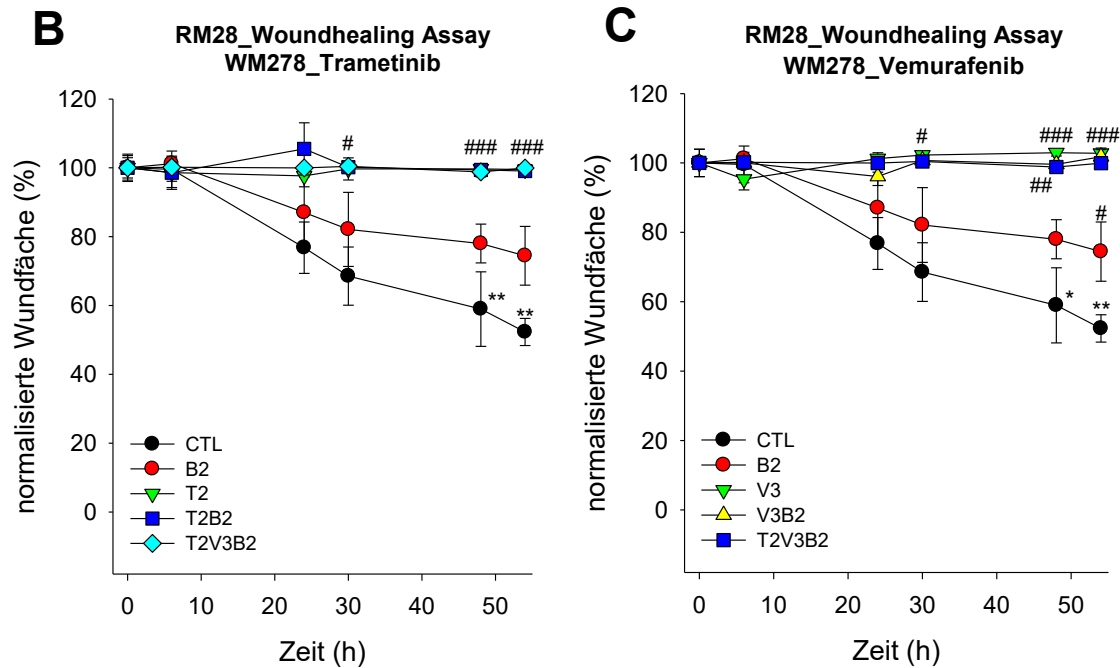


Abbildung 13: Woundhealing Assay von WM278 nach Behandlung mit BAY293 (B), Trametinib (T) und Vemurafenib (V)

Die Zellen wurden in einer 12-Well Platte herangezchtet. Bei einer Konfluenz von 70% wurde mit einer 20 μ L Pipettenspitze der Zellrasen entlang einer Linie entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit BAY293 in den Konzentrationen 0,2 μ M/2 μ M/8 μ M, Trametinib 2 μ M und Vemurafenib 3 μ M behandelt und nach 0, 6, 24, 30, 48 und 54 Stunden Aufnahmen von der Wunde gemacht. Die Fläche der Wunde wurde durch das Programm TScratch ermittelt und in Prozent ausgedrückt. Die Werte wurden auf die Fläche zum Zeitpunkt 0h normalisiert und in einem Kurvendiagramm dargestellt. Die Symbole und Fehlerbalken stellen den Mittelwert $\pm$ S.D. (n= 4) dar. Die statistische Signifikanz wurde mit One Way Anova/ Bonferroni ermittelt und ist gegenüber dem Zeitpunkt 0h mit *: p<0,05/ **: p<0,01/***: p<0,001 gekennzeichnet, sowie gegenüber der Kontrolle zu den jeweiligen Zeitpunkten mit #: p<0,05/ ##: p<0,01/ ###: p<0,001.

6.2.2 WM35

Die Kontrolle und BAY293 0,2 μ M/2 μ M erreichen nach 54 Stunden einen Wundverschluss, der ungefähr bei 80-90% liegt (Abb. 14A). Besonders auffällig ist, dass die Behandlung mit BAY293 8 μ M zu keinem Wundschluss führt und nach 24h keine weitere Auswertung mehr möglich ist. Der KRAS-SOS1 Inhibitor BAY293 führte bei einer Konzentration von 8 μ M zu einem Ablösen der Zellen von der Oberfläche, sodass die ursprüngliche Position der „Wunde“ nicht mehr zu erkennen war.

Ähnlich verhindert die dreifache Wirkstoffkombination in Abbildung 14B und C eine Verkleinerung der Wundfläche. Eine Auswertung ist auch hier nur bis zum Zeitpunkt 30

Stunden möglich. Dies gilt auch für die Kombination von BAY293 mit Vemurafenib oder Trametinib, hier aber etwas abgeschwächt. Gegenüber den Einzelbehandlungen zeigt sich aber eindeutig, dass die Kombination von BAY mit Trametinib oder Vemurafenib einen additiven Effekt zeigt und den „Wundschluss“ zusätzlich reduziert.

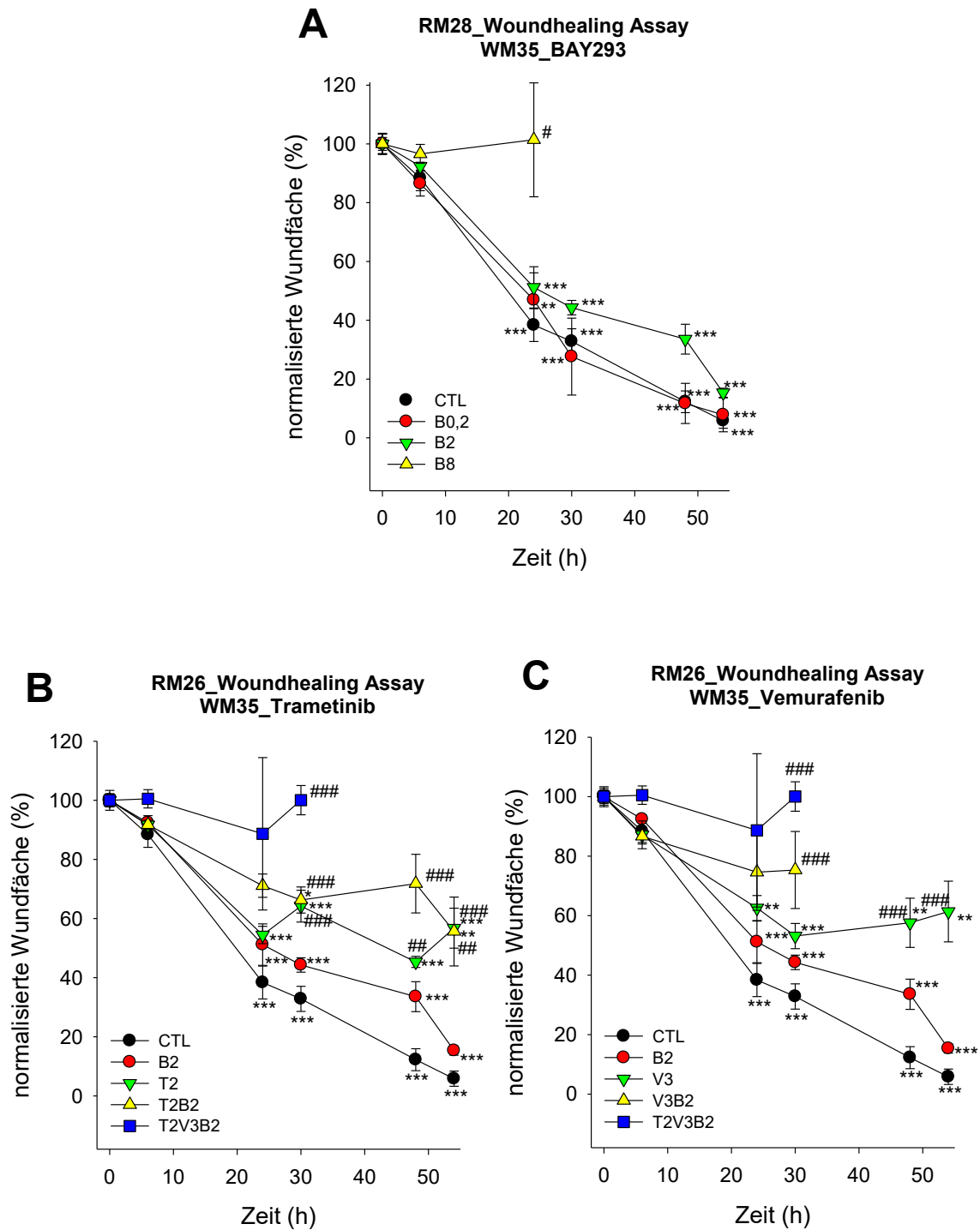


Abbildung 14: Woundhealing Assay von WM35 nach Behandlung mit BAY293 (B), Trametinib (T) und Vemurafenib (V)

Die Zellen wurden in einer 12-Well Platte herangezüchtet. Bei einer Konfluenz von 90% wurde mit einer 20 µL Pipettenspitze der Zellrasen entlang einer Linie entfernt. Anschließend wurden sie mit BAY293 in den Konzentrationen 0,2µM/2µM/8µM, Trametinib 2 µM und Vemurafenib 3 µM behandelt und nach 0, 6, 24, 30, 48 und 54 Stunden wurden Aufnahmen von der Wunde gemacht. Die Fläche der Wunde wurde durch das Programm TScratch ermittelt und in Prozent ausgedrückt. Die Werte wurden auf die Fläche zum Zeitpunkt 0h normalisiert und in einem Kurvendiagramm dargestellt. Die Symbole und Fehlerbalken stellen den Mittelwert $\pm$ S.D. (n= 4) dar. Die statistische Signifikanz wurde mit One Way Anova/ Bonferroni ermittelt und ist gegenüber dem Zeitpunkt 0h mit *: $p<0,05$ / **: $p<0,01$ /***: $p<0,001$ gekennzeichnet, sowie gegenüber der Kontrolle zu den jeweiligen Zeitpunkten mit #: $p<0,05$ / ##: $p<0,01$ / ###: $p<0,001$.

6.2.3 A375

Bei der Zelllinie A375 verläuft die Wundheilung von der Kontrolle, BAY293 0,2 µM und 2 µM sehr ähnlich (Abb. 15A). Die Behandlungen mit dieser Konzentration erreichen nach 48 Stunden einen fast völligen Verschluss der Wundfläche mit einer Signifikanz von $p<0,001$. Die Wirkstoffkonzentration von 8 µM BAY293 reduziert die Fläche bis zu 80%.

Im Gegensatz zu den anderen Zelllinien kommt es bei der dreifachen Wirkstoffkombination zu einem höheren Wundverschluss von bis zu 50 % (Abb. 15B/C). In Abbildung 15 B ist zu erkennen, dass Trametinib mit BAY293 zusammen keinen Unterschied zu Trametinib alleine aufweist. Vemurafenib hingegen zeigt in Kombination mit BAY293 (Abb. 15C) eine höhere Wirkung und verhindert die Zellmigration etwas stärker als die Dreifachkombination. Damit wird die reduzierte Empfindlichkeit von A375 Zellen im MTT-Assay nun auch im wound healing Assay bestätigt.

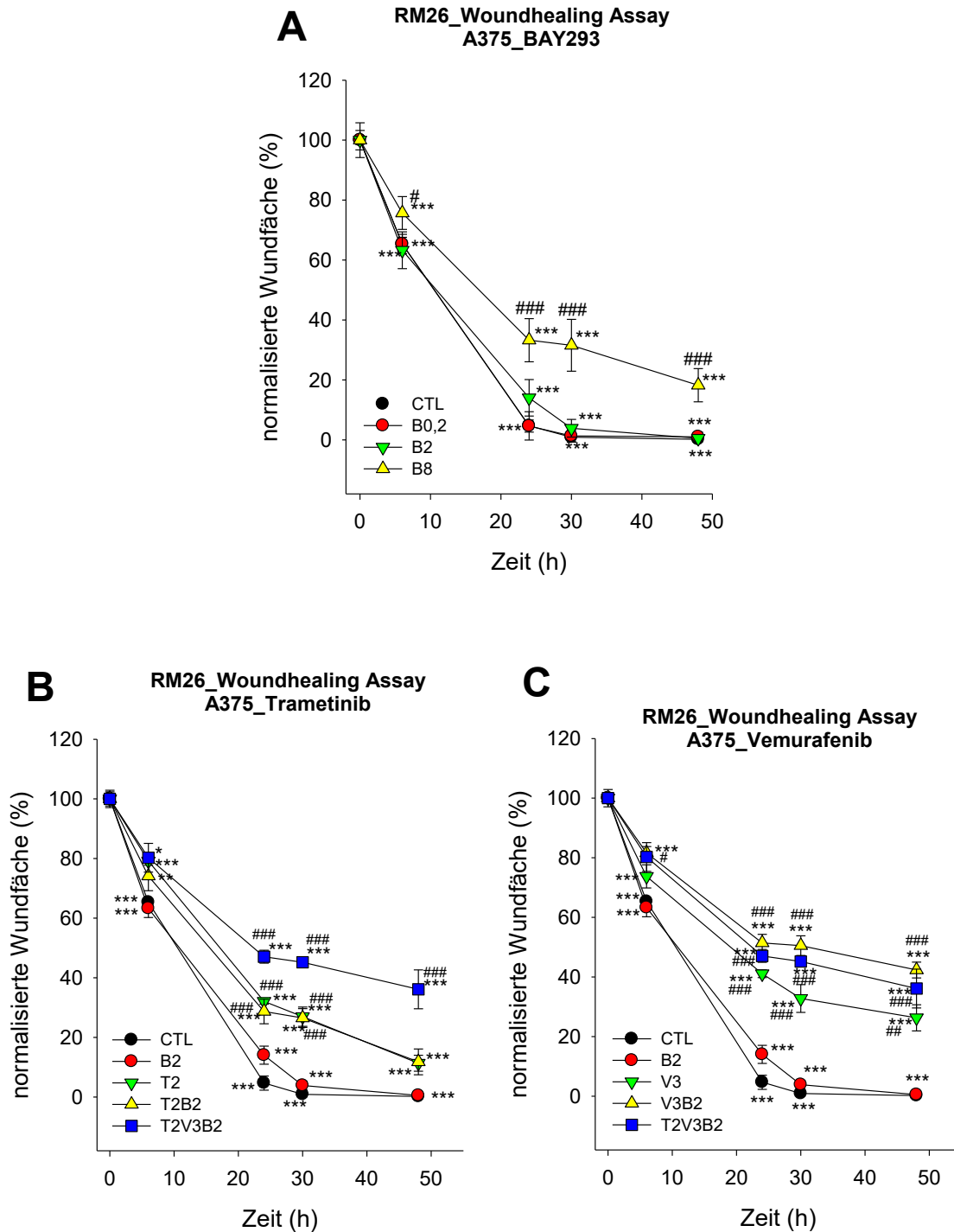


Abbildung 15: Woundhealing Assay von A375 nach Behandlung mit BAY293 (B), Trametinib (T) und Vemurafenib (V)

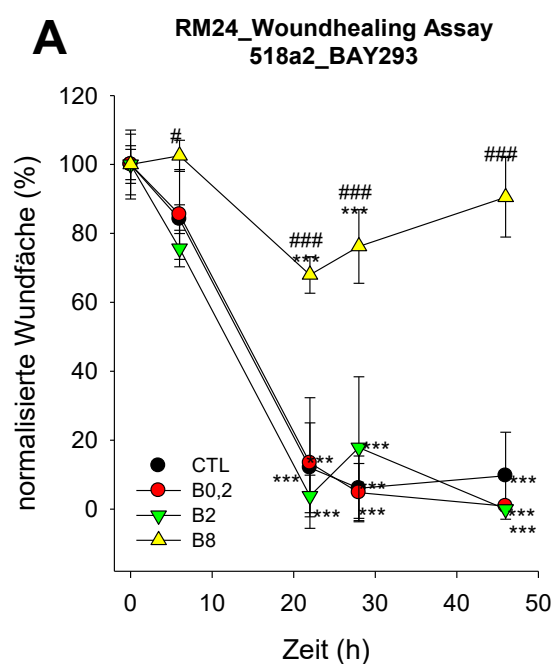
Die Zellen wurden in einer 12-Well Platte herangezchtet. Bei einer Konfluenz von 90% wurde mit einer 20 μ L Pipettenspitze der Zellrasen entlang einer Linie entfernt. Anschließend wurden sie mit BAY293 in den Konzentrationen 0,2 μ M/2 μ M/8 μ M, Trametinib 2 μ M und Vemurafenib 3 μ M behandelt und nach 0, 6, 24, 30, 48 und 54 Stunden wurden Aufnahmen von der Wunde gemacht. Die Fläche der Wunde wurde durch das Programm TScratch ermittelt und in Prozent ausgedrückt. Die Werte wurden auf die Fläche zum Zeitpunkt 0h

normalisiert und in einem Kurvendiagramm dargestellt. Die Symbole und Fehlerbalken stellen den Mittelwert $\pm$ S.D. (n= 4) dar. Die statistische Signifikanz wurde mit One Way Anova/ Bonferroni ermittelt und ist gegenüber dem Zeitpunkt 0h mit *: p<0,05/ **: p<0,01/***: p<0,001 gekennzeichnet, sowie gegenüber der Kontrolle zu den jeweiligen Zeitpunkten mit #: p<0,05/ ##: p<0,01/ ###: p<0,001.

6.2.4 518a2

In Abbildung 16 ist zu beobachten, dass sich der Wert für die Fläche der Wunde mit BAY293 8 μ M bis zum Zeitpunkt 22 Stunden verkleinert und danach wieder vergrößert. Der Grund dafür ist, dass sich die Wunde bis zu einem gewissen Punkt verschließt, danach jedoch die Zellen anfangen zu sterben und die Wundfläche sich wieder vergrößert. In den niedrigeren Wirkstoffkonzentrationen von BAY293 kommt es schon nach 22 Stunden zu einer hohen Zellmigration. Nach 48 Stunden liegt die Wundfläche mit 0,2 und 2 μ M BAY293 schon beinahe zu 0% und höher als die der Kontrolle.

Die Behandlung mit Trametinib zeigt keinen signifikanten Unterschied zur Zweifachkombination mit BAY293 (Abb. 16B). Beide zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die Kontrolle und erzielen nach 48 Stunden einen fast vollständigen Wundschluss. Im Gegensatz dazu erreicht eine Kombination von Vemurafenib und BAY293 ähnliche Werte wie die dreifache Wirkstoffkombination und zeigt synergistische Effekte im Vergleich zur Einzelbehandlung.



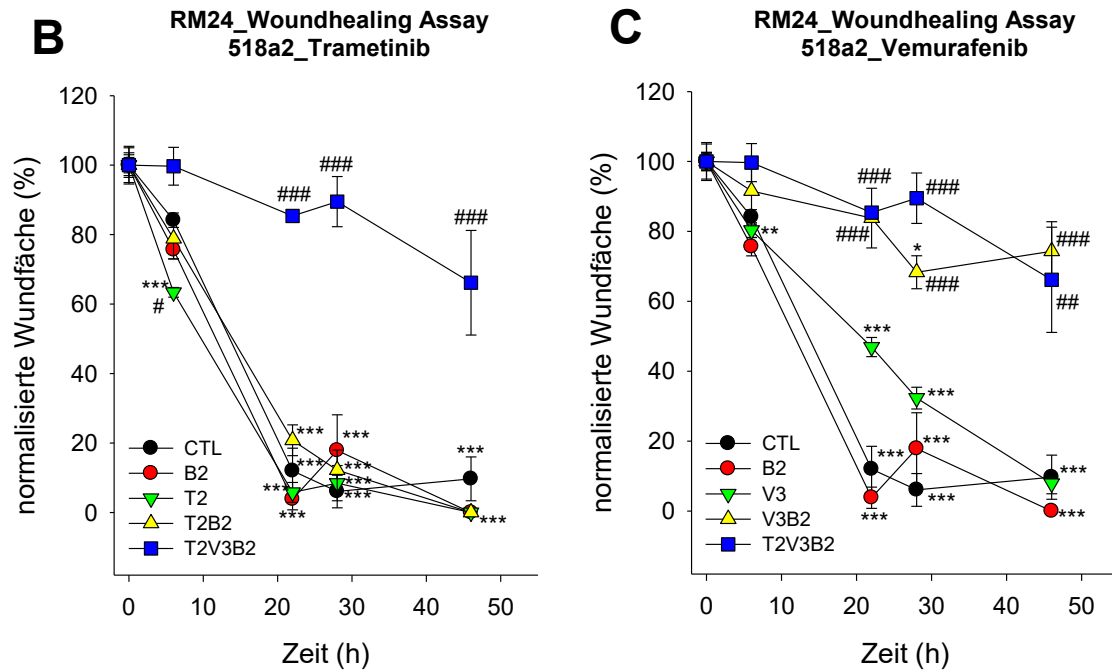


Abbildung 16: Woundhealing Assay von 518a2 nach Behandlung mit BAY293 (B), Trametinib (T) und Vemurafenib (V)

Die Zellen wurden in einer 12-Well Platte herangezchtet. Bei einer Konfluenz von 60-70% wurde mit einer 20 μ L Pipettenspitze der Zellrasen entlang einer Linie entfernt. Anschließend wurden sie mit BAY293 in den Konzentrationen 0,2 μ M/2 μ M/8 μ M, Trametinib 2 μ M und Vemurafenib 3 μ M behandelt und nach 0, 6, 22, 28 und 46 Stunden wurden Aufnahmen von der Wunde gemacht. Die Fläche der Wunde wurde durch das Programm TScratch ermittelt und in Prozent ausgedrückt. Die Werte wurden auf die Fläche zum Zeitpunkt 0h normalisiert und in einem Kurvendiagramm dargestellt. Die Symbole und Fehlerbalken stellen den Mittelwert $\pm$ S.D. (n= 4) dar. Die statistische Signifikanz wurde mit One Way Anova/ Bonferroni ermittelt und ist gegenüber dem Zeitpunkt 0h mit *: p<0,05/ **: p<0,01/***: p<0,001 gekennzeichnet, sowie gegenüber der Kontrolle zu den jeweiligen Zeitpunkten mit #: p<0,05/ ##: p<0,01/ ###: p<0,001.

6.3 Caspase Assay

6.3.1 WM278

6.3.1.1 Caspase 3 Assay

In WM278 Zellen wurde die Caspase 3 Aktivität analysiert und wie in Abbildung 17A zu sehen ist mit Simvastatin als Positivkontrolle schwach stimuliert. BAY293 konnte keine signifikante Erhöhung der Caspaseaktivität gegenüber der Kontrolle innerhalb von 48h erreichen.

Im Gegensatz dazu konnte mit Trametinib oder Vemurafenib Caspase 3 signifikant aktiviert werden (Abb. 17B) ($p < 0,001$). Eine Kombination von Trametinib und BAY293 erhöht die Caspase Aktivität am stärksten. Im Gegensatz dazu sinkt die Kombination mit Vemurafenib bis zu den Werten der Kontrolle. Die dreifache Wirkstoffkombination erreicht ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zu BAY293 oder der Kontrolle.

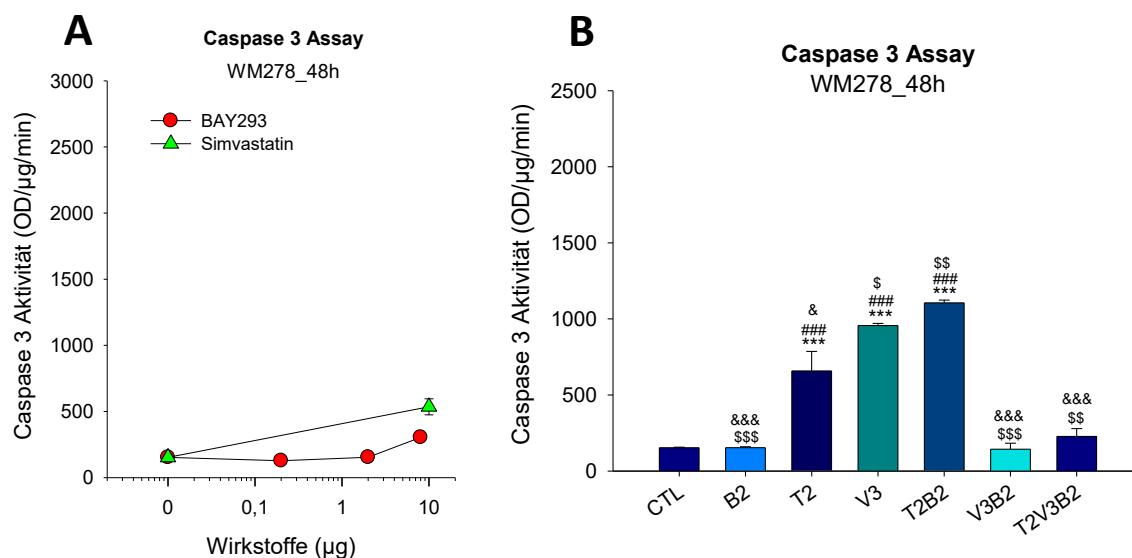


Abbildung 17: Einfluss der Wirkstoffe auf die Caspase 3 Aktivität von WM278 nach 48 Stunden
Inkubation

Die Zellen wurden zuvor mit BAY293 0,2µM/2µM/8µM und Simvastatin 10µM (Abb.17A) und BAY293 2µM, Trametinib 2µM Vemurafenib 3µM (Abb. 17B) behandelt und für 48 Stunden inkubiert. Jeweils 10µl Zelllysate wurde in einer 96-Well Platte zusammen mit 40µl Caspase LYSIS Puffer und anschließend im Dunkeln mit der Substratmischung (25µl Caspase Reaktions Puffer, 100 µM Substrat, 4mM DTT, Wasser) aufgetragen. Die Platte wurde mit Alufolie vollständig abgedeckt und für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde mit dem

Viktor3V Multilabel Plate Reader bei einer Anregungswellenlänge von 405nm und Emissionswellenlänge von 535nm gemessen und in Excel auf OD/μg/min umgerechnet. Die Werte sind in einem Kurvendiagramm (Abb. 17A) und als Säulendiagramm (Abb. 17B) dargestellt. Die Symbole und Fehlerbalken zeigen den Mittelwert mit $\pm$ S.D. (n= 2). Die statistische Signifikanz wurde mit One Way Anova/Bonferroni berechnet und ist gegenüber der Kontrolle (*: $p < 0,05$ / **: $p < 0,01$ /***: $p < 0,001$), BAY293 (#: $p < 0,05$ / ##: $p < 0,01$ / ###: $p < 0,001$), Trametinib (\$: $p < 0,05$ / \$\$: $p < 0,01$ / \$\$\$: $p < 0,001$) und Vemurafenib (&: $p < 0,05$ / &&: $p < 0,01$ / &&&: $p < 0,001$) gekennzeichnet.

6.3.1.2 Caspase 9 Assay

Da in den WM278 Zellen nach der Behandlung mit dem KRAS-SOS1 Inhibitor BAY293 keine erhöhte Caspase 3 Aktivität zu sehen war, wurde anschließend die Caspase 9 Aktivität untersucht. Die Ergebnisse des Assays zeigen, dass Simvastatin diese Caspaseaktivität gering erhöht (Abb. 18A). Es konnte keine signifikante Erhöhung in der Caspase Aktivität mit BAY293 sowie mit den anderen Inhibitoren des MAPK-Signalwegs beobachtet werden (Abb. 18B).

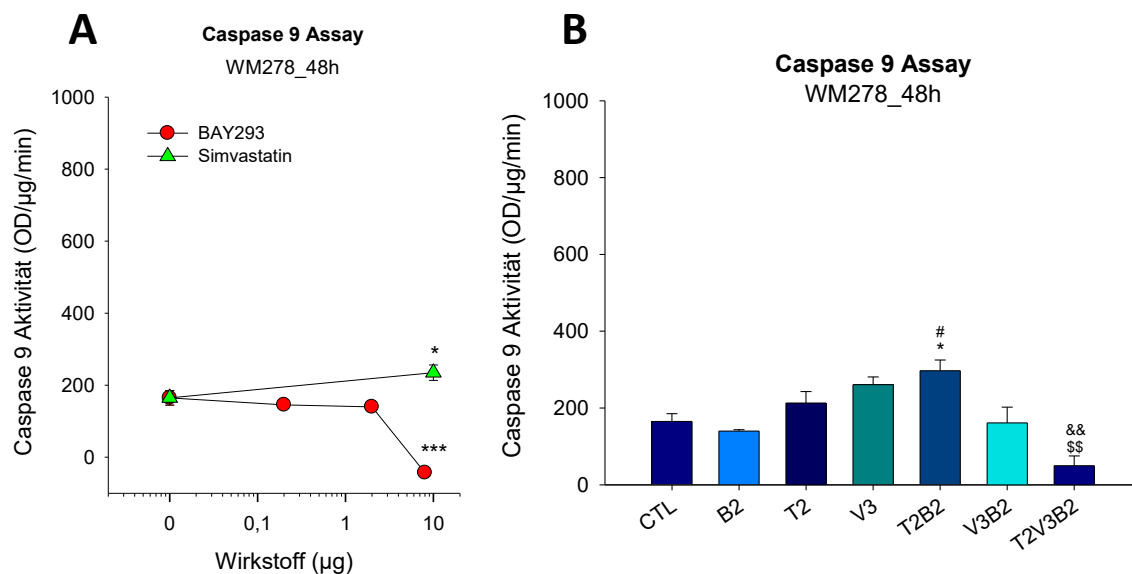


Abbildung 18: Einfluss der Wirkstoffe auf die Caspase 9 Aktivität von WM278 nach 48 Stunden Inkubation

Die Zellen wurden zuvor mit BAY293 0,2μM/2μM/8μM und Simvastatin 10μM (Abb.18A) und BAY293 2μM, Trametinib 2μM Vemurafenib 3μM (Abb. 18B) behandelt und für 48 Stunden inkubiert. Jeweils 10μl Zelllysats wurde in einer 96-Well Platte zusammen mit 40μl Caspase LYSIS Puffer und anschließend im Dunkeln mit der Substratmischung (25μl Caspase Reaktions Puffer, 100 μM Substrat, 4mM DTT, Wasser) aufgetragen. Die Platte wurde mit Alufolie vollständig abgedeckt und für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde mit dem Viktor3V Multilabel Plate Reader bei einer Anregungswellenlänge von 405nm und Emissionswellenlänge von

535nm gemessen und in Excel auf OD/ μ g/min umgerechnet. Die Werte sind in einem Kurvendiagramm (Abb. 18A) und als Säulendiagramm (Abb. 18B) dargestellt. Die Symbole und Fehlerbalken zeigen den Mittelwert mit $\pm$ S.D. (n= 2). Die statistische Signifikanz wurde mit One Way Anova/Bonferroni berechnet und ist gegenüber der Kontrolle (*: $p < 0,05$ / **: $p < 0,01$ /***: $p < 0,001$), BAY293 (#: $p < 0,05$ / ##: $p < 0,01$ / ###: $p < 0,001$), Trametinib (\$: $p < 0,05$ / \$\$: $p < 0,01$ / \$\$\$: $p < 0,001$) und Vemurafenib (&: $p < 0,05$ / &&: $p < 0,01$ / &&&: $p < 0,001$) gekennzeichnet.

6.3.2 WM35

6.3.2.1 Caspase 3 Assay

In Abb. 19A ist zu erkennen, dass Simvastatin nach 24 Stunden Caspase 3 weniger stimuliert als BAY293 8 μ M. Nach 48 Stunden (Abb. 19B) ändert sich dies und der Wert von Simvastatin liegt knapp über BAY293 8 μ M. Die Veränderungen in der Caspaseaktivität erreichen jedoch keine statistisch signifikante Erhöhung nach 48 Stunden. In der Graphik 19A ist zu sehen, dass BAY293 nur in der höchsten Konzentration eine Signifikanz von $p < 0,001$ erreicht.

BAY293 zeigt in der Konzentration von 2 μ M nach 24 und 48 Stunden keine signifikante Aktivität gegenüber der Kontrolle (Abb. 19C/D). Auffällig ist nach 24 Stunden (Abb. 19C) der Wert von Trametinib, der mit BAY293 kombiniert nochmal erhöht wird. Vemurafenib zeigt hingegen dazu nur eine geringere Erhöhung der Caspaseaktivität mit einer Signifikanz von $p < 0,01$. Mit BAY293 zusammen besteht kein zusätzlicher Effekt. Nach 48 Stunden (Abb. 19B) sinkt die Aktivität bei Trametinib und kombiniert mit BAY293.

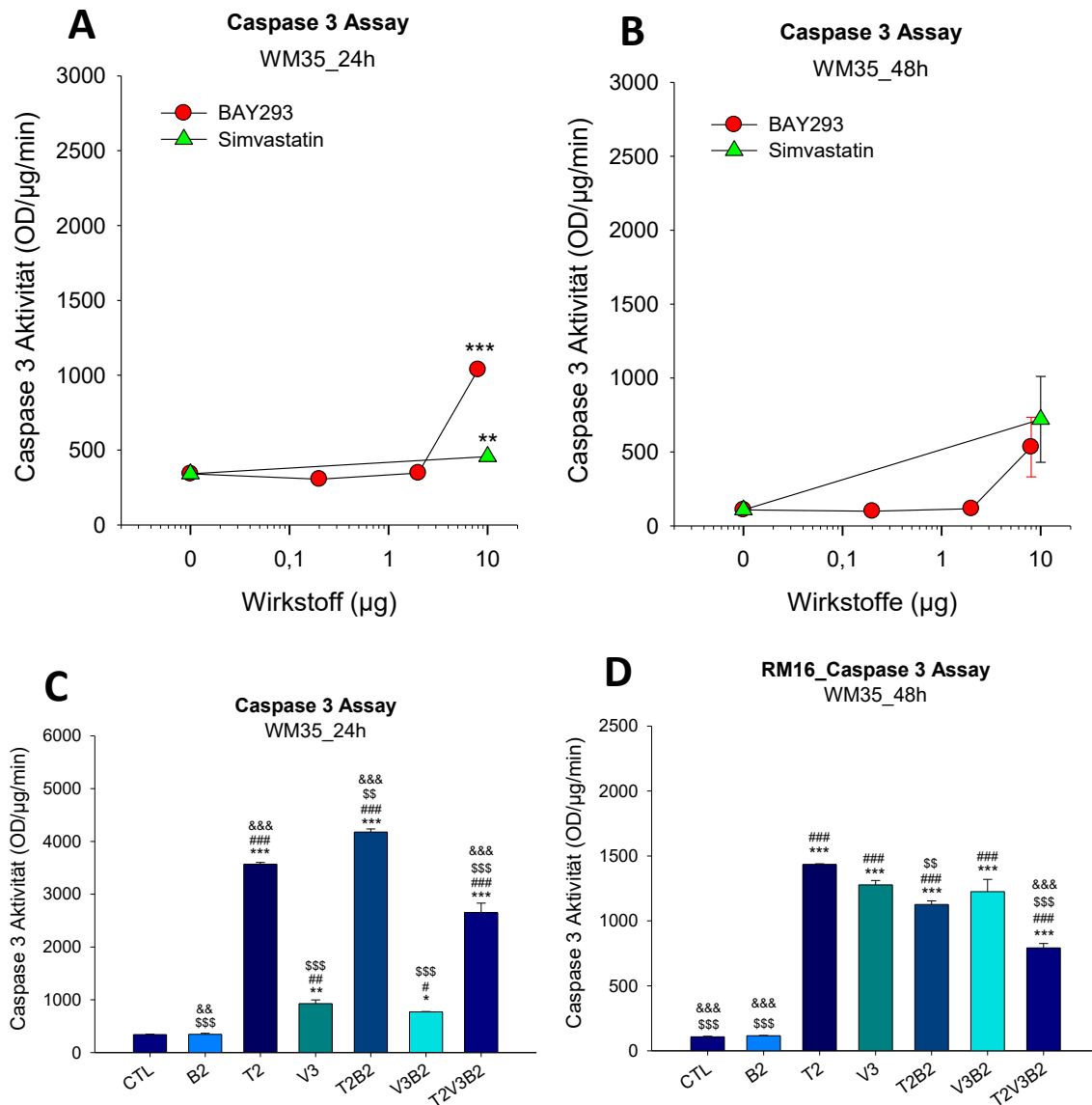


Abbildung 19: Einfluss der Wirkstoffe auf die Caspase 3 Aktivität in der Melanomzelllinie WM35 nach 24 und 48 Stunden Inkubation

Die Zellen wurden zuvor mit BAY293 0,2µM/2µM/8µM und Simvastatin 10µM (Abb. 19A/B) und BAY293 2µM, Trametinib 2µM Vemurafenib 3µM (Abb. 19C/D) behandelt und für 24 sowie 48 Stunden inkubiert. Jeweils 10µl Zelllysate wurde in einer 96-Well Platte zusammen mit 40µl Caspase LYSIS Puffer und anschließend im Dunkeln mit der Substratmischung (25µl Caspase Reaktions Puffer, 100 µM Substrat, 4mM DTT, Wasser) aufgetragen. Die Platte wurde mit Alufolie vollständig abgedeckt und für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde mit dem Viktor3V Multilabel Plate Reader bei einer Anregungswellenlänge von 405nm und Emissionswellenlänge von 535nm gemessen und in Excel auf OD/µg/min umgerechnet. Die Werte sind in einem Kurvendiagramm (Abb. 19A/B) und als Säulendiagramm (Abb. 19C/D) dargestellt. Die Symbole und Fehlerbalken zeigen den Mittelwert mit $\pm$ S.D. (n = 2). Die statistische Signifikanz wurde mit One Way Anova/Bonferroni berechnet und ist gegenüber der Kontrolle (*: $p < 0,05$ / **: $p < 0,01$ /***: $p < 0,001$), BAY293 (#: $p < 0,05$ / ##: $p < 0,01$ / ###: $p < 0,001$),

Trametinib (\$: $p < 0,05$ / \$\$: $p < 0,01$ / \$\$\$: $p < 0,001$) und Vemurafenib (&: $p < 0,05$ / &&: $p < 0,01$ / &&&: $p < 0,001$) gekennzeichnet.

6.3.2.2 Caspase 9 Assay

Ähnlich wie bei der Zelllinie WM278 ist auch bei den WM35 Zellen keine erhöhte Caspase 9 Aktivität erkennbar.

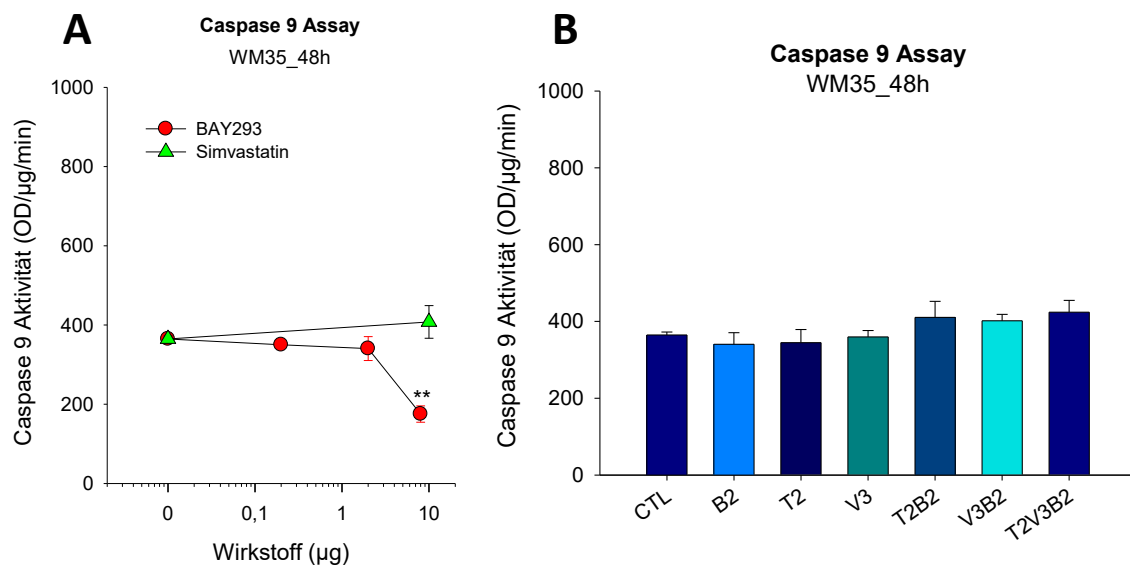


Abbildung 20: Einfluss der Wirkstoffe auf die Caspase 9 Aktivität von WM35 nach 48 Stunden Inkubation

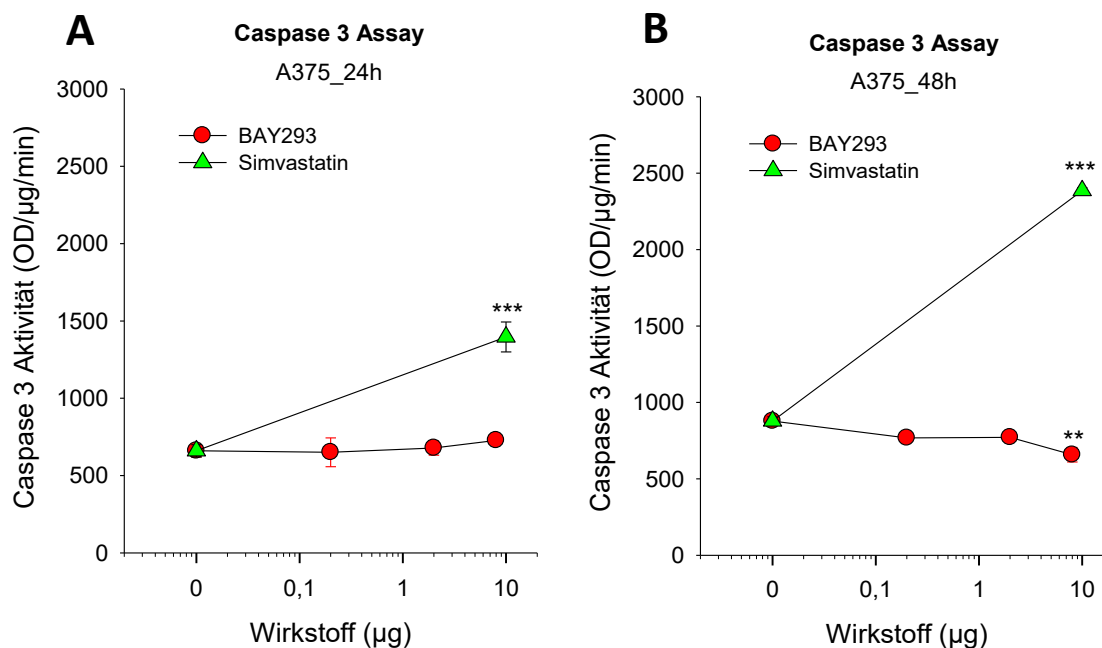
Die Zellen wurden zuvor mit BAY293 0,2µM/2µM/8µM und Simvastatin 10µM (Abb. 20A) und BAY293 2µM, Trametinib 2µM Vemurafenib 3µM (Abb. 20B) behandelt und für 48 Stunden inkubiert. Jeweils 10µl Zelllysate wurde in einer 96-Well Platte zusammen mit 40µl Caspase LYSIS Puffer und anschließend im Dunkeln mit der Substratmischung (25µl Caspase Reaktions Puffer, 100 µM Substrat, 4mM DTT, Wasser) aufgetragen. Die Platte wurde mit Alufolie vollständig abgedeckt und für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde mit dem Viktor3V Multilabel Plate Reader bei einer Anregungswellenlänge von 405nm und Emissionswellenlänge von 535nm gemessen und in Excel auf OD/µg/min umgerechnet. Die Werte sind in einem Kurvendiagramm (Abb. 20A) und als Säulendiagramm (Abb. 20B) dargestellt. Die Symbole und Fehlerbalken zeigen den Mittelwert mit $\pm$ S.D. (n= 2). Die statistische Signifikanz wurde mit One Way Anova/Bonferroni berechnet und ist gegenüber der Kontrolle (*: $p < 0,05$ / **: $p < 0,01$ /***: $p < 0,001$), BAY293 (#: $p < 0,05$ / ##: $p < 0,01$ / ###: $p < 0,001$), Trametinib (\$: $p < 0,05$ / \$\$: $p < 0,01$ / \$\$\$: $p < 0,001$) und Vemurafenib (&: $p < 0,05$ / &&: $p < 0,01$ / &&&: $p < 0,001$) gekennzeichnet.

6.3.3 A375

6.3.3.1 Caspase 3 Assay

Im Gegensatz zu den WM-Zellen ist in metastatischen A375 Zellen (Abbildung 21A) eine signifikante Caspaseaktivität mit der Positivkontrolle Simvastatin gegenüber dem Ausgangswert zu beobachten. Dieser Effekt wird nach 48 Stunden (Abb. 21B) nochmal deutlich verstärkt. BAY293 zeigt zu beiden Zeitpunkten in keiner Konzentration eine signifikante Erhöhung.

Bemerkenswert ist, dass die Behandlung mit Vemurafenib Caspase 3 am stärksten aktiviert und dieses Signal durch die zusätzliche Verabreichung von BAY293 oder Trametinib nicht weiter steigerbar ist (Abb. 21C). Trametinib zeigt zu keinen Zeitpunkten eine statistische Signifikanz zur Kontrolle (Abb. 21C/D). Die Dreifachkombination aus BAY293/Tram/Vem zeigt nach 24 Stunden eine Signifikanz gegenüber BAY293 und Trametinib ($p < 0,001$), liegt aber unter dem Wert von Vemurafenib.



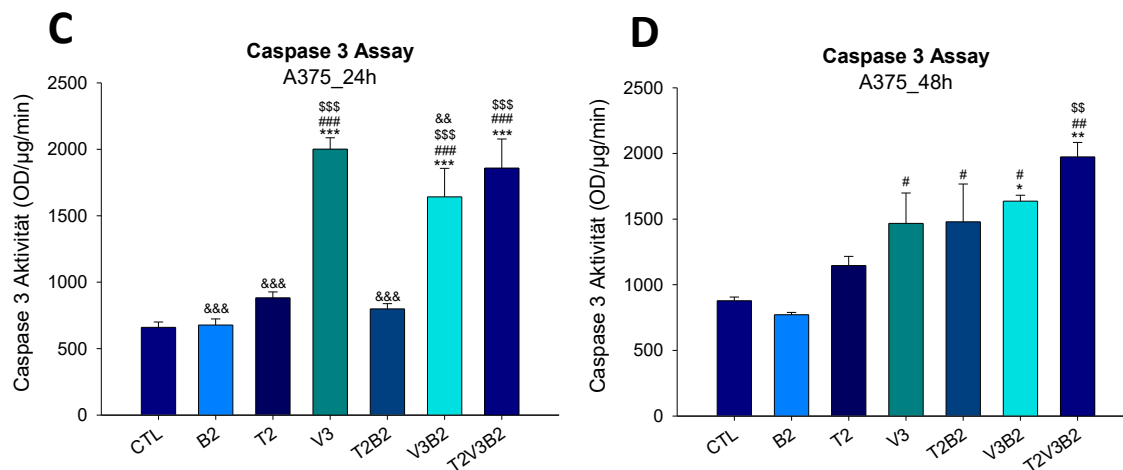


Abbildung 21: Einfluss der Wirkstoffe auf die Caspase 3 Aktivität in der Melanomzelllinie A375 nach 24 und 48 Stunden Inkubation

Die Zellen wurden zuvor mit BAY293 0,2μM/2μM/8μM und Simvastatin 10μM (Abb. 21A/B) und BAY293 2μM, Trametinib 2μM Vemurafenib 3μM (Abb. 21C/D) behandelt und für 24 sowie 48 Stunden inkubiert. Jeweils 10μl Zelllysate wurde in einer 96-Well Platte zusammen mit 40μl Caspase LYSIS Puffer und anschließend im Dunkeln mit der Substratmischung (25μl Caspase Reaktions Puffer, 100 μM Substrat, 4mM DTT, Wasser) aufgetragen. Die Platte wurde mit Alufolie vollständig abgedeckt und für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde mit dem Viktor3V Multilabel Plate Reader bei einer Anregungswellenlänge von 405nm und Emissionswellenlänge von 535nm gemessen und in Excel auf OD/μg/min umgerechnet. Die Werte sind in einem Kurvendiagramm (Abb. 21A/B) und als Säulendiagramm (Abb. 21C/D) dargestellt. Die Symbole und Fehlerbalken zeigen den Mittelwert mit $\pm$ S.D. (n= 2-4). Die statistische Signifikanz wurde mit One Way Anova/Bonferroni berechnet und ist gegenüber der Kontrolle (*: $p < 0,05$ / **: $p < 0,01$ /***: $p < 0,001$), BAY293 (#: $p < 0,05$ / ##: $p < 0,01$ / ###: $p < 0,001$), Trametinib (\$: $p < 0,05$ / \$\$: $p < 0,01$ / \$\$\$: $p < 0,001$) und Vemurafenib (&: $p < 0,05$ / &&: $p < 0,01$ / &&&: $p < 0,001$) gekennzeichnet.

6.3.3.2 Caspase 9 Assay

In Abbildung 22A ist zu erkennen, dass Simvastatin und BAY293 die basale Caspase 9 Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verringern. Dies ist auch bei den anderen Behandlungen im Graphen 22B zu beobachten. Der Grund für diese schwache Caspase Aktivität ist unklar.

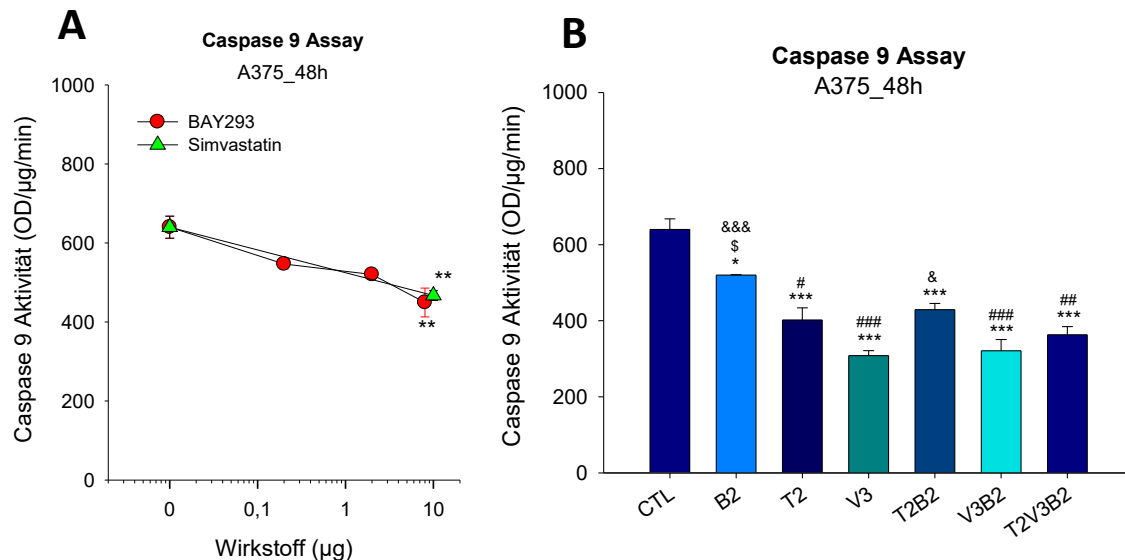


Abbildung 22: Einfluss der Wirkstoffe auf die Caspase 9 Aktivität von A378 nach 48 Stunden Inkubation

Die Zellen wurden zuvor mit BAY293 0,2µM/2µM/8µM und Simvastatin 10µM (Abb. 22A) und BAY293 2µM, Trametinib 2µM Vemurafenib 3µM (Abb. 22B) behandelt und für 48 Stunden inkubiert. Jeweils 10µl Zelllysate wurde in einer 96-Well Platte zusammen mit 40µl Caspase LYSIS Puffer und anschließend im Dunkeln mit der Substratmischung (25µl Caspase Reaktions Puffer, 100 µM Substrat, 4mM DTT, Wasser) aufgetragen. Die Platte wurde mit Alufolie vollständig abgedeckt und für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde mit dem Viktor3V Multilabel Plate Reader bei einer Anregungswellenlänge von 405nm und Emissionswellenlänge von 535nm gemessen und in Excel auf OD/µg/min umgerechnet. Die Werte sind in einem Kurvendiagramm (Abb. 22A) und als Säulendiagramm (Abb. 22B) dargestellt. Die Symbole und Fehlerbalken zeigen den Mittelwert mit $\pm$ S.D. (n= 2). Die statistische Signifikanz wurde mit One Way Anova/Bonferroni berechnet und ist gegenüber der Kontrolle (*: p < 0,05/ **: p < 0,01/***: p < 0,001), BAY293 (#: p < 0,05/ ##: p < 0,01/ ###: p < 0,001), Trametinib (\$: p < 0,05/ \$\$: p < 0,01/ \$\$\$: p < 0,001) und Vemurafenib (&: p < 0,05/ &&: p < 0,01/ &&&: p < 0,001) gekennzeichnet.

6.3.4 518a2

6.3.4.1 Caspase 3 Assay

In der Melanomzelllinie 518a2 zeigt Simvastatin nach 24 Stunden (Abb. 23A) eine signifikant erhöhte Caspaseaktivität an. Die Behandlung mit BAY293 hingegen führt zu keiner Erhöhung. Nach 48 Stunden (Abb. 23B) sinkt das Signal von Simvastatin sehr stark ab und wird sogar kleiner als das von der Kontrolle, wie auch der Wert von BAY293. BAY293 ist aber nicht in der Lage in 518a2 Melanomzellen die Caspase 3 zu aktivieren. So ist es auch nicht weiter verwunderlich, dass die Zweifach- und Dreifachbehandlungen mit Trametinib und

Vemurafenib (Abbildung 23C) durch BAY293 nicht signifikant gesteigert werden können. Wie auch schon in Abbildung 23B gezeigt, sind die 48h Werte der Caspase 3 Aktivität gegenüber der Kontrolle quasi unverändert. Dies könnte damit zu tun haben, dass auch die Caspase 3 im zeitlichen Verlauf der Apoptose zerstört wird (Abb. 23D).

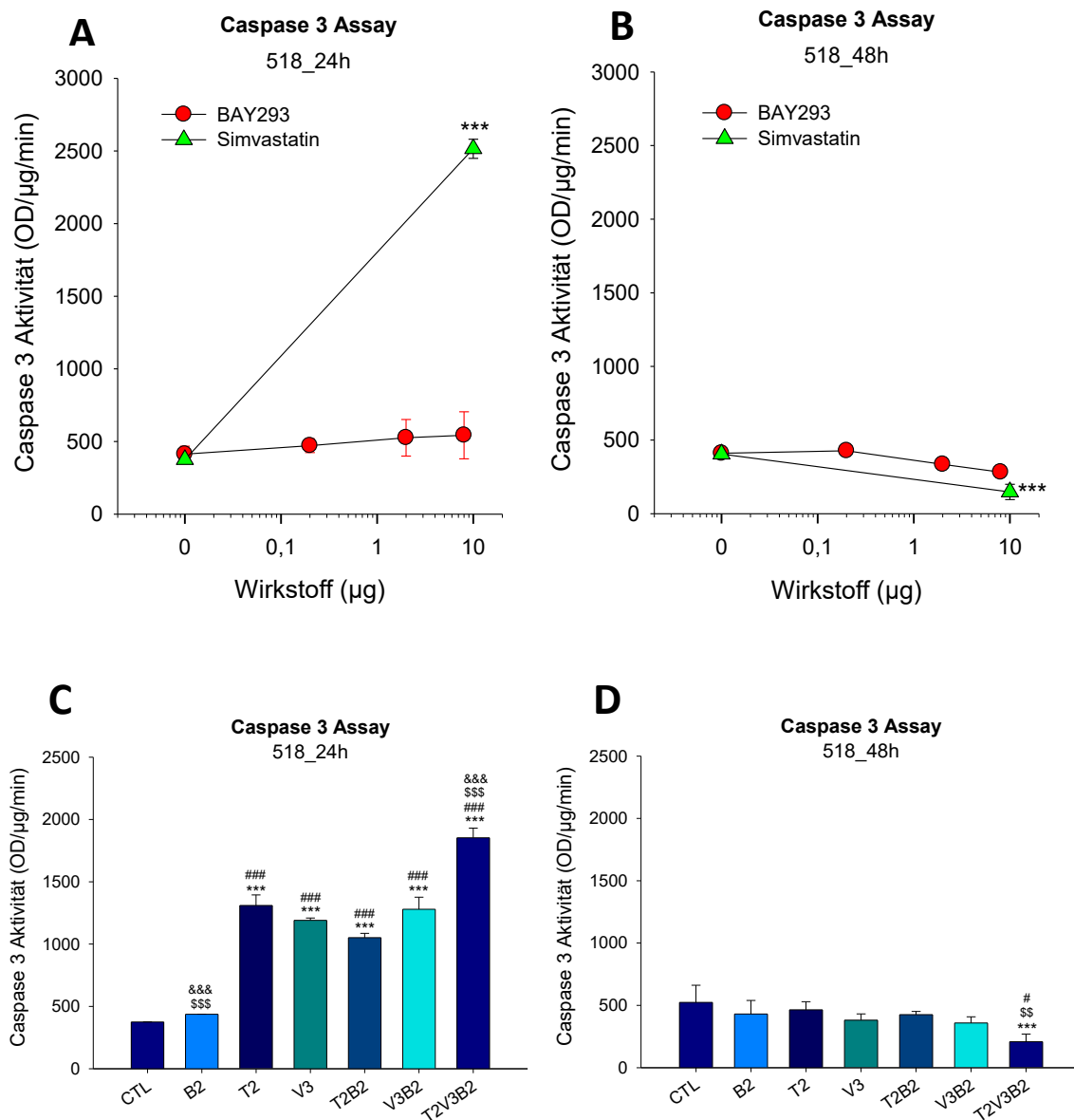


Abbildung 23: Einfluss der Wirkstoffe auf die Caspase 3 Aktivität in der Melanomzelllinie 518a2 nach 24 und 48 Stunden Inkubation

Die Zellen wurden zuvor mit BAY293 0,2µM/2µM/8µM und Simvastatin 10µM (Abb. 23A/B) und BAY293 2µM, Trametinib 2µM Vemurafenib 3µM (Abb. 23C/D) behandelt und für 24 und 48 Stunden inkubiert. Jeweils 10µl Zelllysate wurde in einer 96-Well Platte zusammen mit 40µl Caspase LYSIS Puffer und anschließend im Dunkeln mit der Substratmischung (25µl Caspase Reaktions Puffer, 100 µM Substrat, 4mM DTT, Wasser) aufgetragen. Die

Platte wurde mit Alufolie vollständig abgedeckt und für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde mit dem Viktor3V Multilabel Plate Reader bei einer Anregungswellenlänge von 405nm und Emissionswellenlänge von 535nm gemessen und in Excel auf OD/μg/min umgerechnet. Die Werte sind in einem Kurvendiagramm (Abb. 23A/B) und als Säulendiagramm (Abb. 23C/D) dargestellt. Die Symbole und Fehlerbalken zeigen den Mittelwert mit ± S.D. (n= 2). Die statistische Signifikanz wurde mit One Way Anova/Bonferroni berechnet und ist gegenüber der Kontrolle (*: p < 0,05/ **: p < 0,01/***: p < 0,001), BAY293 (#: p < 0,05/ ##: p < 0,01/ ###: p < 0,001), Trametinib (§: p < 0,05/ §§: p < 0,01/ §§§: p < 0,001) und Vemurafenib (&: p < 0,05/ &&: p < 0,01/ &&&: p < 0,001) gekennzeichnet.

6.3.4.2 Caspase 9 Assay

In der Zelllinie 518a2 ist genauso wie in den anderen Melanomzellen keine Caspase 9 Aktivität zu beobachten. Besonders auffällig in Abbildung 24A ist die erhöhte Hemmung der basalen Caspase 9 Aktivität durch Simvastatin. Die Ursache dafür könnte eine erhöhte Sterberate der 518a2 Zellen sein und die damit verbundene, bereits proteolytisch zerstörte Caspase 9 sein. Auch keine der anderen Substanzen oder Substanzkombinationen war in der Lage Caspase 9 nach 48 Stunden zu aktivieren.

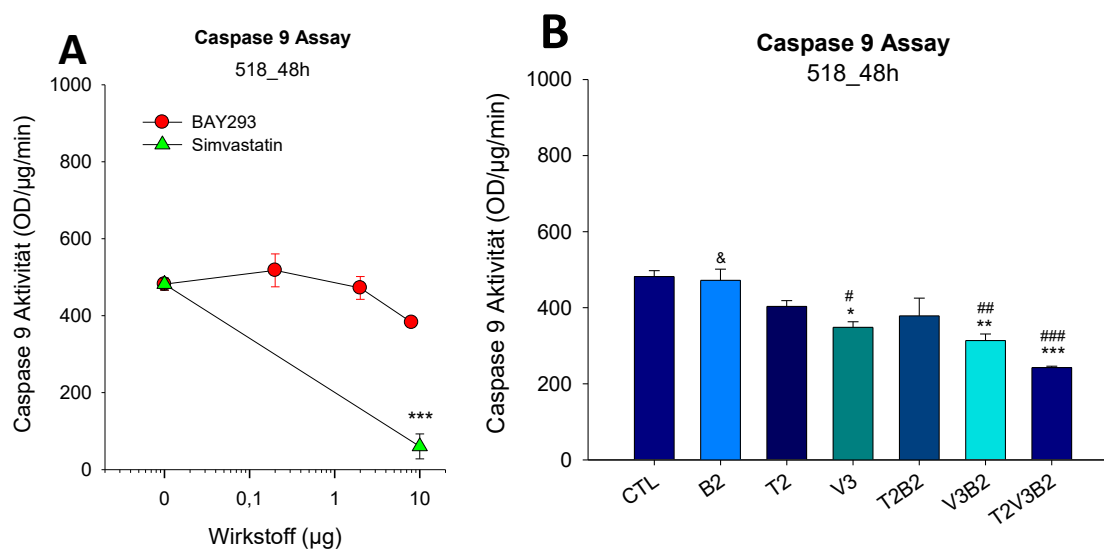


Abbildung 24: Einfluss der Wirkstoffe auf die Caspase 9 Aktivität von A378 nach 48 Stunden Inkubation

Die Zellen wurden zuvor mit BAY293 0,2μM/2μM/8μM und Simvastatin 10μM (Abb. 24A) und BAY293 2μM, Trametinib 2μM Vemurafenib 3μM (Abb. 24B) behandelt und für 48 Stunden inkubiert. Jeweils 10μl Zelllysate wurde in einer 96-Well Platte zusammen mit 40μl Caspase LYSIS Puffer und anschließend im Dunkeln mit der Substratmischung (25μl Caspase Reaktions Puffer, 100 μM Substrat, 4mM DTT, Wasser) aufgetragen. Die Platte

wurde mit Alufolie vollständig abgedeckt und für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde mit dem Viktor3V Multilabel Plate Reader bei einer Anregungswellenlänge von 405nm und Emissionswellenlänge von 535nm gemessen und in Excel auf OD/μg/min umgerechnet. Die Werte sind in einem Kurvendiagramm (24A) und als Säulendiagramm (24B) dargestellt. Die Symbole und Fehlerbalken zeigen den Mittelwert mit $\pm$ S.D. (n= 2). Die statistische Signifikanz wurde mit One Way Anova/Bonferroni berechnet und ist gegenüber der Kontrolle (*: $p < 0,05$ / **: $p < 0,01$ /***: $p < 0,001$), BAY293 (#: $p < 0,05$ / ##: $p < 0,01$ / ###: $p < 0,001$), Trametinib (\$: $p < 0,05$ / \$\$: $p < 0,01$ / \$\$\$: $p < 0,001$) und Vemurafenib (&: $p < 0,05$ / &&: $p < 0,01$ / &&&: $p < 0,001$) gekennzeichnet.

7 Diskussion

Fünf verschiedene Zelllinien des Melanoms wurden mit dem neuen KRAS-SOS1 Inhibitor BAY293 behandelt. Ziel der Arbeit war es, herauszufinden, ob ein Unterschied zwischen den metastasierten Zellen und jenen aus dem radialen sowie vertikalen Wachstum in der BAY293 beeinflussten Viabilität und Zellmigration besteht. Die Zelllinien wurden hierbei mit unterschiedlichen Konzentrationen des Wirkstoffes über drei verschiedene Zeitpunkte (24h, 48h, 72h) untersucht. Zusätzlich wurde der MEK-Inhibitor Trametinib und BRAF-Inhibitor Vemurafenib sowohl einzeln auch in Kombinationen mit BAY293 eingesetzt. Die Frage, ob diese Wirkstoffe in der Kombination mit BAY293 einen zusätzlichen Effekt zeigen, wurde näher beleuchtet. Mittels Caspase Assays wurde die Aktivität der Apoptose analysiert.

7.1 Auswirkungen von BAY293 auf die Viabilität der verschiedenen Zelllinien

7.1.1 BAY293 zeigt in allen Zelllinien eine konzentrationsabhängige Wirkung

Bei der höchsten Konzentration von 8 μM BAY293 tritt in allen Zelllinien der verschiedenen Stadien eine deutliche Reduktion der Viabilität mit einer Signifikanz von $p < 0,001$ auf. In Konzentrationen von 0,3-2,7 μM zeigte sich in keiner der Zelllinien ein signifikanter Unterschied in der Viabilität in den Konzentrations-Wirkungskurven. Dennoch ist eine Tendenz erkennbar, dass über verlängerte Inkubationszeiten die Viabilität abnimmt (24- 72h). Interessant ist auch, dass zwischen der Konzentration von 2,7 μM und 8 μM ein steiler Abfall der Viabilität stattfindet. In den Kombinationsexperimenten aber zeigte bereits 1 μM BAY293 eine signifikante Hemmung der Viabilität.

BAY293 blockiert die Wechselwirkung zwischen KRAS und SOS1, das in eine Hemmung des nachgeschalteten Signalwegs führt. Bislang wurde der Wirkstoff in verschiedenen Zelllinien unter anderem des Lungenkrebses, Gebärmutterhalskrebs und der chronischen myeloischen Leukämie untersucht. Die Resultate zeigen eine Korrelation zwischen der Inhibition der KRAS-SOS1 Interaktion und Reduktion der ERK-Phosphorylierung (Hillig et al., 2019). Kollegin Nadine Szorger untersuchte in ihrer Masterarbeit die Auswirkung von BAY293 auf die Aktivität der nachgeschalteten MAP-Kinase (ERK1/2), JAK/Stat3, p38 und PI3K/AKT Signalkaskaden. Die Ergebnisse ihrer Arbeit zeigten, dass die Phosphorylierung von ERK 1/2 in allen Zelllinien in niedrigen Konzentrationen (0,2 μM /0,8 μM / 2 μM) nach 24h Stunden bereits gehemmt wird.

In der höchsten Konzentration (8 μ M) kommt es zu einer positiven Stimulierung der ERK-Phosphorylierung in den WM35 und WM278 Zelllinien (Szorger, 2023). Die Resultate meiner Auswertungen des MTT-Assays zeigen jedoch bei 24h Stunden in den niedrigeren Konzentrationen des Wirkstoffes keine signifikante Reduktion in der Viabilität in allen Melanomzelllinien. Interessant ist, dass die ERK-Phosphorylierung bei den WM-Zelllinien nach Behandlung mit BAY293 bei 24 Stunden erhöht ist. Durch die Blockierung der Interaktion von SOS1 und KRAS, sollte eine weitere Aktivierung des nachgeschalteten Signalweges und somit die Aktivierung von ERK1/2, die die Zellproliferation stimuliert, verhindert werden (Hillig et al., 2019). In meinen Auswertungen findet jedoch eine signifikante Hemmung der Viabilität in den WM- Zellen bei 8 μ M statt (Abb. 5 und 7). Damit könnte ein bisher noch nicht identifizierter Signalweg für diese paradoxen gegenläufigen Effekte verantwortlich sein.

7.1.2 Zeitabhängige Effekte von BAY293 in WM278

Die Reduktion der Viabilität bei der Konzentration von 8 μ M BAY293 ändert sich bei den WM35, A375 und 518a2 Zellen über die Zeit (24h-72h) nur sehr gering. Besonders auffällig ist der Unterschied der Viabilität bei WM278 zwischen 24 und 48 Stunden (Abb. 5). Nach 48h tritt eine drastische Senkung der Anzahl lebender Zellen auf. Nach 72h findet eine weitere geringe Reduktion der Viabilität statt. Aus diesem Grund besteht ein zeitabhängiger Effekt von 8 μ M BAY293 in der WM278 Zelllinie.

7.1.3 Zeit- und konzentrationsabhängige Effekte von Trametinib im Vergleich zu BAY293

Der Wirkstoff Trametinib ist ein MEK1/2 Inhibitor und besitzt hemmende Wirkungen auf die Zellproliferation (Gilmartin et al., 2011). Im Gegensatz zu BAY293 zeigt Trametinib auch in den niedrigen Konzentrationen eine hemmende Wirkung auf die Viabilität. In den WM278 Zellen (Abb. 5) ist ein deutlicher Unterschied in der Zellviabilität zwischen 24 und 48 Stunden zu erkennen. Während nach 24h nur die höchste Konzentration eine signifikante Reduktion der Zellen erreicht, sterben nach 48 Stunden schon bei der niedrigsten Konzentration von Trametinib mehr als 50% der Zellen. Nach 72h Stunden zeigen alle Konzentrationen eine hoch signifikante Reduktion der Viabilitätswerte ($p < 0,001$). In den WM35 Zellen (Abb. 7) ist ein ähnlicher Effekt zu beobachten, wobei hier nach 24h Stunden eine höhere Reduktion der lebenden Zellen ersichtlich ist. In den metastasierenden Zellen A375 (Abb. 9) zeigen die

Konzentrationen von 0,1-1 μM im Vergleich zu den „early stage“ Zellen eine etwas geringere Hemmung nach 48 und 72 Stunden. Dennoch ist der Trametinib-Effekt eindeutig zeitabhängig und auch konzentrationsabhängig. Somit kann Trametinib die Viabilität wesentlich effizienter hemmen als BAY293.

In der Studie von Gilmartin et al. wurden Proliferationsversuche an Melanom-Zelllinien mit Trametinib durchgeführt. Die Zelllinie SK-MEL-28 wies eine BRAF^{V600E} und die A549 Zelllinie eine KRAS^{G13D} Mutation auf. Bei der SK-MEL-28 Zellen trat nach 24 Stunden ein minimaler Effekt auf die Zellproliferation ein, wohingegen nach 48 und 72 Stunden eine deutliche Reduktion auftrat. In der Zelllinie A549 kam es erst nach 72 Stunden zu einer starken Abnahme der Zellzahl. Damit bestätigen die Ergebnisse der Studie einen zeitabhängigen Effekt von Trametinib auf die Hemmung von Melanom – Zellproliferation, ähnlich wie ich es beobachtet habe (Gilmartin et al., 2011).

Der MEK1/2 Inhibitor Trametinib ist in den 518a2 Zellen (Abb. 11) weniger wirksam im Vergleich zu den anderen von mir untersuchten Zelllinien. Obwohl der Inhibitor in niedriger Konzentration in den WM-Melanomzelllinien sowie in den A375 Zellen (Abb. 9) eine signifikante Effektivität zeigt, erreichen bei der 518a2 Zellen (Abb. 11) die niedrigen Konzentrationen über alle Zeitpunkte keine hemmende Wirkung. Der Kurvenverlauf von Trametinib ist dem von BAY293 sehr ähnlich. Nach 72h sinkt die Anzahl an lebenden Zellen bei 3 μM Trametinib fast genauso stark, wie bei 8 μM BAY293.

7.1.4 Stadienabhängige Unterschiede von BAY293

In allen untersuchten MTT-Assays zeigte BAY293 in der Konzentration von 8 μM eine signifikante Reduktion der lebenden Zellen. Das Ausmaß dieser Reduktion in der Zellviabilität unterscheidet sich in den Zellen des Frühwachstums im Vergleich zu den metastasierenden Melanomzellen. In den WM-Zelllinien sterben, mit Ausnahme der WM278 Zellen (Abb. 5) bei 24h Stunden, zu allen Zeitpunkten mehr als 50% der Melanomzellen bei der Konzentration von 8 μM BAY293. In den A375 (Abb. 9) und 518a2 (Abb. 11) tritt auch nach 72h kein Rückgang der Zellviabilität über 50% statt. Die Ergebnisse meiner Analysen zeigen, dass die „early stage“ Melanomzellen eine viel höhere Empfindlichkeit gegenüber einer hohen Konzentration des KRAS-SOS1 Inhibitors zeigen als die metastasierenden Melanomzellen.

7.1.5 BAY293 in Kombi mit anderen MAPK-Inhibitoren

In der Therapie des Melanoms werden die Inhibitoren des MAPK-Signalweges in Kombinationen eingesetzt. Laut einer Metaanalyse von 16 randomisierten Studien zeigt eine Kombinationstherapie von einem BRAF- und MEK-Inhibitor ein höheres Gesamtüberleben als die Monotherapie mit einem der Wirkstoffe (Ascierto, Marincola, & Atkins, 2015). Somit stellt sich die Frage, ob auch BAY293 in der Kombination mit anderen MAPK-Inhibitoren einen Vorteil bietet und eine zusätzliche Wirkung zeigt.

7.1.5.1 BAY293 in Kombination mit Trametinib

Die Melanomzellen wurden mit den drei Wirkstoffen (BAY293 1 μ M/ Trametinib 2 μ M/Vemurafenib 1 μ M) sowohl einzeln als auch in einer Zweifach- sowie Dreifachkombination behandelt. Die Ergebnisse der MTT-Assays zeigen in den WM35 und A375 Zellen (Abb. 8 und 10) nach 24h bei der Behandlung in der Kombination von BAY293 mit Trametinib eine deutliche Senkung der Viabilität im Vergleich zu Trametinib in der Einzelbehandlung ($p < 0,001$). Nach 48h und 72h wird der Unterschied zwischen der Wirkung der Zweifachkombination und der von Trametinib allein in WM35 geringer. In der 518a2 (Abb. 12) Zelllinie hat diese Zweifachkombination bei 24 und 48 Stunden und bei WM278 (Abb. 6) nach 24h eine bessere Effektivität als die Einzelbehandlung mit Trametinib, schwächt sich aber nach 72h ab. Die Resultate zeigen einen zeitabhängigen additiven Effekt der Kombination von BAY293 und Trametinib. Nach 24 Stunden tritt ein additiver Effekt der Zweifachkombination auf, dessen Wirkung aber in den meisten Zelllinien nach 72h keinen signifikanten Unterschied zur hemmenden Wirkung von Trametinib in der Einzelbehandlung zeigt. Im Vergleich zur BAY293 in der Einzelbehandlung erzielt die Kombination mit Trametinib in allen Zellen, außer den 518a2, zu allen Zeitpunkten eine höhere Absterberate der Melanomzellen.

In der Studie „Cytotoxicity of combinations of the pan-KRAS SOS1 inhibitor BAY293 against pancreatic cancer cell lines“ wurde BAY293 in Kombination mit verschiedenen Wirkstoffen, unter anderem mit Trametinib in Pankreaszellen (MIA PaCa-2, AsPC1, BxPC3) untersucht. Dabei zeigt Trametinib mit dem KRAS-SOS1 Inhibitor BAY293 synergistische Effekte in BxPC3 und AsPC-1 und additive Wirkungen auf die MIA PaCa-2 Zelllinie (Plangger et al., 2022). Des Weiteren wurde BAY293 in Kombination mit Trametinib in nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC) Zellen untersucht. Die Ergebnisse zeigen einen synergistischen Effekt der Inhibitoren in den Osimertinib-resistenten primären NSCLC-Zellen (Plangger et al., 2021).

7.1.5.2 BAY293 in Kombination mit Vemurafenib

Vemurafenib hemmt den ERK-Signalweg und somit die Proliferation selektiv in Melanomzellen mit einer BRAF^{V600E} Mutation (Joseph et al., 2010). Der BRAF-Inhibitor ist in der Kombination mit BAY293 zu allen drei Zeitpunkten in allen Zelllinien, ausgenommen WM278 (Abb. 6), wirksamer als der KRAS-SOS1 Inhibitor allein. Diese Wirkung erreicht vor allem bei den WM35 (Abb. 8) eine hohe statistische Signifikanz. Die Kombination hat im Vergleich zu Vemurafenib in der Einzelbehandlung bei 24h einen höheren hemmenden Effekt. Dieser Unterschied in der Wirksamkeit wird aber in den A375 und WM35 (Abb. 10 und 8) Zellen nach 72h immer kleiner.

7.1.5.3 BAY293 in der Dreifachkombination

Die Dreifachkombination erzielt nur bei den 518a2 (Abb. 12) Zellen zu allen Zeitpunkten einen signifikant verbesserten Effekt im Gegensatz zu den anderen Behandlungen. In den A375 und WM35 Melanomzelllinien (Abb. 10 und 8) zeigt sie ähnliche Ergebnisse wie Trametinib allein. Die geringste Wirksamkeit der Dreifachkombination ist in den WM278 Zellen (Abb. 6) zu beobachten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Kombinationen von BAY293 mit dem MEK- oder BRAF-Inhibitor in fast allen Zelllinien wirksamer ist als BAY293 allein, aber zeitabhängig im Vergleich zu Trametinib oder Vemurafenib in der Einzelbehandlung. Die Dreifachbehandlung hat nur in 518a2 die höchste Wirkung im Vergleich zu den anderen Behandlungen, wobei Trametinib in den 518a2 Zellen eine ähnliche Wirkung zeigt wie BAY293.

7.2 Migration

Die Zellmigration ist ein wichtiger physiologischer Prozess in der Entwicklung und Homöostase, die aber auch eine Rolle bei der Entstehung und Verlauf von Krankheiten spielt. Sie kann dazu führen, dass Tumorzellen durch den Blutkreislauf an andere Orte des Körpers siedeln und Metastasen bilden. Der Wundheilungstest dient der Untersuchung der Zellmigration in vitro (Rodriguez, Wu, & Guan, 2005).

7.2.1 BAY293 zeigt einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Zellmigration

Die Kontrolle, die mit keinem Wirkstoff behandelt wurde, erreicht in den metastasierenden Zellen (Abb. 15 und 16) nach 48 Stunden einen fast vollständigen Wundverschluss. In den WM35 Zellen (Abb. 14) wird die Wundfläche nach 54 Stunden ungefähr bis zu 90% geschlossen. Besonders auffällig sind die WM278 Zellen (Abb. 13), die nach 54 Stunden nur einen 50% Verschluss erreichen. Die WM278 Zelllinie ist durch eine sehr langsame Proliferation gekennzeichnet, was ein Grund für die langsame Wundheilung sein könnte.

Die Ergebnisse des Woundhealing Assays zeigen, dass BAY293 in der Konzentration von 8 μM in fast allen Zelllinien, ausgenommen den A378 (Abb. 15), zu einem Ausbleiben des Wundverschlusses führt. Auffällig war, dass die WM35 Zellen bei dieser Konzentration an BAY293 schon nach 24 Stunden abgelöst im Medium geschwommen sind, sodass keine weiteren Auswertungen des „Wundschlusses“ mehr möglich waren, da die ursprüngliche Wundfläche nicht mehr zu erkennen war. Die Wundheilung verläuft in den metastatischen Zellen in den niedrigen Konzentrationen von BAY293 ähnlich zur Kontrolle. Mit 2 μM BAY293 findet in den WM278 Zellen nach 54 Stunden eine Wundheilung von ca. 20% statt.

7.2.2 BAY293 in Kombination mit anderen Wirkstoffen

Vemurafenib in Kombination mit BAY293 sowie die Dreierkombination mit Trametinib zeigen in allen Zelllinien nach 48 Stunden eine signifikante Hemmung der Zellmigration. Trametinib erzielt in der Einzelbehandlung ähnliche Ergebnisse wie in der Kombination mit BAY293. Die Wirkung des MEK-Inhibitors ist schwächer ausgeprägt als Vemurafenib in der Wundheilung.

7.3 Apoptose

Die Melanomzellen wurden auf eine erhöhte Apoptose Aktivität untersucht, um herauszufinden, ob eine Korrelation zwischen der Reduktion der Viabilität und einem kontrollierten Zelltod besteht. Für den Nachweis der Apoptose wurde der Caspase Assay herangezogen. Zunächst wurde die Caspase 3 Aktivität gemessen. Sie ist eine Effektorcaspase, die nach Aktivierung wichtige zelluläre Proteine zerlegt (Nicholson & Thornberry, 1997). Simvastatin wurde im Assay als Kontrollwert ausgewählt. In vorhergehenden Arbeiten konnte eine erhöhte Caspase 3 und 9 Aktivität nach 48 Stunden mit der Behandlung von 10 μM

Simvastatin in den A375 und 518a2 Melanomzellen festgestellt werden (Minichsdorfer & Hohenegger, 2009). Daher wurde Simvastatin als Positivkontrolle für die Induktion von Apoptose verwendet.

Die Auswertung der Caspase 3 Assays in meiner Arbeit zeigen in der A375 Zelllinie bei 24h und 48 h sowie in den 518a2 Zellen (Abb. 21 und 23) bei 24h signifikant erhöhte Caspase aktivitätswerte mit 10 μ M Simvastatin. In den Zellen des Frühwachstums konnte keine Caspase Aktivität des Statins mit einer statistischen Signifikanz beobachtet werden, was insbesondere für Inkubationszeiten bis 24h schon gezeigt wurde (Minichsdorfer & Hohenegger, 2009). Bei der Behandlung mit BAY293 in verschiedenen Konzentrationen zeigte keiner der Assays eine hohe Caspase Aktivität, bis auf die WM35 Zellen (Abb. 19) mit BAY293 in der höchsten Konzentration nach 24 Stunden. Da aber hier der Simvastatin Wert sehr niedrig ist, ist die Aussagekraft dieses Assays gering und bedarf noch weiteren Untersuchungen. Im nächsten Schritt wurde die Aktivität der Caspase 9 untersucht. Die Resultate zeigen in keiner Zelllinie einen statistisch erhöhten Wert der Caspase 9 nach der Behandlung mit dem KRAS-SOS1 Inhibitor.

Der MEK-Inhibitor U0126 führte in einer Studie zu einer Induktion der Apoptose in Melanomzellen. Es wird vermutet, dass der kontrollierte Zelltod nicht durch die Aktivierung der Caspasen, sondern viel mehr durch die Freisetzung vom proapoptotischen AIF-Protein induziert wird (Wang et al., 2007). In meiner Arbeit wurde das proapoptotische Protein AIF nicht untersucht.

BAY293 wurde in einer Studie zum dukalen Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass der KRAS-SOS1 Inhibitor die Apoptose in MIA-PaCA-2-Zellen auf der einen Seite fördert und in den PANC-1 Zellen zu keiner erhöhten Apoptose Aktivität führte. Dies deutet darauf hin, dass die KRAS-SOS1 Interaktionsinhibition von BAY293 in unterschiedlichen Zellen unterschiedliche Auswirkungen haben kann (Wang et al., 2022).

Zusätzlich zum KRAS-SOS1 Inhibitor wurden die Melanomzellen in meiner Arbeit auch mit Trametinib (2 μ M) und Vemurafenib (3 μ M) einzeln sowie in Kombinationen behandelt. In den A375 Zellen bei 48h und 518a2 Melanomzellen bei 24h lösten Trametinib und Vemurafenib signifikant erhöhte Caspaseaktivitätswerte auf. Die Caspase 3 Aktivität wurde durch die Dreifachkombination am höchsten aktiviert. Die WM35 Zellen zeigten ebenso erhöhte

Aktivitäten mit dem MEK- und BRAF-Inhibitor nach 48h. In den WM278 Zellen waren die Werte von Trametinib, Vemurafenib und Trametinib in Kombination mit BAY293 erhöht.

In der 518a2 Zelllinie konnte nach 48h (Abb. 23) eine Verringerung der Caspase 3 Aktivität mit Simvastatin sowie mit den MAPK-Inhibitoren beobachtet werden. Dieses Vorkommnis wurde auch in der Arbeit meiner Kollegin Magdalena Grömer beschrieben. Sie behandelte die 518a2 Melanomzellen mit Simvastatin und Vemurafenib. Nach zwei Experimenten mit denselben Bedingungen konnte keine Aktivität der Caspase 3 und 9 gemessen werden. Es wird vermutet, dass die 518a2 Zellen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber den verwendeten Wirkstoffen besitzen, sodass nach 48 Stunden keine funktionsfähige Caspasen vorhanden waren (Grömer, 2021).

7.4 Konklusion

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass BAY293 in der Konzentration ab 1 μ M zu einer signifikanten Reduktion der Viabilität in den untersuchten Melanomzellen führen kann. In den niedrigeren Konzentrationen konnte mit dem KRAS-SOS1 Inhibitor keine konsistente Verringerung der Zellviabilität beobachtet werden. Die WM-Zelllinien der frühen Melanomwachstumsphase besitzen hierbei eine höhere Empfindlichkeit gegenüber BAY293 im Vergleich zu den metastatischen Zellen. Damit verhält sich BAY293 entgegengesetzt zu dem Statin Simvastatin, das vor allem in metastatischen Melanomzellen Apoptose auslöst (Minichsdorfer & Hohenegger, 2009). Der KRAS-SOS1 Inhibitor BAY293 zeigt in der Kombination mit Trametinib sowie Vemurafenib einen verstärkten Effekt, der aber zeitabhängig gegenüber Trametinib und Vemurafenib in der Einzelbehandlung ist. Die Dreifachbehandlung erreicht einen vergleichbaren Effekt wie die Zweifachkombinationen im MTT-Assay und ist somit nicht geeignet vermehrt Zelltot auszulösen. Analog zur Viabilität führt der KRAS-SOS1 Inhibitor BAY293 vor allem in der höchsten Konzentration (8 μ M) in fast allen Zellen zu einer Hemmung der Zellmigration, wobei die Zellen des Frühstadiums stärker betroffen sind. In Kombination mit Vemurafenib entstehen synergistische Effekte in der Migrationshemmung. Die Reduktion der Viabilität von Melanomzellen nach Behandlung mit BAY293 geht nicht auf eine Aktivierung der Caspase 3 oder 9 zurück. Die genaue Art des Zelluntergangs müssen zukünftige Arbeiten zeigen.

8 Abkürzungen

AIF	Apoptosis-inducing factor
Apaf1	Apoptotic protease activating factor 1
Bad	Bcl-2 associated agonist of cell death
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bid	BH3-interacting domain death agonist
BIM	Bcl-2 like protein 11
Braf	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
DISC	Death-introducing signaling complex
ERK	Extracellular-signal regulated kinases
FADD	FAS-associated death domain protein
FDA	Food and Drug Administration
Fos	Proto-oncogen c-fos
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnuklotid-Austauschfaktor
Grb2	Growth factor binding protein
GTP	Guanosintriphosphat
HRAS	Harvey-RAS
IEGs	Immediate early genes
JNKs	C-Jun-N-terminale Kinase
Jun	Jun proto-oncogene
KRAS	Kristen-RAS
MAP	Mitogen-activated protein

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mcl	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
Myc	Myelocytomatosis oncogene
NOXA	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
NRAS	Neuroblastom-RAS
PDGF	Platelet-derived growth factor
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RGP	Radial growth phase
RAS	Rat sarcoma virus
SOS	Son of sevenless
SH2/SH3	Src homology 2/3
TNF	Tumor necrosis factor-alpha
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VGP	Vertical growth phase

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MAP-Kinase Signalweg (Guo et al., 2020)	6
Abbildung 2: Grb2-SOS Komplex aktiviert Ras und den ERK-Signalweg (Fremin & Meloche, 2010)	7
Abbildung 3: Umwandlung von der GDP- in die GTP-gebundene Form (Carvalho et al., 2015)	8
Abbildung 4: Apoptose Signalweg (Wani et al., 2023)	12
Abbildung 5: Viabilität der WM278 Zelllinie 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung mit BAY293 oder Trametinib	24
Abbildung 6: Viabilität der WM278 Zelllinie 24, 48 und 72 Stunden nach den Einzel – und Kombinationsbehandlungen	25
Abbildung 7: Viabilität der WM35 Zelllinie 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung mit BAY293 oder Trametinib	27
Abbildung 8: Viabilität der WM35 Zelllinie 24, 48 und 72 Stunden nach den Einzel – und Kombinationsbehandlungen	29
Abbildung 9: Viabilität der A375 Zelllinie 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung mit BAY293 oder Trametinib	30
Abbildung 10: Viabilität der A375 Zelllinie 24, 48 und 72 Stunden nach den Einzel – und Kombinationsbehandlungen	31
Abbildung 11: Viabilität der WM35 Zelllinie 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung mit BAY293 oder Trametinib	33
Abbildung 12: Viabilität der WM35 Zelllinie 24, 48 und 72 Stunden nach Einzel – und Kombinationsbehandlungen	34
Abbildung 13: Woundhealing Assay von WM278 nach Behandlung mit BAY293 (B), Trametinib (T) und Vemurafenib (V)	36
Abbildung 14: Woundhealing Assay von WM35 nach Behandlung mit BAY293 (B), Trametinib (T) und Vemurafenib (V)	37
Abbildung 15: Woundhealing Assay von A375 nach Behandlung mit BAY293 (B), Trametinib (T) und Vemurafenib (V)	39
Abbildung 16: Woundhealing Assay von 518a2 nach Behandlung mit BAY293 (B), Trametinib (T) und Vemurafenib (V)	41
Abbildung 17: Einfluss der Wirkstoffe auf die Caspase 3 Aktivität von WM278 nach 48 Stunden Inkubation	42
Abbildung 18: Einfluss der Wirkstoffe auf die Caspase 9 Aktivität von WM278 nach 48 Stunden Inkubation	43

Abbildung 19: Einfluss der Wirkstoffe auf die Caspase 3 Aktivität in der Melanomzelllinie WM35 nach 24 und 48 Stunden Inkubation	45
Abbildung 20: Einfluss der Wirkstoffe auf die Caspase 9 Aktivität von WM35 nach 48 Stunden Inkubation	46
Abbildung 21: Einfluss der Wirkstoffe auf die Caspase 3 Aktivität in der Melanomzelllinie A375 nach 24 und 48 Stunden Inkubation	48
Abbildung 22: Einfluss der Wirkstoffe auf die Caspase 9 Aktivität von A378 nach 48 Stunden Inkubation	49
Abbildung 23: Einfluss der Wirkstoffe auf die Caspase 3 Aktivität in der Melanomzelllinie 518a2 nach 24 und 48 Stunden Inkubation	50
Abbildung 24: Einfluss der Wirkstoffe auf die Caspase 9 Aktivität von A378 nach 48 Stunden Inkubation	51

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Caspase-Lysis und Caspase-Reaktions Puffer.....	19
--	----

11 Referenzen

- Arnold, M., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Vaccarella, S., Meheus, F., Cust, A. E., de Vries, E., Whiteman, D. C., & Bray, F. (2022). Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. *JAMA Dermatol*, 158(5), 495-503. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2022.0160>
- Ascierto, P. A., Marincola, F. M., & Atkins, M. B. (2015). What's new in melanoma? Combination! *J Transl Med*, 13, 213. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0582-1>
- Balch, C. M., Gershenwald, J. E., Soong, S. J., Thompson, J. F., Atkins, M. B., Byrd, D. R., Buzaid, A. C., Cochran, A. J., Coit, D. G., Ding, S., Eggermont, A. M., Flaherty, K. T., Gimotty, P. A., Kirkwood, J. M., McMasters, K. M., Mihm, M. C., Jr., Morton, D. L., Ross, M. I., Sober, A. J., & Sondak, V. K. (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 27(36), 6199-6206. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.4799>
- Bataille, V., Bishop, J. A., Sasieni, P., Swerdlow, A. J., Pinney, E., Griffiths, K., & Cuzick, J. (1996). Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of naevi: a case-control study. *Br J Cancer*, 73(12), 1605-1611. <https://doi.org/10.1038/bjc.1996.302>
- Bollag, G., Tsai, J., Zhang, J., Zhang, C., Ibrahim, P., Nolop, K., & Hirth, P. (2012). Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 11(11), 873-886. <https://doi.org/10.1038/nrd3847>
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., & McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, 348(6297), 125-132. <https://doi.org/10.1038/348125a0>
- Bowtell, D., Fu, P., Simon, M., & Senior, P. (1992). Identification of murine homologues of the Drosophila son of sevenless gene: potential activators of ras. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(14), 6511-6515. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.14.6511>
- Breslow, A. (1970). Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*, 172(5), 902-908. <https://doi.org/10.1097/0000658-197011000-00017>
- Carvalho, A. T., Szeler, K., Vavitsas, K., Aqvist, J., & Kamerlin, S. C. (2015). Modeling the mechanisms of biological GTP hydrolysis. *Arch Biochem Biophys*, 582, 80-90. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.02.027>
- Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., Hogg, D., Lorigan, P., Lebbe, C., Jouary, T., Schadendorf, D., Ribas, A., O'Day, S. J., Sosman, J. A., Kirkwood, J. M., . . . Group, B.-S. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*, 364(26), 2507-2516. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103782>
- Chardin, P., Cussac, D., Maignan, S., & Ducruix, A. (1995). The Grb2 adaptor. *FEBS Lett*, 369(1), 47-51. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00578-w](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00578-w)
- Cheng, L., Lopez-Beltran, A., Massari, F., MacLennan, G. T., & Montironi, R. (2018). Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. *Mod Pathol*, 31(1), 24-38. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.104>
- Clark, W. H., Jr., Ainsworth, A. M., Bernardino, E. A., Yang, C. H., Mihm, C. M., Jr., & Reed, R. J. (1975). The developmental biology of primary human malignant melanomas. *Semin Oncol*, 2(2), 83-103. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/790575>
- Clark, W. H., Jr., Elder, D. E., Guerry, D. t., Braitman, L. E., Trock, B. J., Schultz, D., Synnestvedt, M., & Halpern, A. C. (1989). Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst*, 81(24), 1893-1904. <https://doi.org/10.1093/jnci/81.24.1893>

- Clark, W. H., Jr., From, L., Bernardino, E. A., & Mihm, M. C. (1969). The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res*, 29(3), 705-727. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5773814>
- Cobb, M. H. (1999). MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol*, 71(3-4), 479-500. [https://doi.org/10.1016/s0079-6107\(98\)00056-x](https://doi.org/10.1016/s0079-6107(98)00056-x)
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., . . . Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949-954. <https://doi.org/10.1038/nature00766>
- Davis, L. E., Shalin, S. C., & Tackett, A. J. (2019). Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biology & Therapy*, 20(11). <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1640032>
- Der, C. J., Krontiris, T. G., & Cooper, G. M. (1982). Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(11), 3637-3640. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.11.3637>
- Elder, D. E., D, M., RA, S., & R, W. (2018). *WHO Classification of Skin Tumours* (Vol. 11).
- Erdmann, F., Lortet-Tieulent, J., Schuz, J., Zeeb, H., Greinert, R., Breitbart, E. W., & Bray, F. (2013). International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008--are recent generations at higher or lower risk? *Int J Cancer*, 132(2), 385-400. <https://doi.org/10.1002/ijc.27616>
- Evan, G. I., & Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411(6835), 342-348. <https://doi.org/10.1038/35077213>
- Ferrell, J. E., Jr. (1996). Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *Trends Biochem Sci*, 21(12), 460-466. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(96\)20026-x](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(96)20026-x)
- Flaherty, K. T., Robert, C., Hersey, P., Nathan, P., Garbe, C., Milhem, M., Demidov, L. V., Hassel, J. C., Rutkowski, P., Mohr, P., Dummer, R., Trefzer, U., Larkin, J. M., Utikal, J., Dreno, B., Nyakas, M., Middleton, M. R., Becker, J. C., Casey, M., . . . Group, M. S. (2012). Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*, 367(2), 107-114. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1203421>
- Fremin, C., & Meloche, S. (2010). From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol*, 3, 8. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-3-8>
- Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M. S., Pasquini, P., Zanetti, R., Masini, C., Boyle, P., & Melchi, C. F. (2005). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer*, 41(14), 2040-2059. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.03.034>
- Gilmartin, A. G., Bleam, M. R., Groy, A., Moss, K. G., Minthorn, E. A., Kulkarni, S. G., Rominger, C. M., Erskine, S., Fisher, K. E., Yang, J., Zappacosta, F., Annan, R., Sutton, D., & Laquerre, S. G. (2011). GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition. *Clin Cancer Res*, 17(5), 989-1000. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2200>
- Grömer, M. (2021). *Enhancement of apoptotic susceptibility in V600E BRAF positive human melanoma cells* [Medical University of Vienna]. Institute for Pharmacology Centre for Physiology and Pharmacology.
- Guo, Y. J., Pan, W. W., Liu, S. B., Shen, Z. F., Xu, Y., & Hu, L. L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med*, 19(3), 1997-2007. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>

- Gurtu, V., Kain, S. R., & Zhang, G. (1997). Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal Biochem*, 251(1), 98-102.
<https://doi.org/10.1006/abio.1997.2220>
- Hauschild, A., Agarwala, S. S., Trefzer, U., Hogg, D., Robert, C., Hersey, P., Eggermont, A., Grabbe, S., Gonzalez, R., Gille, J., Peschel, C., Schadendorf, D., Garbe, C., O'Day, S., Daud, A., White, J. M., Xia, C., Patel, K., Kirkwood, J. M., & Keilholz, U. (2009). Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J Clin Oncol*, 27(17), 2823-2830. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.7636>
- Hauschild, A., Grob, J. J., Demidov, L. V., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Rutkowski, P., Blank, C. U., Miller, W. H., Jr., Kaempgen, E., Martin-Algarra, S., Karaszewska, B., Mauch, C., Chiarion-Sileni, V., Martin, A. M., Swann, S., Haney, P., Mirakhur, B., Guckert, M. E., . . . Chapman, P. B. (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*, 380(9839), 358-365. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60868-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60868-X)
- Hillig, R. C., Sautier, B., Schroeder, J., Moosmayer, D., Hilpmann, A., Stegmann, C. M., Werbeck, N. D., Briem, H., Boemer, U., Weiske, J., Badock, V., Mastouri, J., Petersen, K., Siemeister, G., Kahmann, J. D., Wegener, D., Bohnke, N., Eis, K., Graham, K., . . . Bader, B. (2019). Discovery of potent SOS1 inhibitors that block RAS activation via disruption of the RAS-SOS1 interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(7), 2551-2560.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1812963116>
- Hobbs, G. A., Der, C. J., & Rossman, K. L. (2016). RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J Cell Sci*, 129(7), 1287-1292. <https://doi.org/10.1242/jcs.182873>
- Houghton, A. N., & Polsky, D. (2002). Focus on melanoma. *Cancer Cell*, 2(4), 275-278.
[https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00161-7](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00161-7)
- Igney, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2(4), 277-288. <https://doi.org/10.1038/nrc776>
- International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet, I., & skin, c. (2007). The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer*, 120(5), 1116-1122.
<https://doi.org/10.1002/ijc.22453>
- Jelinek, T., Dent, P., Sturgill, T. W., & Weber, M. J. (1996). Ras-induced activation of Raf-1 is dependent on tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 16(3), 1027-1034.
<https://doi.org/10.1128/MCB.16.3.1027>
- Joseph, E. W., Pratilas, C. A., Poulikakos, P. I., Tadi, M., Wang, W., Taylor, B. S., Halilovic, E., Persaud, Y., Xing, F., Viale, A., Tsai, J., Chapman, P. B., Bollag, G., Solit, D. B., & Rosen, N. (2010). The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(33), 14903-14908.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1008990107>
- Kebebew, E., Weng, J., Bauer, J., Ranvier, G., Clark, O. H., Duh, Q. Y., Shibru, D., Bastian, B., & Griffin, A. (2007). The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg*, 246(3), 466-470; discussion 470-461. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e318148563d>
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4), 239-257.
<https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>

- Kluck, R. M., Martin, S. J., Hoffman, B. M., Zhou, J. S., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. (1997). Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO J*, 16(15), 4639-4649. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.15.4639>
- Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, Deutschen Krebsgesellschaft, & Krebshilfe, D. (2020). S3 - Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms. *J Dtsch Dermatol Ges*, 18(10). <https://doi.org/10.1111/ddg.14307> (S3 - Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms.)
- Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B., & Schlessinger, J. (1993). Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature*, 363(6424), 85-88. <https://doi.org/10.1038/363085a0>
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479-489. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80434-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80434-1)
- Linares, M. A., Zakaria, A., & Nizran, P. (2015). Skin Cancer. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 42(4), 645-659. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2015.07.006>
- Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D., & Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, 70(3), 431-442. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90167-b](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90167-b)
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F., Mason, C. S., & Marshall, C. J. (1997). Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem*, 272(7), 4378-4383. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.7.4378>
- McGovern, V. J., Cochran, A. J., Van der Esch, E. P., Little, J. H., & MacLennan, R. (1986). The classification of malignant melanoma, its histological reporting and registration: a revision of the 1972 Sydney classification. *Pathology*, 18(1), 12-21. <https://doi.org/10.3109/00313028609090822>
- Milburn, M. V., Tong, L., deVos, A. M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., & Kim, S. H. (1990). Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science*, 247(4945), 939-945. <https://doi.org/10.1126/science.2406906>
- Minichsdorfer, C., & Hohenegger, M. (2009). Autocrine amplification loop in statin-induced apoptosis of human melanoma cells. *Br J Pharmacol*, 157(7), 1278-1290. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00298.x>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Murphy, L. O., MacKeigan, J. P., & Blenis, J. (2004). A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration. *Mol Cell Biol*, 24(1), 144-153. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.1.144-153.2004>
- Nicholson, D. W., & Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, 22(8), 299-306. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(97\)01085-2](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(97)01085-2)

- Orton, R. J., Sturm, O. E., Vyshemirsky, V., Calder, M., Gilbert, D. R., & Kolch, W. (2005). Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem J*, 392(Pt 2), 249-261. <https://doi.org/10.1042/BJ20050908>
- Ostrowski, S. M., & Fischer, D. E. (2020). Biology of Melanoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 35(1), 29-56. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2020.08.010>
- Plangger, A., Rath, B., Hochmair, M., Funovics, M., & Hamilton, G. (2021). Cytotoxicity of combinations of the pan-KRAS inhibitor BAY-293 against primary non-small lung cancer cells. *Transl Oncol*, 14(12), 101230. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101230>
- Plangger, A., Rath, B., Stickler, S., Hochmair, M., Lang, C., Weigl, L., Funovics, M., & Hamilton, G. (2022). Cytotoxicity of combinations of the pan-KRAS SOS1 inhibitor BAY-293 against pancreatic cancer cell lines. *Discov Oncol*, 13(1), 84. <https://doi.org/10.1007/s12672-022-00550-w>
- Pratilas, C. A., Taylor, B. S., Ye, Q., Viale, A., Sander, C., Solit, D. B., & Rosen, N. (2009). (V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(11), 4519-4524. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900780106>
- Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, 26(22), 3100-3112. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210392>
- Rodriguez, L. G., Wu, X., & Guan, J. L. (2005). Wound-healing assay. *Methods Mol Biol*, 294, 23-29. <https://doi.org/10.1385/1-59259-860-9:023>
- Ruvolo, P. P., Deng, X., & May, W. S. (2001). Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia*, 15(4), 515-522. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402090>
- Satyamoorthy, K., Li, G., Gerrero, M. R., Brose, M. S., Volpe, P., Weber, B. L., Van Belle, P., Elder, D. E., & Herlyn, M. (2003). Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res*, 63(4), 756-759. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12591721>
- Sauter, E. R., & Herlyn, M. (1998). Molecular biology of human melanoma development and progression. *Mol Carcinog*, 23(3), 132-143. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2744\(199811\)23:3<132::aid-mc2>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2744(199811)23:3<132::aid-mc2>3.0.co;2-1)
- Scolyer, R. A., Long, G. V., & Thompson, J. F. (2011). Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol Oncol*, 5(2), 124-136. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2011.03.002>
- Simanshu, D. K., Nissley, D. V., & McCormick, F. (2017). RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, 170(1), 17-33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.009>
- Strasser, A., O'Connor, L., & Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, 69, 217-245. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.217>
- Szörger, N. (2023). *Pharmakologische Regulation der IL-6 bzw. Oncostatin M medierte Signalwege in Gegenwart des SOS-RAS Interaktionsinhibitors BAY293 in humane Melanomzellen unterschiedlicher Wachstumsphasen* [Masterarbeit, Universität Wien].
- Tkaczowa, A., Durlakowa, I., & Weber, B. (1977). Investigations on drug-resistance of *Shigella sonnei* bacilli isolated in Poland in the years 1959-1972. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 25(2), 263-272. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/326220>
- Ugurel, S., & Gutzmer, R. (2023). [Melanom]. *J Dtsch Dermatol Ges*, 21(4), 343-348. https://doi.org/10.1111/ddg.15053_g

- Vetter, I. R., & Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, 294(5545), 1299-1304. <https://doi.org/10.1126/science.1062023>
- Wang, C. X., Wang, T. T., Zhang, K. D., Li, M. Y., Shen, Q. C., Lu, S. Y., & Zhang, J. (2022). Pan-KRAS inhibitors suppress proliferation through feedback regulation in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Acta Pharmacol Sin*, 43(10), 2696-2708. <https://doi.org/10.1038/s41401-022-00897-4>
- Wang, Y. F., Jiang, C. C., Kiejda, K. A., Gillespie, S., Zhang, X. D., & Hersey, P. (2007). Apoptosis induction in human melanoma cells by inhibition of MEK is caspase-independent and mediated by the Bcl-2 family members PUMA, Bim, and Mcl-1. *Clin Cancer Res*, 13(16), 4934-4942. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0665>
- Wani, A. K., Akhtar, N., Mir, T. U. G., Singh, R., Jha, P. K., Mallik, S. K., Sinha, S., Tripathi, S. K., Jain, A., Jha, A., Devkota, H. P., & Prakash, A. (2023). Targeting Apoptotic Pathway of Cancer Cells with Phytochemicals and Plant-Based Nanomaterials. *Biomolecules*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/biom13020194>
- Wilhelm, S. M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., Chen, C., Zhang, X., Vincent, P., McHugh, M., Cao, Y., Shujath, J., Gawlak, S., Eveleigh, D., Rowley, B., Liu, L., Adnane, L., Lynch, M., Auclair, D., . . . Trail, P. A. (2004). BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res*, 64(19), 7099-7109. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1443>

Bildrechte

*Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber*innen der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.*