

Aus der Klinik und Poliklinik für
Dermatologie und Allergologie
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Lars E. French

Zielgerichtete Kombinationstherapie von BRAF- und MEK-Inhibitor resistenten Melanomzellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Annamarie Strieder

aus
München

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Carola Berking
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Christian Kunte Prof. Dr. Matthias Volkenandt
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. Saskia Graf PD Dr. Markus Heppt
Dekan:	Prof. Dr. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	22.02.2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
Abbildungsverzeichnis	11
1. Einleitung	13
1.1 Das maligne Melanom.....	13
1.2 Grundlagen der Melanomentstehung	14
1.2.1 Entwicklung der Melanozyten	14
1.2.2 Bedeutung des MAPK- und PI3K/AKT-Signalwegs.....	15
1.2.3 Bedeutung des WNT-Signalwegs.....	17
1.2.4 Genetische Alterationen.....	19
1.2.5 Histopathologische Entwicklung	21
1.3 Therapie des metastasierten Melanoms	23
1.3.1 Immuncheckpoint-Blockade.....	24
1.3.2 Zielgerichtete Therapie mit Kinase-Inhibitoren	25
1.3.3 Therapie des fortgeschrittenen Melanoms.....	27
1.4 Resistenzentwicklung gegenüber zielgerichteten Inhibitoren.....	28
1.4.1 Tumorheterogenität als Ursache von Resistenz.....	28
1.4.2 Reaktivierung des MAPK-Signalwegs	30
1.4.3 Aktivierung anderer Signalwege.....	31
1.5 Bedeutung des FGFR-Signalwegs im Melanom.....	32
1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	35
2. Material und Methoden	36
2.1 Material	36
2.1.1 Zelllinien.....	36
2.1.2 Zellkultur	36
2.1.2.1 Medien	36
2.1.2.2 Lösungen	37
2.1.2.3 Antibiotika und Antimykotika	38
2.1.3 Inhibitoren	39
2.1.4 Puffer, Reagenzien und Lösungen	39
2.1.4.1 Puffer, Reagenzien und Lösungen für die Proteinpräparation.....	39
2.1.4.2 Puffer, Reagenzien und Lösungen für den Immunoblot	40
2.1.4.3 Puffer, Reagenzien und Lösungen für den Sphäroid-Assay.....	41

2.1.4.4 Puffer, Reagenzien und Lösungen für die Durchflusszytometrie	42
2.1.4.5 Puffer, Reagenzien und Lösungen für Molekulare Analysen.....	42
2.1.5 Kommerziell erhältliche Kits	43
2.1.6 Oligonukleotide	43
2.1.6.1 Primer und Sonden für die quantitative Echtzeit-PCR	43
2.1.6.2 Small Interfering RNA (siRNA).....	44
2.1.7 Antikörper.....	44
2.1.7.1 Primäre Antikörper	44
2.1.7.2 Sekundäre Antikörper	45
2.1.8 Verbrauchsmaterialien	46
2.1.9 Apparative Ausstattung.....	47
2.1.10 Software	48
2.2 Methoden.....	49
2.2.1 Zellkultur.....	49
2.2.1.1 Kultivierung der Melanomzellen	49
2.2.1.2 Isolierung von Melanomzellen aus Frischgewebe	50
2.2.2 Gen- und Proteinexpression	50
2.2.2.1 Quantifizierung der Genexpression	50
2.2.2.1.1 RNA-Isolation	50
2.2.2.1.2 RNA-Konzentrationsbestimmung	51
2.2.2.1.3 Synthese der cDNA.....	51
2.2.2.1.4 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion	52
2.2.2.2 Zellyse und Proteinpräparation	54
2.2.2.3 Immunoblot nach Lämmli.....	55
2.2.2.3.1 Gelelektrophorese	55
2.2.2.3.2 Proteintransfer	56
2.2.2.3.3 Proteindetektion	57
2.2.3 Bestimmung der Zellvitalität	58
2.2.4 Analyse der Invasionskapazität mittels Sphäroid-Assay	58
2.2.4.1 Sphäroidbildung.....	58
2.2.4.2 Einbetten der Sphäroide in Kollagen	59
2.2.5 Zelltodanalyse mittels Durchflusszytometrie.....	60
2.2.6 Inhibition der Genexpression mittels RNA-Interferenz.....	63

2.2.6.1 Entwicklung spezifischer siRNA	63
2.2.6.2 Transfektion von siRNA.....	63
2.2.7 Humaner Phospho-Kinase-Array	63
2.2.8 Statistische Analysen	64
3. Ergebnisse	65
3.1 Generierung BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen.....	65
3.2 Analyse BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen	67
3.2.1 Reaktivierung des MAPK-Signalwegs	67
3.2.2 Verstärkte Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs	68
3.2.3 Aktivierung des WNT-Signalwegs	69
3.2.4 Resistente Zellen zeigen erhöhte Resilienz bei verringerter translationaler Aktivität	71
3.2.4.1 Morphologie	71
3.2.4.2 Proliferation	72
3.2.4.3 Translation	73
3.2.4.4 Zellzyklus und Apoptose	75
3.3 Inhibitoren zur Resistenzdurchbrechung: Behandlung mit FGFRi	78
3.3.1 FGFRi reduziert die Vitalität resistenter Zellen	80
3.3.2 FGFRi hemmt MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg in resistenten Zellen.....	85
3.3.3 Einfluss von FGFRi auf WNT4 und WNT5A	86
3.3.4 FGFRi hemmt die Invasionskapazität resistenter Zellen	87
3.3.5 FGFRi induziert Apoptose und Zellzyklusarrest in resistenten Zellen	90
3.4 Expressionsanalyse von FGF-Rezeptoren und -Liganden.....	93
3.4.1 FGFR sind in resistenten Zellen verstärkt exprimiert	94
3.4.2 FGFRi induziert die Expression von FGFR in resistenten Zellen	96
3.4.3 Spezifische Hemmung der FGFR reduziert die Vitalität resistenter Zellen	99
3.4.4 FGF sind in resistenten Zellen erhöht exprimiert.....	100
3.4.5 Spezifische Hemmung von FGF7 reduziert die Vitalität in resistenten Zellen	102
3.5 FGFRi reduziert die Vitalität kurzzeitig kultivierter Melanomzellen	103
4. Diskussion	105
4.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	105
4.2 Resistenzentwicklung unter BRAFi/MEKi-Therapie	106
4.2.1 <i>Slow-cycling</i> -Phänotyp resistenter Zellen	106
4.2.2 Dezentrale Aktivierung intrazellulärer Signalwege	109

4.3 Funktionelle Bedeutung der FGFR im malignen Melanom	110
4.3.1 Expression von FGFR und FGF in parentalen und resistenten Zellen.....	111
4.3.2 Inhibition von FGFR2 und FGF7 reduziert die Vitalität resistenter Zellen	114
4.3.3 FGFRi induziert FGFR-Expression in resistenten Zellen.....	114
4.3.4 Modellvorschlag der autokrinen FGF7/FGFR2-Stimulation	115
4.4 Chancen und Grenzen einer Behandlung mit FGFRi	117
4.4.1 Reduktion der Zellvitalität	117
4.4.2 Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose	119
4.4.3 Inhibition von Invasion und Migration	120
4.5 Relevanz für die Klinik	122
4.5.1 Strategien zur Vermeidung einer BRAFi/MEKi-Resistenzentwicklung.....	122
4.5.2 FGFRi als Therapieoption nach BRAFi/MEKi-Resistenz?	124
4.5.3 Limitationen und Ausblick	127
Zusammenfassung	130
Literaturverzeichnis	134
Danksagung.....	153
Affidavit.....	154
Publikationsliste.....	155

Abkürzungsverzeichnis

BRAF	<i>V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
BRAFi	BRAF-Inhibitor
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Bup	Buparlisib
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cob	Cobimetinib
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
Dab	Dabrafenib
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA (<i>double stranded DNA</i>)
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epithelialer Wachstumsfaktor (<i>epithelial growth factor</i>)
EGFR	EGF-Rezeptor
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ERKi	ERK-Inhibitor
4E-BP1	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (<i>fibroblast growth factor</i>)
FGFR	FGF-Rezeptor

FGFRi	FGFR-Inhibitor
FKS	Fetales Kälberserum
FRS2	<i>fibroblast growth factor receptor substrate 2</i>
GDP	Guanosin-Diphosphat
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 beta
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde (<i>hour</i>)
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfactor (<i>hepatocyte growth factor</i>)
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung (<i>Hanks' balanced salt solution</i>)
IGF	Insulin-Wachstumsfaktor (<i>insulin growth factor</i>)
IGFR	IGF-Rezeptor
Inf	Infigratinib
JNK	Janus-Kinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasekinase
MEKi	MEK-Inhibitor
min	Minute
MITF	Mikrophthalmie-assoziiertes Transkriptionsfaktor
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
NF1	Neurofibromatose 1
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>programmed cell death-ligand 1</i>
PDGFR β	<i>Platelet-derived growth factor receptor beta</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat

PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI3Ki	PI3K-Inhibitor
PLC	Phospholipase C
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rav	Ravoxertinib
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RGP	Radiale Wachstumsphase (<i>radial growth phase</i>)
Rnase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	Sekunde
Sel	Selumetinib
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
Tra	Trametinib
TU 2%	Tumormedium
Vem	Vemurafenib
VGP	Vertikale Wachstumsphase (<i>vertical growth phase</i>)
WB	Western Blot

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des MAPK und PI3K/AKT-Signalwegs	17
Abb. 2: Schematische Darstellung des kanonischen WNT-Signaltransduktionswegs	18
Abb. 3: Häufige genetische Alterationen im malignen Melanom	21
Abb. 4: Modell der Melanomentstehung nach Clark	23
Abb. 5: Punkt-Histogramme nach Analyse mittels Durchflusszytometrie	62
Abb. 6: Generierung BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen	66
Abb. 7: MAPK-Signalweg in WM9-Melanomzellen	68
Abb. 8: PI3K/AKT-Signalweg in WM9-Melanomzellen	69
Abb. 9: WNT-Signaltransduktion in WM9-Melanomzellen	70
Abb. 10: Vitalität und Proliferation nach Behandlung mit Kinaseinhibitoren	73
Abb. 11: mTOR-Signalweg in WM9-Melanomzellen	74
Abb. 12: Expression verschiedener Signalproteine in WM9-Melanomzellen	77
Abb. 13: Rationale für die verwendeten zielgerichteten Kinaseinhibitoren	79
Abb. 14: Zellvitalität nach Behandlung mit Kinaseinhibitoren	81
Abb. 15: Lichtmikroskopische Aufnahmen nach Behandlung	84
Abb. 16: Zellvitalität parentaler, Vem- und Vem/Cob-res WM9-Melanomzellen	84
Abb. 17: Aktivität von MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg nach FGFRi-Behandlung	86
Abb. 18: Expression von WNT4 und WNT5A in WM9-Melanomzellen	87
Abb. 19: Invasionskapazität der WM9-Melanomzellen	88
Abb. 20: Sphäroide der WM9-Melanomzellen nach FGFRi-Behandlung	89
Abb. 21: Apoptose-Induktion nach FGFRi-Behandlung	91
Abb. 22: Schematische Darstellung des Zellzyklus	92
Abb. 23: Expression von Zellzyklusmediatoren nach FGFRi-Behandlung	93
Abb. 24: FGFR-Expression in WM9-Melanomzellen	96
Abb. 25: FGFR-Expression in WM9-Melanomzellen nach FGFRi-Behandlung	98
Abb. 26: Proteinexpression von FGFR2, p-FGFR3 und FGFR4 nach FGFRi-Behandlung ...	99
Abb. 27: Spezifische Inhibition von FGFR1-4 in WM9-Melanomzellen	100

Abb. 28: Expression von FGF1, FGF2, FGF7 und FGF10 in WM9-Melanomzellen	102
Abb. 29: Zellvitalität in WM9-Melanomzellen nach FGF7-Inhibition	102
Abb. 30: Zellvitalität und FGFR-Expression in LMU-KM11 und LMU-KM14	104
Abb. 31: Modell der autokrinen Stimulation über die FGF7-FGFR2-Schleife	116

1. Einleitung

1.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor, der von den Melanozyten ausgeht und sich zu 90% als kutanes Melanom an der Felderhaut präsentiert. Weniger häufig findet sich das mukosale Melanom an respiratorischen, gastrointestinalen oder anogenitalen Schleimhäuten oder das uveale Melanom an Choroidea oder Retina des Auges. Es existieren stark pigmentierte ebenso wie weniger pigmentierte bis hin zu amelanotischen Formen. Die erste Beurteilung der Dignität einer pigmentierten Läsion erfolgt nach der sogenannten ABCDE-Regel (Asymmetrie, Begrenzung, Farbe/colour, Durchmesser > 6 mm, Entwicklung). Die häufigsten und klassischen klinisch-histologischen Subtypen sind das superfiziell spreitende Melanom, das noduläre Melanom, das akral-lentiginöse Melanom und das Lentigo-Maligna-Melanom [1].

Weltweit steigt die Inzidenz des malignen Melanoms in den letzten Jahren deutlich an und lag 2016 in Deutschland bei über 23.000 Neuerkrankungen pro Jahr (Robert Koch-Institut, RKI, www.krebsdaten.de). Damit rangiert es auf Platz 5 der häufigsten soliden Tumore, wobei immer häufiger auch junge Patientinnen und Patienten betroffen sind. Etwa 3.000 Menschen versterben in Deutschland jährlich an den Folgen der Erkrankung. Damit sind über 90% der Hautkrebs-assoziierten Todesfälle auf das maligne Melanom zurückzuführen. Trotz steigender Inzidenzen blieb die Mortalitätsrate in den letzten Jahren relativ konstant, was zum einen auf die bessere Früherkennung und Vorsorge und zum anderen auf neue Therapieoptionen zurückzuführen ist.

Als bekannter Risikofaktor für die Entstehung des malignen Melanoms gilt allen voran UV-Strahlung, wobei sowohl UVA- als auch UVB-Strahlen zu Mutationen und Schäden an der DNA führen, die eine Tumorentstehung begünstigen [2]. Hierbei sind insbesondere intermittierende, starke Sonnenbelastung und Sonnenbrände in jungen Jahren zu nennen [3]. Auch ein heller Hauttyp, helle oder rötliche Haare und Sommersprossen konnten als Risikofaktoren identifiziert werden, genauso wie das Vorliegen multipler melanozytärer und dysplastischer Nävi [4]. Da sich in ca. 10% der Fälle ein familiär gehäuftes Auftreten zeigt, scheinen genetische Faktoren ebenfalls eine Rolle zu spielen, eine familiäre Prädisposition geht mit einem etwa zweifach erhöhten Risiko für ein Melanom einher [5]. Außerdem kann eine Immunsuppression z.B. im Rahmen einer HIV- oder

Autoimmunerkrankung oder während einer Chemotherapie das Melanomrisiko erhöhen [6].

Zu den prognosebestimmenden Faktoren des malignen Melanoms zählen gemäß des *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) die Tumordicke und die vertikal gemessene histologische Eindringtiefe in mm nach Breslow, das Vorhandensein oder die Abwesenheit einer Ulzeration, die Mitoserate der Tumorzellen (Anzahl pro mm²) und der Status von Lymphknoten- und Fernmetastasen [7]. Abhängig von der Tumordicke zeigt das maligne Melanom eine frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung, die mit einer deutlich schlechteren Prognose einhergeht. Während das 5-Jahres-Überleben bei Patientinnen und Patienten im Stadium I nahezu 100% beträgt, liegt es bei Fernmetastasierung im Stadium IV nur bei etwa 20% [7, 8].

1.2 Grundlagen der Melanomentstehung

Die für die Transformation von Melanozyten zu malignen Melanomzellen verantwortlichen Mechanismen sind noch nicht vollständig verstanden, einige wichtige Meilensteine sind jedoch bereits gut untersucht. Es wird immer deutlicher, dass das maligne Melanom eine hoch komplexe und heterogene Neoplasie ist, bei der kein Tumor dem anderen gleicht und sich sogar innerhalb ein und desselben Tumors sehr verschiedene phänotypische Stadien und Mutationen finden lassen [9, 10].

1.2.1 Entwicklung der Melanozyten

Melanomzellen entstehen aus entarteten Melanozyten, den Pigment-produzierenden Zellen der Haut, die sich wiederum in der Embryogenese aus Melanoblasten entwickeln. Diese entstammen multipotenten Zellen der Neuralleiste, welche sich bei Wirbeltieren im Verlauf der embryonalen Entwicklung vorübergehend bildet [11, 12]. Die Neuralleistenzellen migrieren in der späteren Embryonalentwicklung in diverse Regionen des Körpers und entwickeln sich zu unterschiedlichen Gewebearten, wie z.B. sensorischen Neuronen, Gliazellen, Chondrozyten, Osteoblasten, sympathischen Zellen des Nebennierenmarks sowie Melanoblasten [13]. Die Differenzierung wird dabei über eine Vielzahl von Signalmolekülen, Wachstums- und Transkriptionsfaktoren zielgerichtet

gesteuert [14, 15]. Neuralleistenzellen, die sich zu Melanoblasten entwickeln, exprimieren spezifische Marker, wie z.B. die Rezeptortyrosinkinase (RTK) c-KIT, deren Signalweg für Überleben, Proliferation und Migration der Melanoblasten von wesentlicher Bedeutung ist [16]. Für die weitere spezifische Entwicklung zu Melanozyten spielt insbesondere der Mikrophthalmie-assoziierte Transkriptionsfaktor (MITF) eine entscheidende Rolle [17]. Die vollständig differenzierten Melanoblasten wandern schließlich in die Basalschicht der Epidermis ein und werden fortan als Melanozyten bezeichnet. Sie bilden dort Melanin und geben dieses an benachbarte Keratinozyten ab, was zu einer Pigmentierung von Haut und Haaren führt und die Keratinozyten vor DNA-Schäden durch UV-Strahlung schützt [18].

1.2.2 Bedeutung des MAPK- und PI3K/AKT-Signalwegs

Ein Schlüssel-Signalweg in der Tumorentstehung nicht nur beim malignen Melanom ist der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK-) Signalweg. Er vermittelt über eine Kette verschiedener Kinasen Überleben, Proliferation und Differenzierung der Zelle. Der MAPK-Signalweg wird über in der Zellmembran gelegene RTK, die mit ihrer extrazellulären Domäne Wachstumsfaktoren wie den epidermalen (*epidermal growth factor*, EGF) und den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (*fibroblast growth factor*, FGF) binden, aktiviert (Abb. 1) [19]. Auch Insulin und verschiedene Arten von zellulärem Stress können zu einer Aktivierung des MAPK-Signalwegs führen [20]. In mehreren Schritten kommt es nachfolgend zu einer GTP-abhängigen Aktivierung des *neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog* (NRAS) Proteins, das daraufhin die Membran-Translokation, Heterodimerisation und Aktivierung des *V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B* (BRAF) Proteins vermittelt. BRAF phosphoryliert und aktiviert die *mitogen-activated protein kinase kinase* (MEK), die weiterhin durch Phosphorylierung die *extracellular signal-related kinase* (ERK) aktiviert [21]. ERK-Proteine phosphorylieren verschiedene Substrate in Zellkern und Zytoplasma und vermitteln so Wachstum, Überleben, Differenzierung und Invasivität der Zelle [22]. Durch die zunehmende Anzahl der Kinasen wird das ursprüngliche Signal von Kinase zu Kinase verstärkt [23].

Neben dem MAPK- hat der PI3K/AKT-Signalweg eine bedeutende Funktion für die Regulierung von Zellwachstum und -überleben ebenso wie bei der Apoptosehemmung und ist in vielen Malignomen, so auch im Melanom, verstärkt aktiviert [24-26]. NRAS kann

neben BRAF auch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktivieren. PI3K katalysiert die Umwandlung von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) und aktiviert PI3K-abhängige Kinasen (PDK), die wiederum die Proteinkinase B, auch AKT genannt, an der Threonin-Bindestelle 308 (Thr³⁰⁸) phosphorylieren und damit aktivieren. Als Protoonkogen reguliert AKT viele verschiedene Substrate, stimuliert die Proteintranslation und Zellproliferation und wirkt antiapoptotisch. Es aktiviert *mammalian target of rapamycin* (mTOR) und *cAMP response element binding-protein* (CREB), hemmt das Tumorsuppressorprotein p27 und nimmt über Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Expression verschiedener für den Zellzyklus verantwortlicher Gene. Natürliche Gegenspieler des PI3K/AKT-Signalwegs sind der Tumorsuppressor Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN), der als Katalysator für die Umwandlung von PIP₃ zurück in PIP₂ fungiert und so die Aktivierung von AKT hemmt, und die Glycogensynthase Kinase 3 beta (GSK3 β). Eine verminderte Expression oder Deletion des PTEN-Gens resultiert in einer Überaktivierung des PI3K-Signalwegs mit kanzerogener Wirkung [27]. Eine konstitutive Aktivierung des MAPK- und PI3K/AKT-Signalweges findet sich in einer Vielzahl der Melanome [27-29].

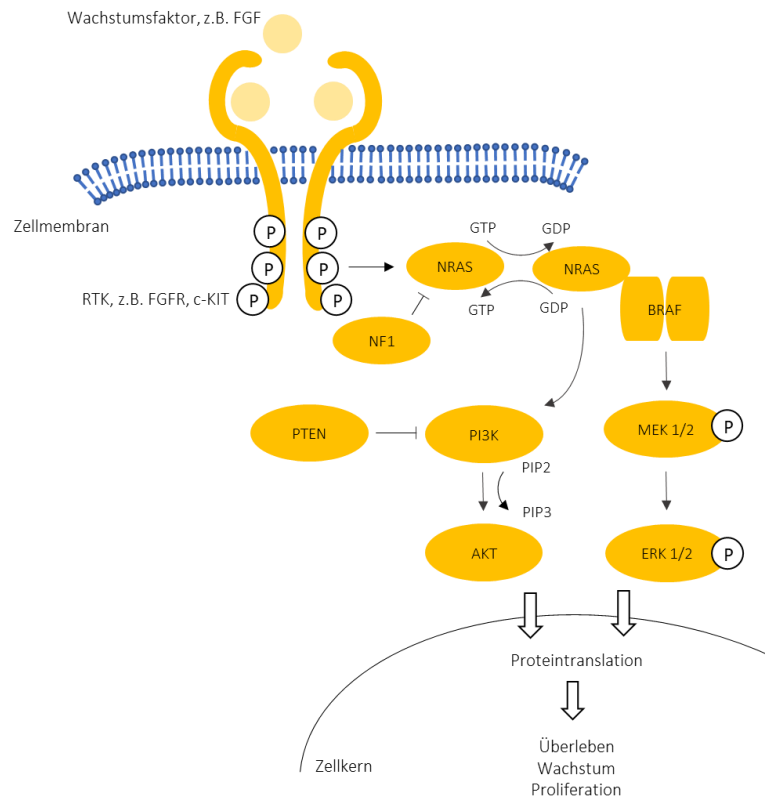


Abb. 1: Schematische Darstellung des MAPK- und PI3K/AKT-Signalwegs

Der MAPK-Signalweg wird durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren aktiviert, die verschiedene in der Zellmembran lokalisierte RTK binden. Über die RTK kommt es zur GTP-vermittelten Aktivierung von NRAS, welches wiederum BRAF aktiviert. BRAF kann anschließend durch Phosphorylierung MEK und ERK aktivieren. NRAS kann zugleich über den PI3K/AKT-Signalweg agieren. Beide Wege vermitteln über die Regulation verschiedener Transkriptionsfaktoren Überleben, Wachstum und Proliferation der Melanomzelle.

1.2.3 Bedeutung des WNT-Signalwegs

Ein weiterer Signaltransduktionsweg, der in Zusammenhang mit der Entwicklung und Progression des malignen Melanoms und auch der Resistenzentwicklung gegenüber BRAF-Inhibitoren diskutiert wird, ist der WNT-Signalweg (*Abb. 2*) [30-32]. Wnts sind Signalproteine, die als Wachstumsfaktoren von entscheidender Bedeutung für Wachstum, Proliferation und Differenzierung von Zellen sind. Der WNT-Signalweg hat so eine wichtige Funktion sowohl bei der Embryogenese als auch bei der Entwicklung verschiedenster Malignome [33, 34]. Er ist hoch komplex, da 19 WNT-Gene für 19 Wnt-Proteine kodieren, die wiederum über 15 verschiedene Rezeptoren und Co-Rezeptoren binden können und so ein sehr differenziertes Muster der Signaltransduktion ermöglichen. Es wird zwischen einem sogenannten kanonischen und mehreren nicht-kanonischen WNT-Signalwegen unterschieden [35]. Der kanonische WNT-Signalweg wird

über β -Catenin vermittelt und steuert vornehmlich Proliferation und Differenzierung von Zellen [36]. Hierbei binden v.a. Wnt1, Wnt3a und Wnt8 extrazellulär an den in der Zellmembran gelegenen Rezeptor *Frizzled* (FZD) und dessen Co-Rezeptor LRP5/6, die dadurch das Protein *Dishevelled* (DVL) aktivieren [36, 37]. DVL hemmt daraufhin einen Komplex aus der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3), dem Tumorsuppressor *Adenomatous-polyposis-coli* (APC) und Axin 1. Dieser sogenannte Degradationskomplex phosphoryliert in Abwesenheit von Wnts β -Catenin und markiert dieses so für die Ubiquitinierung und den anschließenden Abbau in den Proteasomen [38, 39]. Durch die Bindung von Wnt-Liganden wird diese Markierung gehemmt, woraufhin sich β -Catenin im Zytoplasma anreichert, in den Nukleus gelangt und dort spezifische Gene aktiviert. Auch AKT kann GSK-3 durch Phosphorylierung hemmen und so zu einer Anreicherung von β -Catenin im Zytoplasma führen [40]. Die weniger bekannten nicht-kanonischen Wege der Wnt-Signalübertragung sind β -Catenin-unabhängig und vermitteln insbesondere über Wnt5A und Wnt11 Zellpolarität und Migration [41]. Der FGF-Signalweg interagiert sowohl mit dem „kanonischen“ als auch mit dem „nicht-kanonischen“ WNT-Signalweg [42-45].

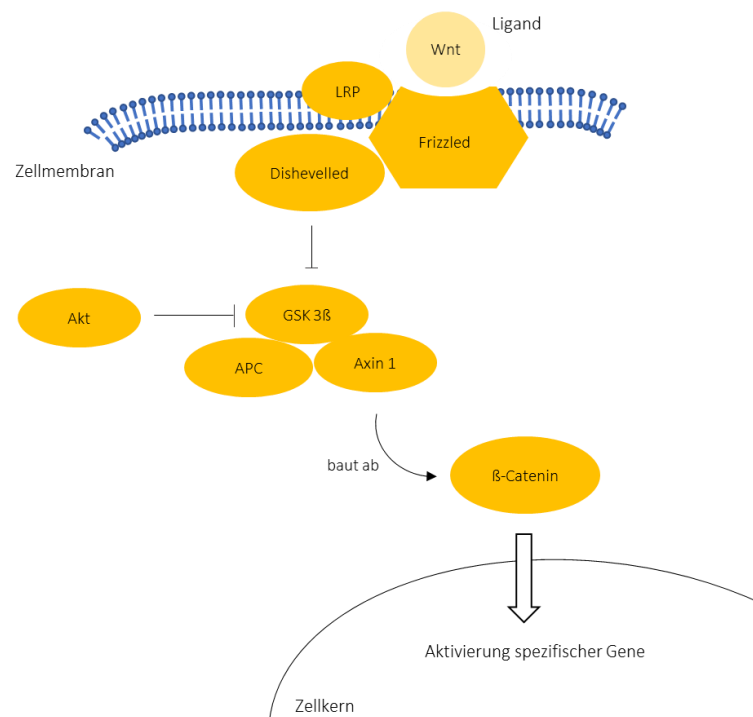


Abb. 2: Schematische Darstellung des kanonischen WNT-Signaltransduktionswegs

Wnts binden an den in der Zellmembran lokalisierten Rezeptor Frizzled und dessen Co-Rezeptor LRP, die das Protein Dishevelled aktivieren. Dieses hemmt daraufhin den Degradationskomplex aus GSK-3 β , APC und Axin 1, so dass β -Catenin nicht mehr abgebaut wird, sich in Zytoplasma anreichert, in den Nukleus übertritt und dort spezifische Gene aktiviert.

1.2.4 Genetische Alterationen

Genomsequenzierungen zeigen, dass die durchschnittliche Mutationsrate im Melanom bei über 10 Mutationen pro Megabase analysierte DNA liegt, was einer der bislang höchsten analysierten Mutationsrate in Tumoren entspricht [46]. Die niedrigste Anzahl an Mutationen fand sich dabei in primären Melanomen, die keiner UV-Strahlung ausgesetzt war, während die höchste Rate mit chronischen Sonnenschäden assoziiert war [47]. Einige genetische Alterationen zeigen sich besonders häufig, eine Übersicht hierüber ist in *Abb. 3* dargestellt. So kommt es während der Melanomentwicklung fast immer zu einer konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalwegs [48]. Die mit Abstand häufigste Alteration betrifft dabei das BRAF-Protein, 50-60% aller kutanen Melanome besitzen hier eine aktivierende Mutation [28, 49, 50]. Zu 70-90% wird dabei die Aminosäure Valin an Position 600 durch Glutamin ersetzt (BRAF^{V600E}) [28], aber auch andere Substitutionen an derselben Stelle (BRAF^{V600D/K}) oder chromosomale Translokationen sind möglich [51, 52]. Da sich BRAF-Mutationen häufig bereits in benignen Nävi zeigen, scheinen sie in der Entwicklung des Melanoms an sehr früher Stelle zu stehen [49, 53, 54]. Interessanterweise zeigen mukosale und akrale Melanome nur in 10-20% BRAF^{V600}-Mutationen, uveale Melanome noch seltener [55, 56].

In 15-20% aller kutanen Melanome finden sich Mutationen in NRAS, einem Membran-assoziierten Guanosin-Triphosphat (GTP)-bindenden Protein des MAPK-Signalweges [57]. Sie halten NRAS in seiner aktiven, GTP-gebundenen Form und führen gleichzeitig zu einer konstitutiven Aktivierung des MAPK- und PI3K-Signalweges [58, 59]. NRAS-Mutationen sind mit einem aggressiveren Tumorwachstum und einer ungünstigeren Prognose assoziiert und schließen BRAF^{V600}-Mutationen aus [60].

10-35% aller kutanen Melanome zeigen einen Verlust von PTEN, einem Enzym, das durch Hydrolyse den PI3K-Signalweg inhibiert und so als Tumorsuppressor wirkt. Der Verlust von PTEN tritt häufig zusammen mit BRAF-Mutationen auf und schließt NRAS-Mutationen aus [27]. Umgekehrt können auch aktivierende Mutationen in AKT die Melanomentstehung begünstigen, indem sie zu einer konstitutiven Aktivierung des PI3K-Signalwegs führen [61].

Weitere Mutationen, die sich in kutanen Melanomzellen und auch in anderen Tumoren häufig schon sehr früh ereignen, betreffen die *telomerase reverse transcriptase* (TERT). Dieses Enzym verlängert nach jeder Replikation erneut die Enden der DNA-Stränge, auch

Telomere genannt, und ist normalerweise nur in Stammzellen und anderen sich permanent teilenden Zellen aktiv [54]. TERT-Mutationen verhelfen Melanomzellen zu unbegrenzter Replikationsfähigkeit und verhindern so den Übertritt in die Seneszenz [62]. Mutationen, die sich zwar nur selten in kutanen, dafür aber sehr häufig in akralen und mukosalen Melanomen finden, betreffen die RTK c-KIT [63, 64]. Diese aktivieren sowohl den MAPK- als auch den PI3K-Signalweg [65].

Ebenfalls selten und meist in Konkurrenz mit BRAF- und NRAS-Mutationen, ist der Verlust von *neurofibromatosis type 1* (NF1), einem Protein, das NRAS über die Hydrolyse von GTP zu GDP inhibiert [66]. In der Folge kommt es über GTP-gebundenes NRAS wiederum zu einer Aktivierung des MAPK-Signalwegs.

Auch eine verringerte Expression oder ein Verlust von p16 durch Mutationen im Gen von *cyclin-dependent kinase inhibitor N2A* (CDKN2A), sind mit einer Risikoerhöhung für die Entwicklung eines malignen Melanoms assoziiert [67]. p16 hemmt normalerweise die Enzyme CDK4 und CDK6 und nimmt so an der Regulierung des Zellzyklus teil, indem es die Zelle in der Gap1-Phase (G1-Phase) hält. Aktivierende Mutationen in CDK4 selbst spielen ebenfalls eine Rolle [68].

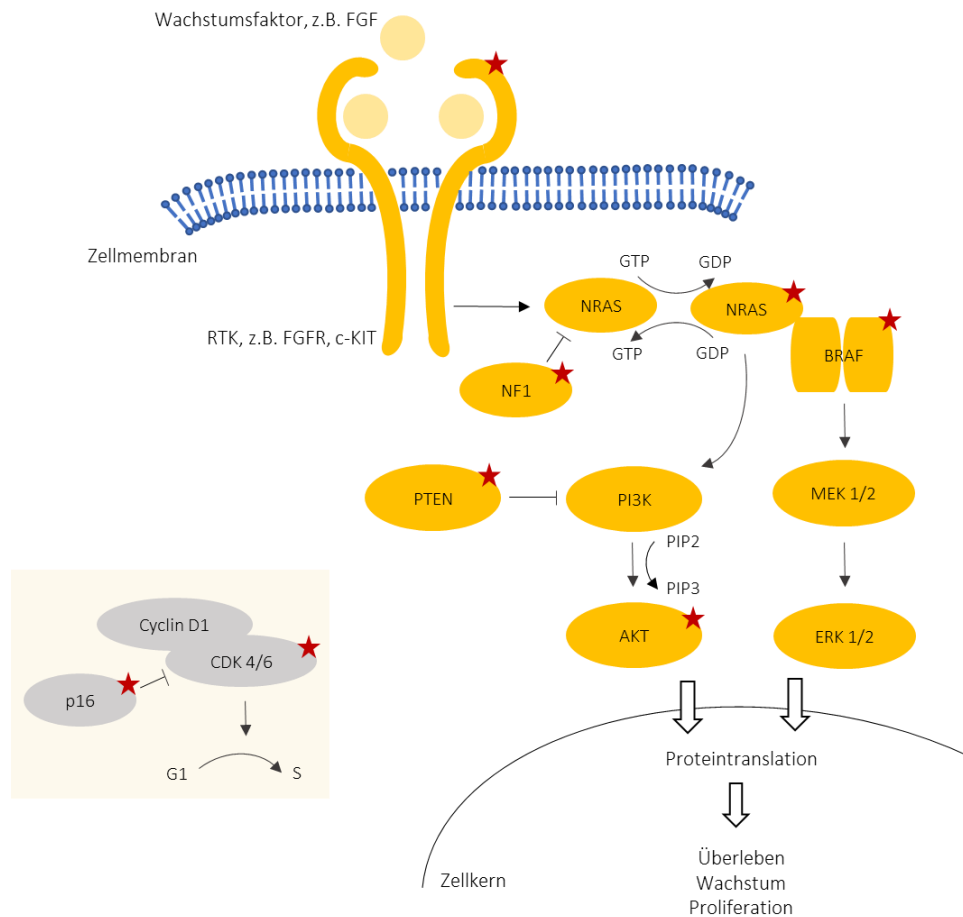


Abb. 3: Häufige genetische Alterationen im malignen Melanom

Dargestellt sind die für die Melanomentstehung und -Progression wesentlichen Mutationen (Sternchen). Durch aktivierende Mutationen von NRAS, BRAF und AKT oder Funktionsverlust von NF1 oder PTEN kommt es zur konstitutiven Aktivierung des MAPK- und/oder PI3K-Signalwegs, was zu verstärktem Überleben, Wachstum und Proliferation der Tumorzelle führt. Zusätzlich führen Mutationen von p16 oder CDK4 und CDK6 zu einer unregulierten Zellzyklusprogression von der G1- in die S-Phase.

1.2.5 Histopathologische Entwicklung

Die Entwicklung von Melanozyten zum malignen Melanom setzt mehrere Schritte voraus, die zeitlich parallel oder auch nacheinander stattfinden können und – wie bereits oben beschrieben – durch verschiedene Mutationen, häufig den MAPK-Signalweg betreffend, getriggert werden. Dabei erlangen die Tumorzellen auf unterschiedliche Art und Weise die Fähigkeit, unabhängig von äußeren Signalen unbegrenzt zu proliferieren [69]. Der weitaus größte Anteil der Melanome entsteht *de novo* in der Epidermis, aber auch eine Entartung bereits bestehender melanozytärer Nävi ist möglich [70]. Das Modell von Wallace H. Clark [71] veranschaulicht die typischen histopathologischen Entwicklungsschritte (Abb. 4). Melanozyten befinden sich normalerweise als einzelne

Zellen oder als Zellverbände in Form von Nävi in der Epidermis, nahe der Basalmembran gelegen. Schon hier lassen sich Mutationen im BRAF-Gen nachweisen, die aber noch nicht ausreichend für eine Tumorentstehung sind und in vielen Fällen eine Onkogen-induzierte Seneszenz auslösen. Über Adhäsionsmoleküle sind die Melanozyten in ein Netz aus Keratinozyten eingebunden, mit denen sie in enger Verbindung stehen und so in Wachstum und Proliferation kontrolliert werden [72]. Durch das Hinzukommen weiterer Mutationen, z.B. im NRAS-Protein und dem Enzym TERT, können sie jedoch unabhängig von äußeren Stimuli werden, was zunächst mit ihrer ungehemmten intraepidermalen Proliferation einhergeht. Es bildet sich ein sogenannter dysplastischer Nävus, klinisch auch atypischer Nävus genannt. Charakteristisch für dieses Stadium ist die noch intakte Basalmembran. Ein wichtiger Unterschied zum invasiven Melanom ist gekennzeichnet durch das Überschreiten der natürlichen Grenze der Basalmembran und häufig von weiteren Mutationen wie z.B. in NRAS und TERT begleitet. Zunächst kommt es zur sogenannten radialen Wachstumsphase (*radial growth phase*, RGP) mit Ausbreitung des Tumors v.a. in der Horizontalen, anschließend wachsen die Melanomzellen während der sogenannten vertikalen Wachstumsphase (*vertical growth phase*, VGP) tief in die Dermis ein. Dieser Schritt wird u.a. durch eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin [73, 74] oder CDKN2A-Mutationen, die zu einem Verlust von p16 führen [67] sowie eine verstärkte Stimulation mit Wachstumsfaktoren, die autokrin oder von benachbarten Keratinozyten sezerniert werden [75], charakterisiert. Mit Hilfe weiterer Mutationen wie dem Verlust von PTEN oder dem Tumorsuppressor p53 sind die Melanomzellen schließlich in der Lage, Gefäße zu arrodieren und sich über die Lymph- oder Blutbahnen in entfernten Organen als Metastasen abzusiedeln. Wie jedes Modell hat jedoch auch das hier vorgestellte seine Grenzen und wurde insbesondere für seine sehr dogmatische Sicht zum Teil stark kritisiert. So kann es weder die *de novo* Melanomentstehung, die den überwiegenden Teil der Melanome ausmacht, erklären, noch die Tatsache, dass während der Melanomentstehung häufig auch einzelne Stufen des Modells übersprungen werden.

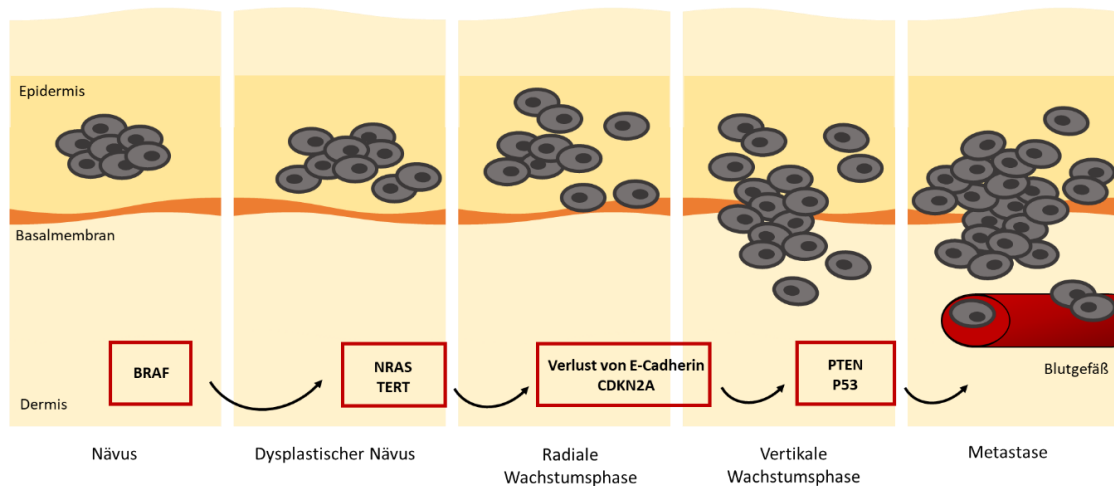


Abb. 4: Modell der Melanomentstehung nach Clark

Schematische Darstellung der Melanomentwicklung im Zusammenhang mit wesentlichen genetischen Veränderungen. Aus einem benignen melanozytären Nävus entwickelt sich, häufig in Begleitung von BRAF-Mutationen, zunächst ein dysplastischer Nävus. Mit Zunahme weiterer Mutationen transformiert sich dieser in ein Melanom, das sich zunächst horizontal in der Epidermis ausbreitet (radiale Wachstumsphase) und ein geringes invasives Potenzial zeigt. Das Durchbrechen der Basalmembran und Einwachsen des Tumors in die Dermis ist u.a. von dem Verlust des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin begleitet und stellt einen Meilenstein für die Melanomprogression dar (vertikale Wachstumsphase). Schließlich kommt es zum Einwachsen des Tumors in Lymph- und Blutgefäße und damit zur Metastasierung in entfernte Organe.

Abbildung in Anlehnung an Miller et al. 2006.

1.3 Therapie des metastasierten Melanoms

Die leitliniengerechte Therapie im lokalen Stadium des malignen Melanoms ist die chirurgische Exzision des Primärtumors mit ausreichendem Sicherheitsabstand sowie ab einer Tumordicke von > 1 cm die Biopsie des Wächterlymphknotens [76]. Patientinnen und Patienten im Frühstadium haben durch dieses Vorgehen sehr gute Heilungschancen. Bei fortgeschrittener Erkrankung mit Metastasierung ist eine Systemtherapie indiziert. Bis 2011 war die Prognose im metastasierten Stadium äußerst schlecht, traditionelle Verfahren wie Radio- oder Chemotherapie mit Dacarbazin, die lange Zeit die einzigen zur Verfügung stehenden therapeutischen Möglichkeiten waren, zeigten mit einem medianen Gesamtüberleben von 6 bis 12 Monaten und einer 5-Jahres-Überlebensrate von 16% wenig Erfolg [7]. Mit der Einführung moderner, effektiver Therapeutika haben sich jedoch eine Vielzahl neuer Optionen eröffnet, die durch hohe Ansprechraten das Gesamtüberleben von Patientinnen und Patienten im fortgeschrittenen Stadium deutlich verbessern konnten [77, 78]. Heutzutage basiert die Therapie des fortgeschrittenen

Melanoms auf zwei Säulen: den Immuntherapien und den zielgerichteten Therapien mit Kinase-Inhibitoren.

1.3.1 Immuncheckpoint-Blockade

Eine Säule der neuen systemischen Therapien stellen die Immuntherapien dar, die unabhängig vom jeweiligen Mutationsstatus angewendet werden. Nachdem sich Therapien mit Interferon und Interleukin-2 zunächst als nur begrenzt wirksam erwiesen, zeigen neuere immuntherapeutische Ansätze sehr gute Erfolge [79]. Durch eine sogenannte Immuncheckpoint-Blockade wirken diese indirekt über das körpereigene Immunsystem, das verstärkt Tumorzellen angreifen soll. Dabei werden zwei Substanzklassen unterschieden, die sich beide als monoklonale Antikörper gegen die tumorinduzierte Hemmung der T-Zell-Aktivierung richten. T-Lymphozyten exprimieren das Oberflächenprotein CTLA-4 (*anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), welches bei einer Aktivierung des T-Zell-Rezeptors ebenfalls aktiviert wird. Über die Bildung eines Komplexes schwächt CTLA-4 die Proliferation der aktivierten T-Zelle, wodurch es zu einer verminderten Stimulation antigenpräsentierender Zellen kommt und eine überschießende Immunantwort verhindert wird. Die Klasse der CTLA-4-Antikörper, zu denen Ipilimumab zählt, blockieren den hemmenden Effekt des Rezeptors und stärken so die T-Zell-Aktivierung [80-82].

Die andere Substanzklasse richtet sich gegen den auf T-Zellen exprimierten Transmembranprotein-Rezeptor PD-1 (*programmed cell death protein 1*) und die dazugehörigen auf Melanomzellen exprimierten Liganden PD-L1 und PD-L2. Durch die physiologische Bindung der Liganden an PD-1 wird die Aktivierung der T-Zelle geschwächt, was die Toleranz der T-Zellen gegenüber Tumorgewebe erhöht. Die PD-1-Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab heben diese hemmende Wirkung auf und erhöhen dadurch die Aktivität des Immunsystems gegen Melanomzellen [83]. Ipilimumab, Nivolumab und Pembrolizumab sind seit 2011 in den USA und seit 2014/2015 auch in Europa für die Therapie des metastasierten Melanoms zugelassen, wobei es keine Beschränkung auf einzelne Subtypen gibt. Neuere Studien belegen einen Vorteil durch Kombination der beiden Substanzklassen, so zeigt sich die Behandlung mit Ipilimumab/Nivolumab als äußerst effektiv [83-89]. Das Ansprechen auf Checkpoint-

Inhibitoren ist sehr unterschiedlich und kann bislang noch nicht im Vorfeld prognostiziert werden. Spricht eine Patientin/ein Patient jedoch auf die Therapie an, kann häufig mit einem langfristigen Ansprechen gerechnet werden [84, 86, 90, 91].

1.3.2 Zielgerichtete Therapie mit Kinase-Inhibitoren

Mit der Entdeckung der BRAF^{V600}-Mutation und damit der bedeutsamen Rolle für den MAPK-Signalwegs für Überleben und Proliferation von Melanomzellen eröffnete sich eine weitere Säule für die Behandlung des metastasierten Melanoms. 2008 gelang es erstmals, mit Hilfe eines selektiven Kinase-Inhibitors das BRAF-Protein durch ATP-kompetitive Bindung zu hemmen und auf diese Weise die Signaltransduktionskaskade des MAPK-Signalwegs zu blockieren. In präklinischen Studien zeigte dieser sogenannte BRAF-Inhibitor (BRAFi) eine deutliche Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose in BRAF^{V600}-mutierten Melanomzellen [92]. Mehrere klinische Studien bestätigten dann für die Behandlung mit den BRAFi Vemurafenib bzw. Dabrafenib höhere Ansprechraten, ein längeres progressionsfreies Überleben sowie ein längeres medianes Gesamtüberleben im Vergleich zur damaligen Standard-Chemotherapie mit Dacarbazin [93-95]. Zudem erwies sich das Nebenwirkungsprofil als akzeptabel, es wurden insbesondere Arthralgien, Hautausschläge, Fatigue und UVA-abhängige Photosensitivität beschrieben, wobei letztere die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen begünstigen kann [96, 97]. Die Antitumoraktivität von Vemurafenib und Dabrafenib ist vergleichbar, schwerwiegende Nebenwirkungen, die zum Abbruch der Behandlung führen, sind jedoch bei Dabrafenib seltener [93, 95]. Daraufhin wurden 2011/2012 Vemurafenib und Dabrafenib in einem verkürzten Verfahren zunächst in den USA und kurz darauf auch in Europa für die Behandlung des metastasierten BRAF^{V600}-mutierten Melanoms zugelassen.

Als weitere Studien eine hohe Sensitivität BRAF^{V600}-mutierter Melanomzellen gegenüber einer Inhibition des MEK-Proteins belegen konnten, verbesserte sich die Prognose für betroffene Patientinnen und Patienten abermals [98]. MEK-Inhibitoren (MEKi) wirken durch kompetitive, allosterische Bindung und sind ähnlich wie BRAFi einer herkömmlichen Chemotherapie mit Dacarbazin deutlich überlegen [62]. Dabei unterscheidet sich das Nebenwirkungsprofil von BRAFi: Am häufigsten treten Hautausschläge, Übelkeit und Diarrhoe sowie periphere Ödeme auf, seltener wurden Hypertension, eine reduzierte

linksventrikulären Ejektionsfraktion und schwerwiegende okuläre Nebenwirkungen beobachtet [99].

Kurze Zeit später verdeutlichten mehrere klinische Studien den Vorteil einer kombinierten Therapie aus BRAFi und MEKi: Durch die Kombination von Dabrafenib/Trametinib bzw. Vemurafenib/Cobimetinib können im Vergleich zur alleinigen BRAFi-Behandlung höhere Ansprechraten und ein längeres progressionsfreies Intervall sowie ein längeres medianes Gesamtüberleben erzielt werden [100-105]. Bemerkenswerterweise führt eine Kombinationstherapie dabei nicht zu einer Kumulation der Nebenwirkungen, sondern im Gegenteil sogar zu einer verbesserten Lebensqualität gegenüber einer Monotherapie mit BRAFi [100, 106]. Am häufigsten treten Fieber, gastrointestinale Beschwerden und Fatigue auf [100]. Diese überzeugenden Ergebnisse mündeten 2014/2015 in die Zulassung der Dabrafenib/Trametinib- bzw. Vemurafenib/Cobimetinib-Kombinationsbehandlung in den USA und Europa, die mittlerweile als Erstlinientherapie des metastasierten BRAF^{V600}-mutierten Melanoms gelten [76]. 2018 wurde mit Encorafenib/Binimetinib eine weitere Kombination zugelassen, die sich dank einer längeren Verweildauer am BRAF-Protein in ihrer Effektivität den anderen beiden Kombinationstherapien bei vergleichbaren Nebenwirkungen als überlegen erweist [107, 108]. Binimetinib zeigt sich zudem als erster zielgerichteter Inhibitor auch im NRAS-mutierten Melanom effektiv [109, 110]. Eine Übersicht über die bedeutendsten klinischen Studien zur Therapie mit BRAFi und BRAFi/MEKi gibt *Tab. 1*.

Studie	Phase	Substanzen	medianes progressionsfreies Überleben (Monate)	medianes Überleben (Monate)	5-Jahres Überleben (%)	Ref.
BRIM-2	II	Vemurafenib	6,8	15,9	-	[111]
BRIM-3	III	Vemurafenib vs. Dacarbazin	5,8	13,6	-	[93, 94]
BREAK-3	III	Dabrafenib vs. Dacarbazin	5,1	-	-	[95]
BRIM-7	I	Vemurafenib + Cobimetinib	13,8	31,2	39	[112]
coBRIM	III	Vemurafenib + Cobimetinib vs. Vemurafenib + Placebo	9,9	22,3	-	[105]
Combi-D	II	Dabrafenib + Trametinib vs. Dabrafenib	9,4	-	-	[100, 113]
Combi-D	III	Dabrafenib + Trametinib	11,0	25,1	34	[104]
Combi-V	III	Dabrafenib + Trametinib vs. Dabrafenib + Placebo	11,4	26,1	34	[101, 106]
COLUMBUS	III	Encorafenib + Binimetinib vs. Vemurafenib/Encorafenib	14,9	33,6	-	[107, 108]
SECOMBIT	II	Encorafenib + Binimetinib gefolgt von Ipilimumab + Nivolumab vs. andere zeitliche Abfolgen der gleichen Medikamente	-	-	-	NCT02631447
CheckMate 067	III	Nivolumab + Ipilimumab vs. Nivolumab + Placebo vs. Ipilimumab + Placebo	11,5	60,0	52	[87]
Trilogy	III	Vemurafenib + Cobimetinib + Atezolizumab vs. Vemurafenib + Cobimetinib + Placebo	-	-	-	[89]

Tab. 1: Bedeutende klinische Studien zur Therapie mit BRAFi- und BRAFi/MEKi

Dargestellt sind bedeutende klinische Studien mit BRAF- und MEK-Inhibitoren am metastasierten Melanom. Angegeben sind neben den Substanzen jeweils das mediane progressionsfreie Überleben und das mediane Gesamtüberleben in Monaten sowie das 5-Jahres-Überleben in Prozent.

1.3.3 Therapie des fortgeschrittenen Melanoms

An die operative Therapie kann gemäß der aktuellen Studienlage und den Empfehlungen der S3-Leitlinie beim fortgeschrittenen Melanom ab dem Stadium AJCC IIA eine adjuvante Systemtherapie angeschlossen werden, um das Rezidivrisiko zu minimieren. Für das Stadium AJCC II soll aktuell unter sorgfältiger Abwägung des zu erwartenden Benefits entsprechend dem Risikoprofil und der möglichen Nebenwirkungen eine

Interferontherapie diskutiert werden [114, 115]. Ab dem Stadium AJCC IIIA sollte eine adjuvante Immuntherapie mit einem anti-PD1-Antikörper (Nivolumab oder Pembrolizumab) durchgeführt werden [116-118]. Bei Patientinnen und Patienten mit V^{600E} oder V^{600K} Mutation wird eine adjuvante Therapie mit BRAFi/MEKi (Dabrafenib und Trametinib) empfohlen [119]. Durch die adjuvante Systemtherapie kann in etwa eine Halbierung der Rückfallrate erreicht werden. Im Tumorstadium AJCC IV wird als Erstlinientherapie grundsätzlich eine Immuntherapie mit einem anti-PD1-Antikörper empfohlen, hier kann auch eine Kombination mit CTLA-4-Inhibitoren erfolgen (Nivolumab und Ipilimumab), die sich als noch effektiver erwiesen hat [86, 118].

1.4 Resistenzentwicklung gegenüber zielgerichteten Inhibitoren

Obwohl ca. 70 % der Patientinnen und Patienten initial auf eine Kombinationstherapie mit BRAFi/MEKi ansprechen [103], ist die Dauer dieses Ansprechens begrenzt. So zeigen 50% der mit BRAFi behandelten Patientinnen und Patienten eine Progression nach 6 bis 8 Monaten [93, 95]. Bei einer Kombinationsbehandlung mit BRAFi/MEKi verzögert sich die Resistenzentwicklung, hier wird bei der Hälfte der Patientinnen und Patienten ein Progress nach 11 bis 12 Monaten beobachtet [100, 101, 104]. Das Verständnis der zugrunde liegenden molekulargenetischen Resistenzmechanismen unter BRAFi- und MEKi-Therapie ist daher weiterhin Gegenstand intensiver Forschung. Bislang konnten zahlreiche Resistenz-vermittelnde Mechanismen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* identifiziert werden, viele Zusammenhänge sind jedoch weiterhin ungeklärt. Bemerkenswerterweise konnte bisher in nur etwa 60% aller Melanome, die eine Progression unter BRAFi-Therapie zeigen, ein spezifischer Resistenzmechanismus identifiziert werden [9].

1.4.1 Tumorheterogenität als Ursache von Resistenz

Das maligne Melanom weist eine einzigartige inter- und intratumorale Heterogenität auf, die von großer Bedeutung für die Entwicklung von Resistenzen ist [28, 120-123]. Diese Tumorheterogenität betrifft nicht nur genetische Unterschiede, sondern schließt epigenetische Veränderungen und das Tumormikromilieu mit ein [122, 124, 125]. Das geht so weit, dass sich sogar beachtliche Unterschiede in verschiedenen Komponenten

desselben Tumorgewebes bzw. derselben Patientin/desselben Patienten an verschiedenen Tumorlokalisationen feststellen lassen. So kommt es zu einem unterschiedlichen Ansprechen einzelner Tumor-Subpopulationen in ein und derselben Patientin/desselben Patienten, wodurch jeweils einige wenige Tumorzellen die Behandlung überleben und Mechanismen entwickeln, mit deren Hilfe sie erneut ungehindert proliferieren.

Aktuell werden im Wesentlichen drei Modelle zur Entstehung der Tumorheterogenität vorgeschlagen [126]. Das weit verbreitete Modell der klonalen Evolution erklärt den veränderten Phänotyp verschiedener Subpopulationen mit zusätzlich erworbenen Mutationen, die einzelnen Zellen einen Überlebensvorteil unter BRAFi- und MEKi-Behandlung verschaffen und so zu einem selektiven Wachstum der besser angepassten Zellklone führt [127, 128]. Das sogenannte Stammzell-Modell nimmt dahingegen eine kleine Population von Tumorzellen an, die über stammzellähnliche Eigenschaften verfügt und allein für das Tumorwachstum verantwortlich ist. Daneben existiert eine große Population nicht-stammzellähnlicher Tumorzellen, die erworbene epigenetische Veränderungen in sich trägt [126, 129, 130]. Das dritte Modell ist das der phänotypischen Plastizität oder des *phenotypic switching*. Es geht davon aus, dass Tumorzellen angeregt durch das Tumormikromilieu ihr Genexpressionsmuster verändern und so dynamisch zwischen verschiedenen phänotypischen und metabolischen Zuständen wechseln können [131-135]. Demnach können Zellen einerseits einen proliferativen Status mit hoher Stoffwechselaktivität und rascher Zellteilung annehmen, andererseits aber auch in einen invasiven Zustand mit einem deutlich verlangsamten Zellzyklus übergehen [136]. Die Tumormikroumgebung wird neben Tumorzellen von Stromazellen wie Fibroblasten und Endothelzellen sowie von Immunzellen wie Neutrophilen, Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen gebildet und spielt für die Entwicklung von Resistenzen gegenüber BRAFi eine entscheidende Rolle [137, 138]. So kann z.B. der von Stromazellen sezernierte Hepatozyten-Wachstumsfaktor (*hepatocyte growth factor*, HGF) über den MET-Rezeptor zu einer Reaktivierung von MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg in Melanomzellen führen [139, 140].

Bezüglich der Mechanismen, die Resistenz gegenüber BRAFi bzw. BRAFi/MEKi vermitteln, wurde eine Einteilung in sogenannte primäre (intrinsische) [139] und sekundäre (erworbene) [24, 141] Resistenzmechanismen vorgeschlagen. Primäre Resistenzen lassen

sich dabei schon vor Therapiebeginn nachweisen und führen zu einem geringeren Ansprechen oder sogar einer vollständigen Resistenz gegenüber BRAFi bzw. MEKi. Hierzu zählen u.a. der Verlust des Tumorsuppressors PTEN, Amplifikationen von Cyclin D1 bzw. Mutationen im CDK4-Gen (*siehe 1.2.4*). Sekundäre Resistenzen entwickeln sich hingegen während der initial erfolgreichen Therapie mit BRAFi bzw. BRAFi/MEKi und führen so nach einigen Monaten der Regression zum Therapieversagen und Progression der Erkrankung. Da die zugrunde liegenden Mechanismen teilweise identisch sind und es auch Hinweise auf ein kurzfristiges primäres Ansprechen gibt, das aber aufgrund einer sehr raschen Resistenzentwicklung im Sinne einer Anpassungsreaktion der Tumorzellen gar nicht beobachtet wird [142, 143], scheinen die Übergänge zwischen intrinsischen und erworbenen Resistenzen fließend und eine klare Zuordnung nicht immer möglich und sinnvoll. Im Folgenden werden die häufigsten erworbenen Resistenzmechanismen gegenüber einer Therapie mit BRAFi bzw. MEKi beschrieben.

1.4.2 Reaktivierung des MAPK-Signalwegs

Eine Reaktivierung des MAPK-Signalwegs zeigen 50-70% aller BRAFi-resistenten Melanome [9, 10, 144]. Für Patientinnen und Patienten, die einen Progress unter BRAFi/MEKi-Therapie erleben, gilt das sogar in 9 von 10 Fällen [145]. Dies verdeutlicht die Relevanz des MAPK-Signalwegs für Melanomzellen.

Einer der häufigsten Mechanismen, der zu einer Reaktivierung des MAPK-Signalwegs in resistenten Melanomzellen führt, ist der Zugewinn an BRAF-Kopien, sogenannte BRAF-Amplifikationen. Diese finden sich in etwa 20% aller BRAFi-resistenten Tumoren [144] und Patientinnen/Patienten, die einen Progress unter Dabrafenib/Trametinib-Therapie erlitten, zeigten eine höhere Anzahl an BRAF-Kopien als Patientinnen/Patienten mit Progress unter Dabrafenib allein [145]. Des Weiteren werden in etwa 30% der BRAFi- und auch in BRAFi/MEKi-res Melanomen sogenannte *Splice*-Varianten von BRAF gefunden. BRAF hat hier die RAS-Bindedomäne verloren, was zu einer reduzierten Bindungsaffinität für BRAFi, nicht jedoch für MEKi führt [145, 146].

Neben Alterationen von BRAF können auch MEK1/2-Mutationen Resistenzen gegenüber BRAFi und MEKi vermitteln [9, 10, 147, 148]. Dabei scheint es, dass MEK2-Mutationen eine übergeordnete Rolle spielen und allein in der Lage sind, unter einer

Kombinationsbehandlung mit Dabrafenib/Trametinib eine ERK-Phosphorylierung und Zellproliferation aufrecht zu erhalten [145].

Der oben beschriebene Expressionsverlust des Tumorsuppressors NF1 kann ebenfalls im Verlauf einer BRAFi- bzw. MEKi-Therapie erworben werden. Er geht mit einer verstärkten Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch verminderte Hemmung von RAS einher [66, 149]. Des Weiteren finden sich Mutationen, die den MAPK-Signalweg unabhängig von BRAF aktivieren und so die Behandlung mit einem BRAFi umgehen. Hier sind aktivierende NRAS-Mutationen zu nennen, die häufig sind und deren Bedeutung im Zusammenhang mit BRAFi-Resistenz besonders gut erforscht ist [9, 24, 88, 128]. Unter BRAFi bewirkt onkogen mutiertes NRAS über eine Aktivierung von CRAF und Umgehung von BRAF eine verstärkte MEK-Phosphorylierung.

Auch eine Überexpression der Kinasen COT oder CRAF selbst kann Resistenz gegenüber BRAFi vermitteln, indem MEK unabhängig von BRAF phosphoryliert und somit der MAPK-Signalweg aktiviert wird [141, 150].

1.4.3 Aktivierung anderer Signalwege

Trotz der Relevanz des MAPK-Signalwegs für die Entwicklung von Resistenzen gegenüber BRAFi und MEKi zeigt sich in etwa 20% aller BRAFi-resistenten Melanome der MAPK-Signalweg weiterhin gehemmt [9], was auf Resistenzmechanismen außerhalb dieses Signalwegs schließen lässt.

Insgesamt zeigen über 50% der Melanome eine Deregulierung des PI3K-Signalwegs [151]. Melanome, die eine frühe Resistenz gegenüber BRAFi oder MEKi entwickeln oder bereits eine intrinsische Resistenz gegenüber BRAFi oder MEKi aufweisen, zeigen in 10-20% einen neu aufgetretenen Verlust des Tumorsuppressors PTEN oder Mutationen von PI3K oder AKT [10, 61, 128]. Jede dieser Veränderungen führt zu einer konstitutiven Aktivierung des PI3K-Signalwegs und Patientinnen/Patienten mit einem Verlust von PTEN zeigten ein geringeres Ansprechen und ein kürzeres progressionsfreies Überleben unter der Therapie mit Dabrafenib [152, 153].

Häufig findet sich auch eine Hochregulierung bzw. verstärkte Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen wie z.B. *insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF1R) [154], *epidermal growth factor receptor* (EGFR) [155], *fibroblast growth factor receptor* (FGFR)

[156] oder *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR β) [24]. Über diese können dann verschiedene Signalwege, wie z.B. der MAPK- und der PI3K-Signalweg, aber auch der PLC- und JAK-STAT-Signalweg aktiviert werden. Neben einer Hochregulierung der genannten Rezeptoren können auch die jeweiligen Liganden wie z.B. EGF und FGF sowohl durch Stromazellen als auch durch Melanomzellen selbst verstärkt sezerniert werden [75, 158-160].

In einem hohen Anteil BRAFi- bzw. BRAFi/MEKi-resistenter Melanome finden sich jedoch keine der bekannten Resistenz-vermittelnden Veränderungen. Bemerkenswerterweise zeigt sich in BRAFi/MEKi-res Zellen die Behandlung mit einem BRAFi häufig erfolgreich, obwohl der MAPK-Signalweg weiterhin aktiv zu sein scheint [145]. Das bestätigt sich anfänglich in klinischen Studien, die trotz Therapieansprechen ebenfalls eine nur unvollständige Hemmung des MAPK-Signalwegs unter BRAFi/MEKi beobachten. Dies könnte auf intrinsische Resistenzmechanismen in einem Teil der Tumorzellen hinweisen [90]. Es wird zunehmend deutlich, dass sich Melanomzellen unter dem selektiven Druck zielgerichteter Therapien weiterentwickeln. Durch vorbestehende oder neu erworbene genetische Mutationen besser angepasste Zellklone werden so im Verlauf der Behandlung selektioniert, was dazu führt, dass häufig mehrere Mechanismen nebeneinander in ein und demselben Tumor existieren [9, 10, 128]. Das primäre Therapieansprechen scheint demzufolge nur einen Teil der Tumorzellen abzutöten und bietet besonders weniger sensiblen Zellen eine Nische, um weiter zu proliferieren.

1.5 Bedeutung des FGFR-Signalwegs im Melanom

Die zu der großen Gruppe der RTK zählende Familie der transmembran-ständigen FGF-Rezeptoren (*fibroblast growth factor receptors*, FGFR) setzt sich aus fünf Mitgliedern zusammen (FGFR1-5), die über 22 verschiedene FGF-Liganden (*fibroblast growth factors*, FGF) aktiviert werden [161-164]. Die Struktur der an der Zelloberfläche lokalisierten FGFR ist hoch konserviert, sie besteht aus einem extrazellulären Abschnitt mit drei Immunglobulin-ähnlichen Bindedomänen, einem transmembranösen Abschnitt und einem intrazellulären Abschnitt mit katalytischer Kinase-Aktivität. Durch alternatives Splicen der dritten Bindedomäne entstehen mehrere FGFR-Isoformen [161, 165].

Mit Hilfe von Heparansulfat-Proteoglykanen als Co-Faktoren binden FGF spezifisch an die extrazelluläre Domäne des FGFR, wodurch es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung der intrazellulären Rezeptordomäne kommt [166]. Daraufhin kommt es über die Phosphorylierung von PLC γ 1 und FRS2 zur Aktivierung verschiedener Signalwege wie dem MAPK-, JAK/STAT- und PI3K/AKT-Signalweg [167, 168]. So vermitteln FGFR Überleben, Proliferation, Differenzierung und Migration der Zelle [164, 167, 169]. Daher spielt der FGF-FGFR-Signalweg insbesondere während der Embryogenese, aber auch später für die Gewebemöostase, Wundheilung und Angiogenese eine wichtige Rolle [164].

FGFR wirken zugleich als Protoonkogene, sie haben einen anti-apoptotischen und die Proliferation verstärkenden Einfluss, tragen zur epithelialen-mesenchymalen Transition bei und vermitteln Neoangiogenese und Metastasierung [170]. Veränderte FGFR-Expressionen wurden in verschiedenen Tumorentitäten gefunden, u.a. im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, Glioblastom, Urothel-/Blasenkarzinom und Cholangiokarzinom [171, 172]. Hierzu zählen Gen-Amplifikationen und -Translokationen, *Gain-of-Function*-Mutationen, Liganden-abhängige Aktivierungen sowie Überexpressionen von FGFR und FGF [171, 172].

Auch im malignen Melanom wurden Alterationen im FGFR-Status beobachtet [75, 173, 174]. Erhöhte Expressionen verschiedener FGFR und FGF konnten sowohl in Primärtumoren als auch in Metastasen gefunden [159, 174] und mit einer verstärkten Tumorprogression assoziiert werden [172]. Die FGFR-Inhibition konnte das Melanomwachstum *in vitro* und *in vivo* hemmen [174]. Zudem gibt es Hinweise, dass Veränderungen im FGF-FGFR-Signalweg auch eine Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen gegenüber zielgerichteten Inhibitor-Therapien mit BRAFi und MEKi spielen [139, 173]. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind allerdings Großteils noch nicht abschließend erforscht. Hierdurch sind FGF-Rezeptoren und deren Liganden interessante therapeutische Zielstrukturen für das fortgeschrittene Melanom. Mehrere spezifische FGFR-Inhibitoren (FGFRi) wurden bereits entwickelt und zum Teil klinisch erprobt [175], so dass potenzielle Substanzen für eine FGFRi-Behandlung zur Verfügung stehen. Bislang gibt es jedoch nur wenige Untersuchungen zu FGFRi im Melanom, insbesondere in Bezug auf die Wirksamkeit in BRAFi/MEKi-resistenten Melanomen. In Anbetracht bislang fehlender überzeugender Therapiealternativen für das BRAF^{V600}-mutierte Melanom nach

Resistenzentwicklung gegenüber BRAFi und MEKi sind weitere Erkenntnisse zur Bedeutung des FGF-FGFR-Signalwegs und der Wirksamkeit einer FGFR-Inhibition in BRAFi/MEKi-res Melanomen dringend erforderlich.

Der pan-FGFRi Infigratinib (BGJ-398) hemmt selektiv FGFR1/2/3 und führte in verschiedenen Modellen zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase, wirkte antiproliferativ und induzierte die Apoptose in Tumorzellen [176-178]. Bislang zeigte Infigratinib dabei ein akzeptables Nebenwirkungsprofil, es wurden hauptsächlich Fatigue, Diarrhoe, Hyperphosphatämie und Nagelschäden beobachtet [177, 179].

1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die zielgerichtete Kombinationstherapie aus BRAFi/MEKi gehört mittlerweile zum festen Bestandteil einer modernen Therapie des fortgeschrittenen BRAF^{V600}-mutierten malignen Melanoms. Dabei ist die Resistenzentwicklung innerhalb kurzer Zeit für die Mehrheit der Patientinnen und Patienten weiterhin der limitierende Faktor. Ein tieferes Verständnis der zugrunde liegenden Resistenzmechanismen und darauf aufbauend die Identifikation weiterer potenzieller therapeutischer Angriffspunkte, die sich gerade im Stadium der BRAFi/MEKi-Resistenz als effektiv erweisen, ist daher von größter klinischer Relevanz. Neben aktivierenden Mutationen im MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg gibt es Hinweise, dass verstärkte FGFR- und FGF-Expressionen eine wesentliche Rolle bei der Resistenzentwicklung spielen könnten. Die Expressionen von FGFR und FGF sowie die Wirksamkeit eines FGFRi sind jedoch in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Melanomzellen noch wenig untersucht. Die vorliegende Arbeit möchte hierzu einen Beitrag leisten, indem folgende Fragestellungen untersucht wurden:

1. Welche Effekte hat der FGFRi Infigratinib auf Melanomzellen, auch in Kombination mit BRAFi und MEKi?
2. Welche Rolle spielt der FGF-FGFR-Signalweg bei der Vermittlung von Resistenz gegenüber BRAFi und MEKi in Melanomzellen?
3. Welche Rezeptoren und Liganden sind dabei involviert?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Die für diese Arbeit verwendete humane WM9 Melanomzelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Meenhard Herlyn (Wistar Institute, Philadelphia, PA, USA) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um eine aus einer Lymphknotenmetastase eines Patienten hergestellte und etablierte Melanomzelllinie mit einem metastatischen Wachstumsmuster (Herlyn et al., 1985). Sie trägt die BRAF^{V600E}-Mutation, während N-RAS, c-KIT und CDK4 als Wildtyp vorkommen.

Bei den Zelllinien LMU-KM11 und LMU-KM14 handelt es sich um kurzzeitig kultivierte humane Melanomzelllinien, die zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils frisch aus kutanen Melanommetastasen einer an der Klinik für Dermatologie und Allergologie der LMU behandelten Patientin gewonnen wurden. Die Patientin befand sich bereits bei Erstdiagnose in einem metastasierten Stadium. Der Tumor zeigte eine BRAF^{V600E}-Mutation.

2.1.2 Zellkultur

2.1.2.1 Medien

Medium für Melanozyten

		V	C (final)
Medium 254CF	Gibco by Life Technologies	500 ml	
		99%	
Humanes Melanozyten- Wachstums-Supplement (HMGS-2)	Gibco by Life Technologies	5 ml	1%
CaCl ₂ , 0,2 M	Gibco by Life Technologies	0,5 ml	0,2 mM
Volumen gesamt		505 ml	

Medium für Melanomzellen (TU2%)

		V	C (final)
MCDB153 in H ₂ O bidest., pH 7,4 eingestellt mit NaHCO ₃	Sigma Gibco by Life Technologies	400 ml	78%
Leibovitz L-15	Gibco by Life Technologies	100 ml	20%
Fetales Kälberserum (FBS)	Cansera	10 ml	2%
Insulin	Sigma	0,25 ml	10 µg/ml
CaCl ₂ 2 M	Sigma	0,42 ml	1,68 mM
Volumen gesamt		560,67 ml	

Luria Broth (LB) Medium

LB Puder	Sigma	12,5 mg
H ₂ O bidest.	Hausapotheke, Klinikum der LMU	500 ml
Volumen gesamt, autoklaviert		500 ml

2.1.2.2 Lösungen

Phosphat-gepufferte Saline (PBS)	Hausapotheke, Klinikum der LMU
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Gibco by Life Technologies
0,05 % Trypsin/EDTA in HBSS	Gibco by Life Technologies
0,2% EDTA in PBS	Hausapotheke, Klinikum der LMU
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma

Verdau-Lösung zur Aufbereitung primärer Melanomzellen

		V	C (final)
Stock 10 x	Sigma	1 ml	
Kollagenase (0,5%)			0,05%
Dispase (0,73%)			0,073%
Hyaluronidase (1%)			0,1%
HBSS		9 ml	
Volumen gesamt		10 ml	

Einfrierlösung zum Lagern der Zellen in flüssigem Stickstoff

Fetales Kälberserum (FBS) + 10% DMSO

2.1.2.3 Antibiotika und Antimykotika

Antibiotika für die Selektion

Ampicillin, Stockkonzentration 100 mg/ml	Sigma	100 x
Kanamycin, Stockkonzentration 10 mg/ml	Gibco by Life Technologies	100 x
Puromycin, Stockkonzentration 10 mg/ml	Life Technologies	100 x

Antibiotika und Antimykotika zum Aufbewahren der Zellen

Antibiotikum/Antimykotikum

(Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B)	Gibco by Life Technologies	100 x
--	----------------------------	-------

2.1.3 Inhibitoren

Name	Abkürzung	Ziel	Hersteller
Vemurafenib (PLX4032)	Vem	BRAF	Selleckchem
Dabrafenib	Dab	MEK	Selleckchem
Selumetinib	Sel	MEK	Selleckchem
Trametinib	Tra	MEK	Selleckchem
Buparlisib (BKM120)	Bup	PI3K	Selleckchem
Ravoxertinib (GDC-0994)	Rav	ERK	Selleckchem
Infigratinib (BGJ-398)	Inf	FGFR	Selleckchem

2.1.4 Puffer, Reagenzien und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden in H₂O bidest. (Hausapotheke, Klinikum der LMU) oder in Aqua ad injectabilia (Braun) zubereitet.

2.1.4.1 Puffer, Reagenzien und Lösungen für die Proteinpräparation

Cold Spring Harbor (CSH) Puffer

		C (final)
Tris-HCL pH 7,4	Sigma	50 mM
NaCl	Sigma	250 mM
EDTA	Sigma	1 mM
H ₂ O bidest.		ad 20 ml
Volumen gesamt		20 ml

Lysepuffer für die Proteinpräparation (Mengen für 1 ml)

5x CSH Puffer		200 µl
TritonX-100	Sigma	10 µl
Complete Stock Protease-Inhibitoren (1 Tabl. in 1,5 ml H ₂ O bidest.)	Roche	150 µl
PhosStop Protease-Inhibitoren (1 Tabl. in 1 ml H ₂ O bidest.)	Roche	100 µl
H ₂ O bidest.		540 µl
Volumen gesamt		1000 µl

2.1.4.2 Puffer, Reagenzien und Lösungen für den Immunoblot

1x Laufpuffer

NuPAGE® MES SDS Running Buffer	Life Technologies	50 ml
NuPAGE® Antioxidanz	Life Technologies	0,5 ml
H ₂ O bidest.		949,5 ml
Volumen gesamt		1000 ml

1x Transferpuffer

NuPAGE® Transferpuffer	Life Technologies	25 ml
Methanol, pro analysi	Merck	50 ml / 100 ml für 2 Blots
NuPAGE® Antioxidanz	Life Technologies	0,5 ml
H ₂ O bidest.		ad 500 ml
Volumen gesamt		500 ml

1x Blockierlösung

Western Blocking Reagenz	Roche	50 ml
Natriumfluorid 0,5 M	Sigma	50 ml
PBS	Hausapotheke, Klinikum der LMU	450 ml
Volumen gesamt		550 ml

1x Waschpuffer

Tween20	Calbiochem/Merck	0,5 ml (0,1%)
PBS	Hausapotheke, Klinikum der LMU	500 ml
Volumen gesamt		500,5 ml

2.1.4.3 Puffer, Reagenzien und Lösungen für den Sphäroid-Assay

Kollagen-Mix

Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 10x	Lonza	420 µl
Fetales Kälberserum (FBS)	Millipore/Merck	462 µl
L-Glutamin 100 x	Gibco by Life Technologies	38 µl
NaHCO ₃ 7,5 %	Gibco by Life Technologies	78 µl
Kollagen Typ I aus der Ratte mit 0,05% AcOH auf 1,3 mg/ml verdünnt	Biosciences	3,5 ml

Der Kollagen-Mix wurde auf Eis angefertigt und durch Zugabe von weiterem NaHCO₃ auf eine orange-rote Farbe gebracht.

Agar für Lochplatten

Select-Agar in 500 ml LB Medium, autoklaviert	Life Technologies	7,5 g
---	-------------------	-------

2.1.4.4 Puffer, Reagenzien und Lösungen für die Durchflusszytometrie

Annexin V-Färbung (Menge für eine Probe)

Annexin V Fluos	Roche	1 µl
Färbepuffer		49 µl
HEPES pH 7,4 10 mM	Sigma	
NaCl 140 mM	Sigma	
CaCl ₂ 5 mM	Sigma	
Volumen gesamt		50 µl

Propidiumjodid-Färbung (Menge für eine Probe)

Propidiumjodid 0,5 mg/ml in PBS	Sigma	10 µl
Färbepuffer		50 µl
Volumen gesamt		60 µl

2.1.4.5 Puffer, Reagenzien und Lösungen für Molekulare Analysen

Chloroform	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC) 0,1% in H ₂ O bidest., autoklaviert	Sigma
Dithiothreitol (DTT) (0,1 M)	Invitrogen
DNase I	Invitrogen
dNTP Mix (jeweils 10 mM)	Amersham Biosciences
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid (10 µg/ml)	Sigma
First-Strand Puffer (5x)	Roche
Lipofectamin TM RNAiMax Reagenz	Life Technologies
Oligo(dT) ₁₅ (500 µg/ml)	Promega
OPTi-MEM Medium	Life Technologies
Rekombinantes RNasin	Promega
RNaseOUT TM Recombinanter Ribonuklease Inhibitor (40 U/µl)	Invitrogen
SuperScriptII TM Reverse Transcriptase (200 U/µl)	Invitrogen
Trizol Reagent	Invitrogen

2.1.5 Kommerziell erhältliche Kits

Amersham™ ECL™ Prime Western Blot Detection Reagent	GE Healthcare
Pierce™ BCA Protein Assay	ThermoFisher Scientific
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega
Human Phospho-Kinase Array	R&D Systems, ARY003C
LightCycler® TaqMan® Master	Roche
Venor® GeM	Minerva Biolabs
Reverse Transkriptase	Roche
RNeasy™ Mini Kit	Qiagen
QIAshredder	Qiagen

Puffer und Lösungen von kommerziellen Kits sind nicht eigens aufgelistet.

2.1.6 Oligonukleotide

2.1.6.1 Primer und Sonden für die quantitative Echtzeit-PCR

Gen	vorwärts	rückwärts	Sonde
CTNNB1	gctttcagttgagctgacca	caagtccaagatcagcagctctc	# 21
EGFR	catgtcgatggacttccaga	gggacagcttggatcacact	# 44
ERK1	ccctagcccagacagacatc	gcacagtgtccattttctaacagt	# 16
ERK2	tctgcaccgtgacctcaa	gccaggccaaagtacacag	# 62
FGFR1	acaacctgccttatgtccaga	tccatctctttgtcgggtgt	# 67
FGFR2	ggacccaaaatgggagtttc	accacttgcccaaagcaa	# 14
FGFR2IIIb	cctgccaacacagcaagc	aagaccctatgcagtaaattgg	# 80
FGFR2IIIc	ctcacttcacaaccaatgagg	aactaggtgaatactgttcgagagg	# 30
FGFR3	tcctcgggagatgacgaa	cagcagcttctgtccatcc	# 30
FGFR4	gccgtcaagatgctcaaag	gatcagcttcatcacctccat	# 54
FGFR5	cagcctgagcgtcaactaca	ctctccttcctgggctaata	# 42
FGF1	gggctttatagcgtcaca	tgcttcttggatatataggtgtgtaa	# 19
FGF2	ttcttctgcatccac	cctctcttctgctgaagttg	# 7
FGF7	aagggaccaagagatgaaga	cctttgattgccacaattcc	# 59

FGF10	gaaggagaactgccctgaca	ggcaacaactccgatttctact	# 80
PIK3CA	cacgagatcctctctctgaaatc	ggtagaatttcggggatagttaca	# 15
WNT1	cgctggaactgtcccact	aacgccgtttctcgacag	# 81
WNT3A	aactgcaccaccgtccac	aaggccgactccctggta	# 64
WNT4	gcagagccctcatgaacct	caccgcgatgtgtgtcag	# 4
WNT5A	attgtactgcaggtgtaccttaaac	ccccctataaatgcaactgttc	# 48

Alle Primer wurden über Eurofins Genomics (Ebersberg) bezogen.

2.1.6.2 Small Interfering RNA (siRNA)

Name	Gen	Sequenz
siFGFR1	SASI_Hs01_00126674	augaacuccacguugcuac
siFGFR2	SASI_Hs01_00221068	uggcaguacaagcauagag
siFGFR3	SASI_Hs01_00154694	aucauguacaggucgugug
siFGFR4	SASI_Hs01_00130921	uaaucaaggugagauucug
siFGF7	SASI_Hs01_00097196	gagaugaagaauaaauaca

Alle siFGFRs und siFGF7 wurden über Sigma-Aldrich bezogen.

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Primäre Antikörper

Ziel	Quelle	Hersteller	Verdünnung
ERK1/2	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
pERK1/2	Maus	Cell Signaling	1:1000
pAKT (Ser473)	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
pAKT (Thr308)	Maus	Cell Signaling	1:1000
pRb	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
β-Aktin	Maus	Sigma	1:5000
β-Catenin	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
Cyclin D1	Maus	Thermo Scientific	1:1000
Caspase 3	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000

p65	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
pospho-p65	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
pGSK	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
MITF	Maus	Thermo Scientific	1:100
FGFR1	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
FGFR2	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
FGFR3	Maus	Santa Cruz	1:500
pFGFR3	Kaninchen	Santa Cruz	1:500
FGFR4	Maus	Santa Cruz	1:500
FGF7	Maus	Santa Cruz	1:500
p38	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
phospho-p38	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
phospho-p90RSK	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
phospho-mTOR (Ser2448)	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
phospho-p70S6K (Ser371)	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
phospho-p53	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
pSTAT3 (Ser727)	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
pPLCgamma1	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
pJNK	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
p-cJun(Ser63)	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
PARP	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
XIAP	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000

2.1.7.2 Sekundäre Antikörper

Name	Quelle	Hersteller	Verdünnung
Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert	Pferd	Cell Signaling	1:5000
Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	Ziege	Cell Signaling	1:2000
Anti-Ziege IgG, HRP-konjugiert	Esel	Santa Cruz	1:30000

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Amicon® Ultra 0,5 ml Zentrifugenfilter	Millipore/Merck
Einmal-Glaspipetten (5, 10 ml)	Corning
Einmal-Küvetten, Semi-Micro PMMA (1,5 ml)	Brand
Einmal-Skalpell	Braun
Einmal-Spritzen	Becton Dickinson
FACS-PE Glasröhrchen (5 ml)	Falcon/Becton Dickinson
Filtropur BT50 500 ml Flaschen-Filter (0,2 µm Porengröße)	Sarstedt
Hyperfilm ECL	GE Healthcare
Kryo-Gefäße (2 ml)	Greiner bio-one
LightCycler-Kapillaren	Roche
NuPAGE® Novex® 4-12% Bis Tris Gel, (1,0 mm), 10 Taschen	Life Technologies
Nylonmembran, positiv geladen	Roche
Objektträger und Glasplättchen	Menzel-Gläser
Parafilm	Bemis
Pasteur-Pipetten	Hirschmann
PCR-Mikroreaktionsgefäße (0,6 ml)	Agilent Technologies
Petrischalen (94x16 mm)	Greiner bio-one
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen, gestopft	Kisker
Reaktionsgefäße mit rundem Boden (12 ml)	Greiner bio-one
Safe-lock Reaktionsgefäße (2 ml)	Eppendorf
SafeSeal Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt
Rotilabo® Spritzen-Filter (0,22 µm Porengröße)	Roth
Zellkulturflaschen Biotac®, Kollagen-beschichtet (25 cm ²)	Becton Dickinson
Zellkulturflaschen mit Filterverschluss (25, 75 cm ²)	Greiner bio-one
Zellkultur-Lochplatten (6-, 24-, 96-Loch)	Greiner bio-one
Zellsieb, Nylon (100 µm)	BD Falcon™
Zellschaber (24 cm)	TPP
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Greiner bio-one
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Greiner bio-one

2.1.9 Apparative Ausstattung

CO ₂ -Inkubator Heraeus	Heraeus
Durchflusszytometer FACScan	Perkin-Elmer
Entwicklungsgerät KODAK RP X-OMAT für Röntgenfilme	Kodak
Fluoreszenz-Mikroskop Axioskop mit Mrc und Mrc 5 Kamera	Zeiss
Fluorimeter Cytofluor 2350	Millipore/Merck
LightCycler™ 2.0 Gerät	Roche
Luminometer GloMAX® 96	Promega
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Mikroskop CK2	Olympus
Mikroskop Olympus BX51 mit DP21 Kamera	Olympus
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Photometer SmartSpec 3000	Biorad
RoboCycler® Thermocycler	Stratagene/Agilent Technologies
Schüttler Swip	Edmund Bühler
Sterile Werkbank HERAsafe	Heraeus
Stromversorgungsmodul 200/2.0 und Pac300	Bio-Rad
Thermomixer (5436)	Eppendorf
Tischzentrifuge (5415 C)	Eppendorf
Tischzentrifuge (5415 R)	Eppendorf
Tischzentrifuge, gekühlt (5810 R)	Eppendorf
Vortex Gerät	Scientific Industries
Wasserbad	Bachhofer
XCell II™ Blot Modul	Life Technologies
XCell SureLock™ Minizell-Elektrophorese-System	Life Technologies
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich AG

2.1.10 Software

Assay Design Center

Roche

www.universalprobelibrary.com

AxioVision rel. 4.7.2 Mikroskop-Software

Zeiss

EndNote X9

HeatMapper Version 13

GenePattern

<http://genepattern.broadinstitute.org/gp/>

Illustrator CS5

www.adobe.com

Microsoft Office 2010

Microsoft Word 2010

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung der Melanomzellen

Die Melanomzellen wurden in einem luftbefeuchteten Brutschrank bei 37°C und 5% Kohlenstoffdioxid (CO₂) in TU2% Medium kultiviert. Sie wurden regelmäßig lichtmikroskopisch auf Zellvitalität und Hinweise von Verunreinigung durch Pilze oder Bakterien kontrolliert. Zweimal in der Woche fand ein Wechsel des Mediums statt, bei 80-90% Konfluenz wurden die Zellen gesplittet. Hierzu wurde unter dem Abzug steril gearbeitet.

Zum Splitten wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit HBSS gewaschen und zum Ablösen vom Boden der Zellkulturflaschen anschließend mit 2 ml Trypsin für ca. 3 min inkubiert. Die Reaktion mit Trypsin wurde durch die Zugabe von 4 ml TU2% beendet. Dann wurde die Zellsuspension in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 3 min ein Zellpellet gewonnen. Dieses wurde in frischem TU2% Medium aufgelöst und je nach Dichte und Wachstumsgeschwindigkeit gesplittet.

Zum Einfrieren von Zellen wurde ein Drittel einer konfluent bewachsenen 75 ml Zellkulturflasche wie beim Splitten mit Trypsin vom Boden der Flasche gelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in 1 ml Einfriermedium (EFM) aufgenommen und die Zellsuspension zügig in gekühlte Einfriergefäße überführt. Diese wurden dann sofort bei -80°C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Bei längerfristigem Einfrieren wurden die Einfriergefäße in einen Stickstofftank überführt. Um Zellen aus -80°C aufzutauen, wurden die Einfriergefäße zunächst bei 37°C aufgetaut und die Zellsuspension dann zügig in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 4 ml TU 2% überführt. Die Zellen wurden für 3 min bei 1000 rpm abzentrifugiert, erneut in 10 ml TU 2% mit Antibiotikum/Antimykotikum aufgenommen und in eine 75 ml Zellkulturflasche gegeben. Diese wurde dann wie üblich kultiviert, wobei am nächsten Tag ein Mediumwechsel erfolgte. Bevor die Zellen für Experimente zur Verfügung standen, wurden sie ein- bis zweimal gesplittet.

Für Experimente im 96-, 24- oder 6-Well-Format erfolgte zunächst eine Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer und dann die Aussetzung der Zellen mit einer Konfluenz von 60-70% (entsprechend 100.000 Zellen im 6-Well-Format).

2.2.1.2 Isolierung von Melanomzellen aus Frischgewebe

Tumorproben primärer oder metastatischer Melanomtumore, die direkt aus Patientinnen/Patienten gewonnen werden konnten, wurden zunächst mit HBSS gewaschen, dann mit Hilfe eines Skalpells von überschüssigem Gewebe befreit und in etwa 1 mm³ große Stücke zerschnitten. In einer 10 cm² Zellkulturplatte wurden diese dann bei 37°C in 5 ml Verdaulösung (mit Kollagenase, Hyaluronidase, Dispase) inkubiert, um so auch noch die die Tumorzellen umgebende extrazelluläre Matrix proteolytisch zu zersetzen. Mit DMSO/10% FBS wurde der Verdau nach einer Stunde gestoppt, die groben Überreste mit Hilfe eines Siebes herausgefiltert und verworfen und die Tumorzellsuspension bei 2000 rpm und Raumtemperatur (RT) für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml TU2% mit Antibiotikum/Antimykotikum aufgenommen und die Zellen bei 37°C in Biocat 25 cm² Flaschen inkubiert. Die Kollagenbeschichtung ermöglichte ein besseres Anhaften der Zellen am Boden der Flasche. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Bei einer Dichte von 80-90% konnten die Zellen in die üblichen Zellkulturflaschen überführt und darin weiter kultiviert werden.

2.2.2 Gen- und Proteinexpression

2.2.2.1 Quantifizierung der Genexpression

2.2.2.1.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde gemäß den Herstellerangaben mit dem *RNeasy™ Mini Kit* (Quiagen) durchgeführt. Hierzu wurden die in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesetzten Melanomzellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 500 µl RLT-Buffer (Quiagen) für 5 min bei RT inkubiert. Dieser lysiert die Zellen und stabilisiert gleichzeitig die enthaltene RNA. Mittels Zellschaber wurden die Zellen anschließend gänzlich vom Boden der Platten gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Lysate 30 s mit dem Vortexer gemischt. Anschließend wurden 500 µl 70% Ethanol in RNase-freiem Wasser (H₂O-DEPC) hinzugefügt und weiter nach den Herstellerangaben verfahren. Die gereinigte RNA wurde in 30-50 µl RNase-freiem Wasser (H₂O-DEPC) gelöst und entweder vorübergehend bei -80°C gelagert oder es wurde sofort die Konzentration der RNA bestimmt.

2.2.2.1.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung wurde die RNA 1:20 mit 10 mM TRIS verdünnt und die optische Dichte (OD) bei 260 nm in einer Quartz-Küvette mit einem SmartSpec 3000 Photometer gemessen. Es wurden je 80 µl in die Küvette pipettiert, 10 mM TRIS diente als Referenz. Die RNA-Konzentration wurde mit folgender Formel berechnet: $RNA (\mu g/ml) = A_{260} \times 20 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 40 \mu g/ml \text{ (Konversionsfaktor)}$. 1 OD entsprach einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

2.2.2.1.3 Synthese der cDNA

Die Expression eines Gens kann über die Anzahl an Kopien des *messenger RNA* (mRNA)-Transkriptes dieses Gens bestimmt werden. mRNA ist jedoch äußerst instabil und eignet sich deshalb nicht für die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Daher erfolgt zunächst eine Umschreibung der mRNA in die stabilere *complementary DNA* (cDNA) mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Hierfür wurde als Primer Oligo-Deoxythymidin (poly-dT) verwendet, wobei es sich um einen kurzen DNA-Abschnitt handelt, der an den für mRNA spezifischen poly-A-Schwanz des 3'-Endes bindet und so der RT den Synthesestart ermöglicht.

Für die Synthese der cDNA wurden 450-1000 ng isolierte RNA in RNase-freiem Wasser (H₂O/DEPC) zu einem Gesamtvolumen von 8,5 µl aufgenommen und 2 µl (entsprechend 500 ng) poly-dT (15 dTs, Eurofins Genomics, Ebersberg) hinzugefügt. Um die RRA zu Denaturieren wurde der Ansatz für 10 min bei 65°C in einem RoboCycler® Thermo Cycler inkubiert und anschließend sofort abgekühlt.

Die anschließende cDNA-Erststrangsynthese mittels RT-Reaktion wurde für 1 h im Wasserbad bei 42°C mit folgendem Ansatz durchgeführt:

RNA in H ₂ O/DEPC + poly-dT		10,5 µl
5x First Strand Buffer	Roche	4 µl
Dithiothreitol (DTT, 0,1 M)	Roche	2 µl
dNTPs (10 mM)	Roche	2 µl
RNAsin	Promega	0,5 µl
Reverse Transkriptase	Roche	1 µl
Volumen gesamt		20 µl

Anschließend wurde jede Probe in 40 µl RNase-freiem Wasser (H₂O/DEPC) verdünnt und je 3 µl (entsprechend 50 ng cDNA) für die quantitative Echtzeit-PCR (*quantitative real time PCR*, qRT-PCR) verwendet oder die Proben vorübergehend bei -80°C gelagert.

2.2.2.1.4 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Spezifische Genabschnitte der cDNA können mittels quantitativer Echtzeit-PCR quantifiziert werden. Diese kombiniert die konventionelle PCR mit einem Fluoreszenzfarbstoff, über den das amplifizierte PCR-Produkt quantifiziert werden kann. Hierzu wird eine sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte Sonde an die DNA hybridisiert und zusammen mit dieser amplifiziert, wobei die Fluoreszenzentwicklung angeregt über einen Laser nach jedem Amplifikationszyklus in Echtzeit gemessen wird. Da die Zunahme des emittierten Lichts proportional zur Menge des entstehenden PCR-Produkts ist, kann nach Abschluss der Reaktion die Menge der amplifizierten DNA ermittelt werden.

Die Reaktionskurve der PCR zeigt einen sigmoidalen Verlauf: zu Beginn kommt die Reaktion aufgrund der noch geringen DNA-Menge erst langsam in Fahrt, in der sogenannten exponentiellen Phase zeigt sich aufgrund ausreichender DNA, Substrate und Enzym die höchste Reaktionsgeschwindigkeit und gegen Ende stellt sich durch den Verbrauch von Enzym und Substraten sowie die Anhäufung störender Nebenprodukte ein Plateau ein. Für die Quantifizierung des PCR-Produktes wird die exponentielle Phase gewählt, deren Beginn der Threshold Cycle (CT-Wert), auch Crossing Point (CP) genannt, markiert. Damit wird der Zeitpunkt bezeichnet, an dem das Fluoreszenz-Signal erstmals die Hintergrundfluoreszenz übersteigt.

Bei jeder qRT-PCR werden eine Kontroll-Probe (unbehandelte Zellen) und daraus generierte Verdünnungen mitgemessen, aus denen eine Standardkurve ermittelt wird. Anhand dieser kann mit Hilfe des CT-Werts die relative Menge eines PCR-Produktes bestimmt werden. Zusätzlich zum Zielgen wird als Referenz ein sogenanntes Housekeeping-Gen gemessen, das ubiquitär und stabil in der Zelle exprimiert wird. Die Werte der Zielgene werden dann auf die Referenzwerte normiert. Es handelt sich also um eine relative Quantifizierung, da keine absoluten Mengen sondern lediglich PCR-Produkte verschiedener Ansätze miteinander verglichen werden können.

Für die qRT-PCR wird eine thermostabile DNA-Polymerase, die sogenannte Taq-Polymerase, benötigt, die auch bei hohen Temperaturen arbeitet. Mit Hilfe spezifischer Primer bindet sie an den vorgesehenen cDNA-Abschnitt und beginnt mit der Synthese eines komplementären DNA-Stranges. Zusätzlich werden fluoreszenzmarkierte Hybridisierungssonden, sogenannte LNA (*Locked Nucleic Acids*)-Sonden eingesetzt. Diese sind kurze Nukleinsäuren, die chemisch so modifiziert wurden, dass sie eine höhere Bindungsaffinität als natürlich vorkommende Nukleinsäuren aufweisen. An ihrem 5'-Ende sind sie mit Fluoreszein und an ihrem 3'-Ende mit Hilfe eines Quenchers markiert, der die Fluoreszenz unterdrückt. Da die Taq-Polymerase gleichzeitig über eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität verfügt, beginnt sie bei Erreichen der Sonden, diese abzubauen. So wird das Fluoreszein vom Quencher getrennt und es kommt zu einem Fluoreszenzsignal. Durch die Kombination genspezifischer Primer mit LNA-Sonden kann mit nur 90 verschiedenen Sonden fast das gesamte in die Referenzdatenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) eingepflegte menschliche Transkriptom detektiert werden.

Für diese Arbeit wurde die qRT-PCR über die Lightcycler®-Technologie mit dem Lightcycler® Taqman® Master Kit (Roche) durchgeführt. Die genspezifischen Primer wurden über das *Assay Design Center* bezogen, die fluoreszenzmarkierten LNA-Sonden von der *Universal Probe Library* (Roche), beide sind in Kapitel 2.1.6.1 aufgelistet. Als Housekeeping-Gen wurde die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gewählt.

Für alle Reaktionen einheitlicher Ansatz für eine Probe:

H ₂ O, PCR grade	4,5 µl
Sonde	0,1 µl
Primer vorwärts (10 µM)	0,2 µl
Primer rückwärts (10 µM)	0,2 µl
Master Mix (mit Enzym)	2,0 µl
cDNA	3,0 µl
Volumen gesamt	10 µl

H₂O, Sonde, Primer und Master Mix wurden zusammen auf Eis in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und vorsichtig gemischt. Jeweils 7 µl des Reaktionsansatzes wurden in Lightcycler®-Kapillaren (Roche) vorgelegt und 3 µl der cDNA dazu gegeben. Die Kapillaren wurden bei 1000 rpm und 4°C für 30 s zentrifugiert. Die qRT-PCR wurde mit einem LightCycler® 2.0-Gerät (Roche) durchgeführt. Dabei lief das Programm folgendermaßen ab:

Initiale Denaturierung	94°C	10 min	1 Zyklus
Amplifizierung und Quantifizierung	94°C	10 s	insgesamt
	60°C	30 s	50 Zyklen
	72°C	1 s	
Abkühlung auf 40°C	0,1°C/s		

2.2.2.2 Zellyse und Proteinpräparation

Um Gesamtzellprotein zu isolieren, wurden die Zellen entweder aus einer Zellkulturflasche oder aus einer 6-Loch-Zellkulturplatte nach vorangegangener dreitägiger Behandlung als Pellet geerntet. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 0,2% EDTA in PBS bei 37°C und 5% CO₂ für 5-10 min inkubiert und lösten sich so vom Boden ab. Die Zellen wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß bei 2600 rpm und 4°C für 2,5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zwei weitere Male mit

PBS gewaschen und abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 50 µl CSH-Puffer gelöst und zur Zelllyse für 30 min auf Eis inkubiert. Das gelöste Protein wurde dann durch 20-minütige Zentrifugation bei 13.200 rpm und 4°C von den Zellfragmenten getrennt und als Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) durchgeführt. Bei diesem Assay wird die Reduktion von Cu² zu Cu¹ durch Protein in einem alkalischen Milieu – auch Biuret-Reaktion genannt – mit dem Nachweis von Cu¹ durch Bicinchoninsäure (BCA) kombiniert. Durch Chelatisierung zweier BCA-Moleküle mit einem Kupferion entsteht ein intensiv violett gefärbter Komplex, der bei 562 nm eine lineare Extinktion zeigt. Reagenz A wurde in Reagenz B im Verhältnis 1:50 gelöst und jeweils 1 ml der Lösung in Plastik-Küvetten vorgelegt. Mit in CSH-Puffer verdünntem Kälberserumalbumin (BSA, New England Biolabs, 10 mg/ml) wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 80, 40, 20, 10 und 5 mg/ml erstellt, die als Standardkurve diente. Je 10 µl Proteinlysate bzw. 10 µl der BSA-Verdünnungen sowie 10 µl CSH-Puffer als Referenz wurden in die Küvetten dazu gegeben. Die Proben wurden kurz mit dem Vortexer gemischt, dann für 30 min abgedunkelt bei RT inkubiert und vor der Messung abermals mit dem Vortexer gemischt. Die OD wurde mit einem SmartSpec 3000 Photometer bei 562 nm gemessen. Dabei entsprach 1 OD einer Protein-Konzentration von 10 µg/µl. Die Proteine wurden anschließend bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 Immunoblot nach Lämmli

Mit Hilfe des Immunoblots nach Lämmli können Proteine ihrer Größe nach getrennt und auf eine Membran übertragen werden. Anschließend werden die Proteine über eine Antikörper-vermittelte Reaktionen semiquantitativ nachgewiesen.

2.2.2.3.1 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen zum semiquantitativen Nachweis gelang mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Alle hierfür benötigten Reagenzien sowie das Kammeresystem und die Gele wurden bei Life Technologies erworben. Das Gesamtprotein der Zellen wurde zunächst wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben isoliert und die Konzentration bestimmt. Dann wurden je 7,5 – 15 µg Protein zu einem Volumen von 15,6 µl in H₂O

verdünnt, mit 6 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer und 2,4 µl NuPAGE® Reducing Agent in einem Gesamtvolumen von 24 µl aufgenommen. Die Proteine wurden für 10 min bei 70°C denaturiert. Die Gelelektrophorese wurde in einem XCell SureLock™ mini-cell System durchgeführt. Nach dem Aufbau der Kammer und dem Einsetzen des NuPAGE® Novex® 4-12% Bis Tris Gels wurde die äußere Kammer mit Laufpuffer und die innere Kammer mit 200 ml Laufpuffer plus 500 µl NuPAGE® Antioxidant befüllt. Die Proteine sowie 10 µl SeeBlue® Plus2 pre-stained als Größenmarker wurden auf dem Gel geladen. Die Elektrophorese wurde bei 150 Volt für etwa 45 min durchgeführt. Hierbei werden die Proteine durch das parallel zum Gel angelegte elektrische Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, da kleine Proteine schneller durch das Gel wandern als große.

2.2.2.3.2 Proteintransfer

Die mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden mit dem XCell II Modul auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran übertragen. Blotting Pads, Filterpapier und Membran wurden ebenfalls von Life Technologies bezogen. Die Membran wurde für 30 s in 100% Methanol aktiviert, für 2 min in H₂O gewaschen und dann zusammen mit den Blotting Pads für etwa 15 min in Transferpuffer mit 0,1% Antioxidant und 10% Methanol (20% bei zwei Gelen) getränkt. Die Anordnung im Modul für ein Gel sah folgendermaßen aus: Kathode – 3 Pads – Filterpapier – Gel – Membran – Filterpapier – 3 Pads – Anode. Bei zwei Gelen wurde so angeordnet: Kathode – 2 Pads – Filterpapier – Gel – Membran – Filterpapier – 1 Pad – Filterpapier – Gel – Membran – Filterpapier – 2 Pads – Anode. Die innere Kammer wurde mit Transferpuffer mit 0,1% Antioxidans gefüllt, die äußere Kammer zum Kühlen mit destilliertem Wasser. Der Elektroblot erfolgte bei 30 Volt für etwa 70 min, dabei wandern die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membranoberfläche, wo sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Die Membran wurde anschließend kurz mit PBS/0,1% Tween20 gewaschen und dann für 1 h bei RT in Blockierlösung auf dem Schüttler inkubiert. So konnten unspezifische Antikörper-Bindungen reduziert werden.

2.2.2.3.3 Proteindetektion

Um spezifische Proteine nachzuweisen, erfolgte die Inkubation der Membran mit einem Primärantikörper bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler (*siehe Kapitel 2.1.7.1*), der in Blockierlösung gelöst wurde. Antikörper von Cell Signaling wurden in 5% BSA/0.1% Tween20 mit 0,02% Natriumazid gelöst. Am folgenden Tag wurde die Immunoblot-Membran dreimal für 10 min auf dem Schüttler mit PBS/0,1% Tween20 gewaschen, um schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran für 1 h bei RT auf dem Schüttler mit dem korrespondierenden in Blockierlösung verdünnten Sekundärantikörper inkubiert (*siehe Kapitel 2.1.7.2*). Dieser richtet sich gegen die Fc-Region des Primärantikörpers und ist mit einer aus dem Meerrettich gewonnenen Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) konjugiert. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal gewaschen, um überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen.

Die Protein-Detektion geschieht über eine Chemilumineszenz-Reaktion des an den Sekundärantikörper gebundenen HRP mit einem Detektions-Reagenz. Dabei entsteht durch die Oxidation von Luminol ein Lumineszenz-Signal, das auf einem Film sichtbar gemacht werden kann. Hierzu wurde die Membran zwischen zwei Folien platziert, der überschüssige Waschpuffer ausgestrichen und die Membran mit 1,5 ml *Amersham Enhanced Chemiluminescence (ECL) Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare, Reagenz A und B im Verhältnis 1:1) für 5 min abgedunkelt bei RT zwischen den Folien inkubiert. Das Lumineszenz-Signal wurde in einer Dunkelkammer mittels ECL Hyperfilmen (GE Healthcare) detektiert, die Detektionszeit war abhängig von der Proteinmenge und dem verwendeten Primärantikörper und lag zwischen 1 s und 10 min. Die Filme wurden mit einem RP X-OMAT 1000 (KODAK) automatisch entwickelt.

2.2.3 Bestimmung der Zellvitalität

Die Vitalität der kultivierten Melanomzellen wurde mit Hilfe des CellTiter-Blue® Cell Viability Assays festgestellt. Der darin enthaltene dunkelblaue Redoxfarbstoff Resazurin wird durch den Stoffwechsel vitaler Zellen zu dem rötlichen Resafurin reduziert. Dadurch verändert sich das Absorptionsmaximum von 600 nm nach 560 nm, was fluorimetrisch gemessen werden kann.

Die Zellen wurden in einer 6- oder 24-Loch-Kulturplatte behandelt. Das Kulturmedium wurde zunächst auf ein einheitliches Volumen reduziert (750 µl bei 6-Loch-Platten und 250 µl bei 24-Loch-Platten) und das CellTiter-Blue®-Reagenz im Verhältnis 1:6 dazu gegeben. Der Ansatz wurde kurz geschüttelt und für 45-60 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Frisches Kulturmedium mit CellTiter-Blue®-Reagenz im gleichen Verhältnis diente als Referenz. Sobald eine deutliche Farbentwicklung sichtbar war, wurden aus jeder Probe zweimal 100 µl abgenommen und in eine 96-Loch-Kulturplatte pipettiert. In dieser erfolgte dann die Messung an einem Cytofluor 2350 Fluorimeter bei einem Absorptionsmaximum von 560 nm und einem Emissionsmaximum von 590 nm.

2.2.4 Analyse der Invasionskapazität mittels Sphäroid-Assay

Um die Invasionskapazität der Zellen dreidimensional zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Sphäroid-Modell eingesetzt.

2.2.4.1 Sphäroidbildung

Um ein Anhaften der Zellen am Boden der Zellkulturplatten zu verhindern und so eine Sphäroidbildung zu ermöglichen, wurde zunächst Agar hergestellt, mit dem der Boden der Platten bedeckt werden sollte. Hierfür wurden 1,5% Agar Noble in 20 ml PBS aufgelöst und in kleine Glasflaschen abgefüllt. Diese wurden autoklaviert und dann bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Zum Ausplattieren wurde der Agar in der Mikrowelle erneut erhitzt und verflüssigt und dann je 50 µl pro Loch blasenfrei in eine 96-Loch-Zellkulturplatte pipettiert. Dabei wurde steril unter dem Abzug gearbeitet. Anschließend wurde die Platte bei RT für ca. 1 h inkubiert, bis sich der Agar abgekühlt und wieder verfestigt hatte. Für die Untersuchung der Sphäroidbildung wurden jeweils 5000 Zellen in 100 µl TU2% Medium in die mit Agar bedeckten 96-Loch Zellkulturplatten ausgesetzt und bei 37°C und

5% CO₂ inkubiert. Bei den resistenten Zelllinien wurden dem Medium die jeweiligen Inhibitoren zugefügt. Über 7 Tage wurde die Formierung der Sphäroide beobachtet und mit Hilfe eines Lichtmikroskops fotografiert. So konnte der Zeitpunkt der Sphäroidbildung für jede Zelllinie genau ermittelt werden, er lag abhängig von der Zelllinie bei 1-4 Tagen nach Aussetzen der Zellen.

2.2.4.2 Einbetten der Sphäroide in Kollagen

In einem nächsten Schritt wurden die entwickelten Sphäroide zu dem zuvor ermittelten Zeitpunkt in Kollagen eingebettet. Hierzu wurde ein Kollagen-Mix (Kollagen Typ I aus der Ratte, Biosciences) auf Eis angesetzt (*siehe Kapitel 2.1.4.3*). Für resistente Zellen wurden zusätzlich die jeweiligen Inhibitoren zugefügt, wobei die Konzentration doppelt so hoch wie üblich gewählt wurde, da sich der Kollagen-Mix mit dem TU2% 1:2 verdünnte. Je 100 µl des Kollagen-Mix wurden anschließend vorsichtig zu den Sphäroiden auf die 100 µl TU2% in die 96-Loch-Platten pipettiert. Diese wurden dann weiter bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Einwachsen der Zellen in das Kollagen wurde wiederum über 6 Tage hinweg unter dem Lichtmikroskop fotografisch dokumentiert.

In einem weiteren Versuch wurden dem Kollagen-Mix zusätzlich verschiedene Kombinationen der zu testenden Inhibitoren zugefügt, als Kontrolle diente DMSO. Die Konzentration der Inhibitoren wurde abermals doppelt so hoch wie üblich gewählt und wiederum 100 µl des Kollagen-Mix auf die Sphäroide pipettiert. Diese bei 37°C und 5% CO₂ für 6 Tage inkubiert. Alle zwei Tage erfolgte eine Fotodokumentation am Lichtmikroskop.

2.2.5 Zelltodanalyse mittels Durchflusszytometrie

Das Signal zum Übergang in die Apoptose kann extrinsisch über Todesrezeptoren wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) oder intrinsisch durch zellulären Stress über die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien vermittelt werden. Beide Wege führen durch die Expression pro-apoptotischer und gleichzeitigen Hemmung anti-apoptotischer Faktoren schließlich zu einer Aktivierung von Cysteinaspertat-spaltenden Proteinase, den sogenannten Caspasen. Zusammen mit DNAsen sorgen diese für die Proteolyse und DNA-Fragmentierung [180]. Die Zelle schrumpft, der Zellkern kondensiert, Zellinhalte werden in Vesikel verpackt und Zellkontakte zu umliegenden Zellen gelöst. Zudem wird Phosphatidylserin (PS) an die Außenseite der Zellmembran verlegt und dient als Signal für Makrophagen, die apoptotische Zelle zu phagozytieren. Während all dieser Vorgänge bleibt die Zellmembran intakt. Dem programmierten Zelltod steht die Nekrose gegenüber, die durch äußere Schäden, wie z.B. Infektionen oder Gewebeerletzungen entsteht. Die Nekrose geht immer mit einer Zerstörung der Zellmembran und Freilassung intrazellulärer Bestandteile in den Extrazellularraum einher, was zu einer inflammatorischen Antwort des umliegenden Gewebes führt. Dies kann genutzt werden, um apoptotische von nekroptotischen bzw. nekrotischen Zellen zu unterscheiden.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie, auch FACS-Analyse (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) genannt, können Fluoreszenz-markierte Zellen untersucht und nach ihren optischen Emissionen bei der Passage durch einen Laserstrahl in verschiedene Populationen eingeteilt werden. Dazu werden die Zellen zunächst mit fluoreszenzmarkiertem Annexin V (AV) inkubiert, das spezifisch an PS bindet. Durch eine Kopplung von AV mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) kommt es im Durchflusszytometer durch eine Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm zu einer messbaren Fluoreszenz. AV kann jedoch nicht zwischen dem an die Außenseite der Membran verlegten PS apoptotischer Zellen und intrazellulär gelegenem PS differenzieren. Für die Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen wird daher gleichzeitig eine Färbung mit Propidiumjodid (PJ) durchgeführt. PJ kann die intakte Zellmembran nicht überwinden und dringt nur in Zellen mit beschädigter Membran ein. Dort interkaliert es in doppelsträngige DNA, was zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums von 590 nm nach 617 nm und dadurch zu einer Intensitätssteigerung des emittierenden Lichts um das 20- bis 30-fache führt. Folglich werden durch die Kombination beider Färbungen lebende

Zellen mit intakter Membran weder mit AV noch mit PJ angefärbt und apoptotische Zellen zeigen sich AV-positiv. Bei Zellen, die sich sowohl mit AV als auch mit PJ positiv färben lassen, kann nicht zwischen Apoptose und Nekrose diskriminiert werden. Die auf diese Weise fluoreszenzmarkierten Zellen werden anschließend mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

Für die Zelltodanalyse wurden je 80 000 Melanomzellen in einer 6-Loch-Zellkulturplatte in TU2% Medium ausgesetzt und am folgenden Tag mit den jeweiligen Inhibitoren behandelt. Nach drei Tagen wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 0,2% PBS/EDTA für 5-10 min bei 37°C inkubiert, vom Boden der Platten abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die gelösten Zellen wurden für 2 min bei 2400 rpm und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet zwei weitere Male in PBS gewaschen und abzentrifugiert. Unter der abgedunkelten Werkbank wurden 20 µl Annexin-V-Fluos in 1000 µl Färbepuffer (10 mM HEPES pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) gegeben und das trockene Pellet dann in 50 µl der Lösung aufgenommen und für 10-15 min im Dunklen bei RT inkubiert. Ebenso wurden 200 µl PJ mit 1000 µl Färbepuffer gemischt und davon je 60 µl in Glasröhrchen vorgelegt. Nach der Inkubationszeit für AV wurde die Zellsuspension zu der PJ-Lösung in die Glasröhrchen überführt und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Zellsuspensionen zügig auf Eis zum Durchflusszytometer gebracht und die optischen Emissionen gemessen.

In *Abb. 5* sind repräsentative Punkt-Histogramme der Analyse BRAFi/MEKi-res WM9 nach Behandlung mit verschiedenen Inhibitor-Kombinationen gezeigt. AV- und PJ-negative Zellen (Quadrant links unten) entsprechen vitalen Zellen. Die Zellen der restlichen drei Quadranten erscheinen AV- und/oder PJ-positiv, befinden sich also gerade in der Apoptose oder sind bereits tot.

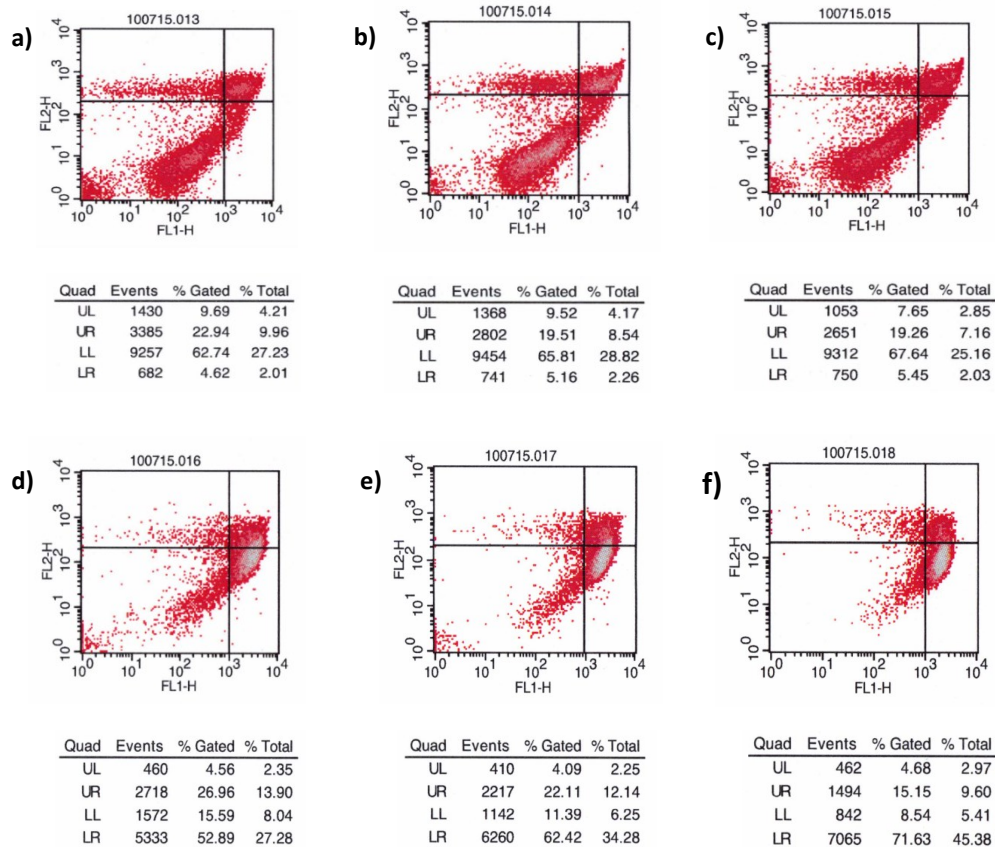


Abb. 5: Repräsentative Punkt-Histogramme fluoreszenzmarkierter BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen nach Analyse mittels Durchflusszytometrie

Quantifizierung der Zelltodinduktion 3 Tage nach Behandlung mit **a)** DMSO als Kontrolle, **b)** 1 μM Vemurafenib, **c)** 1 μM Vemurafenib und 10 μM Selumetinib, **d)** 2 μM Infigratinib, **e)** 2 μM Infigratinib und 1 μM Vemurafenib, **f)** 2 μM Infigratinib, 1 μM Vemurafenib und 10 μM Selumetinib. Die Zellen wurden mit AV und PJ gefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Quadranten zeigen intakte Zellen (unten links, AV-/PJ-), in Apoptose befindliche, jedoch noch intakte Zellen (unten rechts, AV+/PJ-), durch Nekrose zugrunde gegangene Zellen (oben links, AV-/PJ+) und tote Zellen, bei denen nicht zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden werden kann (oben rechts, AV+/PJ+). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Punkt-Histogramm von 3 unabhängigen Experimenten.

2.2.6 Inhibition der Genexpression mittels RNA-Interferenz

2.2.6.1 Entwicklung spezifischer siRNA

Die hier verwendeten siRNA wurden nach den Standards von Reynolds [181] und Ui-Tei [182] entwickelt. Die Kontroll-siRNA wurde so gewählt, dass sie mit keiner Sequenz des menschlichen Transkriptoms interferieren konnte.

2.2.6.2 Transfektion von siRNA

Für die Transfektion von siRNA wurden die Melanomzellen in eine 6-Loch-Zellkulturplatte mit etwa 70% Konfluenz in TU2%-Medium ausgesetzt und nach 24 h transfiziert. Dazu wurden 1,25 µl der siRNA (20 µM) in 125 µl serumreduziertem Medium (Opti-MEM, Life Technologies) verdünnt. Analog dazu wurden 1,25 µl Lipofectamin RNAiMAX (Life Technologies) in 125 µl Opti-MEM verdünnt. Nach etwa 2 min wurden beide Lösungen vereint, vorsichtig gemischt und wiederum 15-20 min bei RT inkubiert, um eine Komplexierung der siRNA mit Lipofectamin RNAiMAX zu ermöglichen. Das TU2%-Medium wurde in der 6-Loch-Zellkulturplatte durch 1,25 ml frisches TU2% ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 250 µl der komplexierten siRNA tröpfchenweise in das TU2% auf die Zellen pipettiert, so dass sich ein Gesamtvolumen von 1,5 ml mit einer siRNA-Konzentration von 20 nM je Loch ergab. Die Inhibition der Genexpression wurde anschließend durch qRT-PCR und Immunoblot überprüft. Als Kontrollvektor dienten allein mit Transfektionsreagenz behandelte Zellen.

2.2.7 Humaner Phospho-Kinase-Array

Um einen Überblick über das Phosphorylierungsprofil von Kinasen verschiedenster intrazellulärer Signalwege zu erhalten, wurde ein humaner Phospho-Kinase-Array (R&D Systems, ARY003C) eingesetzt. Dieser erlaubt die Detektion des relativen Phosphorylierungsgrades von 43 Kinase-Phosphorylierungsstellen sowie von 2 Proteinsubstraten mit Hilfe von Antikörpern auf einer Nitrozellulose-Membran, ähnlich einem Immunoblot. Dies kann Aufschluss über Anpassungsvorgänge auf die Behandlung mit den verschiedenen Inhibitoren innerhalb der Zellen geben. Für die Anwendung des Arrays wurden zunächst jeweils 10^7 Zellen gesammelt, als Pellet geerntet und vorübergehend bei -80°C eingefroren. Nachdem von jeder Zelllinie ausreichend Zellen

gesammelt waren, wurden die Pellets aufgetaut, mit PBS gewaschen und danach entsprechend den Herstellerangaben aufbereitet, auf die Membran aufgetragen und die Antikörper zuletzt mit Hilfe des RP X-OMAT 1000 (KODAD) detektiert.

2.2.8 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit Varianz-Analysen (ANOVA) und nachfolgenden post-hoc t-Tests unter Verwendung der *open-source* Software JASP durchgeführt. Die Ergebnisse der t-Tests wurden mit Hilfe des Tukey-Verfahrens für multiples Testen korrigiert. Werte mit $p < 0.05$ gelten als signifikant (*), Werte $p < 0.005$ als hoch signifikant (**) und Werte mit $p < 0.001$ als höchst signifikant (***). Nicht signifikante p-Werte wurden nicht eigens gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Generierung BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen

Für die Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit wurden aus BRAF^{V600E}-mutierten WM9-Melanomzellen verschiedene BRAF-Inhibitor-resistente (BRAFi-res) sowie BRAF/MEK-Inhibitor-resistente (BRAFi/MEKi-res) Zellen generiert. WM9 ist eine humane, aus einer axillären Metastase generierte Melanomzelllinie. Sie trägt eine V600E (Val600Glu)-Mutation des BRAF-Gens und eine hemizygote Deletion des PTEN-Gens. NRAS, c-KIT und CDK4 liegen in der Wildtyp-Form vor. Für die Generierung resistenter Zellen wurden der BRAFi Vemurafenib (PLX4032, Vem) und die MEKi Selumetinib (AZD6244, Sel), Cobimetinib (GDC-0973, Cob) und Trametinib (GSK-1120212, Tra) verwendet. Jeder dieser Inhibitoren ist bereits in klinischen Studien am Melanom untersucht, mit Ausnahme von Selumetinib sind alle zur Erstlinientherapie des fortgeschrittenen BRAF-mutierten Melanoms zugelassen [93, 95, 101, 102, 104]. Da sich die Cobimetinib- und Trametinib-resistenten Melanomzellen deutlich schwieriger anzüchten ließen als die Selumetinib-resistenten, konzentriert sich diese Arbeit auf die Ergebnisse an Vemurafenib- und Vemurafenib/Selumetinib-resistenten Zellen, die im Folgenden als Vem-res bzw. Vem/Sel-res WM9 bezeichnet werden.

Zunächst wurde durch 3-tägige Behandlung der ursprünglichen (parentalen) Zellen mit aufsteigenden Inhibitor-Konzentrationen und anschließender Vitalitätsmessung mittels CellTiter-Blue[®] Assay jeweils die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) bestimmt (*Daten nicht gezeigt*). Die IC₅₀ eines Inhibitors ist die Konzentration, bei der eine halbmaximale Inhibition erreicht wird.

Mit dieser Konzentration wurden die Zellen dann durchschnittlich über 6-10 Wochen zunächst mit dem BRAFi Vemurafenib behandelt. An den so generierten Vem-res Zellen konnte die erworbene Resistenz im Vergleich zu parentalen Zellen mittels erneuter Vitalitätsmessung nachgewiesen werden. Hier zeigten parentale WM9 nach 3-tägiger Inhibitor-Behandlung eine deutlich geringere Vitalität als resistente (*Abb. 6a*). Vem-res Zellen wurden daraufhin zusätzlich mit der zuvor ermittelten IC₅₀ des jeweiligen MEKi behandelt und so Vem/Sel-res, Vem/Cob-res und Vem/Tra-res Zellen generiert. Auch hier konnte anschließend in der Vitalitätsbestimmung eine erhöhte Resistenz gegenüber der Behandlung im Vergleich zu parentalen Zellen gezeigt werden (*Abb. 6b am Beispiel von*

Vem/Sel-res WM9). Mittels Western Blot wurde anschließend die Phosphorylierung von ERK detektiert (Abb. 6c und d). Im Vergleich zu parental Zellen blieb ERK in den resistenten Zellen auch bei höheren Inhibitor-Konzentrationen phosphoryliert und der MAPK-Signalweg somit trotz Inhibitor-Behandlung aktiviert.

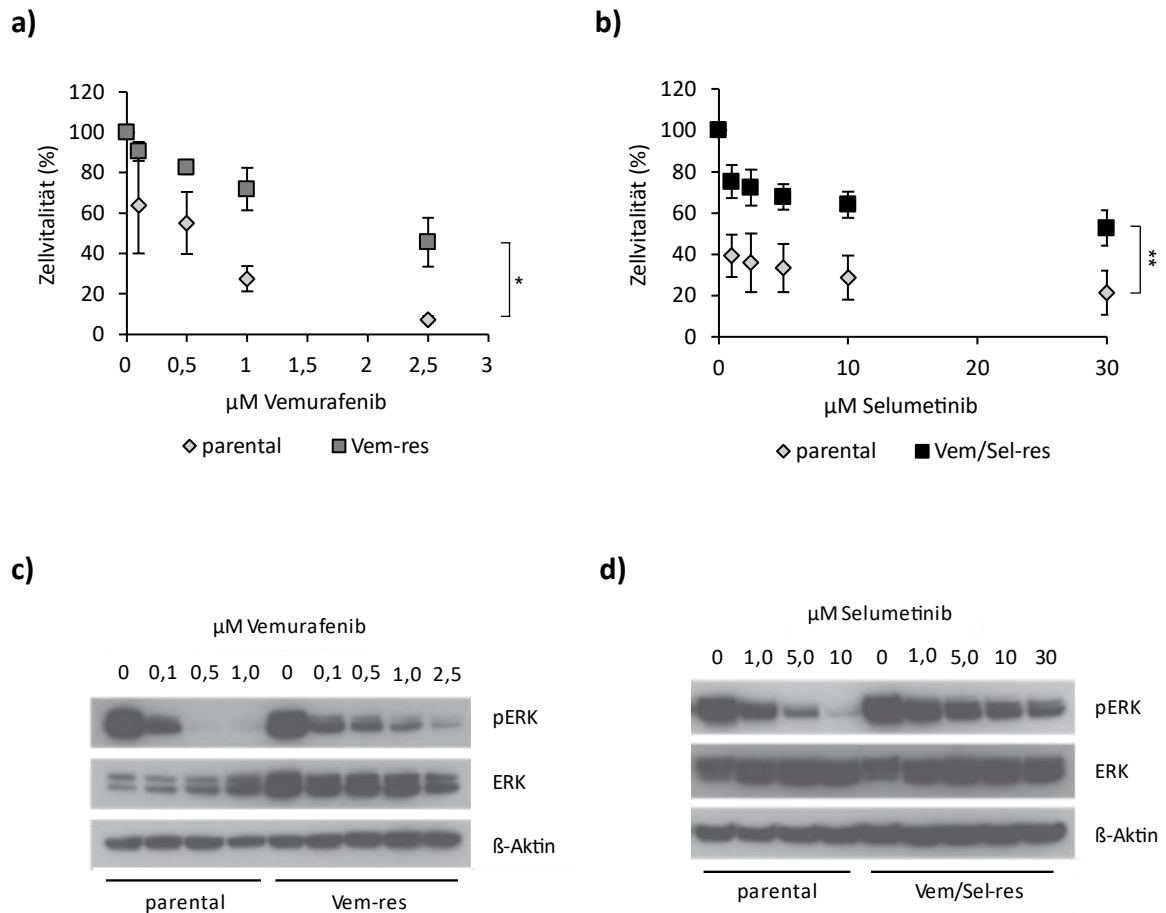


Abb. 6: Generierung BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen

Die erworbene Resistenz gegenüber Vemurafenib und Vemurafenib/Selumetinib wurde mittels CellTiter-Blue® Assay 3 Tage nach Behandlung mit steigenden Inhibitor-Konzentrationen im Vergleich zu parental Zellen überprüft, n = 3. **a)** Unter der Behandlung mit Vemurafenib zeigten Vem-res Zellen im Mittel eine signifikant höhere Vitalität als parentale Zellen ($p = 0.004$). **b)** Unter der Behandlung mit Vemurafenib/Selumetinib zeigten Vem/Sel-res Zellen eine signifikant höhere Vitalität als parentale Zellen ($p < 0.01$). Im Western Blot fand sich eine ERK-Aktivierung in Form von pERK in **c)** Vem- und **d)** Vem/Sel-res WM9 3 Tage nach Behandlung mit Vemurafenib bzw. Vemurafenib/Selumetinib. Abhängig von der Inhibitor-Konzentration blieb ERK in resistenten Zellen phosphoryliert und der MAPK-Signalweg somit aktiviert. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

3.2 Analyse BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen

Um eine Übersicht über die bedeutendsten mit Melanom-Progression und Resistenzentwicklung assoziierten Signalwege und deren Aktivität in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen zu erhalten, wurde die Expression ausgewählter Gene in parentalen und resistenten WM9 mit Hilfe der Echtzeit-PCR analysiert und die entsprechenden Proteine mittels Western Blot detektiert.

3.2.1 Reaktivierung des MAPK-Signalwegs

Eine Reaktivierung des MAPK-Signalwegs findet sich in etwa 50% BRAFi- und in über 80% BRAFi/MEKi-res Melanomzellen [9, 145]. Früh auftretende Resistenzen zeigen jedoch auch häufig eine fortbestehende Hemmung des MAPK-Signalweges [9, 145]. Um die Aktivität des MAPK-Signalwegs in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 Zelllinien mit der in parentalen Zellen zu vergleichen, wurde die Genexpression von ERK1 und ERK2 in parentalen, Vem- und Vem/Sel-res Zellen gemessen (*Abb. 7a*). Hier zeigte sich sowohl für ERK1 als auch für ERK2 eine stabile Expression gegenüber parentalen Zellen. Anschließend wurde die Proteinexpression von ERK1/2, pERK1/2 und der von ERK1/2 aktivierten p90RSK in parentalen, BRAFi- und verschiedenen BRAFi/MEKi-res WM9 mittels Western Blot detektiert (*Abb. 7b*). In allen resistenten Zellen zeigte sich ERK phosphoryliert, in Vem/Sel-res Zellen fand sich sogar eine stärkere ERK-Phosphorylierung als in parentalen Zellen. Auch p90RSK konnte in allen resistenten Zellen detektiert werden, jedoch war hier die stärkste Aktivität in parentalen Zellen zu beobachten. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse auf eine fortwährende Aktivierung des MAPK-Signalwegs in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 hin.

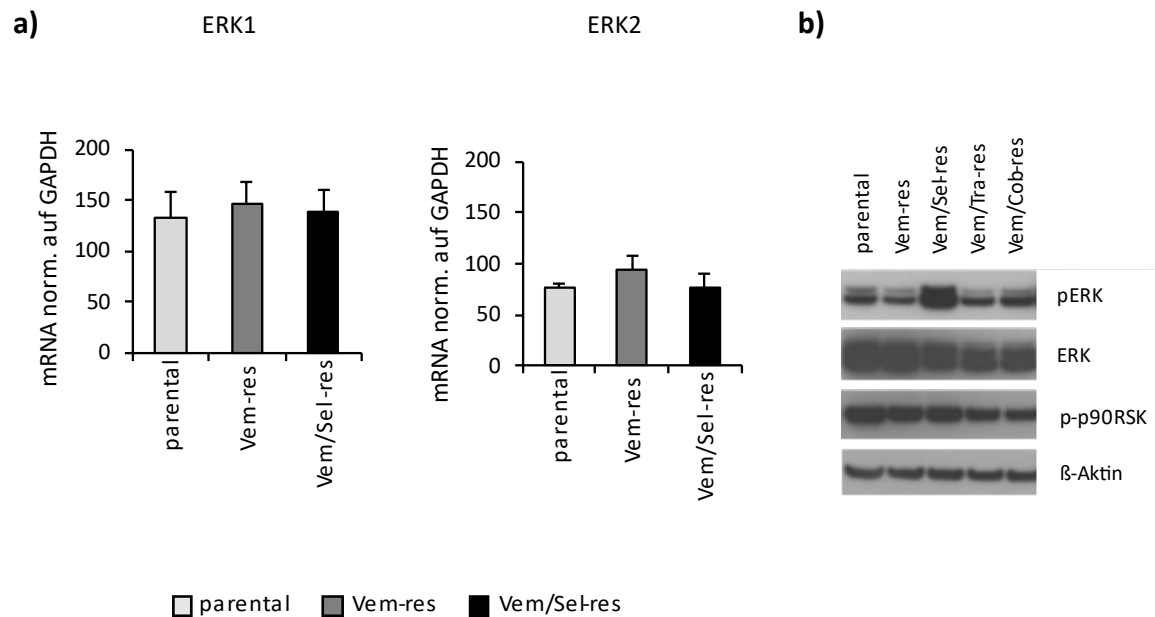


Abb. 7: MAPK-Signalweg in parentalen, BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen

a) ERK-Expression in parentalen und resistenten WM9-Melnaomzellen. Die Expression von ERK1 und ERK2 war nicht unterschiedlich.

b) Western-Blot-Analyse: Alle resistenten Zellen zeigten eine ERK-Phosphorylierung, Vem/Sel-res sogar deutlich stärker als parentale. p90RSK konnte ebenfalls in allen resistenten Zellen detektiert werden, wenngleich schwächer als in parentalen Zellen. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

3.2.2 Verstärkte Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs

Neben dem MAPK- ist der PI3K/AKT-Signalweg für das Überleben der Melanomzellen von entscheidender Bedeutung und ebenfalls dafür bekannt, Resistenz gegenüber BRAFi und MEKi zu vermitteln [128, 183]. AKT ist eine Serin/Threonin-Kinase, die an zwei Stellen durch Phosphorylierung aktiviert werden kann, wobei die Serin-Bindestelle 473 (Ser⁴⁷³) über den mTORC2-Komplex und die Threonin-Bindestelle 308 (Thr³⁰⁸) über die Proteinkinase PDK1 phosphoryliert wird, welche wiederum über die PI3K aktiviert wird. Es wurde daher die Expression des PIK3CA-Gens analysiert, das für die katalytische Untereinheit der PI3K kodiert, sowie die phosphorylierten (aktiven) Formen von AKT. Die analysierten Vem- und Vem/Sel-res WM9 Zellen zeigten gegenüber parentalen Zellen eine verstärkte Expression von PIK3CA (Abb. 8a). Im Western Blot fand sich gegenüber parentalen Zellen eine verstärkte Aktivität von AKT (Thr³⁰⁸), nicht jedoch von AKT (Ser⁴⁷³) für alle resistenten Zellen (Abb. 8b). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der PI3K/AKT-Signalweg in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 verstärkt aktiviert

ist und möglicherweise genutzt wird, um dem Selektionsdruck von BRAFi und MEKi zu entkommen.

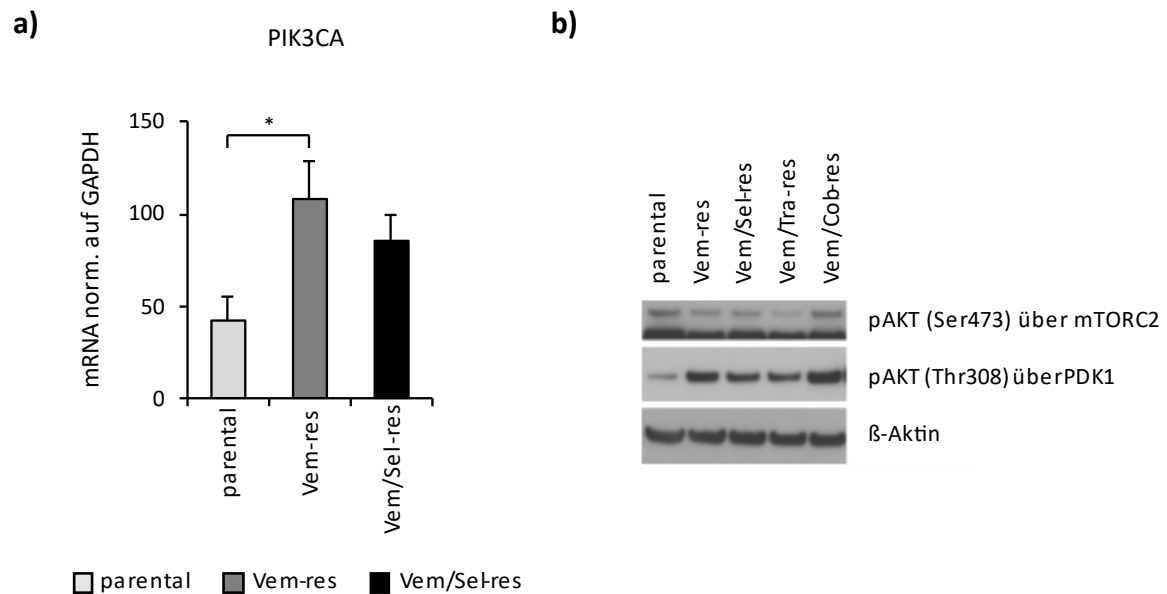


Abb. 8: PI3K/AKT-Signalweg in parentalen, BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen

a) Expression von PIK3CA in parentalen und resistenten WM9-Melanomzellen. Es fand sich eine signifikant erhöhte Expression in Vem-res gegenüber parentalen Zellen ($p = 0.015$).

b) Western-Blot-Analyse: Alle resistenten Zellen zeigten eine verstärkte Aktivität von AKT durch Phosphorylierung von Thr³⁰⁸, nicht jedoch von Ser⁴⁷³. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

3.2.3 Aktivierung des WNT-Signalwegs

Um die Aktivität des WNT-Signalwegs zu untersuchen, wurde zunächst die Genexpression des für β -Catenin kodierenden CTNNB1 bestimmt. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen parentalen und resistenten WM9 (Abb. 9a). In den resistenten Zellen war im Western Blot die Expression von pGSK3 leicht verringert und die von β -Catenin erhöht (Abb. 9b). Anschließend wurde die Genexpression einiger WNTs analysiert. Die Expression der Liganden des kanonischen WNT-Signalwegs, WNT1 und WNT3A (siehe 1.2.4), war in den resistenten Zellen im Vergleich zu den parentalen Zellen nicht unterschiedlich (Daten nicht gezeigt). Für die Liganden WNT4 und WNT5A fanden sich erhöhte Mengen in Vem- und Vem/Sel-res WM9 gegenüber parentalen Zellen, was auf eine verstärkte Aktivität der nicht-kanonischen WNT-Signaltransduktion zurückzuführen sein könnte (Abb. 9c und d). Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse

auf eine Hochregulierung des kanonischen Signalwegs in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen hin.

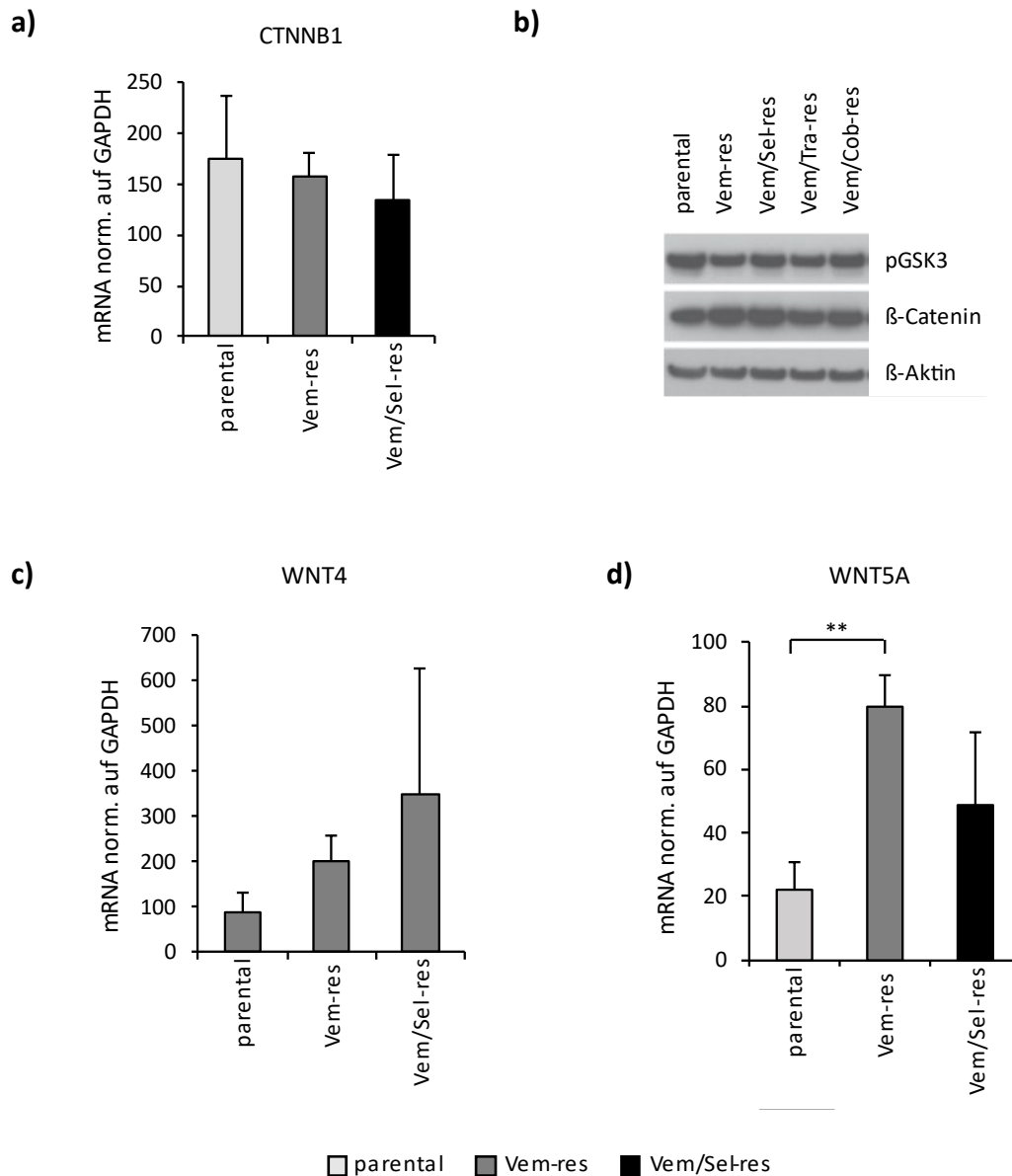


Abb. 9: WNT-Signaltransduktion in parentalen, BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen

a) Expression von CTNNB1 in parentalen und Vem- bzw. Vem/Sel-res WM9. Resistente Zellen zeigten eine anhaltend stabile Expression verglichen mit parentalen Zellen.

b) Western-Blot-Analyse: β-Catenin und pGSK3 in parentalen und verschiedenen resistenten WM9. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

c) Expression von WNT4 in parentalen, Vem- und Vem/Sel-res WM9. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen parentalen und resistenten Zellen.

d) Expression von WNT5A in parentalen, Vem- und Vem/Sel-res WM9. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von WNT5A in Vem-res Zellen ($p = 0.001$).

3.2.4 Resistente Zellen zeigen erhöhte Resilienz bei verringerter translationaler Aktivität
Melanomzellen, die eine Resistenz gegenüber MAPKi entwickelt haben, zeigen häufig Merkmale des so genannten *slow-cycling* [142, 184, 185]. Darunter versteht man Zellen, die im Gegensatz zu sich rasch teilenden Tumorzellen durch stark verlangsamte Proliferationsraten und eine geringe Expression von MITF gekennzeichnet sind [131, 186]. Es gibt wachsende Evidenz darüber, dass *slow-cycling* Tumorzellen keinesfalls ruhende Zellen sind, sondern im Gegenteil über ein hoch aggressives Tumorpotential verfügen [184, 187]. Da zielgerichtete Inhibitor-Therapien ihre Wirkung v.a. in sich schnell teilenden Zellen entfalten, führt *slow-cycling* zu einem verminderten Ansprechen der Tumorzellen und kann so die Entwicklung von Resistenzen begünstigen [188]. Einige Studien weisen darauf hin, dass die Behandlung mit zielgerichteten Inhibitoren sogar zur vermehrten Ausbildung genau dieses *slow-cycling*-Typs führt [189, 190].

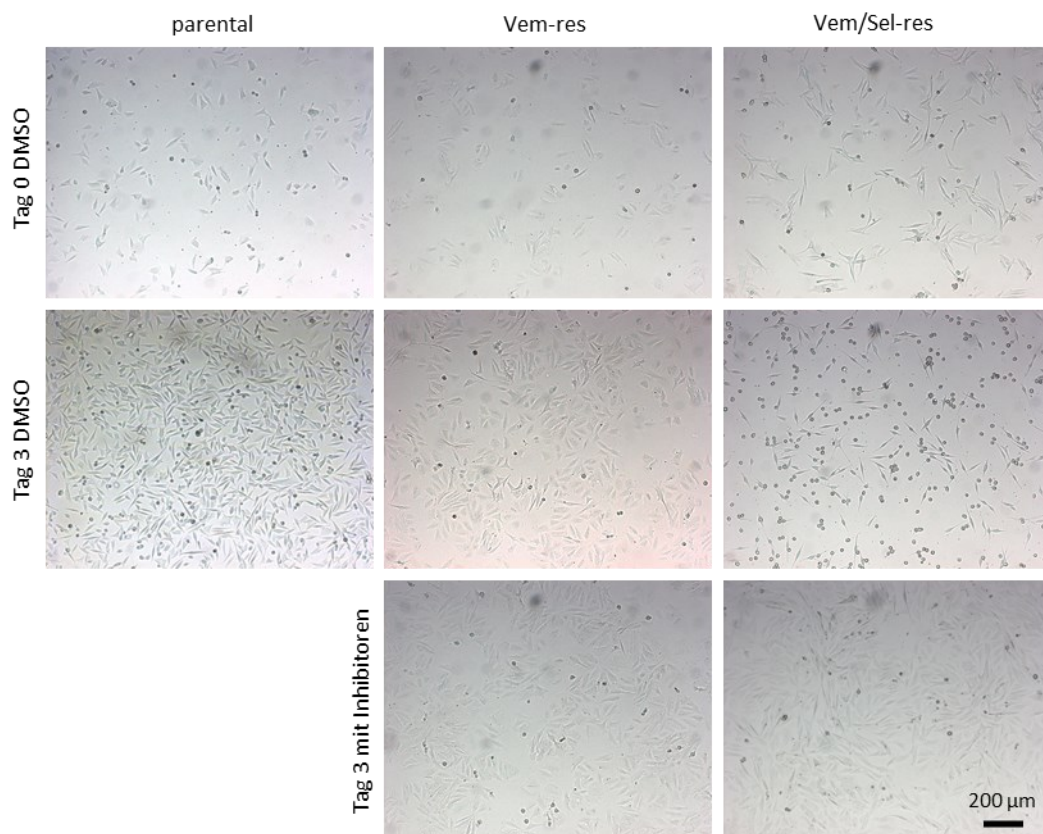
3.2.4.1 Morphologie

Um die generierten BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 auf Hinweise des *slow-cycling*-Phänotyps zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst lichtmikroskopisch analysiert. Hier zeigten sich deutliche morphologische Unterschiede zwischen parentalen, BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9. Parentale Zellen stellten sich länglich-spindelförmig dar, ihre Form war insgesamt kompakt. BRAFi- und noch deutlicher BRAFi/MEKi-res Zellen hatten ein breiteres, durchsichtigeres Erscheinungsbild mit teilweise langen Ausläufern (*vgl. Vem/Sel-res Abb. 10a, Tag 0*). Die Behandlung mit einem BRAFi oder der Kombination BRAFi/MEKi führte in parentalen Zellen zu einer verstärkten Ausbildung ihrer Spindelform. Resistente Zellen lösten sich teilweise vom Boden der Platten, sobald sie nicht mit ihren jeweiligen Inhibitoren in Kultur gehalten wurden. Schon nach 3-tägigem Pausieren der Inhibitoren fand sich regelmäßig ein Großteil der resistenten Zellen abgerundet im Medium schwimmend (*vgl. Vem/Sel-res Abb. 10a, Tag 3 ohne Behandlung*).

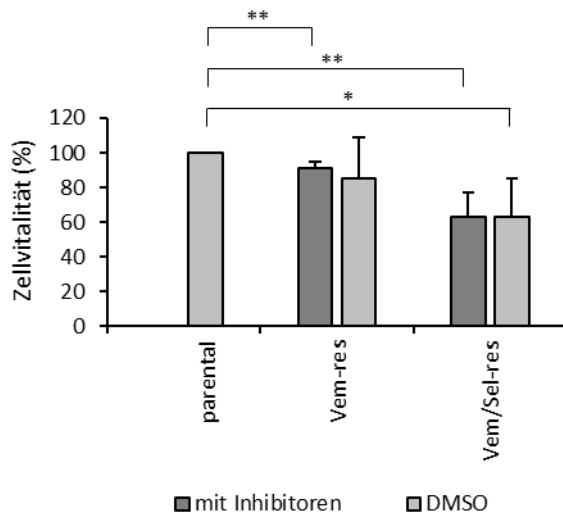
3.2.4.2 Proliferation

Auffällig war zudem ein verlangsamtes Wachstum resistenter Zellen im Vergleich zu parental, das sich sowohl mit als auch ohne Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren feststellen ließ (vgl. Abb. 10a, Tag 3). Die Bestimmung der Zellvitalität mittels CellTiter-Blue® Assay bestätigte dies, hier ergab sich eine verminderte Vitalität resistenter gegenüber parental Zellen. Dies zeigte sich für BRAFi/MEKi-res WM9 sowohl in Anwesenheit der jeweiligen Inhibitoren als auch in deren Abwesenheit (Abb. 10b). Zudem ließ sich als weiterer Hinweis auf einen *slow-cycling*-Phänotyp in resistenten WM9 eine gegenüber parental Zellen deutlich verringerte Expression von MITF feststellen (Abb. 10c).

a)



b)



c)

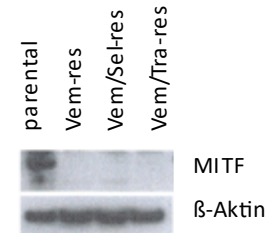


Abb. 10: Vitalität und Proliferation parentaler und BRAFi- bzw. BRAFi/MEKi-res WM9 Melanomzellen nach Behandlung mit Kinaseinhibitoren

Vergleich parentaler, Vem- und Vem/Sel-res WM9 nach 3-tägiger Behandlung mit 1 μ M Vemurafenib (Vem-res) bzw. 1 μ M Vemurafenib + 10 μ M Selumetinib (Vem/Sel-res) bzw. DMSO als Kontrolle.

a) Repräsentative lichtmikroskopische Fotografien an Tag 0 sowie 3 Tage nach Behandlung. Im Vergleich zu parentalen war in resistenten Zellen an Tag 3 ein deutlich verlangsamtes Wachstum erkennbar. Ohne die Inhibitoren löste sich ein Großteil der Vem/Sel-res Zellen vom Boden der Platte ab. Messbalken 200 μ m.

b) Zellvitalität gemessen mittels CellTiter-Blue[®] Assay 3 Tage nach Behandlung, n = 3. Die Vitalität parentaler Zellen wurde als 100% festgelegt. Vem/Sel-res WM9 zeigten eine signifikante Reduktion der Vitalität gegenüber parental Zellen (p = 0.03 für DMSO und p = 0.01 für Vem/Sel).

c) Western-Blot-Analyse: Nur in unbehandelten parental Zellen ließ sich eine Expression von MITF detektieren. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

3.2.4.3 Translation

Daraufhin wurde die Expression einiger weiterer Proteine, die mit Überleben, Proliferation und Translation assoziiert sind, untersucht (Abb. 11). Dabei wurde insbesondere nach unterschiedlichen Expressionsmustern in resistenten gegenüber parental Zellen gesucht, die möglicherweise einen Hinweis auf die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen geben könnten.

Mammalian target of rapamycin (mTOR) ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die von AKT durch Phosphorylierung an der Threonin-Bindestelle 308 (Thr³⁰⁸) aktiviert wird und zusammen mit Raptor und mLST8 den mTOR Complex 1 (mTORC1) bildet. mTORC1 übt u.a. über die 70-kDa ribosomale S6-Kinase (p70S6K), die an der Ribosomenbiogenese beteiligt ist, und das *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1* (4E-BP1) einen wesentlichen Einfluss auf die Cap-abhängige mRNA-Translation aus [191, 192]. Die Translation ist Teil der Proteinbiosynthese. Dabei wird die Basensequenz der mRNA in die

Aminosäuresequenz des Proteins übersetzt. Um die Translation zu initiieren, muss das 5' Ende der mRNA mit der Cap-Struktur, vermittelt durch den Translations-Initiationskomplex eIF4F, an das Ribosom gebunden werden. Dieser Prozess wird u.a. durch 4E-BP1 streng reguliert, das als Repressor der Cap-abhängigen mRNA-Translation gebunden an Initiationsfaktor eIF4E vorliegt. Wird 4E-BP1 von mTORC1 phosphoryliert und damit inaktiviert, gibt es den Initiationsfaktor frei, der daraufhin mit dem Strukturprotein eIF4G und der Helikase eIF4A den Translations-Initiationskomplex bilden kann. Dieser bindet nun das Cap-Ende der mRNA und die Proteinbiosynthese beginnt. Eine verminderte Aktivität von mTOR führt so zu einer verringerten mRNA-Translation und zum Arrest der Zelle in der G1-Phase. Die hier untersuchten BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 zeigten eine gegenüber parentalen Zellen verringerte Expression der phosphorylierten und damit aktiven Formen von mTOR und seinen Effektorproteinen p70S6-Kinase und 4E-BP1, mit Ausnahme von Vem/Cob-res Melanomzellen, die eine verstärkte Phosphorylierung von p70S6K aufwiesen (*Abb. 11a*). Dies ist insofern erstaunlich, als sich eine Überaktivität im PI3K/AKT-Signalweg in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 feststellen ließ (*siehe 3.2.2*) und AKT ein Aktivator von mTOR ist. Insgesamt weist die verminderte Aktivität von mTOR, p70S6K und 4E-BP1 bei gleichzeitig erhöhter Aktivität des PI3K/AKT-Signalwegs auf eine verstärkte Überlebensfähigkeit bei gleichzeitig verringerter translationaler Aktivität in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen hin.

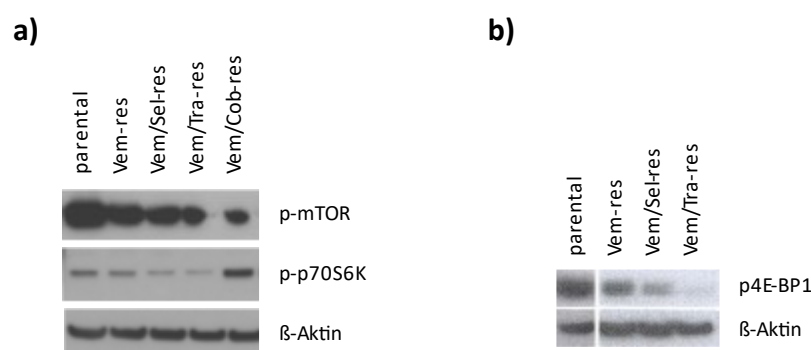


Abb. 11: mTOR-Signalweg in parentalen, BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen

In der Western-Blot-Analyse zeigte sich eine verringerte Aktivität von **a)** mTOR und seinen Effektorproteinen p70S6K und **b)** 4E-BP1 in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen, was auf eine verminderte translationale Aktivität hinweist. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

3.2.4.4 Zellzyklus und Apoptose

Der onkogene Transkriptionsfaktor c-Jun vermittelt über eine Aktivierung von u.a. Cyclin D1 die Progression des Zellzyklus während der G1-Phase und hemmt UV-induzierte oder durch p53 induzierte Apoptose [193]. Er wird über Wachstumsfaktoren, Zytokine, Zellstress oder UV-Strahlung durch N-terminale Phosphorylierung von *c-Jun N-terminal kinases* (JNK) aktiviert [194]. Auch eine konstitutive Hochregulierung von ERK kann zu einer Aktivierung von c-Jun beitragen [195]. Eine Überexpression von c-Jun und JNK wurde in verschiedenen Tumoren und auch beim malignen Melanom gefunden [196]. Die Western-Blot-Analyse ergab eine verstärkte Phosphorylierung von JNK und c-Jun in drei von vier resistenten WM9-Zelllinien (*Abb. 12a*). Zugleich zeigte sich jedoch auch eine verminderte Expression von Cyclin D1 in resistenten Zellen, was ein Hinweis auf Zellzyklusarrest in der G1-Phase ist (*Abb. 12d*).

STAT3 ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der über externe Liganden wie Wachstumsfaktoren und Zytokine durch Phosphorylierung aktiviert wird und an der Expression von Onkogenen beteiligt ist [197]. Im malignen Melanom vermittelt STAT3 so Überleben und Proliferation der Tumorzellen und spielt eine wichtige Rolle bei Angiogenese und Metastasierung [198, 199]. Für alle BRAFi/MEKi-res Zelllinien konnte eine verminderte Aktivierung von STAT3 im Vergleich zu parentalen Zellen festgestellt werden, die Expression in BRAFi-res Zellen blieb gegenüber parentalen Zellen stabil (*Abb. 12a*).

Der Tumorsuppressor p53 wird u.a. durch Zellstress oder UV-Strahlung mittels Phosphorylierung aktiviert und vermittelt Zellzyklusarrest, Seneszenz und Apoptose [200]. Er stellt eine der letzten Hürden für die ungehemmte Proliferation von Melanomzellen dar, die erst relativ spät während der Melanomentwicklung überwunden wird [201]. In etwa 90% aller fortgeschrittenen Melanome findet sich eine Inaktivierung von p53, entweder durch verminderte Expression oder durch p53-Mutation, die zu einem aggressiven Wachstum beitragen [28]. Im Western Blot fand sich p-p53 in allen BRAFi/MEKi-res Zellen im Vergleich zu parentalen Zellen geringer exprimiert, einzig BRAFi-res WM9 zeigten gegenüber parentalen Zellen eine verstärkte Phosphorylierung von p53 (*Abb. 12a*).

p65 ist eine Untereinheit des *Nuclear Factor kappa B* (NF- κ B), einem Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle für die Balance von Zellproliferation und Apoptose spielt und

dessen Aktivierung in Zusammenhang mit Melanomprogression diskutiert wird [202]. NF- κ B wird über Wachstumsfaktoren, Zytokine und UV-Strahlung durch Phosphorylierung aktiviert. Eine verstärkte Aktivierung von NF- κ B vermittelt Zellproliferation und Überleben und wirkt im fortgeschrittenen Stadium des malignen Melanoms über die Hemmung verschiedener pro-apoptotischer Faktoren anti-apoptotisch [203-205]. Auch eine konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalwegs scheint NF- κ B indirekt über verschiedene Zytokine zu aktivieren [206]. Des Weiteren kann p65 über AKT direkt phosphoryliert werden [207] und PI3K-Inhibitoren (PI3Ki) können NF- κ B in Melanomzellen hemmen [208].

In den untersuchten BRAFi/MEKi-res Zellen fand sich eine gegenüber parental WM9 verstärkte Proteinexpression für p65, nicht jedoch für p-p65 (*Abb. 12a und b*).

Die p38-Kinasen gehören zur Familie der MAPK und werden über zellulären Stress, inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und MAPK-Kinasen aktiviert [209, 210]. Die Aktivierung von p38-Kinasen führt zu verlangsamten Proliferationsraten, Zellzyklusarrest in der G1- sowie G2/M-Phase oder auch zur Induktion der Apoptose [211, 212]. Auch eine Rolle für den Übergang in die Seneszenz wird diskutiert [213, 214]. In den hier analysierten BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 konnte mit Ausnahme von Vem/Cob-res Zellen eine verstärkte Proteinexpression von p38 beobachtet werden (*Abb. 12c*).

Der programmierte Zelltod wird u.a. von mehreren IAP-Proteinen (*inhibitor of apoptosis*) streng reguliert. Zu ihnen gehören XIAP (*X chromosome-linked IAP*) und c-IAP1 (*cellular IAP*). Beide können Caspasen inhibieren und wirken so anti-apoptotisch [215, 216]. BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen zeigten eine deutlich verstärkte Expression von XIAP und c-IAP1, mit der Ausnahme von XIAP in Vem/Tra-res WM9 (*Abb. 12e*). Dies weist auf eine verstärkte Unabhängigkeit gegenüber pro-apoptotischen Signalen hin.

Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass insbesondere BRAFi/MEKi-res Melanomzellen einen verlangsamten Metabolismus mit verringerter Proliferationsrate und Persistenz in der G1-Phase sowie verstärkte anti-apoptotische Eigenschaften haben.

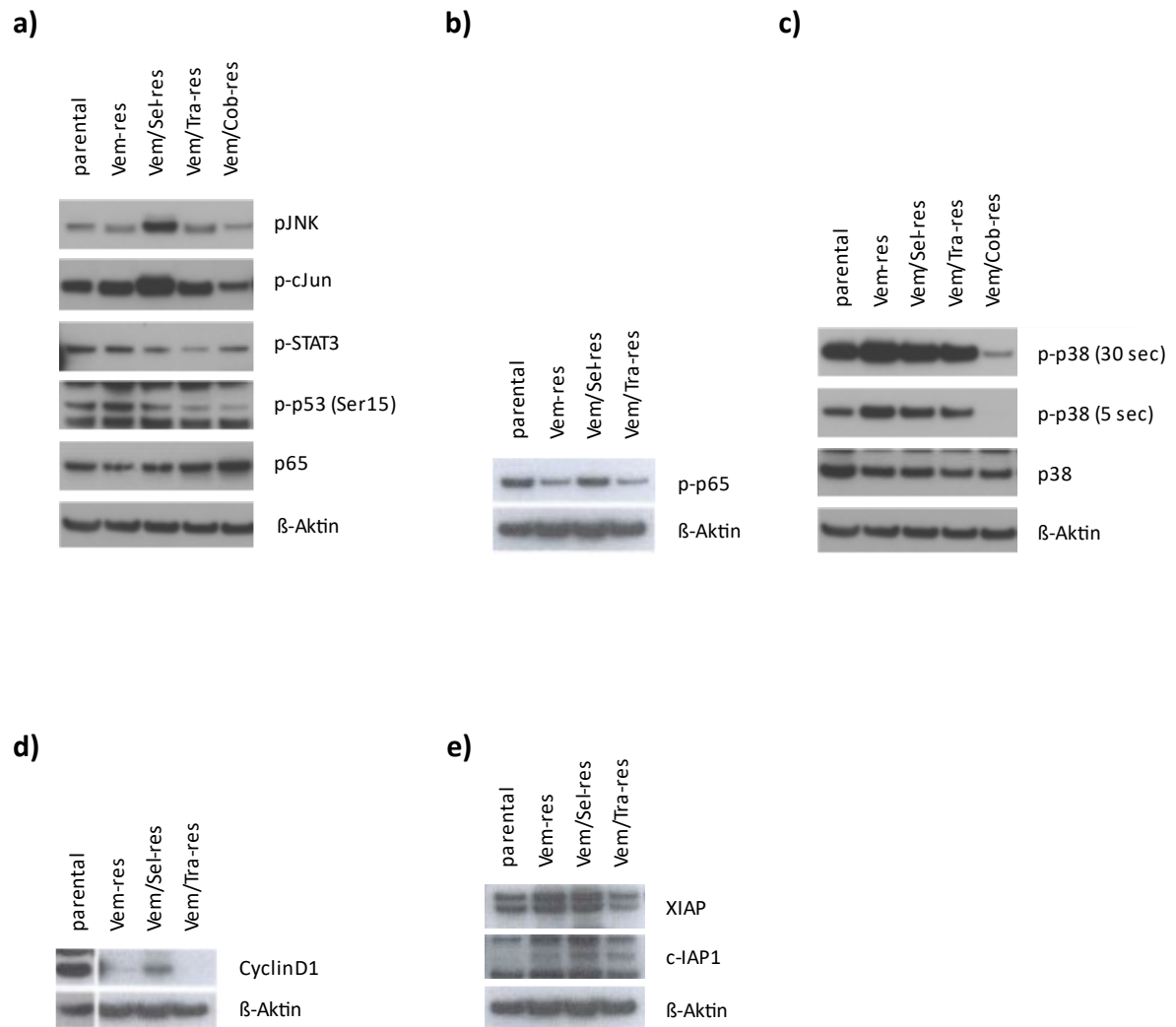


Abb. 12: Expression verschiedener Signalproteine in parentalen, BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen

- a)** Die Western-Blot-Analyse ergab ein individuelles Expressionsmuster der verschiedenen resistenten Zellen für pJNK, p-cJun, p-STAT3, p-p53 und p65.
- b)** Auch für p-p65 zeigte sich eine unterschiedlich starke Expression in den verschiedenen resistenten Zellen.
- c)** Es fand sich eine verstärkte Aktivität der p38-mitogenaktivierten Proteinkinasen in resistenten Zellen mit Ausnahme von Vem/Cob-res WM9.
- d)** Alle resistenten Zellen zeigten eine verringerte Expression von Cyclin D1, was auf Zellzyklusarrest hinweist.
- e)** Vem- und Vem/Sel-res Zellen (nicht jedoch Vem/Tra-res) ließen zudem eine verstärkte Expression der Apoptose-Inhibitoren XIAP und c-IAP1 erkennen. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

3.3 Inhibitoren zur Resistenzdurchbrechung: Behandlung mit FGFRi

Da sowohl der MAPK- als auch der PI3K/AKT-Signalweg bei der Entwicklung von Resistenzen gegenüber BRAFi und MEKi eine entscheidende Rolle spielen [24, 128, 217] und die zuvor analysierten BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 eine Aktivität beider Signalwege zeigten (*siehe 3.2.1 und 3.2.2*), wurden die Auswirkungen einer simultanen Hemmung beider Signalwege durch den FGFR-Inhibitor (FGFRi) Infigratinib (BGJ-398, Inf) auf parentale und BRAFi- bzw. BRAFi/MEKi-res Zellen untersucht (*Abb. 13*). Infigratinib zählt zu den niedermolekularen Inhibitoren und hemmt selektiv FGFR1-3 sowie in deutlich geringerem Maße auch FGFR4 [176-178, 218, 219].

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Untersuchungen zusätzlich mit zwei weiteren Inhibitoren durchgeführt. Zum einen wurde der niedermolekulare ERK-Inhibitor (ERKi) Ravoxertinib (GDC-0994, Rav) gewählt, der den MAPK-Signalweg weiter abwärts von MEK hemmt. In BRAFi-res Melanomzellen finden sich in etwa 50-70% und in BRAFi/MEKi-res sogar in nahezu 90% eine Reaktivierung von ERK [9, 10, 144, 145]. Zugleich wurden ERKi bereits an verschiedenen BRAFi-res Zelllinien erfolgreich getestet und zeigten eine hohe Ansprechrate [220]. Bezüglich der Hemmung der MAPK-Aktivität und Proliferation BRAFi-res Zellen zeigte die Behandlung mit einem ERKi sogar Vorteile gegenüber MEKi und selbst bei nachgewiesenen MEK1-Mutationen bleibt eine Sensitivität für ERKi erhalten [221].

Zum anderen wurde mit Hilfe des niedermolekularen PI3Ki Buparlisib (BKM120, Bup) der Einfluss einer Hemmung des PI3K/AKT-Signalwegs analysiert. Dieser hemmt spezifisch PI3K, so dass die Bildung von PIP3 reduziert und damit die Aktivität des PI3K/AKT-Signalwegs inhibiert wird. So wirkt Buparlisib antiproliferativ und inhibiert das Tumorzellwachstum [222-224]. Am Melanom wurde für Buparlisib bereits ein antitumoraler Effekt *in vitro* und *in vivo* beschrieben [225]. Eine Überaktivität des PI3K-Signalwegs durch verschiedene Mechanismen fand sich in vielen BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen, u.a. wurden eine verstärkte Expression von pAKT sowie eine persistierende Aktivität von mTOR als ursächlich für eine Resistenzentwicklung beschrieben [61, 153, 226]. Zudem konnten in BRAFi-res Melanomzellen synergistische Effekte zwischen einer Therapie mit BRAFi/MEKi und PI3Ki beobachtet werden [225, 227].

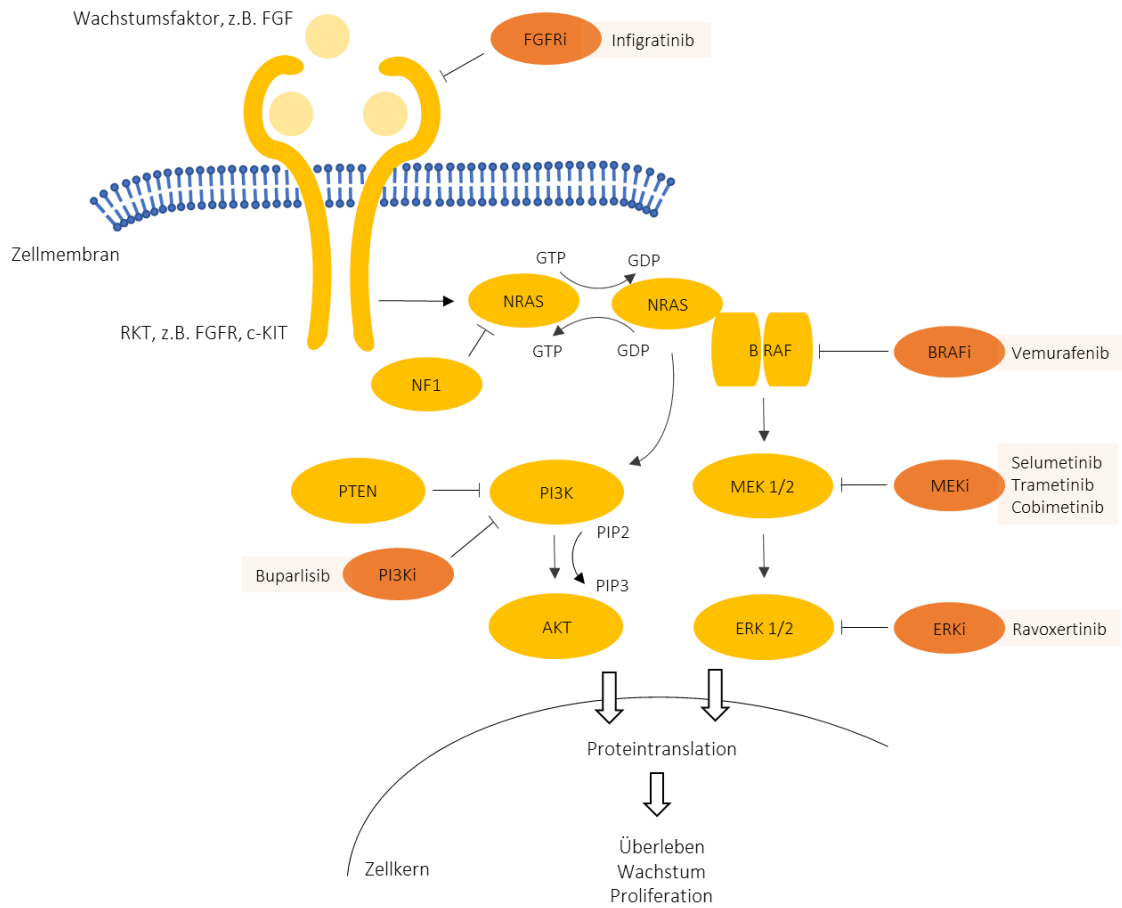


Abb. 13: Rationale für die in dieser Arbeit verwendeten zielgerichteten Kinaseinhibitoren

Für eine Kombinationsbehandlung an BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Melanomzelllinien wurde der pan-FGFRi Infigratinib (BGJ-398), der PI3Ki Buparlisib (BKM120) und der ERKi Ravoxertinib (GDC-0994) gewählt.

3.3.1 FGFRi reduziert die Vitalität resistenter Zellen

Parentale, Vem- und Vem/Sel-res WM9 wurden zunächst mit den zu testenden Inhibitoren allein oder in Kombination mit Vemurafenib bzw. Selumetinib behandelt und die Zellvitalität anschließend mittels CellTiter-Blue® Assay bestimmt.

Die Behandlungen mit Ravoxertinib (*Abb. 14a*) hatten auf parentale Zellen stärkere Auswirkungen als auf resistente. So konnte mit Ravoxertinib allein in parentalen Zellen eine Reduktion der Vitalität um durchschnittlich 38% gegenüber der Kontrolle erreicht werden. In Vem-res Zellen hingegen nur um durchschnittlich 19% und in Vem/Sel-res um 2%. Die Kombination Rav/Vem reduzierte die Vitalität von Vem-res WM9 im Durchschnitt um etwa 15%. Die Dreifachkombination führte in Vem/Sel-res Zellen zu einer mittleren Abnahme von etwa 10%. Insgesamt erwies sich Ravoxertinib sowohl unter alleiniger Behandlung als auch in den Kombinationsbehandlungen in resistenten Zellen den Inhibitoren Infigratinib und Buparlisib unterlegen.

Auch die Behandlung mit Buparlisib (*Abb. 14b*) ergab sowohl in parentalen als auch in Vem- und Vem/Sel-res WM9 eine signifikante Reduktion der Vitalität. Im Mittel waren die Effekte einer Kombinationsbehandlung mit Buparlisib jedoch in den resistenten Zellen weniger ausgeprägt als mit Infigratinib. So resultierte die Kombination Bup/Vem in Vem-res Zellen in einer mittleren Abnahme der Vitalität um etwa 50% gegenüber der Behandlung mit Vemurafenib allein. Die Dreifachkombination reduzierte die Vitalität in Vem/Sel-res Zellen um etwa 25% im Vergleich zur Behandlung mit Vem/Sel. In parentalen Zellen erwies sich Buparlisib sowohl allein als auch in den Kombinationsbehandlungen als effektiver als Infigratinib. Unter der Dreifachkombination Bup/Vem/Sel sank die mittlere Vitalität parentaler WM9 auf den insgesamt niedrigsten Wert von etwa 11%.

Am effektivsten in Vem/Sel-res Zellen erwies sich die Behandlung mit Infigratinib (*Abb. 14c*). Schon die alleinige Behandlung mit Infigratinib reduzierte die Vitalität signifikant um im Mittel etwa 59% in Vem/Sel-res Zellen und etwa 43% in Vem-res, während parentale Zellen im Mittel nur eine Abnahme der Vitalität um etwa 7,5% zeigten. Die Kombination Inf/Vem führte in Vem-res WM9 zu einer mittleren Reduktion der Vitalität um ca. 55% gegenüber der Behandlung mit Vemurafenib allein. Die Dreifachkombination Inf/Vem/Sel ergab in Vem/Sel-res Zellen eine mittlere Abnahme der Vitalität um etwa 51% verglichen mit der Behandlung mit Vem/Sel allein und resultierte in einem fast vollständigen Absterben der Zellen. Unter der Dreifachkombination sank die mittlere Vitalität Vem-res

WM9 auf etwa 15%, die Vem/Sel-res auf etwa 13%. Erstaunlicherweise zeigten parentale Zellen unter der Dreifachkombination immer noch eine mittlere Vitalität von ca. 32%.

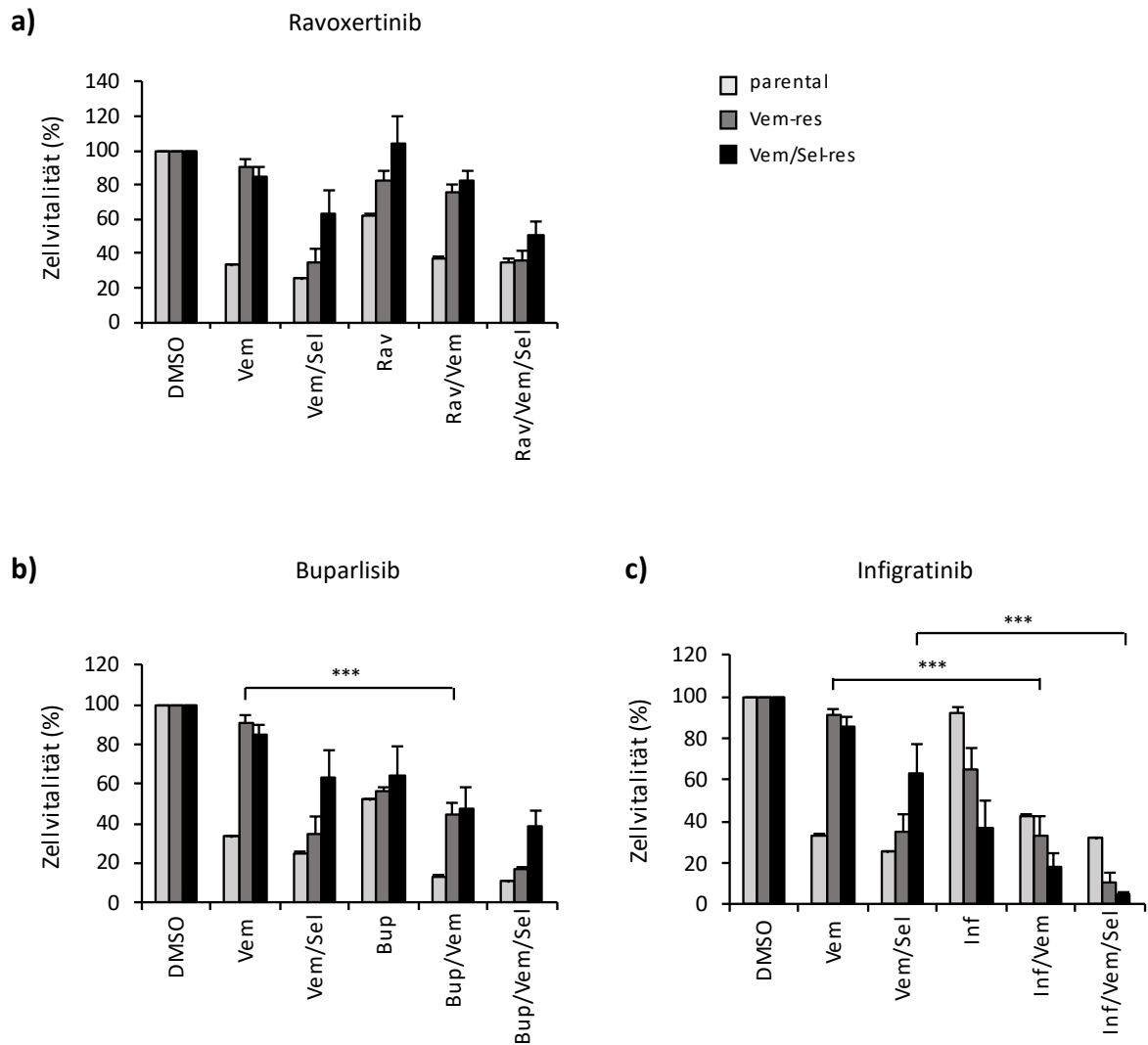


Abb. 14: Zellvitalität parentaler, Vem- und Vem/Sel-res WM9-Melanomzellen nach Behandlung mit Kinaseinhibitoren

Die Zellvitalität wurde mittels CellTiter-Blue® Assay 3 Tage nach Behandlung gemessen. Es wurden je 100.000 Zellen in einer 6-Loch-Platte ausgesetzt und mit 1 µM Vemurafenib, 10 µM Selumetinib, 0,1 µM Ravoxertinib, 1 µM Buparlisib und 2 µM Infigratinib allein oder in Kombination behandelt. Als Kontrolle diente DMSO, n = 3.

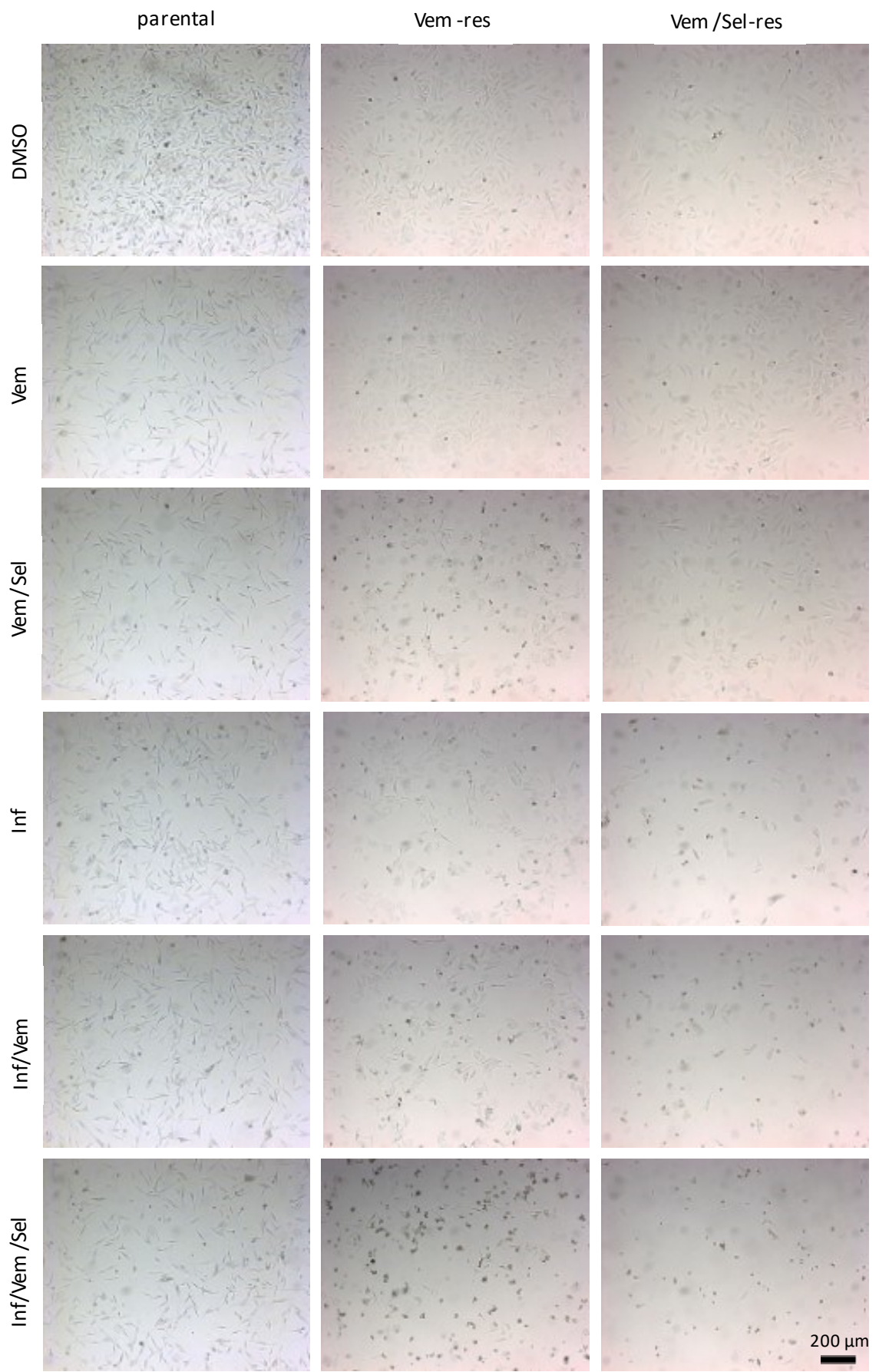
a) Vem-res Zellen: Die Rav-Behandlung führte weder allein noch in Kombination mit Vem zu einer signifikanten Reduktion der Vitalität im Vergleich zur Vem-Behandlung. Vem/Sel-res Zellen: Rav reduzierte die Zellvitalität weder allein noch in Kombination mit Vem/Sel signifikant, verglichen mit Vem/Sel allein.

b) Die Kombination Bup/Vem verringerte höchst signifikant die Vitalität Vem-res Zellen gegenüber der Behandlung mit Vem allein ($p < 0.001$).

c) Vem-res Zellen: Die Kombination Inf/Vem führte gegenüber der Behandlung mit Vem allein zu einer höchst signifikanten Reduktion der Zellvitalität ($p < 0.001$). Vem/Sel-res Zellen: Die Kombination Inf/Vem/Sel zeigte als einzige Dreifachbehandlung eine höchst signifikante Reduktion der Zellvitalität gegenüber der Behandlung aus Vem/Sel ($p < 0.001$).

Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen 3 Tage nach Behandlung ergaben ein mit den Vitalitätsmessungen übereinstimmendes Bild (*Abb. 15a*). Die Behandlung mit Infigratinib führte in Vem- und noch stärker in Vem/Sel-res WM9 zu einer stark verringerten Zellzahl. Dieser Effekt wurde durch Kombination mit Vemurafenib und Selumetinib noch verstärkt. Außerdem wurde beobachtet, dass sich während der Behandlung mit Infigratinib in resistenten Zellen kleine intrazelluläre Vesikel bildeten (*Abb. 15b*). Das könnte ein Hinweis auf verstärkte Autophagozytose sein, eine Form des programmierten Zelltods, die jedoch nicht unbedingt den Zelltod zur Folge haben muss, sondern auch zum Überleben der Zelle führen kann [228].

a)



b)

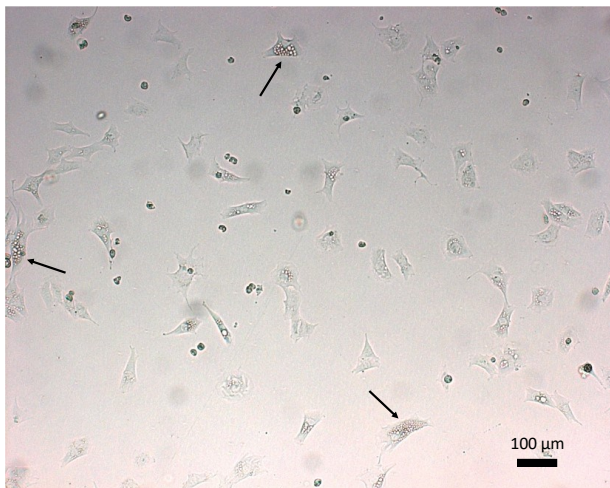


Abb. 15: Lichtmikroskopische Aufnahmen nach Behandlung mit verschiedenen Inhibitor-Kombinationen

a) Repräsentative Fotografien parentaler, Vem- und Vem/Sel-res WM9 3 Tage nach Behandlung mit 1 μM Vemurafenib, 10 μM Selumetinib und 2 μM Infigratinib allein oder in Kombination. Als Kontrolle diente DMSO. Messbalken 200 μm . **b)** Aufnahme Vem/Sel-res WM9 3 Tage nach Behandlung mit Infigratinib. Die Pfeile markieren Zellen mit besonders vielen neu aufgetretenen intrazellulären Vesikeln, die ein Hinweis auf Autophagozytose sein könnten. Messbalken 100 μm .

Um die Ergebnisse an weiteren Zellen zu validieren, wurden die Zellvitalitäts-Untersuchungen anschließend an Vem/Cob-res WM9 wiederholt. Auch hier bewirkte Infigratinib allein und in Kombination mit Vemurafenib und Cobimetinib eine effektive Reduktion der Zellvitalität vor allem in resistenten Zellen (*Abb. 16*).

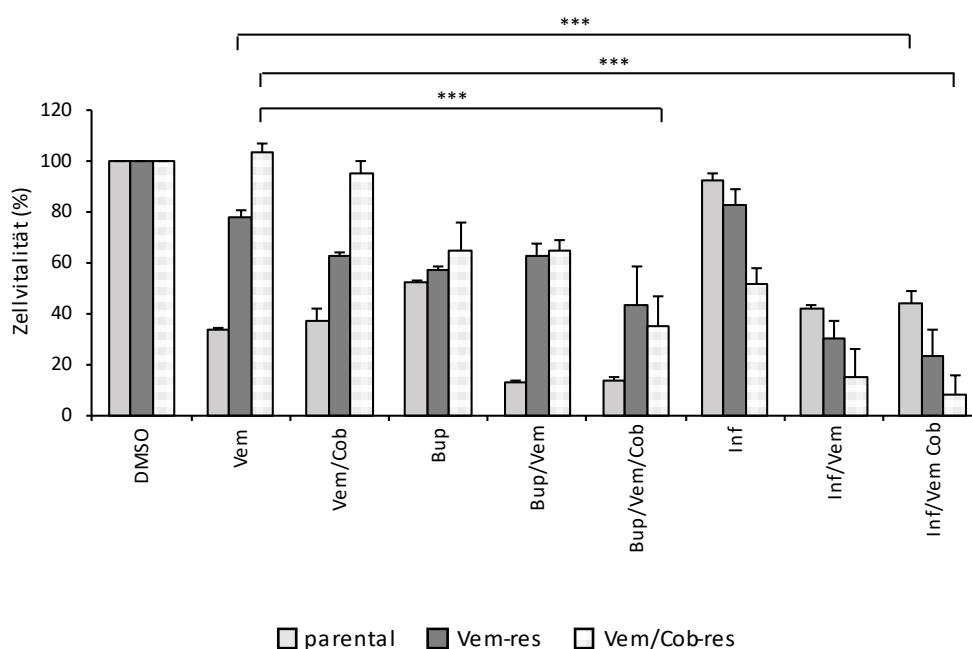


Abb. 16: Zellvitalität parentaler, Vem- und Vem/Cob-res WM9-Melanomzellen

Die Zellvitalität wurde mittels CellTiter-Blue® Assay 3 Tage nach Behandlung gemessen. Es wurden je 100.000 Zellen in einer 6-Loch-Platte ausgesetzt und mit 1 μM Vemurafenib, 1 μM Cobimetinib, 1 μM Buparlisib und 2 μM Infigratinib allein oder in Kombination behandelt. Als Kontrolle diente DMSO, n = 3.

Vem-res Zellen: Die Kombinationsbehandlung aus Inf/Vem führte als einzige zu einer höchst signifikanten Reduktion der Zellvitalität gegenüber einer Behandlung mit Vem allein ($p < 0.001$).

Vem/Sel-res Zellen: Die Kombinationsbehandlungen aus Bup/Vem/Sel ($p < 0.001$) und Inf/Vem/Sel ($p < 0.001$) zeigten jeweils eine höchst signifikante Reduktion der Zellvitalität gegenüber der Behandlung mit Vem/Sel.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine FGFR-Inhibition durch Infigratinib in BRAFi- und verschiedenen BRAFi/MEKi-res WM9 zu einer effektiven Hemmung der Zellvitalität führt und darin insbesondere in Kombination mit BRAFi und MEKi einer Behandlung mit dem PI3Ki Buparlisib bzw. dem ERKi Ravoxertinib überlegen ist und möglicherweise eine Therapieresistenz durchbrechen kann.

3.3.2 FGFRi hemmt MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg in resistenten Zellen

Nachdem eine starke Aktivität von MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 beobachtet wurde, die möglicherweise zur Resistenzentwicklung gegenüber BRAFi und MEKi beiträgt (*siehe 3.2.1 und 3.2.2*), wurden nun die Auswirkungen von Infigratinib auf die Aktivität von MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg untersucht. Dazu wurde die Aktivität von ERK1/2 und AKT (Ser⁴⁷³) 3 Tage nach Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren in parentalen, Vem- und Vem/Sel-res Zellen bestimmt (*Abb. 17*).

Parentale Zellen zeigten unter Behandlung mit Vemurafenib und Vemurafenib/Selumetinib eine verminderte Expression von pERK im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO. AKT blieb hingegen stabil phosphoryliert. Die Behandlung mit Infigratinib führte nur in Kombination mit Vemurafenib bzw. Vemurafenib/Selumetinib zu einer deutlichen Reduktion der ERK-Phosphorylierung in parentalen WM9, ein Einfluss auf pAKT ließ sich nicht beobachten. Vem-res Zellen zeigten dagegen eine verminderte ERK- und AKT-Phosphorylierung unter Vemurafenib, während die Kombination Vemurafenib und Selumetinib die Aktivität von ERK und AKT verstärkte. Die Hochregulierung des MAPK- und PI3K/AKT-Signalwegs könnte ein früher Anpassungsmechanismus auf die doppelte Blockade durch Vemurafenib und Selumetinib sein. In Infigratinib-behandelten Vem-res Zellen war die Phosphorylierung von ERK vollständig gehemmt, durch Hinzufügen von Vemurafenib bzw. Vemurafenib und Selumetinib konnte auch eine deutlich verminderte Aktivität von AKT detektiert werden, was folglich auf eine simultane Hemmung von MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg schließen lässt. In Vem/Sel-res WM9 resultierte die Infigratinib-Behandlung bereits in einer deutlichen Reduktion der AKT-Phosphorylierung, die Kombination mit Vemurafenib führte zu einer stark verminderten Expression von pERK und pAKT. Unter der Dreifachbehandlung aus Infigratinib, Vemurafenib und Selumetinib kam es schließlich zur völligen Hemmung von pERK und pAKT. Das lässt auf eine effektive

Hemmung von MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg in Vem/Sel-res Zellen nach Behandlung mit Infigratinib schließen.

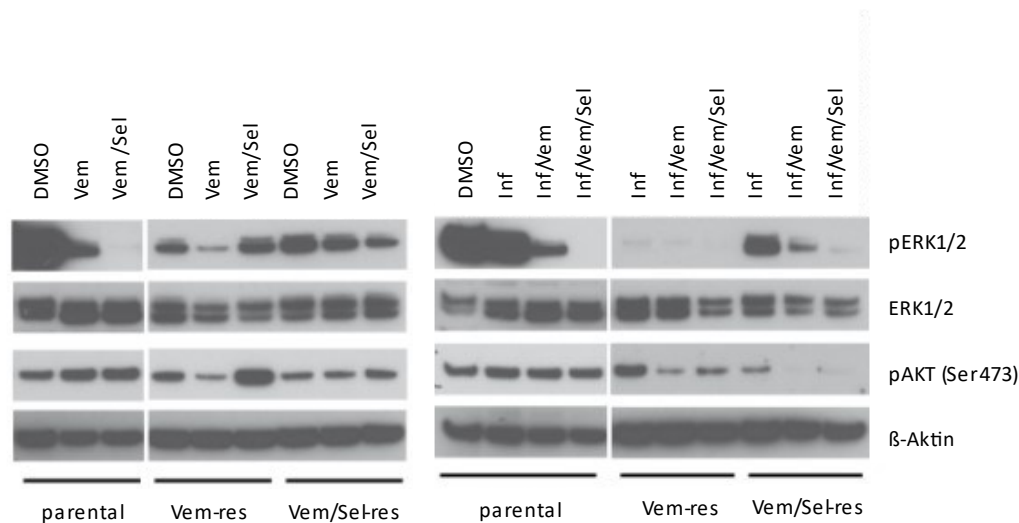


Abb. 17: Aktivität von MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg nach FGFRi-Behandlung

Western-Blot-Analyse parentaler, Vem- und Vem/Sel-res WM9 3 Tage nach Behandlung mit 1 μ M Vemurafenib, 10 μ M Selumetinib und 2 μ M Infigratinib. DMSO diente als Kontrolle. pERK1/2, ERK1/2 und pAKT (Ser⁴⁷³) wurden mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

3.3.3 Einfluss von FGFRi auf WNT4 und WNT5A

Da die vorherigen Untersuchungen eine erhöhte Expression von WNT4 und WNT5A in Vem- und Vem/Sel-res Zellen ergeben hatte (*siehe 3.2.3*), wurden nun die Auswirkungen von Infigratinib auf die Expression dieser beiden Liganden des nicht-kanonischen WNT-Signalwegs analysiert. Hier zeigte sich, dass die Behandlung Infigratinib allein oder in Kombination mit Vemurafenib und Selumetinib zu einer Induktion von WNT4 in resistenten WM9 führte, die jedoch nur in Vem/Sel-res Zellen signifikant war (*Abb. 18a*). Die Kombinationsbehandlung aus Infigratinib/Vemurafenib bzw. Vemurafenib/Selumetinib resultierte sowohl in parentalen als auch in resistenten Zellen in einer verstärkten Expression von WNT4 im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit DMSO. Der größte Unterschied fand sich abermals in Vem/Sel-res Zellen.

Anders verhielt es sich mit WNT5A. Hier blieb die Expression in parentalen, Vem- und Vem/Sel-res Zellen unabhängig von der Behandlung relativ stabil (*Abb. 18b*). Resistente Zellen zeigten jedoch eine gegenüber parentalen Zellen signifikant erhöhte Expression. Die FGFRi-Behandlung resistenter WM9-Melanomzellen resultierte also nicht in einer

eindeutigen Induktion des nicht-kanonischen WNT-Signalwegs, vertreten durch die Liganden WNT4 und WNT5A.

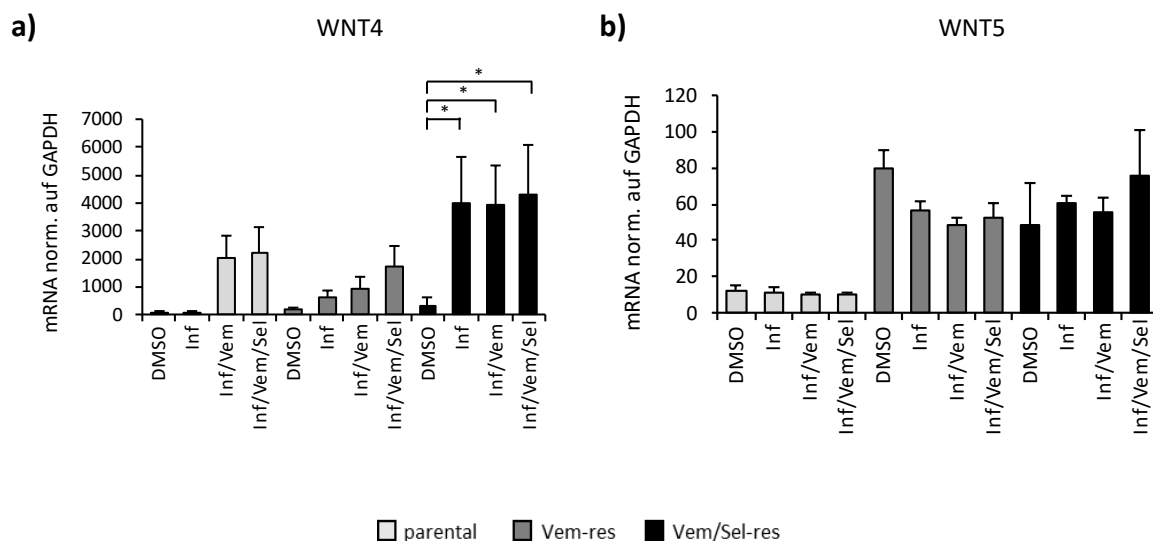


Abb. 18: Expression von WNT4 und WNT5A in parentalen, Vem- und Vem/Sel-res WM9-Melanomzellen

mRNA-Expression nach 3-tägiger Behandlung mit 2 μ M Infigratinib allein bzw. in Kombination mit 1 μ M Vemurafenib und 10 μ M Selumetinib. Als Kontrolle diente DMSO, n = 3.

a) Nach Behandlung mit Inf allein und in Kombination mit Vem bzw. Vem/Sel zeigte sich eine signifikante Induktion von WNT4 in Vem/Sel-res Zellen ($p = 0.024$ für Inf, $p = 0.030$ für Inf/Vem und $p = 0.012$ für Inf/Vem/Sel).

b) Vem- und Vem/Sel-res Zellen zeigten eine signifikant erhöhte Expression von WNT5A, unabhängig von der jeweiligen Behandlung ($p < 0.001$ für Vem-res, $p < 0.001$ für Vem/Sel-res).

3.3.4 FGFRi hemmt die Invasionskapazität resistenter Zellen

Da die Aggressivität von Tumorzellen u.a. von ihrer Fähigkeit zur Migration und Invasion in angrenzende Gewebe abhängt, wurde ein dreidimensionaler *in-vitro*-Assay eingesetzt, mit dem sich die Invasionskapazität der Zellen anschaulich darstellen lässt. Hierbei werden Sphäroide der Zellen in Kollagen eingebettet und können daraufhin aktiv in ihre Umgebung auswandern. Die Sphäroide sind durch ihre Dreidimensionalität dem morphologischen Aufbau eines Tumors ähnlicher als eine 2-dimensionale Kultur, die Zellen können vermehrte Zellkontakte untereinander ausbilden und die Sphäroide entwickeln im Inneren ein hypoxisches Zentrum und verminderte Proliferationsraten, was sich auch in soliden Tumoren zeigt. Diese Vorteile machen den Sphäroid-Assay zu einem weit verbreiteten Tumormodell [229].

Parentale, BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 wurden auf Agar-beschichteten Platten ausgesetzt und nach der Bildung von Sphäroiden in Kollagen eingebettet. Dabei fiel auf,

dass resistente Zellen bei gleicher Zellzahl deutlich kleinere und kompaktere Sphäroide bildeten als parentale (Abb. 19, Tag 0). Außerdem zeigten resistente Zellen eine verbesserte Sphäroidbildung unter Zugabe der jeweiligen Inhibitoren (Daten nicht gezeigt). Die Entwicklung der Sphäroide und die Migration der Zellen wurde über sechs Tage hinweg beobachtet und alle 48 h lichtmikroskopisch fotografiert. Die Bilder veranschaulichen, dass BRAFi- und noch deutlicher BRAFi/MEKi-res Zellen unter Behandlung mit ihren jeweiligen Inhibitoren eine frühere und stärkere Invasion zeigen als parentale (Abb. 19).

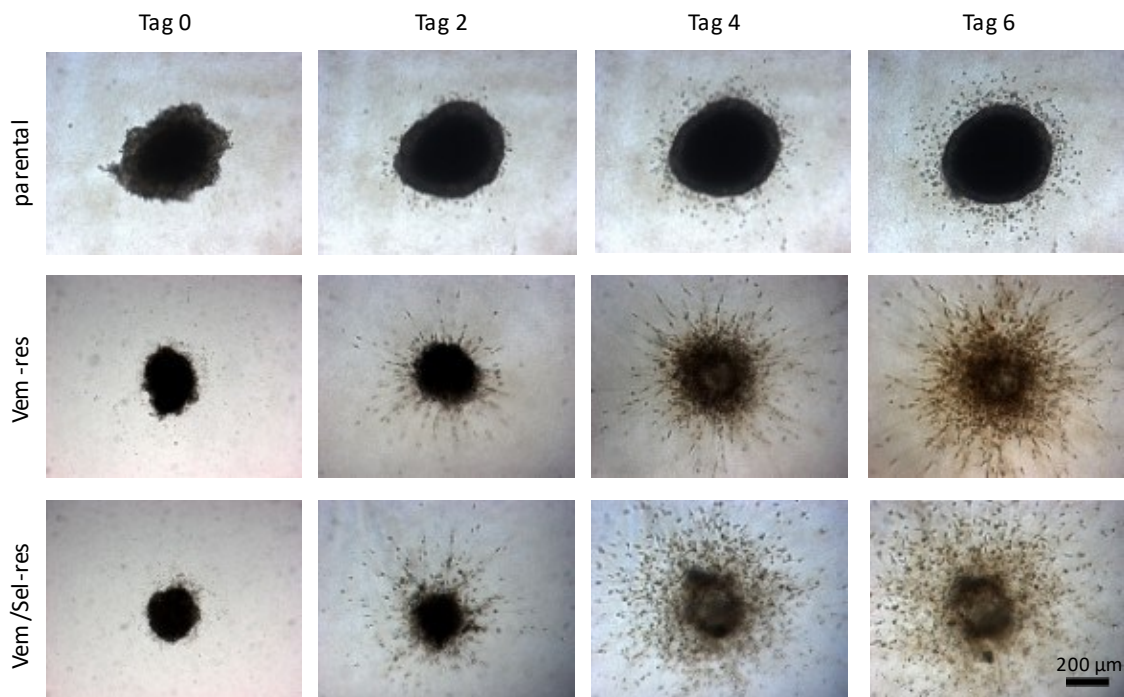


Abb. 19: Invasionskapazität parentaler, Vem- und Vem/Sel-res WM9-Melanomzellen

Dargestellt sind repräsentative Fotografien der Melanomzell-Sphäroide unmittelbar nach Einbettung in Kollagen (Tag 0) sowie nach weiteren 2, 4 und 6 Tagen. Es wurden jeweils 5000 Zellen pro Loch in eine Agar-beschichtete 96-Loch-Platte ausgesetzt und die gebildeten Sphäroide nach 4 Tagen in Kollagen (Endkonzentration 1mg/ml) eingebettet. Resistenten Zellen wurden die jeweiligen Inhibitoren zugefügt (1 µM Vemurafenib bzw. 1 µM Vemurafenib + 10 µM Selumetinib). Messbalken = 200 µm.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Sphäroide mit dem FGFRi allein und in Kombination mit BRAFi und MEKi behandelt. Repräsentative Fotografien an Tag 4 zeigen die Auswirkungen auf die Invasionskapazität der Zellen (Abb. 20). Die Invasion parentaler WM9 wurde durch alle Inhibitor-Kombinationen deutlich eingeschränkt, am effektivsten durch Zweifach- und Dreifachkombinationen. Mit Infigratinib allein war die Invasion parentaler Zellen nicht vollständig gehemmt, hier ließen sich noch einige invasive Zellen

finden. BRAFi-res Zellen zeigten unter der Kombination Vemurafenib und Selumetinib eine vollständige Hemmung der Migration. Sowohl in BRAFi- als auch in BRAFi/MEKi-res WM9 bewirkte der FGFRi allein bereits eine deutliche Inhibition der Invasion. In Kombination mit BRAFi und noch stärker mit BRAFi/MEKi wurde die Invasion resistenter Zellen völlig gehemmt, die Sphäroide präsentierten sich klein und kompakt mit teilweise totem Sphäroidkern. Die FGFR-Inhibition führte folglich zu einer effektiven Hemmung der Invasionskapazität in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen.

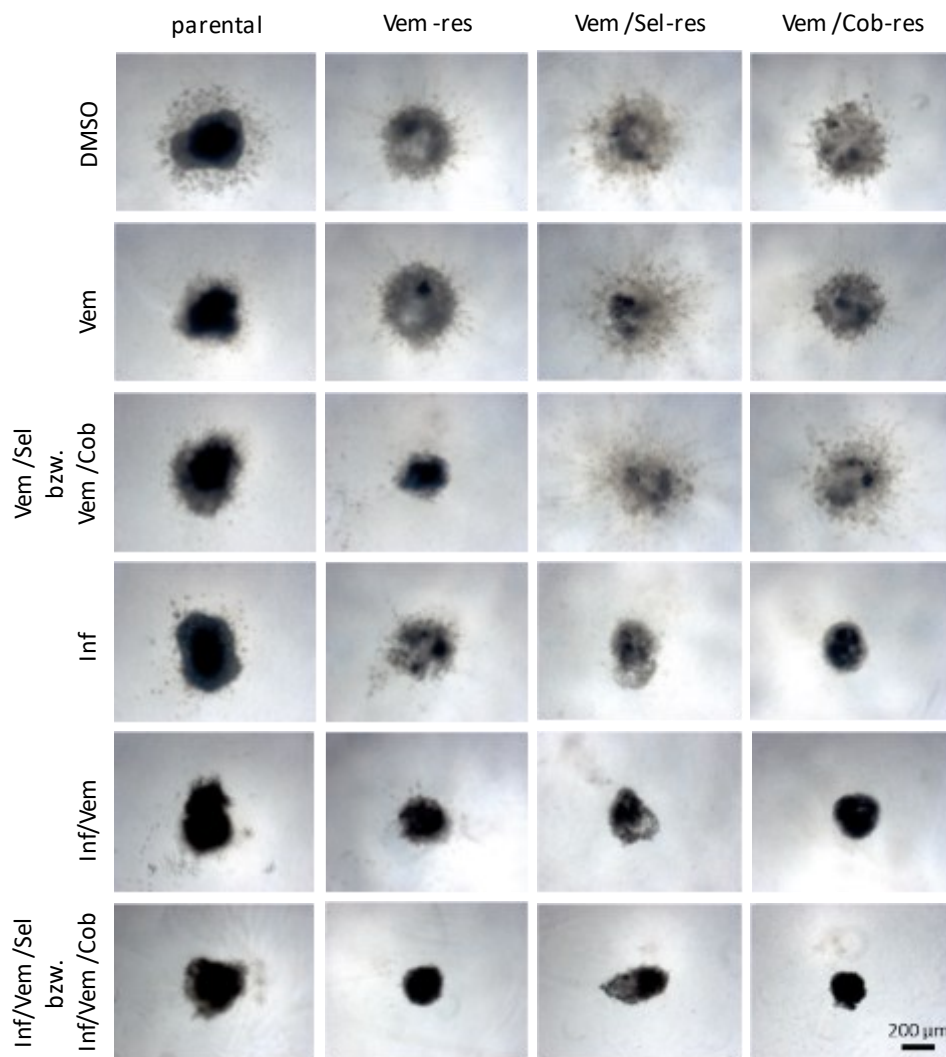


Abb. 20: Sphäroide parentaler, BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen nach FGFRi-Behandlung
 Repräsentative Fotografien der Melanomzell-Sphäroide an Tag 4 nach Einbettung in Kollagen (End-Konzentration 1 mg/ml). Dem Kollagen wurden 2 μ M Infigratinib allein oder in Kombination mit 1 μ M Vemurafenib bzw. 10 μ M Selumetinib oder 10 μ M Cobimetinib hinzugefügt. Als Kontrolle diente DMSO. Messbalken = 100 μ m.

3.3.5 FGFRi induziert Apoptose und Zellzyklusarrest in resistenten Zellen

Eine wesentliche Eigenschaft von Tumorzellen ist ihre Unabhängigkeit von Signalen, die natürlicherweise Wachstum und Überleben der Zelle regulieren und so für ein ausgewogenes Verhältnis von Zellteilung und Zelltod sorgen [69]. Irreparable Schäden an der DNA führen in einer gesunden Zelle zu Zellzyklusarrest und programmiertem Zelltod in Form von Apoptose, Nekroptose oder Autophagozytose [228]. So wird verhindert, dass sich defekte Zellen weiter vermehren oder über Gewebegrenzen hinauswachsen. Die Deregulation des üblicherweise streng kontrollierten Prozesses der Apoptose spielt daher eine zentrale Rolle bei der Tumorentstehung.

Um den Einfluss von Infigratinib auf die Apoptoseinduktion näher zu untersuchen, wurden parentale, BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen 3 Tage nach Behandlung mit PJ und AV gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert (*Abb. 21*). Keine der Inhibitor-Kombinationen beeinflusste die Apoptoserate der parentalen WM9. Der Anteil apoptotischer Zellen insgesamt blieb unter allen Behandlungen relativ konstant, In resistenten Zellen konnte unter der Behandlung mit Infigratinib allein eine deutliche Erhöhung der apoptotischen Zellpopulation beobachtet werden (9,8% in Vem-res und 46,3% in Vem/Sel-res Zellen). Eine weitere Steigerung der Apoptose war nach der kombinierten Behandlung aus Infigratinib mit Vemurafenib bzw. Vemurafenib/Selumetinib messbar. In parentalen Zellen konnte dieser steigernde Effekt nicht beobachtet werden. Unter der Dreifachbehandlung kam es in BRAFi-res WM9 zu einem Anstieg der apoptotischen Zellen auf etwa 57%. In BRAFi/MEKi-res Zellen führte die Dreifachbehandlung sogar zu einem Anstieg apoptotischer Zellen auf etwa 66%. Zugleich zeigte sich, dass Infigratinib resistente Zellen für die Behandlung mit Vemurafenib bzw. Vemurafenib/Selumetinib sensibilisierte (20,4% apoptotische Vem-res Zellen nach Behandlung mit Infigratinib/Vemurafenib gegenüber 3,9% nach Vemurafenib bzw. 66,3% apoptotische Vem/Sel-res Zellen nach Infigratinib/Vemurafenib/Selumetinib gegenüber 22,33% unter der Behandlung mit Vemurafenib/Selumetinib). Dieser Effekt konnte ebenfalls nicht in parentalen Zellen beobachtet werden. Durch die AV- und PJ-Färbung wurde demnach gezeigt, dass die zuvor beobachtete verminderte Zellvitalität nach FGFRi-Behandlung insbesondere in resistenten WM9 (*siehe 3.3.1*) auf eine erhöhte Apoptoserate zurückzuführen ist. Zusammenfassend ergeben diese Daten, dass die Behandlung mit Infigratinib zu einer deutlichen Apoptoseinduktion in resistenten, nicht

jedoch in parentalen Zellen führt, dieser Effekt durch Hinzufügen von Vemurafenib und Selumetinib noch verstärkt wird und Infigratinib resistente Zellen für die Behandlung mit Vemurafenib bzw. Vemurafenib/Selumetinib sensibilisiert.

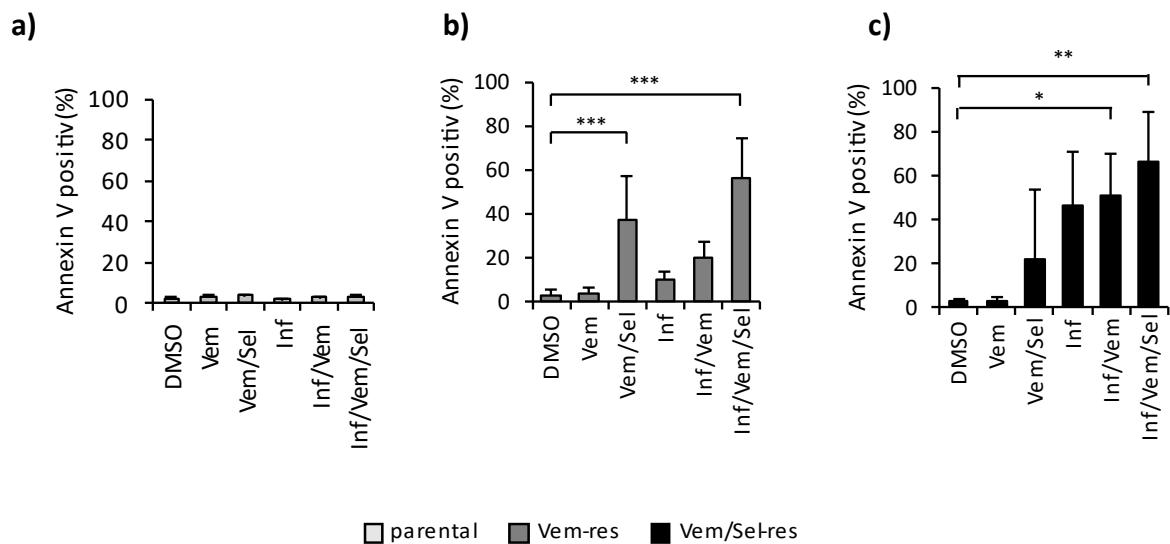


Abb. 21: Apoptose-Induktion nach FGFRi-Behandlung

Apoptose-Induktion parentaler, Vem- und Vem/Sel-res WM9 nach Färbung mit AV und PJ und Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie 3 Tage nach Behandlung mit 1 μ M Vemurafenib, 10 μ M Selumetinib und 2 μ M Infigratinib allein oder in Kombination. Als Kontrolle diente DMSO, n = 3.

a) Parentale Zellen zeigten unter keiner der getesteten Behandlungen eine erhöhte Apoptoserate.

b) Vem-res Zellen zeigten unter der Behandlung mit Vem/Sel sowie mit Inf/Vem/Sel eine signifikant erhöhte Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO ($p < 0,0001$). Auch Inf allein und noch stärker in Kombination mit Vem führte zu einem Anstieg der apoptotischen Fraktion.

c) Vem/Sel-res Zellen zeigten durch die Behandlung mit Inf allein und noch deutlicher mit Inf/Vem ($p < 0,05$) bzw. Inf/Vem/Sel ($p < 0,001$) einen Anstieg der apoptotischen Fraktion.

Wachstum und Proliferation der Zelle unterliegen einem streng kontrollierten Zyklus, dem sogenannten Zellzyklus. Dieser setzt sich aus drei Phasen zusammen: der Interphase, die der Vorbereitung auf die Zellteilung dient, der Mitose, während der Chromosomen und Zellkern geteilt werden sowie der Zytokinese, also der eigentlichen Zellteilung (Abb. 22). Der Übertritt in die jeweils nächste Phase wird an sogenannten Checkpoints reguliert und von Zellzyklusmediatoren, v.a. Cyclinen im Zusammenspiel mit Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDK) und Wachstumsfaktoren, streng kontrolliert [230]. Für den erfolgreichen Progress von der G1- in die S-Phase beispielsweise muss Cyclin D1 einen Komplex mit CDK4 und CDK6 bilden. Verschiedene Zellzyklusinhibitoren können wiederum bei Vorliegen von DNA-Schäden zum Verbleiben der Zelle in der G1-Phase

führen. Hierzu zählt das *retinoblastoma protein* (Rb), welches durch den Komplex aus Cyclin D1 und CDK4/6 phosphoryliert und damit inhibiert wird. Die Inhibition von Rb ermöglicht in der späten G1-Phase die Transkription von Genen, die für die Progression in die S-Phase nötig sind [231]. Bleibt sie aus, verbleibt die Zelle in der G1-Phase. Eine verminderte Expression von Cyclin D1 und pRb sind folglich ein Zeichen für Zellzyklusarrest.

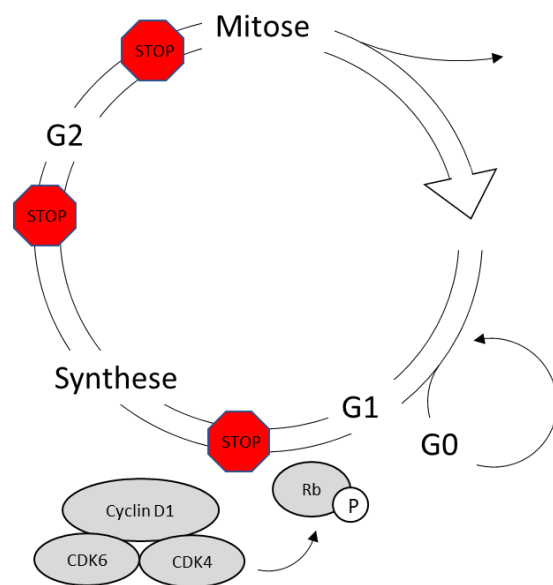


Abb. 22: Schematische Darstellung des Zellzyklus

Die Interphase des Zellzyklus gliedert sich in die G1-, S- und G2-Phase, auf sie folgt die Mitose, die mit der Zytokinese endet. Die Übergänge zwischen zwei Phasen werden an Checkpoints (hier gekennzeichnet durch STOP) streng kontrolliert, stimmen die Voraussetzungen nicht, verbleibt die Zelle in der jeweiligen Phase. So wird die Proliferation beschädigter Zellen vermieden. Den Übergang zwischen G1- und S-Phase überwacht ein Komplex aus Cyclin D1, CDK4 und CDK6, der Rb durch Phosphorylierung inhibiert. Dadurch wird die Freisetzung von Transkriptionsfaktoren ermöglicht, die den Eintritt in die S-Phase bewirken.

Neben der Zelltodinduktion wurde die Proteinexpression verschiedener Zellzyklus- und Apoptosemediatoren in parentalen, BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 nach Behandlung mit den jeweiligen Inhibitor-Kombinationen analysiert (Abb. 23). Neben Cyclin D1 und pRb wurden Caspase 3 und Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) detektiert. Die Caspase-Aktivierung kann dabei mit Hilfe der gespaltenen aktiven Untereinheit der Procaspase gemessen werden. PARP ist an der Reparatur von DNA-Strang-Brüchen beteiligt. Sind die DNA-Schäden allerdings zu groß und nicht zu reparieren, wird PARP zu Beginn der Apoptose durch Effektorcaspasen, u.a. durch Caspase 3, gespalten und so inaktiviert. Die Spaltung von PARP markiert somit ein sehr frühes Stadium der Apoptose.

Erstaunlicherweise war in allen Zellen Caspase 3 nur schwach detektierbar. In parentalen wie in resistenten WM9 zeigte sich die stärkste PARP-Spaltung nach Behandlung mit Infigratinib/Vemurafenib/Selumetinib. Interessanterweise fand sich in resistenten Zellen

auch nach der Behandlung mit Infigratinib allein eine deutliche Spaltung von PARP, nicht jedoch in parentalen Zellen. Übereinstimmend mit Apoptoseinduktion und PARP-Spaltung fand sich eine verminderte Expression von Cyclin D1 und pRb, was darauf hinweist, dass die FGFRi-Behandlung einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase insbesondere in Vem- und Vem/Sel-res Zellen induziert und in Kombination mit Vemurafenib und Selumetinib synergistische Effekte ausübt.

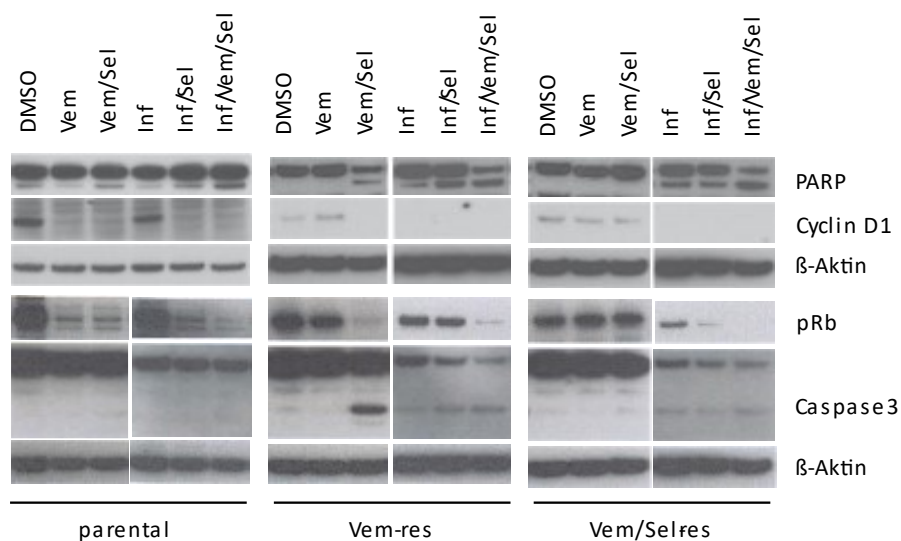


Abb. 23: Expression von Zellzyklusmediatoren nach FGFRi-Behandlung

Western-Blot-Analysen der Proteinexpression verschiedener Zellzyklusmediatoren in parentalen, Vem- und Vem/Sel-res WM9-Melanomzellen 3 Tage nach Behandlung mit 1 μ M Vemurafenib, 10 μ M Selumetinib und 2 μ M Infigratinib allein oder in Kombination. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

3.4 Expressionsanalyse von FGF-Rezeptoren und -Liganden

In Anbetracht der vielversprechenden Ergebnisse der FGFRi-Behandlung konzentrierten sich unsere weiteren Untersuchungen auf die Expression der Zielstrukturen von Infigratinib. Dabei wurde vorrangig nach unterschiedlichen Expressionsmustern zwischen parentalen und resistenten Zellen gesucht, die möglicherweise den starken Effekt des FGFRi in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 erklären und auf zugrunde liegende Resistenzmechanismen hinweisen könnten.

3.4.1 FGFR sind in resistenten Zellen verstärkt exprimiert

Zunächst wurde untersucht, ob dem Ansprechen auf eine FGFRi-Behandlung ein gegenüber parentalen Zellen verändertes Expressionsmuster der FGFR in resistenten Zellen zugrunde liegt. Dazu wurde die Genexpression der FGFR1-5 in parentalen, BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 analysiert und die Ergebnisse anschließend auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analyse überprüft (*Abb. 24*). Es fanden sich signifikant erhöhte Genexpressionen für FGFR1, 2, 3 und 5 in BRAFi/MEKi-res Zellen gegenüber parentalen Zellen (*Abb. 24a*). Die Expression von FGFR1 war ganz besonders hoch in Vem-res WM9. Die stärkste relative Expressionserhöhung fand sich für FGFR2. Während parentale Zellen fast keine FGFR2-Expression aufwiesen, war diese in Vem-res Zellen um das 46-fache, in Vem/Sel-res Zellen um das 93-fache und in Vem/Cob-res Zellen um das 79-fache erhöht. Demgegenüber war nur FGFR4 in resistenten im Vergleich zu parentalen Zellen geringer oder gleichbleibend stabil exprimiert.

Das FGFR2-Gen kodiert für mehrere Rezeptor-Isoformen, zwei repräsentative sind FGFR2IIIb und FGFR2IIIc. FGFR2IIIb wird überwiegend in epithelialen Zellen exprimiert, FGFR2IIIc vornehmlich in mesenchymalen [232]. Die Genexpressionsanalyse ergab, dass beide Isoformen in resistenten Zellen exprimiert wurden, wobei in Vem-res vorwiegend FGFR2IIIb, in Vem/Sel-res dagegen vorwiegend FGFR2IIIc vorlag (*Abb. 24c*).

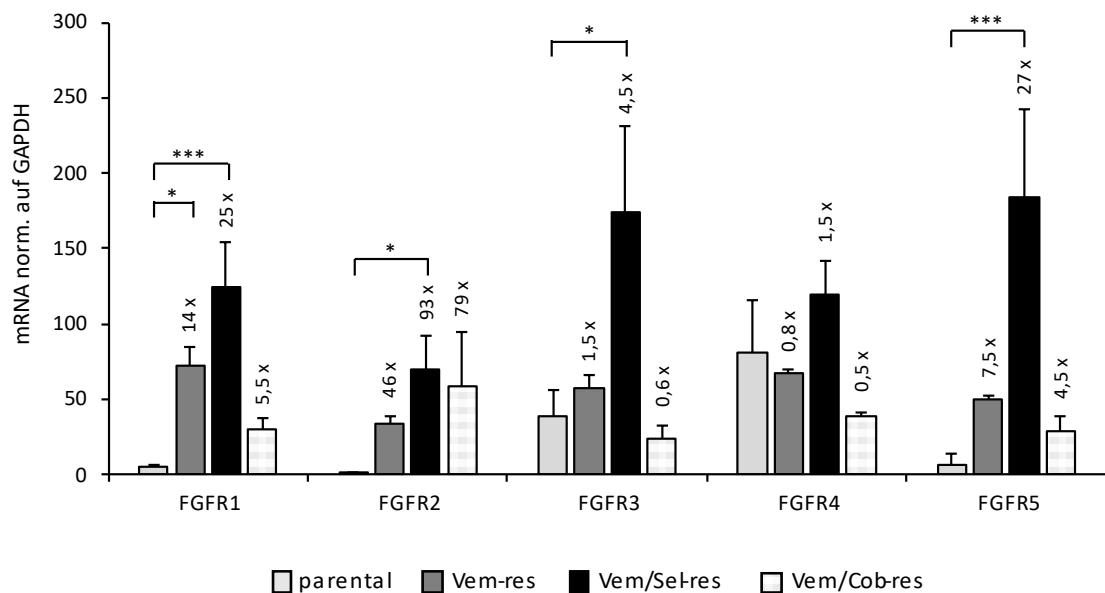
Die anschließende Expressionsanalyse der FGFR1-4 auf Proteinebene ergab Großteils ein mit der Genexpression übereinstimmendes Bild (*Abb. 24b*). FGFR1 war sowohl in parentalen als auch in Vem- und Vem/Sel-res Zellen stark exprimiert. Die stärkste Erhöhung gegenüber parentalen Zellen fand sich erneut für FGFR2. FGFR3 und die aktive Form pFGFR3 zeigte sich in parentalen und resistenten WM9 ähnlich stark exprimiert. Für FGFR4 konnte eine verminderte Expression in resistenten verglichen mit parentalen Zellen beobachtet werden.

Zusätzlich wurde die Proteinexpression der Phospholipase C gamma (PLC γ) detektiert. PLC hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu den Botenstoffen Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) und spielt so eine wichtige Rolle für die intrazelluläre Signaltransduktion und Zellproliferation [233]. In verschiedenen Tumorentitäten konnte eine Überexpression von PLC beobachtet werden, die Tumorphiliferation, Angiogenese und Metastasierung vermittelt [234]. Es existieren verschiedene Isoformen, die entweder über G-Proteine oder im Fall der PLC γ über

Phosphorylierung von RTK, u.a. von FGFR, aktiviert werden [161, 235]. Die hier untersuchten resistenten WM9 zeigten eine gegenüber parental Zellen leicht erhöhte Proteinexpression von pPLC γ , was auf eine verstärkte Aktivität des FGFR-Signalwegs hinweisen könnte (Abb. 24b).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mehrere FGFR in BRAFi- und noch stärker in BRAFi/MEKi-res Zellen gegenüber parental Zellen überexprimiert waren, was die zuvor beschriebene effektive Hemmung der Vitalität und Invasionskapazität sowie die Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose in resistenten, nicht jedoch in parental WM9 erklären könnte.

a)



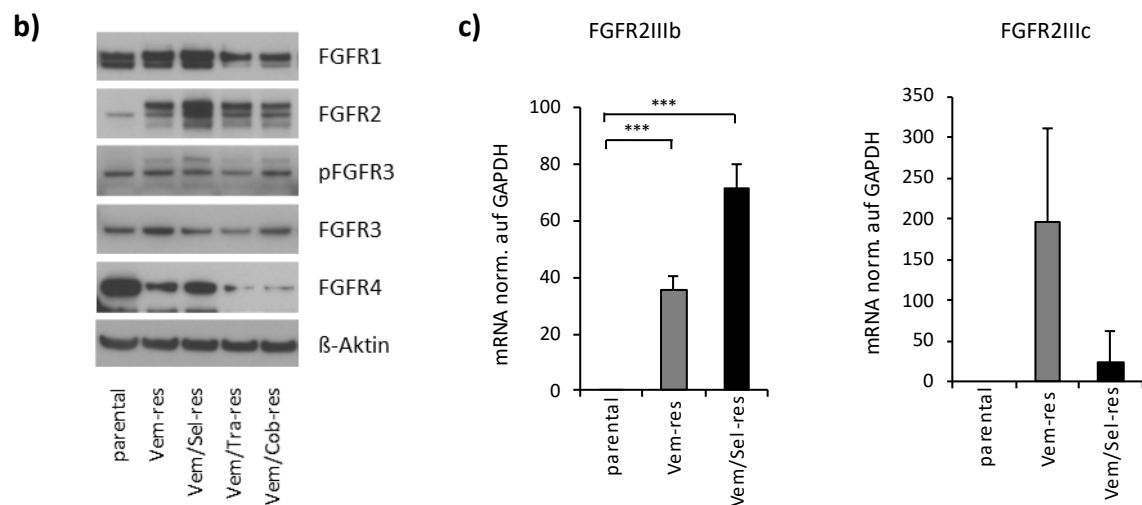


Abb. 24: FGFR-Expression parental, BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen

a) mRNA-Expression der FGFR1-5, $n = 3$. Es zeigten sich signifikante Expressionserhöhungen in resistenten gegenüber parental Zellen für FGFR1 ($p = 0.015$ für Vem-res, $p < 0.001$ für Vem/Sel-res), FGFR2 ($p = 0.025$ für Vem/Sel-res), FGFR3 ($p = 0.009$ für Vem/Sel-res) und FGFR5 ($p = 0.001$ für Vem/Sel-res). Vem/Sel-res Zellen zeigten für alle FGFR die höchsten Expressionen.

b) Proteinexpression der FGFR1-4 sowie pPLC γ in parental, BRAFi- und mehreren BRAFi/MEKi-res Zellen. Hier bestätigte sich die stärkste relative Expressionserhöhung gegenüber parental Zellen für FGFR2. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

c) mRNA-Expression der Isoformen FGFR2IIIb und FGFR2IIIc, $n = 3$. Für FGFR2IIIb zeigte sich keine signifikante Expressionserhöhung, FGFR2IIIc war sowohl in Vem- als auch in Vem/Sel-res Zellen signifikant erhöht ($p < 0.001$ für Vem-res und $p < 0.001$ für Vem/Sel-res).

3.4.2 FGFRi induziert die Expression von FGFR in resistenten Zellen

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, inwiefern eine FGFRi-Behandlung die Expression der einzelnen FGFR in parental und BRAFi- bzw. BRAFi/MEKi-res WM9 beeinflusst. Dazu wurde die Expression von FGFR1-5 mittels Echtzeit-PCR nach dreitägiger Behandlung mit Infigratinib allein und in Kombination mit Vemurafenib und Selumetinib ermittelt (*Abb. 25*). Hier zeigte sich, dass Infigratinib allein und noch stärker in Kombination mit Vemurafenib bzw. Vemurafenib/Selumetinib zu einer signifikanten Expressionserhöhung der FGFR2, 3, 4 und 5 in Vem/Sel-res Zellen führte. Für FGFR2 und FGFR4 konnte zudem eine signifikante Genexpressionserhöhung in Vem-res WM9 gefunden werden. Die stärkste relative Erhöhung fand sich erneut für FGFR2 (*Abb. 25b*). Hier resultierte die Behandlung mit Infigratinib allein in Vem-res Zellen in einer 3-fachen, in Vem/Sel-res sogar in einer 5-fachen Genexpressionserhöhung. Unter der

Dreifachkombination kam es zu einer Erhöhung der FGFR2-Expression um das etwa 10-fache in Vem- und das etwa 9-fache in Vem/Sel-res Zellen. Für FGFR1 ließ sich keine signifikante Veränderung der Expression nach FGFRi-Behandlung finden (Abb. 25a). Weder die Behandlung mit Infigratinib allein noch in Kombination mit Vemurafenib und Selumetinib führte in parentalen Zellen zu einer Expressionserhöhung der Rezeptoren.

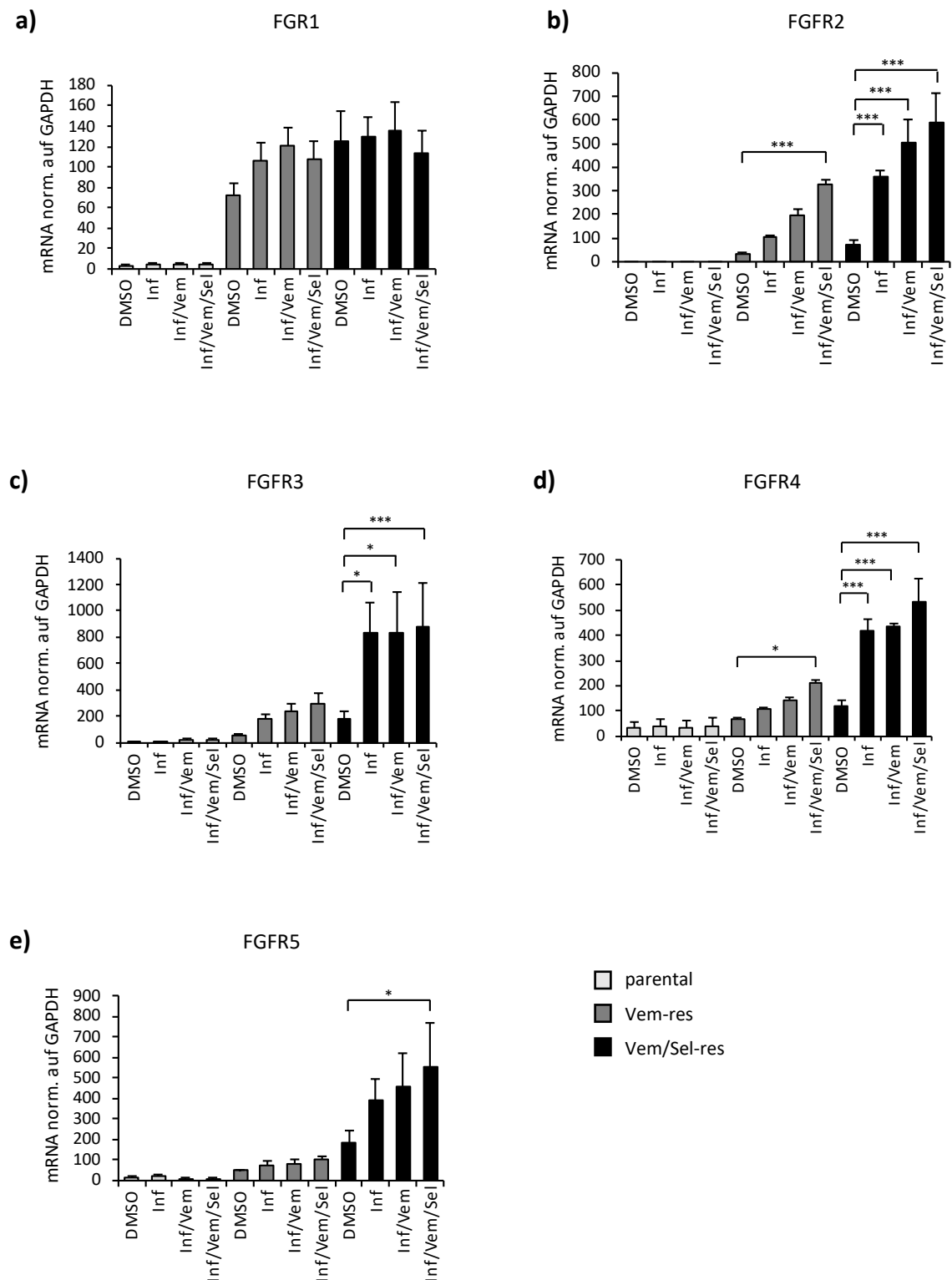


Abb. 25: FGFR-Expression in parentalen, Vem- und Vem/Sel-res WM9-Melanomzellen nach FGFRi-Behandlung
mRNA-Expression von FGFR1-5 in parentalen, Vem- und Vem/Sel-res Zellen 3 Tage nach Behandlung mit 2 μ M Infigratinib allein oder in Kombination mit 2 μ M Vemurafenib und 10 μ M Selumetinib. Als Kontrolle diente DMSO, n = 3.

- a)** FGFR1: Infigratinib führte weder allein noch in Kombination mit Vem bzw. Vem/Sel zu einer signifikanten FGFR1-Induktion in parentalen, Vem- oder Vem/Sel-res Zellen.
- b)** FGFR2: Die Behandlung mit Inf führte in Vem- und Vem/Sel-res Zellen zu einer signifikanten FGFR2-Induktion, die durch Hinzufügen von Vem und Vem/Sel noch verstärkt wurde ($p < 0.001$ für Vem-res mit Inf/Vem/Sel, $p < 0.001$ für Vem/Sel-res mit Inf, $p < 0.001$ für Vem/Sel-res mit Inf/Vem und $p < 0.001$ für Vem/Sel-res mit Inf/Vem/Sel).
- c)** FGFR3: In Vem/Sel-res Zellen zeigte sich eine signifikante Expressionserhöhung nach Infigratinib-Behandlung ($p = 0.008$ für Inf, $p = 0.009$ für Inf/Vem und $p = 0.005$ für Inf/Vem/Sel).
- d)** FGFR4: Es zeigte sich eine signifikante FGFR4-Induktion in Vem-res Zellen nach Behandlung mit Inf/Vem/Sel ($p = 0.027$) und für alle Infigratinib-Behandlungen in Vem/Sel-res Zellen WM9 ($p < 0.001$ für Inf, $p < 0.001$ für Inf/Vem und $p < 0.001$ für Inf/Vem/Sel).
- e)** FGFR5: Einzig die Kombinationsbehandlung aus Inf/Vem/Sel führte in Vem/Sel-res Zellen zu einer signifikanten Expressionserhöhung ($p = 0.008$).

Die Proteinexpression von FGFR2, pFGFR3 und FGFR4, die in resistenten WM9 nach Inhibitorbehandlung eine deutlich erhöhte Genexpression aufwies, wurde 3 Tage nach Behandlung mit Infigratinib allein oder in Kombination mit Vemurafenib und Selumetinib untersucht (*Abb. 26*). Hier zeigte sich analog zu den oben dargestellten Ergebnissen, dass die Behandlung mit Infigratinib allein und noch stärker in Kombination mit Vemurafenib bzw. Vemurafenib/Selumetinib zu einer deutlichen Induktion der Proteinexpression von FGFR2 in Vem- und Vem/Sel-res Zellen führte. Dies galt nicht für parentale Zellen, hier konnte überhaupt kein FGFR2 detektiert werden. Die Proteinexpression von p-FGFR3 und FGFR4 zeigte sich hingegen unter der Behandlung mit Infigratinib allein und noch stärker in Kombination mit Vemurafenib bzw. Vemurafenib/Selumetinib sowohl in parentalen als auch in resistenten Zellen gegenüber der Kontrolle mit DMSO vermindert.

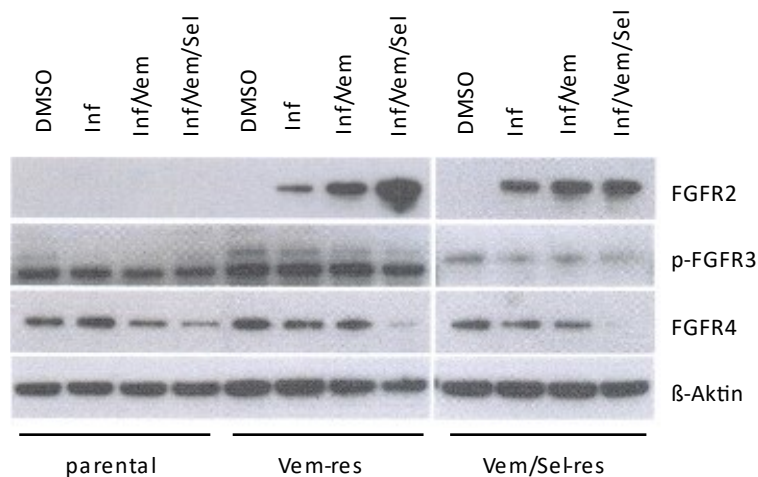


Abb. 26: Proteinexpression von FGFR2, p-FGFR3 und FGFR4 nach FGFRi-Behandlung

Expression von FGFR2, pFGFR3 und FGFR4 in parentalen, Vem- und Vem/Sel-res WM9-Melanomzellen 3 Tage nach Behandlung mit 2 μ M Infigratinib allein oder in Kombination mit 2 μ M Vemurafenib und 10 μ M Selumetinib. Als Kontrolle diente DMSO. Es zeigte sich eine deutlich verstärkte Expression von FGFR2 in resistenten Zellen nach Behandlung mit Inf allein und noch stärker in Kombination mit Vem und Sel. β -Aktin diene als Ladekontrolle.

3.4.3 Spezifische Hemmung der FGFR reduziert die Vitalität resistenter Zellen

Die oben dargestellten Ergebnisse führten zur Hypothese, dass resistente Zellen in der Lage sind, durch eine Hochregulierung einiger FGFR, insbesondere von FGFR2, dem Druck zielgerichteter BRAFi- und BRAFi/MEKi-Therapien zu entkommen. Um diese These zu prüfen, sollte der Effekt einer spezifischen Hemmung der einzelnen FGFR auf die Vitalität parentaler und resistenter Zellen untersucht werden. Dazu wurde die Technik der RNA-Interferenz angewendet, die es ermöglicht, mit Hilfe spezifischer siRNAs zielgerichtet ein bestimmtes Gen auszuschalten. Dadurch kann eine sehr hohe Spezifität erreicht werden. Um den Einfluss der einzelnen FGFR auf die Vitalität parentaler und resistenter WM9 zu analysieren, wurden spezifische siRNAs gegen die FGFR1-4 entworfen und zunächst die FGFR-Expression in Vem/Sel-res Zellen 3 Tage nach gezielter FGFR-Inhibition auf Proteinebene überprüft (Abb. 27a). Hier zeigte sich, dass die Inhibition nicht voll funktioniert und nicht zu einer spezifischen, unabhängigen Reduktion der jeweiligen Proteinexpression der FGFR geführt hatte. Am besten funktionierte die Hemmung von FGFR1, die jedoch auch eine Expressionsverminderung von FGFR2 und FGFR3 bewirkte. Dennoch wurde anschließend der Einfluss der Hemmung der einzelnen FGFR auf die Zellvitalität 6 Tage nach Transfektion der jeweiligen siRNA mittels CellTiter-Blue® Assay

bestimmt (Abb. 27b). Die Ergebnisse zeigen, dass die spezifische Hemmung von FGFR1 und FGFR2 die Vitalität parentaler und resistenter Zellen reduzierte. Am deutlichsten zeigte sich dies für FGFR1, hier reduzierte sich die Vitalität in Vem-res WM9 im Mittel auf etwa 32%, in Vem/Sel-res sogar auf etwa 17%. Für die Hemmung von FGFR2 konnte eine Reduktion der Vitalität in Vem-res Zellen auf im Mittel 53%, in Vem/Sel-res auf etwa 42% beobachtet werden. Die Ergebnisse sind jedoch aus o.g. Gründen mit großer Vorsicht zu interpretieren, lediglich eine Abhängigkeit der Vitalität parentaler und resistenter WM9 von FGFR1 und FGFR2 kann angenommen werden.

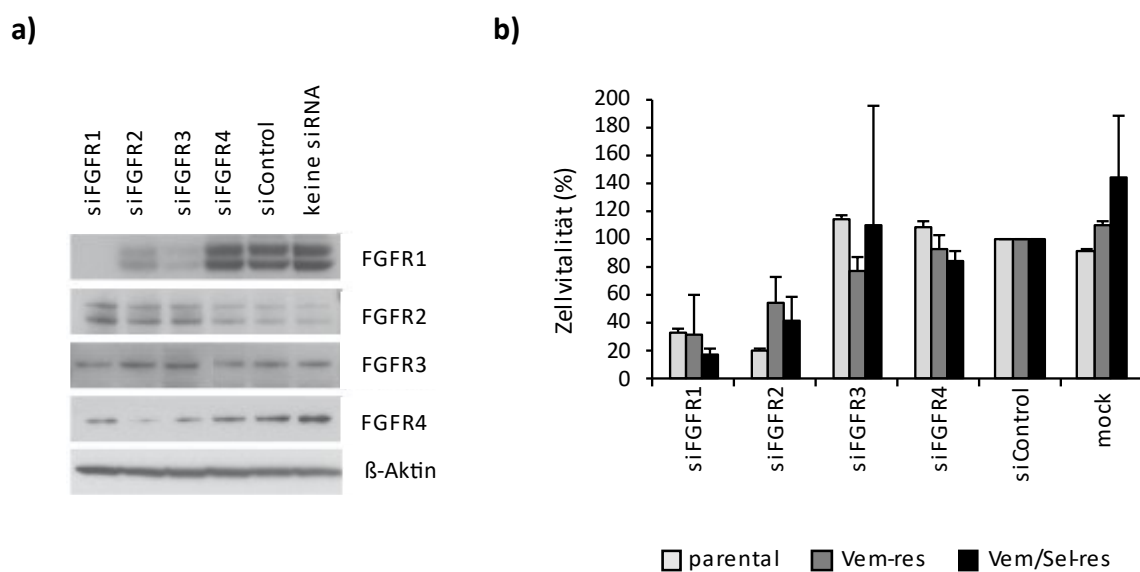


Abb. 27: Spezifische Inhibition von FGFR1-4 in WM9-Melanomzellen

a) Überprüfung der spezifischen Hemmung von FGFR1-4 in Vem/Sel-res Zellen mittels Western-Blot-Analyse 3 Tage nach siRNA-Transfektion. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

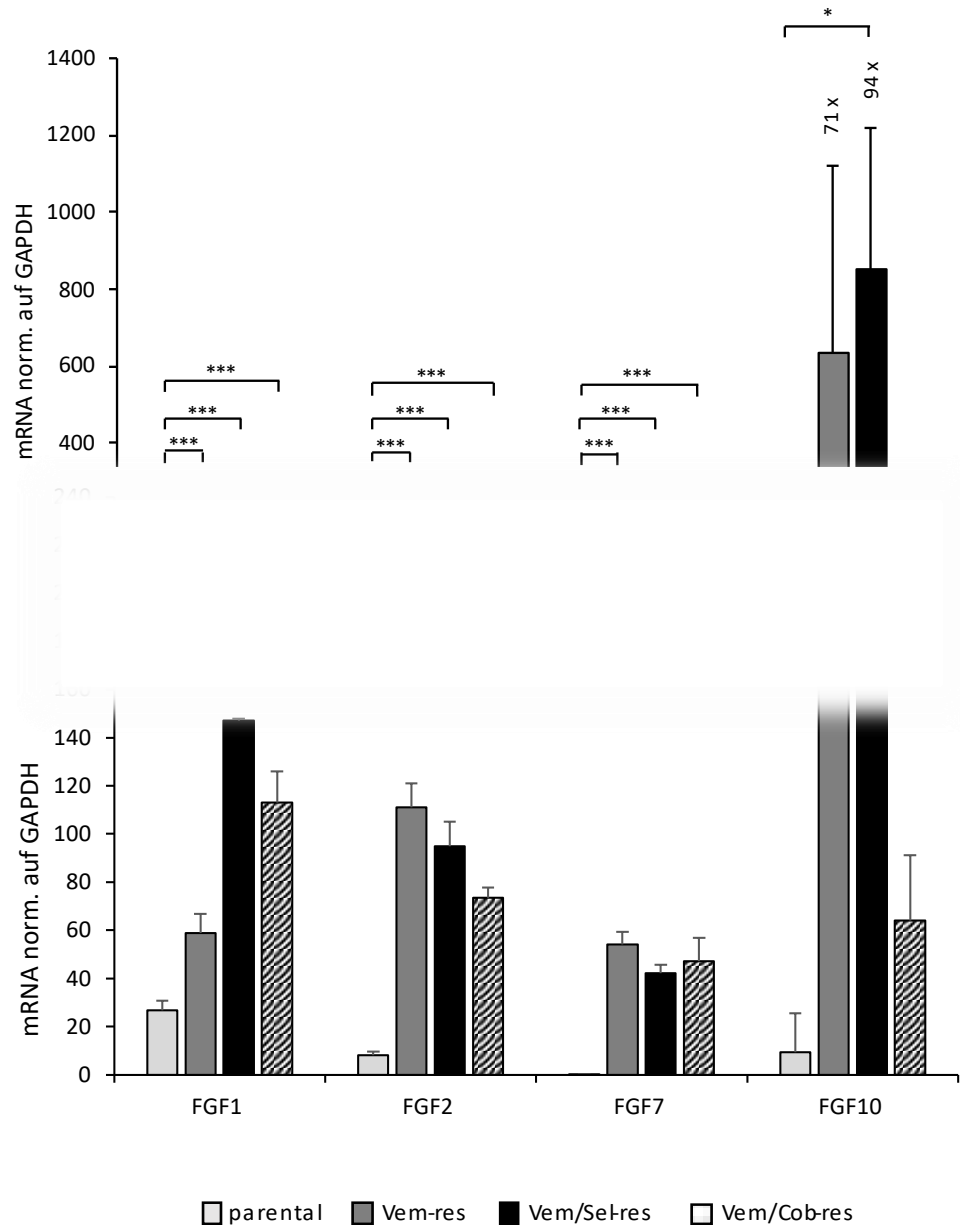
b) Zellvitalität parentaler, Vem- und Vem/Sel-res Zellen 6 Tage nach siRNA-Transfektion, n = 3. Es zeigte sich eine Reduktion der Zellvitalität in parentalen, Vem- und Vem/Sel-res Zellen nach Hemmung von FGFR1 und FGFR2.

3.4.4 FGF sind in resistenten Zellen erhöht exprimiert

Neben einer erhöhten FGFR-Expression kann auch eine verstärkte Sezernierung von FGF-Liganden zu einer Hochregulierung des FGFR-Signalwegs führen. Die 22 bekannten FGF binden die einzelnen FGFR mit unterschiedlicher Affinität. Die meisten Liganden können dabei mehrere FGFR aktivieren und umgekehrt wird jeder FGFR von verschiedenen FGF aktiviert [161, 236]. Da die vorangegangene Analyse der FGFR-Expression v.a. eine Erhöhung für FGFR2 in resistenten WM9 ergeben hatte, wurde in einem nächsten Schritt die Genexpression einiger FGF, die insbesondere FGFR2 mit einer hohen Affinität binden,

analysiert. Dies sind v.a. FGF1, FGF2, FGF7 und FGF10, wobei FGF1 und FGF2 alle FGFR1-4 aktivieren, FGF7 jedoch ausschließlich FGFR2 [236-238]. Eine signifikant erhöhte Expression in allen resistenten verglichen mit parentalen Zellen fand sich für FGF1, FGF2 und FGF7. FGF10 war nur in Vem/Sel-res WM9 signifikant gegenüber parentalen Zellen erhöht. Die stärkste relative Erhöhung fand sich für FGF7, der sowohl in Vem- als auch in Vem/Sel-res Zellen um mehr als das 200-fache gegenüber parentalen Zellen exprimiert war (Abb. 28a). Für FGF7 wurde deshalb anschließend zudem die Proteinexpression mittels Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 28b). Hier zeigte sich ebenfalls eine stark erhöhte Expression für Vem- und Vem/Sel-res, nicht jedoch für Vem/Tra- und Vem/Cob-res Zellen.

a)



b)

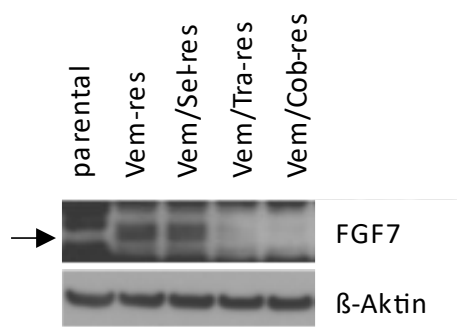


Abb. 28: Expression von FGF1, FGF2, FGF7 und FGF10 in parental, BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen

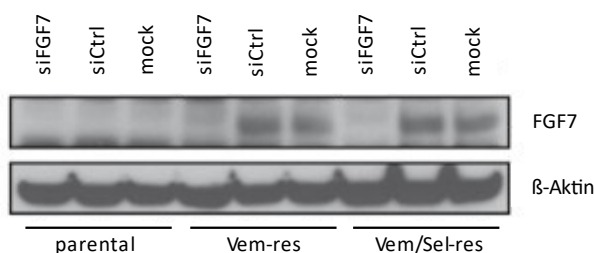
a) mRNA-Expression analysiert mittels Echtzeit-PCR, n = 3. Die Expression von FGF1 ($p < 0.001$ für Vem-res, $p < 0.001$ für Vem/Sel-res und $p < 0.001$ für Vem/Cob-res), FGF2 ($p < 0.001$ für Vem-res, Vem/Sel-res und Vem/Cob-res), FGF7 ($p < 0.001$ für Vem-res, Vem/Sel-res und Vem/Cob-res) und FGF10 ($p = 0.040$ für Vem/Sel-res) war signifikant erhöht in den BRAFi/MEKi-res Melanomzellen im Vergleich zu den parentalen Kontrollen. Der Unterschied war am stärksten für FGF7.

b) Western-Blot-Analyse: 2 von 4 resistenten Zelllinien zeigten eine gegenüber parental WM9 erhöhte Proteinexpression von FGF7. β -Aktin diene als Ladekontrolle.

3.4.5 Spezifische Hemmung von FGF7 reduziert die Vitalität in resistenten Zellen

Um die Bedeutung von FGF7 für BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen näher zu charakterisieren, wurde der Einfluss einer spezifischen Hemmung von FGF7 auf die Zellvitalität untersucht. Die erfolgreiche Hemmung von FGF7 wurde mittels Western-Blot-Analyse im Vergleich zur Kontroll-siRNA und Kontrollvektor-transfizierten Zellen überprüft (Abb. 29a). Anschließend wurde die Vitalität der transfizierten Zellen mit Hilfe des CellTiter-Blue® Assay bestimmt. Hier zeigte sich, dass die spezifische Hemmung von FGF7 in Vem- und Vem/Sel-res WM9 zu einer signifikanten Reduktion der Vitalität führte, nicht jedoch in parentalen Zellen (Abb. 29b). Die Vitalität Vem-res Zellen sank auf im Mittel etwa 79%, die Vem/Sel-res auf etwa 68%, während parentale Zellen immer noch eine Vitalität von etwa 91% zeigten.

a)



b)

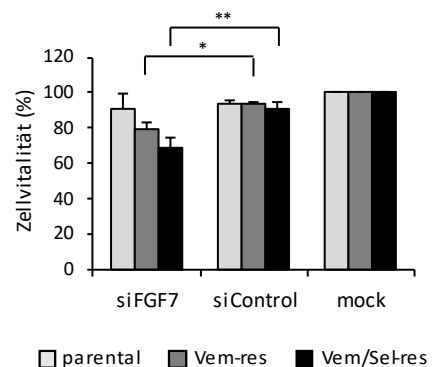


Abb. 29: Zellvitalität parentaler, Vem- und Vem/Sel-res WM9-Melanomzellen nach spezifischer Inhibition von FGF7

a) Western-Blot-Analyse zur Überprüfung der spezifischen Inhibition von FGF7 48h nach siRNA-Transfektion. β -Aktin diene als Ladekontrolle.

b) Die Zellvitalität wurde mittels CellTiter-Blue® Assay 72h nach siRNA-Transfektion gemessen, n = 3. Die Vitalität der Kontrollvektor-transfizierten Zellen wurde mit 100% angenommen. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Vitalität gegenüber der Kontrolle für Vem-res ($p = 0.036$) und Vem/Sel-res ($p = 0.002$).

Zusammen mit der Analyse der FGFR-Expression veranschaulicht dieses Ergebnis nochmals die Bedeutung des FGF7/FGFR2-Signalwegs für BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9. Zum einen waren einige FGFR – insbesondere FGFR2 – und einige FGF – vor allem FGF7 – in resistenten Zellen verstärkt exprimiert. Zum anderen zeigte die Vitalität resistenter Zellen eine deutliche Abhängigkeit von der FGFR1-, FGFR2- und FGF7-Aktivität, die für parentale Zellen nicht beobachtet werden konnte.

3.5 FGFRi reduziert die Vitalität kurzzeitig kultivierter Melanomzellen

Abschließend wurde die Wirkung des FGFRi Infigratinib an weiteren Zelllinien überprüft. Dazu wurden die Zelllinien LMU-KM11 und LMU-KM14 gewählt, die beide frisch aus kutanen Melanom-Metastasen einer an der Klinik für Dermatologie und Allergologie der LMU behandelten Patientin gewonnen wurden. Die Patientin befand sich bereits bei Erstdiagnose 2011 in einem metastasierten Stadium und trug eine BRAF^{V600}-Mutation. Bis zur Gewebeentnahme für die Zelllinie LMU-KM11 wurde er mit Dabrafenib und Trametinib sowie nach einem Progress mit Ipilimumab behandelt. Anschließend folgte eine Behandlung mit BRAFi/MEKi/FGFRi über die LOGIC-2 Studie (NCT02159066), auch hierunter zeigte sich ein Progress und es erfolgte die Gewebeentnahme für die Zelllinie LMU-KM14.

Im Vergleich zu WM9-Melanomzellen wurden LMU-KM11 und LMU-KM14 für wesentlich kürzere Zeit in Kultur gehalten. Tumorzelllinien können zwar über längere Zeit kultiviert werden, von Zellgeneration zu Zellgeneration nehmen allerdings genetische und phänotypische Veränderung zu. So können sich die in Zellkultur gezüchteten Melanomzellen in ihren Eigenschaften von *in vivo* Melanomzellen immer weiter entfernen. An den beiden Kurzzeitkultur-Zelllinien wurden die Vitalitätsmessungen nach Behandlung mit Infigratinib, Buparlisib und Ravoxertinib allein und in Kombination mit Vemurafenib und Selumetinib wiederholt (*Abb. 30a und b*). Es zeigte sich, dass auch in LMU-KM11 und LMU-KM14 die Behandlung mit dem FGFRi allein und noch stärker in Kombination mit Vemurafenib bzw. Vemurafenib/Selumetinib zur stärksten Reduktion der Zellvitalität führte. Daraufhin wurde die Proteinexpression der FGFR1-4 mittels Western Blot analysiert (*Abb. 30c*). Hierbei waren die Expressionen von FGFR1 und von FGFR2 am höchsten.

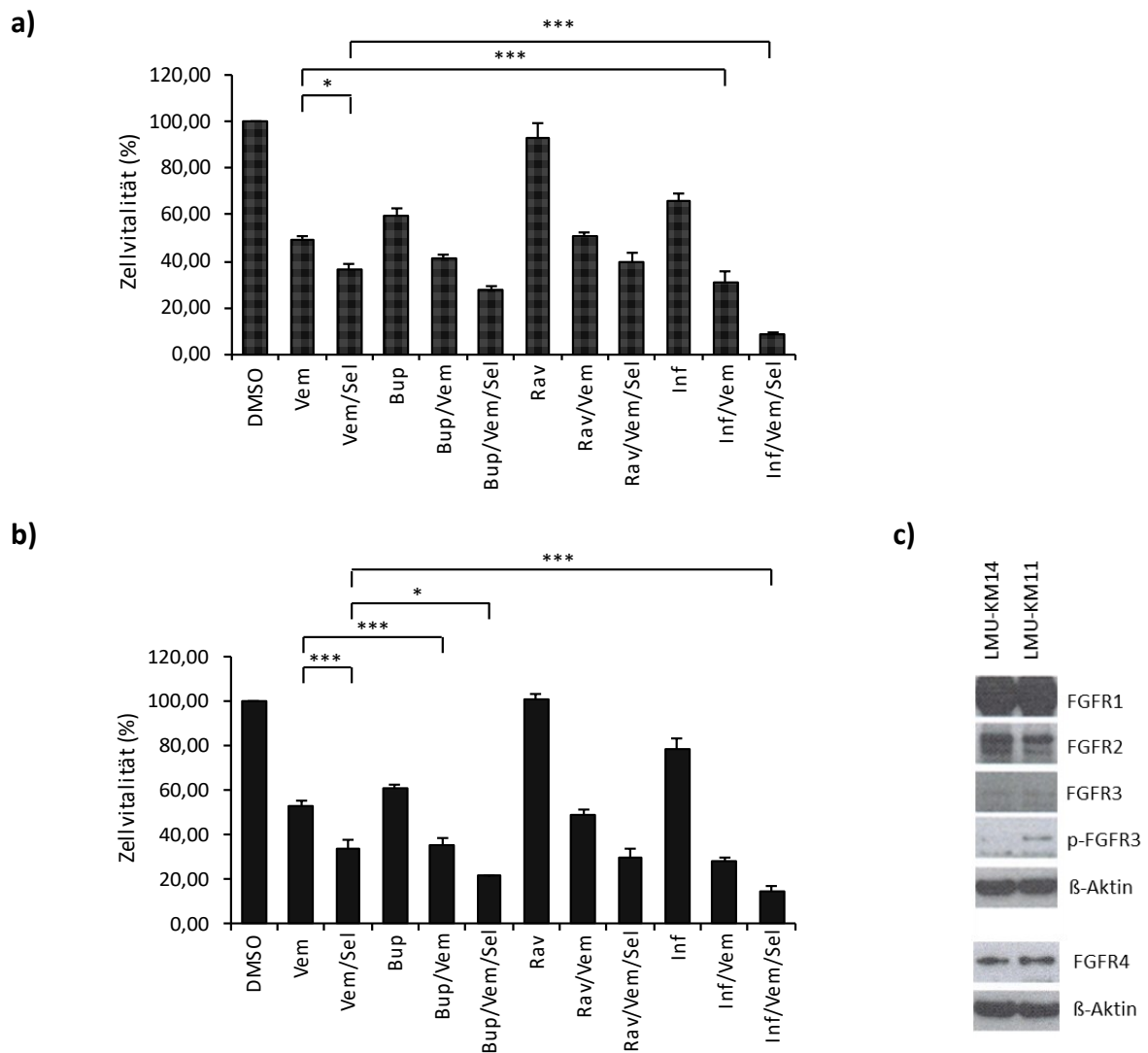


Abb. 30: Zellvitalität und FGFR-Expression in den Melanomzelllinien LMU-KM11 und LMU-KM14

Die Zellvitalität wurde mittels CellTiter-Blue® Assay 3 Tage nach Behandlung gemessen. Es wurden je 100.000 Zellen in einer 6-Loch-Platte ausgesetzt und mit 2 μ M Vemurafenib, 10 μ M Selumetinib, 1 μ M Buparlisib, 0,1 μ M Ravoxertinib und 2 μ M Infigratinib allein oder in Kombination behandelt. Als Kontrolle diente DMSO, n = 3.

a) LMU-KM11: Die Kombinationen aus Vem/Sel ($p = 0.013$) und Inf/Vem ($p < 0.001$) induzierten eine signifikante Reduktion der Zellvitalität verglichen mit Vem allein. Die Dreifachkombination Inf/Vem/Sel führte zur stärksten Reduktion der Zellvitalität gegenüber allen anderen Kombinationen und den Kontrollen ($p < 0.001$).

b) LMU-KM14: Die Kombinationen Vem/Sel ($p < 0.001$) und Inf/Vem ($p < 0.001$) induzierten eine signifikante Reduktion der Zellvitalität gegenüber der Behandlung mit Vem allein. Die Dreifachkombination Inf/Vem/Sel führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität gegenüber der Behandlung mit Vem/Sel allein ($p < 0.001$).

c) Western Blot: In den Melanomzelllinien LMU-KM11 und LMU-KM14. war die Expression von FGFR1 und FGFR2 am stärksten. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Diese Daten bestätigen die zuvor durchgeführten Untersuchungen an BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 in einem weiteren Modell und lassen vermuten, dass der FGFRi Infigratinib ein vielversprechender Wirkstoff für die Behandlung des BRAFi/MEKi-res Melanoms sein könnte.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des FGFRi Infigratinib auf humane parentale und BRAFi- bzw. BRAFi/MEKi-res Melanomzellen durch verschiedene Methoden analysiert und nach zugrunde liegenden Resistenzmechanismen gesucht. Dazu wurden zunächst eine BRAFi- und mehrere BRAFi/MEKi-res WM9 Melanomzelllinien generiert und die Resistenzentwicklung über die Detektion von pERK bestätigt (*siehe 3.1*).

Anschließend wurden einige für Metabolismus, Überleben und Proliferation bedeutende intrazelluläre Signalwege analysiert und deren Aktivität in resistenten Zellen mit der in parentalen Zellen verglichen (*siehe 3.2*). Dabei zeigte sich in resistenten Zellen eine gegenüber parentalen Zellen verstärkte Aktivität im MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg sowie einiger Vertreter der WNT-Signaltransduktion. Zudem konnte ein verstärktes Überleben bei gleichzeitig verlangsamtem Metabolismus in resistenten Zellen beobachtet werden.

In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss einer Behandlung mit dem FGFRi Infigratinib allein oder in Kombination mit BRAFi und MEKi auf parentale und resistente Zellen untersucht (*siehe 3.3*). Zunächst wurde dafür vergleichend die Zellvitalität nach Behandlung mit dem FGFRi Infigratinib, dem PI3Ki Buparlisib und dem ERKi Ravoxertinib untersucht. Die effektivste Reduktion der Vitalität resistenter WM9 konnte durch eine Kombinationsbehandlung aus FGFRi/BRAFi/MEKi erreicht werden. Um die Auswirkungen der FGFRi-Behandlung näher zu charakterisieren, wurde anschließend deren Effekt auf die Aktivität von MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg, die Expression von WNTs sowie auf wesentliche zelluläre Funktionen wie Invasionskapazität, Zellzyklus und Apoptose analysiert.

Im weiteren Verlauf wurden über die Expressionsanalysen der FGFR und einiger FGF die Zielstrukturen von Infigratinib näher untersucht (*siehe 3.4*). Hierdurch konnte die Induktion von FGFR2 und seinem spezifischen Liganden FGF7 in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen identifiziert werden. Die Bedeutung der FGF7/FGFR2-Signaltransduktion für die Vitalität resistenter WM9 wurde durch gezielte Inhibition der Genexpression dargelegt.

Abschließend wurden die Zellvitalitätsuntersuchungen nach Behandlung mit Infigratinib, Buparlisib und Ravoxertinib sowie die Analyse der FGFR-Proteinexpression an frisch

isolierten humanen Melanomzellen überprüft (*siehe* 3.5). Hier konnte Infigratinib als effektivster Inhibitor bestätigt werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zum Einfluss von Infigratinib auf BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Melanomzellen sowie zur Expression von FGF-Rezeptoren und einigen -Liganden sollen hier diskutiert werden. Darüber hinaus soll auf die Resistenzmechanismen unter BRAFi/MEKi-Therapie und FGF-Rezeptoren und -Liganden als potenzielle therapeutische Zielstruktur für das maligne Melanom eingegangen werden. Abschließend werden Limitationen der Arbeit beleuchtet und ein Ausblick für weitere Forschungsprojekte gegeben.

4.2 Resistenzentwicklung unter BRAFi/MEKi-Therapie

Die zielgerichteten Therapien mit Kinaseinhibitoren bedeuteten einen Durchbruch für die Behandlung des BRAF-mutierten metastasierten Melanoms [239]. Die Hemmung des MAPK-Signalwegs durch BRAFi und MEKi führt zu einer raschen Tumorregression und verlängert signifikant das Überleben der Patientinnen und Patienten [101, 103, 104]. Das Ansprechen dieser Therapien ist jedoch begrenzt und die Entwicklung von Resistenzen auf dem Boden einer ausgeprägten Tumoheterogenität bleibt die größte Herausforderung in der Behandlung [10, 113, 128]. Neben genetischen und epigenetischen Faktoren spielt vor allem das Tumormikromilieu eine wichtige Rolle bei der Entwicklung dieser Heterogenität [121, 122, 128, 240]. Es kann die Tumorzellen parakrin und durch Zell-Zell-Kontakte direkt beeinflussen und so genetische und phänotypische Veränderungen induzieren, die einen wesentlichen Anteil an der Entwicklung von Resistenzen haben können [122, 142].

4.2.1 *Slow-cycling*-Phänotyp resistenter Zellen

Einige der durch das Tumormikromilieu beeinflussten metabolischen Veränderungen, die sich häufig in Melanomzellen mit erworbener Resistenz gegenüber MAPKi beobachten lassen, können unter dem Begriff des *slow-cycling*-Phänotyps zusammengefasst werden. Hierzu zählen stark verlangsamte Proliferationsraten, eine verminderte Expression von MITF und ausgeprägt invasiv-metastatische Eigenschaften [188]. *Slow-cycling*-Tumorzellen scheinen einen wesentlichen Anteil an der Entwicklung von Resistenzen zu

haben [142, 188, 241]. An den für diese Arbeit generierten BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen konnten genau diese Merkmale beobachtet werden. So ergab die Zellvitalitätsmessung eine gegenüber parental Zellen signifikant verminderte Vitalität (*Abb. 10a und b*), was auf eine verringerte Anzahl metabolisch aktiver Zellen hinweist. Lichtmikroskopische Aufnahmen bestätigten eine gegenüber parental Zellen verminderte Proliferationsrate in resistenten WM9. Die verringerte Expression von Cyclin D1 war ein Indikator für Zellzyklusarrest in der G1-Phase (*Abb. 12d*). Zugleich fanden sich jedoch durch eine erhöhte Expression der Apoptose-hemmenden Proteine XIAP und c-IAP1 (*Abb. 12e*) und eine verringerte Aktivität des pro-apoptotischen Tumorsuppressors p53 (*Abb. 12a*) Hinweise für ein verstärktes Überleben resistenter Zellen. Im 3D-Sphäroid-Modell, das die Invasions- und Migrationskapazität der Zellen veranschaulicht, zeigten resistente Zellen zudem eine deutlich stärkere und beschleunigte Invasion gegenüber parental Zellen (*Abb. 19*). Schließlich fand sich eine gegenüber parental Zellen verringerte Aktivität von mTOR und seinen Zielproteinen, die eine regulierende Rolle hinsichtlich Zellwachstum, Überleben, Differenzierung und Metabolismus spielen (*Abb. 11*). Insbesondere legte die verminderte Expression von MITF (*Abb. 10c*) den Schluss nahe, dass die BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen eindeutige Eigenschaften des *slow-cycling*-Phänotyps aufwiesen.

MITF reguliert wesentliche Aspekte sowohl der Melanozyten- als auch der Melanomentwicklung [17, 242]. Eine hohe Expression von MITF führt in Melanomzellen zu verstärkter Differenzierung und Proliferation, eine niedrige Expression hingegen zu Zellzyklusarrest in der G1-Phase und verstärkten invasiven Eigenschaften [131, 186, 243]. In Melanomzellen mit geringer MITF-Expression wurde häufig zugleich eine erhöhte Expression von WNT5A beschrieben [135, 244]. Dies stimmt mit den Beobachtungen an den hier untersuchten BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen überein. Auch hier zeigte sich eine deutliche Induktion von WNT5A (*Abb. 9d*). Die Rolle von MITF für die Resistenzentwicklung unter BRAFi/MEKi-Therapie wird kontrovers diskutiert und ist noch nicht vollständig verstanden. Häufig konnte eine erhöhte MITF-Expression in BRAFi/MEKi-res Melanomzellen beobachtet werden [245, 246]. Zugleich wurden resistente Melanomzellen mit stark verringerter MITF-Aktivität beschrieben [244].

Es gibt Hinweise, dass die Behandlung mit zielgerichteten Inhibitoren zur vermehrten Ausbildung und Selektion des *slow-cycling*-Phänotyps führt, der zunächst nur in einem

sehr geringen Anteil von maximal 5% im Melanom zu finden ist [142, 143, 189]. *Slow-cycling*-Tumorzellen scheinen durch ihre geringere Abhängigkeit vom MAPK-Signalweg einen Überlebensvorteil unter der Behandlung mit BRAFi und MEKi zu haben. Gemäß dem Modell der klonalen Evolution führt die sequentielle Akkumulation von Mutationen zum Erwerb onkogener Eigenschaften, die zu einer verstärkten Aggressivität einzelner Tumorzellklone führt [127, 128]. Unter dem anhaltenden Selektionsdruck der Therapie kommt es dann zur selektiven Proliferation der besser angepassten *slow-cycling*-Klone und auch – gemäß dem Modell des Phänotyp-Wechsels – zum Übertritt einiger proliferativer Melanomzellen in invasive *slow-cycling*-Zellen [127, 131].

Neben den oben genannten Merkmalen fiel noch eine weitere Beobachtung auf: BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen lösten sich sowohl unter der Kontrollbehandlung als auch unter der Behandlung mit ihren jeweiligen Inhibitoren regelmäßig vom Boden der Zellkulturplatten ab und flottierten frei im Medium (*Abb. 10a*). Dies könnte ein Hinweis auf eine möglicherweise verringerte Expression von Adhäsionsmolekülen in resistenten Zellen sein. Dass eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin, P-Cadherin und Desmoglein regelmäßig während der Melanomentstehung auftritt, ist bekannt [74, 75, 247]. Auch veränderte Expressionsmuster von *melanoma cell adhesion molecule* (Mel-CAM), Metalloproteasen und Zell-Matrix-Adhäsionsmolekülen finden sich in Melanomzellen, nicht jedoch in Melanozyten [248, 249]. Dies alles führt zu einem verstärkten Loslösen der Zellen von der Basalmembran und ermöglicht den Tumorzellen eine unabhängige Organisation und eine verstärkte Motilität, die wesentlich für das metastatische Potenzial sind.

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die hier untersuchten BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Melanomzellen im Zuge ihrer Resistenzentwicklung unter der Selektion einer Behandlung mit BRAFi und MEKi einige phänotypische und metabolische Veränderungen gegenüber den ursprünglichen Zellen durchlaufen haben. Diese mündeten in eine Population resistenter Zellen, die anti-apoptotische Eigenschaften mit verlangsamter Proliferation, verminderter Translation und erhöhter Invasivität vereint, und somit dem *slow-cycling*-Phänotyp zugeordnet werden kann.

4.2.2 Dezentrale Aktivierung intrazellulärer Signalwege

In einem weiteren Schritt wurden BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen mit Hilfe von Genexpressions- und Western-Blot-Analysen auf veränderte Aktivität im MAPK, PI3K/AKT- und WNT-Signalweg untersucht, die möglicherweise zugrunde liegende Resistenzmechanismen vermitteln könnten. Die Reaktivierung des MAPK-Signalwegs ist einer der häufigsten Resistenzmechanismen unter der Behandlung mit BRAFi und MEKi [145] und kann über die Aktivität von ERK1/2 detektiert werden. Es zeigte sich, dass resistente Zellen weiterhin eine Aktivität des MAPK-Signalwegs aufwiesen, was sich übereinstimmend durch eine im Vergleich zu parentalen Zellen stabile Genexpression von ERK1/2 sowie die Phosphorylierung von Erk1/2 und p90RSK, einer über den MAPK-Signalweg aktivierten Kinase, belegen ließ (*Abb. 7*). Für resistente WM9 scheint der MAPK-Signalweg demnach noch von zentraler Bedeutung zu sein.

Zugleich zeigte sich eine gegenüber parentalen Zellen verstärkte Aktivität des PI3K-Signalwegs über AKT (Thr³⁰⁸). Die aktivierende Phosphorylierung an der Threonin-Bindestelle wird über PDK1 vermittelt. Eine verstärkte Aktivierung von AKT über die Serin-Bindestelle (Ser⁴⁷³) durch mTOR fand sich nicht (*Abb. 8*). Vielmehr konnte eine verminderte Aktivität von mTOR nachgewiesen werden (*Abb. 11*), was erstaunlich ist, da andere Arbeiten häufig eine Überaktivität des mTOR-Signalwegs in resistenten Melanomzellen beschreiben [128, 226, 250, 251]. Eine verstärkte Aktivität des PI3K/AKT-Signalwegs, der Überleben und Proliferation vermittelt, ist bekannt dafür, Resistenz gegenüber BRAFi und MEKi zu vermitteln [151, 154, 252]. Auch in den hier untersuchten resistenten WM9-Melanomzellen scheint die Hochregulierung des PI3K/AKT-Signalwegs zumindest eine bedeutende Rolle für die Resistenzentwicklung zu spielen, die in nachfolgenden Arbeiten weiter untersucht werden könnte.

Neben dem MAPK- und PI3K/AKT-Signalweg konnte eine zumindest leicht erhöhte Aktivität des WNT-Signalwegs in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen beobachtet werden. Der kanonische WNT-Signalweg über β -Catenin schien dabei weniger stark aktiviert als der nicht-kanonische (*Abb. 9*). Die Rolle von β -Catenin im Melanom ist noch nicht abschließend geklärt. Während einige Arbeiten eine verstärkte Aktivität von β -Catenin mit einem aggressiveren Tumorverhalten und Progress in Verbindung bringen [32], verweisen andere auf eine bessere Prognose bei erhöhten β -Catenin-Mengen [253] und beobachteten einen Verlust der β -Catenin-Expression bei Melanomprogression [254]. Der FGF-

Signalweg interagiert auf verschiedenste Weise mit dem WNT-Signalweg. So werden beispielsweise FGF-Liganden direkt über den kanonischen WNT-Signalweg hochreguliert [42, 43]. Über die Bindung an FGFR kommt es dann zu einer verstärkten Aktivierung von β -Catenin im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus [44]. Auch andere Interaktionswege sind beschrieben [255, 256]. Stellvertretend für den nicht-kanonischen WNT-Signalweg wurde WNT5A analysiert, das β -Catenin hemmen kann [257]. Eine Überexpression von WNT5A, die hier allerdings nur in geringem Maß gezeigt werden konnte, wurde bereits für BRAFi-res Melanome beschrieben und scheint über eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs Resistenz gegenüber einer BRAFi-Therapie zu vermitteln [258]. Zudem gibt es Untersuchungen, die eine verstärkte Motilität und Invasionskapazität von Melanomzellen durch WNT5A belegten und dies mit einem reduzierten progressionsfreien Intervall und einem geringeren Überleben assoziieren konnten [259].

Diese Ergebnisse zeigen, dass BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 nicht durch Alterationen in einem einzigen Signalweg, sondern vielmehr durch die Hochregulierung mehrerer paralleler Signalwege eine verstärkte Unabhängigkeit vom MAPK-Signalweg erlangen und so dem Druck zielgerichteter Inhibitoren entkommen konnten. Dies stimmt mit anderen Untersuchungen überein, die ebenfalls zeigen, dass die Mechanismen der Resistenzentwicklung gegenüber BRAFi und MEKi vielfältig und in ihrer Komplexität nur unvollständig verstanden sind. Zumeist finden sich mehrere verschiedene Mechanismen in ein und demselben Tumor und in etwa 40% kann kein spezifischer Mechanismus identifiziert werden [9, 10, 128].

4.3 Funktionelle Bedeutung der FGFR im malignen Melanom

Es ist bekannt, dass FGFR über die Aktivierung des MAPK-, PI3K/AKT-, STAT- und WNT/ β -Catenin-Signalwegs onkogenes Potenzial besitzen und häufig während der Karzinogenese aktiviert werden [260]. Genamplifikationen, chromosomale Translokationen, Punktmutationen oder Einzelnukleotid-Polymorphismen in den FGFR-Genen können zu einer konstitutiven Aktivierung des FGFR-Signalwegs führen und so zu Tumorwachstum, Neoangiogenese und Metastasierung beitragen [162, 170, 172, 261, 262]. Genomische Alterationen der FGFR fanden sich u.a. im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom [263,

264], Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinom [265], Magenkarzinom vom diffusen Typ [266], Endometriumkarzinom [267, 268] und Blasenkarzinom [269]. Auch im malignen Melanom konnten in etwa 20% Alterationen des FGFR-Status sowohl in Primärtumoren als auch in Metastasen identifiziert werden, während Nävi keine oder nur eine sehr schwache Expression von FGFR zeigten [159, 174, 270, 271]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine erhöhte FGFR-Expression mit einer verstärkten Melanomprogression assoziiert ist [172]. Zudem zeigen Melanomzellen nach erfolgter Chemotherapie oder Behandlung mit BRAFi und MEKi eine erhöhte Aktivität im FGF-FGFR-Signalweg [173]. Die Rolle des FGF-FGFR-Signalwegs für die Resistenzentwicklung unter BRAFi- und MEKi-Behandlung ist jedoch erst anfänglich untersucht [272].

4.3.1 Expression von FGFR und FGF in parentalen und resistenten Zellen

In dieser Arbeit wurde die Genexpression von FGFR1-5 vergleichend in parentalen, BRAFi- und mehreren BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen mit Hilfe quantitativer PCR-Analysen untersucht. Mit Ausnahme von FGFR4 fand sich in allen resistenten Zellen eine gegenüber parentalen Zellen erhöhte FGFR-Expression (*Abb. 24a*). Der größte relative Unterschied zwischen parentalen und resistenten Zellen wurde für FGFR2 beobachtet, aber auch FGFR1 war in resistenten Zellen deutlich erhöht. Diese Ergebnisse konnten auf Proteinebene bestätigt werden (*Abb. 24c*). In parentalen wie resistenten WM9 war eine starke Proteinexpression von FGFR1 und eine relativ schwache von FGFR3 und pFGFR3 sowie eine verminderte Expression von FGFR4 in resistenten gegenüber parentalen Zellen nachweisbar. FGFR2-Protein war in resistenten Melanomzellen stark exprimiert im Gegensatz zu den parentalen Zellen. Die Genexpressionsuntersuchung der zwei repräsentativen FGFR-Isoformen FGFR2IIIb und FGFR2IIIc ergab, dass in BRAFi-res Zellen insbesondere FGFR2IIIb, in BRAFi/MEKi-res hingegen insbesondere FGFR2IIIc exprimiert wurde (*Abb. 24b*). Kritisch anzumerken sind hier sicherlich die zum Teil sehr großen Standardabweichungen in den Genexpressionsanalysen. Diese könnten – neben technischen Variationen in der Messung – ein Hinweis auf eine interzelluläre Heterogenität auch in Bezug auf die Expression von FGFR sein.

FGFR2 wird über verschiedene FGF aktiviert, u.a. über FGF1, FGF2, FGF7 und FGF10, deren Genexpression in parentalen, BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 in dieser Arbeit mittels

Echtzeit-PCR analysiert wurden (Abb. 28a). Dabei zeigte sich, dass alle untersuchten FGF in resistenten Zellen verstärkt exprimiert wurden. Die stärkste relative Erhöhung gegenüber parental Zellen fand sich für FGF7 und FGF10, die beide zur gleichen FGF-Subfamilie gehören. Dies ist insofern von Bedeutung, als FGF7 neben FGF10 die höchste Affinität spezifisch für FGFR2 zeigt, während FGF1 alle FGFR und FGF2 neben FGFR2 die Rezeptoren FGFR1 und FGFR3 mit einer höheren Affinität bindet. Die Isoform FGFR2b zeigt eine hohe Bindungs-Affinität u.a. für FGF1, FGF7 und FGF10, während FGFR2c eine hohe Affinität u.a. für FGF1 und FGF2 zeigt [236]. Kritisch anzumerken ist, dass die Überprüfung der erhöhten Expression von FGF7 auf Proteinebene nur für Vem- und Vem/Sel-res, nicht jedoch für Vem/Tra- und Vem/Cob-res WM9 bestätigt werden konnte (Abb. 28b).

Bisherige Untersuchungen des FGFR-Status im Melanom fanden verstärkte Expressionen von FGFR1 und FGFR4 [174, 273]. Für FGFR1 und FGFR3 wurde zudem eine Resistenzvermittelnde Funktion gegenüber BRAFi vermutet [156, 173]. Eine Überexpression von FGFR2 wurde bereits für verschiedene Tumorentitäten beschrieben, u.a. für das Bronchial-, Mamma-, Magen- und Pankreaskarzinom [274-277]. Häufig ist hier eine erhöhte FGFR2-Expression auch mit einem späteren Tumorstadium und einem verstärkten invasiven Potenzial der Tumorzellen assoziiert [274, 278-280]. Daher wird FGFR2 bereits als therapeutisches Ziel diskutiert [281, 282]. Untersuchungen am Blasen- und Prostatakarzinom konnten zeigen, dass ein Isoform-Wechsel von FGFR2IIIb zu FGFR2IIIc mit einem erhöhten malignen Potenzial der Tumoren assoziiert ist [283, 284]. Ob dies auch für das Melanom gilt, ist bislang nicht bekannt. Erhöhte FGFR2-Expressionen wurden jedoch auch im Melanom schon beschrieben [173]. Diese Untersuchungen fanden allerdings ausschließlich an MAPKi-naiven Melanomzellen statt. Einzig in einem mit BRAFi behandelten Patienten, der eine BRAFi-Resistenz entwickelte, wurde eine neue FGFR2-Mutation beschrieben [285]. Paradoxerweise gibt es zugleich jedoch auch Hinweise für eine tumorsuppressive Rolle von FGFR2 im Melanom, wobei der genaue Mechanismus bislang nicht gezeigt werden konnte. Bekannt ist jedoch, dass 10% der Melanome *missense*-Mutationen im FGFR2-Gen zeigen, die einen Funktionsverlust von FGFR2 zur Folge haben [286, 287]. Hier könnten fortführende Arbeiten ein tieferes Verständnis ermöglichen.

Eine erhöhte Expression von FGF-Liganden konnte ebenso in verschiedenen Tumorentitäten gefunden werden [288-290]. Im Melanom wurde bislang vor allem die Überexpression von FGF1 und FGF2 mit einem onkogenem Potenzial assoziiert [173, 174, 272, 291]. Es wurde gezeigt, dass FGF1 in einigen BRAFi/MEKi-res Melanomzellen verstärkt exprimiert wird und Resistenz gegenüber BRAFi und MEKi vermitteln kann [272]. In verschiedenen Untersuchungen induzierte die Behandlung mit Vemurafenib die Expression von FGF1, was zu einem schwächeren Ansprechen der Melanomzellen gegenüber Vemurafenib beitrug [173]. Die Behandlung mit FGF1 vermittelte zudem Resistenz gegenüber Vemurafenib und Cobimetinib in Vem/Cob-naiven Zellen [272]. Besonders gut untersucht ist die Rolle von FGF2 über die Aktivierung von FGFR1 für die Karzinogenese [292, 293]. FGF2 wird von Fibroblasten und Keratinozyten produziert und wurde zudem als autokriner Wachstumsfaktor in Melanomzellen beschrieben [159]. Eine verstärkte Expression von FGF2 fand sich in dysplastischen Nävi sowie in primären und metastatischen Melanomen und ist mit Melanomprogression assoziiert [158, 271, 294-296]. Im fortgeschrittenen Melanom ist FGF2 wesentlich an der Metastasenbildung und über die Aktivierung von VEGF zudem an der Neoangiogenese beteiligt [293, 297, 298]. Es gibt jedoch auch gegenteilige Untersuchungen, die in dysplastischen Nävi eine verringerte FGF2/FGFR1-Expression gegenüber nicht-dysplastischen Nävi beschreiben [273]. FGF10 wurde als ein bedeutender Faktor für die Migrations- und Invasionskapazität im Pankreaskarzinom identifiziert [275]. Im Magenkarzinom wurde eine erhöhte Expression von FGF7 durch tumorassoziierte Fibroblasten beobachtet, was auf eine parakrine Stimulation der Tumorzellen durch hinweisen könnte [299]. Auch im Melanom konnten bereits erhöhte FGF7-Expressionen beobachtet werden, jedoch fanden andere Untersuchungen keine Resistenz-vermittelnden Eigenschaften von FGF7 in BRAFi/MEKi-res Melanomzellen [173, 272].

Die hier vorgelegten Ergebnisse in WM9-Melanomzellen konnten darlegen, dass BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen gegenüber parentalen Zellen veränderte FGFR- und FGF-Expressionsmuster zeigten. Fast alle untersuchten FGFR und FGF waren dabei in resistenten Zellen erhöht exprimiert. Insbesondere eine erhöhte Expression von FGFR2 und FGF7 war mit einer BRAFi- und BRAFi/MEKi-Resistenz assoziiert. Dies unterstützt die Vermutung einer Resistenz-vermittelnden Rolle des FGF-FGFR-Signalwegs im Melanom.

4.3.2 Inhibition von FGFR2 und FGF7 reduziert die Vitalität resistenter Zellen

Um die Bedeutung der einzelnen FGFR für das Überleben von parentalen und resistenten Zellen näher zu beleuchten, wurde in einem nächsten Schritt die Zellvitalität nach gezielter Inhibition der FGFR mittels siRNA ermittelt. Bedauerlicherweise funktionierte die gezielte Inhibition auch nach mehreren Wiederholungen nicht wie erhofft, was eine valide Interpretation der Ergebnisse nicht zulässt (*Abb. 27*).

Die Bedeutung von FGFR1 und seinem Liganden FGF2 für die Vitalität von Melanomzellen ist jedoch bereits bekannt. So konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass die Inhibition von FGFR1 bzw. FGF2 Überleben und Proliferation hemmt [169, 174, 293, 300-302]. Möglicherweise könnte ein erneuter Versuch der Inhibition mit frischen Reagenzien dies auch für FGFR2 und FGF7 in WM9-Melanomzellen bestätigen.

4.3.3 FGFRi induziert FGFR-Expression in resistenten Zellen

Um zu evaluieren, ob die Hochregulierung von FGFR ein grundlegender Mechanismus resistenter Zellen auf den Selektionsdruck zielgerichteter Inhibitor-Behandlungen ist, wurde die Expression einzelner FGFR-Subtypen nach Behandlung mit Infigratinib allein und in Kombination mit BRAFi und MEKi analysiert (*Abb. 25*). Dabei war FGFR1 zwar in resistenten Zellen deutlich verstärkt exprimiert, die Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren führte jedoch weder in parentalen noch in resistenten WM9 zu einer signifikanten Veränderung der FGFR1-Expression. Anders verhielt es sich für FGFR2, FGFR3, FGFR4 und FGFR5. Hier fand sich jeweils eine Induktion der Expression nach FGFRi-Behandlung in Vem- und noch deutlicher in Vem/Sel-res Zellen. Bemerkenswert ist, dass sich der Effekt durch die Kombination mit BRAFi und MEKi noch verstärken ließ und in parentalen Zellen keine Expressionsveränderung beobachtet wurde. Die Expression von FGFR2 nahm am deutlichsten zu. Dies konnte auf Proteinebene bestätigt werden, hier zeigte die FGFRi-Behandlung allein und noch stärker in Kombination mit BRAFi und MEKi eine deutliche Induktion von FGFR2 in resistenten, nicht jedoch in parentalen WM9. Demgegenüber war die Expression von pFGFR3 und FGFR4 nach Inhibitorbehandlung eher reduziert (*Abb. 26*). Dies unterstützt die Vermutung, dass FGFR2 eine bedeutende Rolle für die Integrität resistenter Zellen spielt und der FGFR-Signalweg in resistenten Zellen unter BRAFi/MEKi-Behandlung verstärkt aktiviert wird. Das wiederum stützt die

Vermutung, dass die Aktivierung des FGF-FGFR-Signalwegs ein Resistenz-vermittelnder Mechanismus in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Melanomzellen ist, was in anderen Melanomzelllinien insbesondere für FGF1 bereits gezeigt werden konnte [272].

Um dies für WM9-Melanomzellen näher zu überprüfen, müsste in weiterführenden Arbeiten die Expression der einzelnen FGFR nach Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren, insbesondere mit BRAFi und MEKi, untersucht werden. Interessant wäre auch eine Genexpressionsanalyse nach Behandlung mit PI3Ki und ERKi, um zu evaluieren, ob die Induktion der FGFR-Expression eine generelle Antwort resistenter Zellen unabhängig von der Zielstruktur der einzelnen Inhibitoren ist.

4.3.4 Modellvorschlag der autokrinen FGF7/FGFR2-Stimulation

Die Aktivierung der FGFR erfolgt zum einen parakrin über benachbarte Zellen des Tumormikromilieus, zum anderen autokrin durch die Melanomzellen selbst [161]. Eine autokrine Stimulation der FGFR konnte bereits für verschiedene FGFR gezeigt werden [159, 160, 295, 296, 303]. Eine autokrine Schleife konnte explizit für die Stimulation von FGFR1 über FGF2 gefunden werden [174]. *In vitro* kultivierte Melanomzellen wachsen zudem unabhängig von exogen zugeführten Wachstumsfaktoren und zeigen dabei weder eine Verlangsamung ihres Zellzyklus noch eine Veränderung in essenziellen intrazellulären Signalwegen oder dem Ansprechen auf BRAFi/MEKi [304]. Das könnte bedeuten, dass die parakrine Stimulation der FGFR eine unwesentliche Rolle für Melanomzellen spielt.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit fanden ausschließlich in der Zellkultur, also ohne den Einfluss einer zellulären Tumormikroumgebung mit beispielsweise Fibroblasten statt. Dabei wurde deutlich, dass FGFR2 und dessen spezifischer Ligand FGF7 in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen überexprimiert waren und eine entscheidende Rolle für die Vitalität resistenter WM9-Melanomzellen spielten. Deshalb wird im Folgenden ein Modell der autokrinen FGFR2-Stimulation über FGF7 in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Melanomzellen vorgeschlagen:

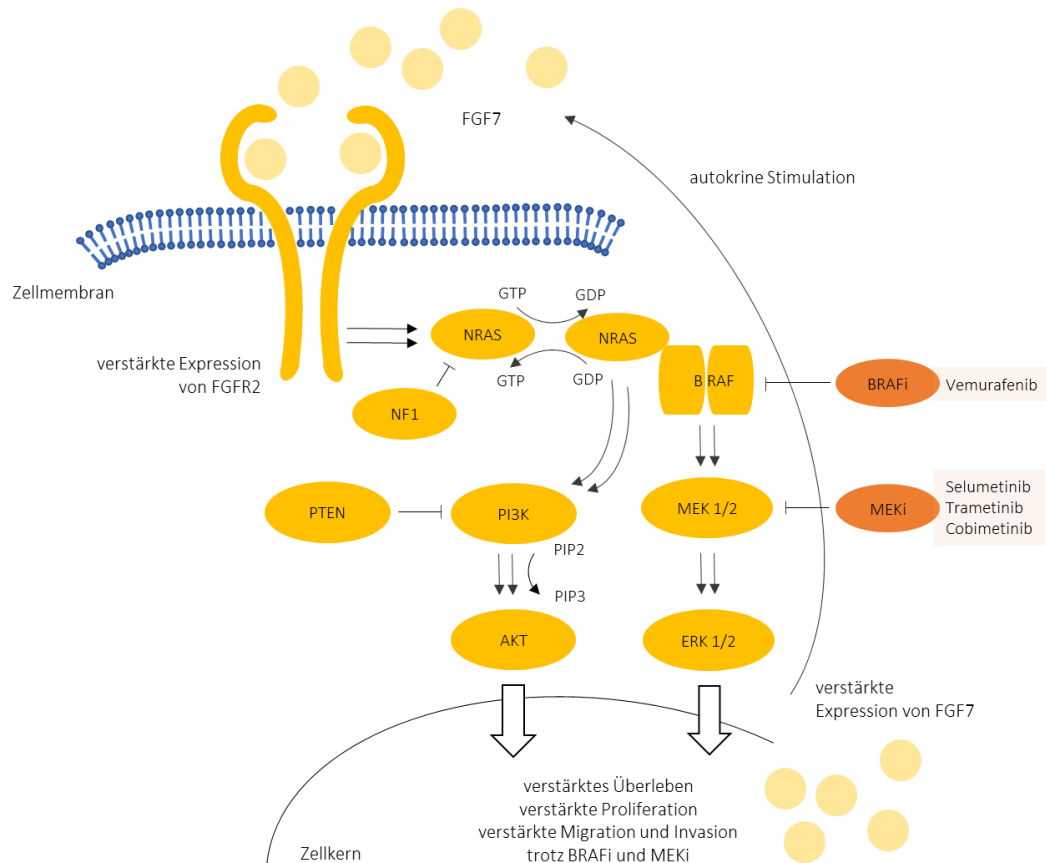


Abb. 31: Modell der autokrinen Stimulation über die FGF7-FGFR2-Schleife

BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Melanomzellen zeigen eine erhöhte Expression von FGFR2. Hierdurch kommt es zu einer verstärkten Aktivierung des MAPK- und PI3K/AKT-Signalwegs auch unter Behandlung mit BRAFi und MEKi. Die aufrecht erhaltene Aktivierung von MAPK- und PI3K/AKT verschafft resistenten Zellen über die Vermittlung von Überleben, Proliferation, Migrations- und Invasionskapazität einen Vorteil gegenüber parentalen Zellen. BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen zeigen zudem eine erhöhte Expression von FGF7, die eine autokrine Stimulation von FGFR2 bewirkt. Über diesen Mechanismus können resistente Zellen die verstärkte Aktivität des MAPK- und PI3K/AKT-Signalwegs aufrechterhalten und so dem Druck von BRAFi- und MEKi entkommen.

4.4 Chancen und Grenzen einer Behandlung mit FGFRi

Diese Arbeit untersuchte den Einfluss des FGFRi Infigratinib auf parentale, BRAFi-res und BRAFi/MEKi-res Melanomzellen. Dies wurde anhand mehrerer Untersuchungen von Zellvitalität, Zellzyklusarrest, Apoptose-Induktion und Invasionskapazität durchgeführt. Die Zellvitalitätsanalysen wurden zur besseren Vergleichbarkeit auch mit dem ERKi Ravoxertinib und dem PI3Ki Buparlisib durchgeführt.

4.4.1 Reduktion der Zellvitalität

Die FGFRi-Behandlung BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen resultierte in einer effektiven Reduktion der Zellvitalität (*Abb. 14*). In BRAFi-/MEKi-resistenten Zellen konnte durch die FGFRi-Behandlung eine Reduktion der Vitalität um 59% und in BRAFi-res Zellen um 43% erreicht werden. Zudem konnten synergistische Effekte von BRAFi und MEKi beobachtet werden. So konnte die Vitalität BRAFi-res Zellen durch die Kombination FGFRi und BRAFi um weitere 27% und die Vitalität BRAFi/MEKi-res Zellen durch die Kombination FGFRi, BRAFi und MEKi um weitere 28% gesenkt werden. Diese Ergebnisse entsprechen anderen Untersuchungen, die bereits zeigen konnten, dass eine Inhibition von FGFR *in vitro* und *in vivo* zu einer starken Reduktion des Melanomwachstums führt und synergistisch mit BRAFi wirkt [157, 174]. In parentalen Zellen bewirkte FGFRi allein eine deutlich schwächere Reduktion der Zellvitalität von etwa 7,5% und auch die Kombinationen aus FGFRi, BRAFi und MEKi beeinflussten die Vitalität deutlich geringer als in den resistenten Melanomzellen. Die Behandlungen mit BRAFi und BRAFi/MEKi allein führten zu einer stärkeren Reduktion der Zellvitalität als die Kombinationen mit FGFRi, synergistische Effekte zwischen BRAFi, MEKi und FGFRi konnten demnach nicht beobachtet werden. Der Unterschied zwischen parentalen und resistenten Zellen ist insofern bemerkenswert, als diese Arbeit einen geeigneten Inhibitor oder Kombinationspartner insbesondere für BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen identifizieren wollte. Ein geringeres Ansprechen in parentalen Zellen zeigt, dass dieses nicht allein durch toxische Effekte erzielt wird, sondern die FGFR-Inhibition möglicherweise auf einen spezifischen Kompensationsmechanismus resistenter Zellen zielt.

Um diese Ergebnisse besser einordnen zu können, wurde der Einfluss zweier weiterer niedermolekularer Inhibitoren auf die Vitalität parentaler und resistenter Zellen

untersucht. Hierfür wurde der ERKi Ravoxertinib und der PI3Ki Buparlisib gewählt. Beide wurden bereits als zielgerichtete Therapeutika im Melanom diskutiert und in klinischen Studien überprüft (Ravoxertinib: NCT01875705, NCT02457793; Buparlisib: NCT01512251). Bemerkenswerterweise zeigte der ERKi in parentalen WM9 den größten Effekt. Hier konnte eine Reduktion der Vitalität um etwa 38% erreicht werden, während es in BRAFi-res Zellen nur 19% waren und in BRAFi/MEKi-res Zellen keine signifikante Abnahme der Zellvitalität beobachtet werden konnte. Dies könnte ein Hinweis auf die Aktivierung paralleler Signalwege in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen sein, wodurch die alleinige Hemmung des MAPK-Signalwegs nicht mehr ausreichend ist, um die Vitalität der Zellen zu hemmen.

Der PI3Ki bewirkte sowohl in parentalen als auch in resistenten WM9 eine deutliche Abnahme der Zellvitalität. Sowohl in parentalen als auch in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen zeigte die Kombination des PI3Ki mit BRAFi und MEKi synergistische Effekte. Die stärkste Reduktion der Vitalität konnte in parentalen Zellen mit Kombination mit BRAFi bzw. BRAFi und MEKi. Es lässt sich vermuten, dass der PI3K/AKT-Signalweg unter dem Druck der Behandlung mit BRAFi und MEKi verstärkt aktiviert wird und sowohl in parentalen als auch in resistenten Zellen kompensatorisch aktiviert wird. Dies konnte in mehreren Studien beobachtet werden [151, 252]. Die gleichzeitige Hemmung des MAPK- und PI3K-Signalwegs führt dann zu einer deutlichen Abnahme der Vitalität. Dass diese Abnahme in resistenten Zellen schwächer ausfällt, lässt darauf schließen, dass diese weitere Signalwege aktiviert haben, die ihnen ein besseres Überleben ermöglichen.

Diese Ergebnisse konnten an Vem/Cob-res WM9 sowie an zwei aus kutanen Metastasen gewonnen Melanomzelllinien bestätigt werden (*Abb. 16 bzw. 30*). Auch hier stellte sich der FGFRi in Kombination mit BRAFi und MEKi als effektivster Inhibitor dar. Dies ist insofern erstaunlich, da die vorherige Behandlung der Patientin im Rahmen der LOGIC-2-Studie zu einem Progress der Tumorerkrankung geführt hatte. Dies lässt sich vermutlich zumindest zum Teil durch die immensen Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* Behandlungen erklären. Kein *in vitro* Modell kann die Komplexität eines Organismus und der verschiedenen Einflüsse und Stoffwechselforgänge vollständig abbilden.

Um die Bedeutung der FGFR-Expression für die Sensitivität gegenüber BRAFi und MEKi näher zu beleuchten, wären weiterführende Analysen wünschenswert. Hier könnte z.B.

untersucht werden, ob die siRNA-vermittelte Hemmung insbesondere von FGFR2 resistente WM9 erneut für die Behandlung mit BRAFi und MEKi sensibilisiert.

4.4.2 Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose

Um die verminderte Vitalität resistenter Zellen durch die FGFRi-Behandlung näher zu charakterisieren, wurden anschließend Untersuchungen zu Zellzyklusprogression und Zelltod durchgeführt. Dass die Inhibition von FGF2 und FGFR1 in Melanomzellen die Proliferation hemmt und Apoptose induziert, ist bereits *in vivo* im Mausmodell berichtet worden [293, 305]. In dieser Arbeit konnte durch Western-Blot-Analysen über die Detektion von Cyclin D1 und pRb gezeigt werden, dass BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 nach der Behandlung mit FGFRi vermehrt in der G1-Phase des Zellzyklus verblieben und damit die Zellzyklusprogression gehemmt wurde (*Abb. 23*). Dieser Effekt wurde durch die kombinierte Behandlung mit BRAFi und MEKi verstärkt. Die anschließende Detektion von gespaltenem PARP und Caspase 3 belegte, dass FGFRi in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res, nicht jedoch in parentalen Zellen Apoptose induzierte (*Abb. 23*). Wiederum wurde dieser Effekt durch die Kombination mit BRAFi und MEKi verstärkt. Die Apoptose-Induktion wurde ebenso mittels Durchflusszytometrie nach Färbung mit AV und PJ bestätigt (*Abb. 21*). Anzumerken ist hier, dass die apoptotischen Populationen nicht sehr groß waren. Dies könnte vielleicht damit erklärt werden, dass die Untersuchungen nach dreitägiger Behandlung mit FGFRi stattfanden und der Übertritt in die Apoptose zu diesem Zeitpunkt erst begann. Das würde auch die starke Detektion von gespaltenem PARP erklären, welches ein Indikator für den Beginn der Apoptose ist. Zudem war auch ein leichter Anstieg der nekrotischen Populationen nach Behandlung mit FGFRi in resistenten Zellen zu beobachten, die in parentalen Zellen nicht stattfand. Beachtenswert ist außerdem, dass parentale Zellen zu keinem Zeitpunkt eine Apoptose-Induktion mit den hier untersuchten Assays zeigten, was wenigstens nach Behandlung mit BRAFi und MEKi zu erwarten gewesen wäre. Möglicherweise könnten hier Analysen zu einem späteren Zeitpunkt oder Assays zur Detektion Caspase-unabhängiger Apoptose zur weiteren Klärung beitragen. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem FGFRi allein und noch stärker in Kombination mit BRAFi und MEKi zu Zellzyklusarrest und programmiertem Zelltod in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 führt. Genauere Untersuchungen zu den

einzelnen Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie sowie zur Unterscheidung von intrinsischer und extrinsischer Apoptose, z.B. durch Detektion von Caspase 9 als Schlüsselmolekül für den mitochondrialen sowie Caspase 8 für den rezeptorvermittelten Apoptoseweg, sind hierfür angebracht.

Unter dem Lichtmikroskop zeigten sich 3 Tage nach der Behandlung mit FGFRi auffällig viele intrazelluläre Vesikel in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen (*Abb. 15b*). Diese könnten ein Indikator für durch Zellstress induzierte Autophagozytose sein, was mit genaueren Methoden weiter untersucht werden müsste. Autophagozytose ist ein Prozess, bei dem zelleigenes, beschädigtes „Material“ und sogar ganze Zellorganellen abgebaut werden. Das Material wird dafür zunächst in ein neu gebildetes Autophagosom aufgenommen, welches mit Lysosomen zu Autophagolysosomen verschmilzt und mit Hilfe von Enzymen das Material verdaut. Dieser Vorgang findet in geringem Umfang in jeder Zelle statt, wird jedoch u.a. durch Nährstoffmangel oder Hypoxie verstärkt induziert. Autophagozytose kann sogar die mitochondrial vermittelte Apoptose unterdrücken, indem durch den raschen Abbau beschädigter Mitochondrien die Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol verhindert wird, was normalerweise die Apoptose induziert [306]. Auch an wesentlichen Aspekten der Motilität und Invasion von Tumorzellen sowie der Tumorprogression und -Metastasierung ist die Autophagozytose auf vielfältige Weise beteiligt [307]. Ein maßgeblicher Regulator der Autophagozytose ist mTOR, welches die Ausbildung von Autophagosomen unterdrückt [308]. Bei einer verringerten Aktivität von mTOR, wie sie in den hier untersuchten BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Melanomzellen beobachtet wurde (*Abb. 11*), fällt die hemmende Wirkung weg und es kommt vermehrt zur Autophagozytose.

4.4.3 Inhibition von Invasion und Migration

Die Aggressivität von Tumorzellen hängt maßgeblich von ihrem metastatischen Potenzial ab. Hierunter versteht man die Fähigkeit von Tumorzellen, ihren Zellverbund zu verlassen und in zum Teil weit entfernte und völlig andersartige Gewebe einzudringen um dort neue Tumorkolonien, also Metastasen, zu formen. Die Erlangung dieser Fähigkeit wird epitheliale-mesenchymale Transition genannt. Sie bezeichnet die Verwandlung epithelialer Zellen mit eindeutiger Polarität und vielen engen Zellverbindungen in Zellen

mit mesenchymalen Eigenschaften ohne Zellpolarität und feste Zellkontakte. Entscheidend dafür ist der Verlust von E-Cadherin, wodurch die Loslösung aus dem Zellverband, die Migration durch die Basalmembran und anschließend die Invasion in andere Gewebe ermöglicht wird [73, 74]. Dieser Mechanismus konnte auch beim Melanom identifiziert werden [309]. Die Migrations- und Invasionskapazität zu hemmen, ist ein wesentliches Ziel onkologischer Therapien. In dieser Arbeit wurde ein weit verbreitetes *in vitro* 3D-Sphäroid-Modell angewendet, das geeignet ist, die Zellmigration und -Invasion näher zu beobachten [229]. Dieses Modell ermöglicht eine den natürlichen *in vivo* Gegebenheiten ähnlichere Formierung von Sphäroiden. So können dreidimensionale Zell-Zell-Kontakte ausgebildet werden und es entwickelt sich eine proliferative äußere Schicht mit einem hypoxisch-nekrotischen Kern, wie es in soliden Tumoren häufig der Fall ist.

Das Sphäroid-Modell zeigte, dass BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 weniger dichte und kompakte Sphäroide bildeten als parentale Zellen, dafür jedoch eine deutlich beschleunigte und verstärkte Invasions- und Migrationskapazität aufwiesen (*Abb. 19*). Dies zeigt, dass resistente Zellen gegenüber parentalen an Invasivität gewonnen haben. Der FGFRi war in der Lage, die Migration resistenter Zellen vollständig zu inhibieren (*Abb. 20*). In Kombination mit BRAFi und MEKi war zudem ein Absterben der resistenten Sphäroide auffällig. Bei den parentalen Sphäroiden konnte nach FGFRi weiterhin eine leichte Invasion beobachtet werden, erst durch Hinzufügen von BRAFi bzw. BRAFi und MEKi wurde diese gänzlich gehemmt. Es konnte somit anschaulich dargelegt werden, dass die Behandlung mit FGFRi allein ausreicht, die Invasion und Migration BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen vollständig zu inhibieren. Die verstärkte Invasionsfähigkeit resistenter Zellen könnte auf einer verminderten Ausprägung von Zelladhäsionsproteinen beruhen. Dies könnte auch die anfänglich beobachtete Ablösung resistenter Zellen vom Boden der Zellkulturplatten erklären (*Abb. 10a*). Weiterführend wären hier Expressionsanalysen von E-Cadherin und Integrin interessant, um die molekularen Ursachen der verstärkten Invasionskapazität resistenter Zellen einerseits und deren Inhibition durch FGFRi näher zu beleuchten.

4.5 Relevanz für die Klinik

Obwohl die Kombination mit BRAFi und MEKi die Entwicklung einer Resistenz verzögert, stellt das Therapieversagen durch erworbene Resistenzen weiterhin die größte Herausforderung zielgerichteter Therapien des BRAF^{V600}-mutierten Melanoms dar. Angesichts der fast regelmäßig nach wenigen Monaten auftretenden Resistenzentwicklung und des damit einhergehenden Fortschreitens der Tumorerkrankung, stellen sich neue Fragen in den Therapieregimen mit zielgerichteten Inhibitoren. Es gilt zum einen, Strategien zur Vermeidung von Resistenzen zu entwickeln und zum anderen, therapeutische Optionen nach dem Auftreten von BRAFi/MEKi-Resistenzen zu erforschen. Dabei werden aktuell verschiedene Vorgehensweisen untersucht und diskutiert.

4.5.1 Strategien zur Vermeidung einer BRAFi/MEKi-Resistenzentwicklung

Obwohl Untersuchungen von Resistenzmechanismen und Ergebnisse aus Zellkultur-Experimenten anderes vermuten ließen, sind die Ansprechraten gegenüber einer alleinigen MEKi-Behandlung nach der Resistenzentwicklung gegenüber BRAFi gering [145, 310]. Etwas bessere Ansprechraten von ca. 15% konnten durch das Hinzufügen eines MEKi zum BRAFi erzielt werden [311]. Die höchsten Ansprechraten mit ca. 70% erreichte jedoch eine primäre Kombinationstherapie aus BRAFi/MEKi in BRAFi-naiven Patientinnen und Patienten [103]. Behandlungsoptionen nach Resistenzentstehung sind von größter Bedeutung und die Frage nach dem therapeutischen Vorgehen bei Progress unter BRAFi/MEKi-Therapie wird kontrovers diskutiert.

Einige Studien lieferten Hinweise für die Entwicklung einer Abhängigkeit der Melanomzellen von BRAFi- bzw. BRAFi/MEKi-Therapien, die sogar zu einem Wachstumsvorteil unter der Inhibitor-Behandlung führen können [312, 313]. Im Xenograft-Modell resultierte das Abbrechen einer Vemurafenib-Therapie nach Resistenzentwicklung in einer Tumorregression [314]. In einer anderen Studie hingegen wurde beobachtet, dass das Beenden einer Therapie zwar zur Regression von Metastasen, nicht jedoch zur klinischen Remission führte [313]. Andere Studien hingegen beobachteten, dass das Abbrechen einer BRAFi- oder BRAFi/MEKi-Behandlung im Falle einer Progression zu einer Tumorregression führen kann [314, 315]. Auf Basis dieser

Ergebnisse wurden daher die Optionen eines Therapieabbruchs bzw. intermittierender Therapieregime im Sinne einer „On-Off“-Therapie in Erwägung gezogen, um so eine Resistenzentwicklung zu verzögern oder bereits entstandenen Resistenzen zu begegnen [314]. Im Gegensatz dazu finden sich jedoch auch Studien, die ein längeres Gesamtüberleben durch Fortsetzung der BRAFi/MEKi-Therapie ungeachtet der Progression belegten, und daher eine Fortführung der Therapie als „*treatment beyond progression*“ empfohlen wird [316, 317]. Gleichzeitig wurde ein zum Teil rasches Fortschreiten der Tumorerkrankung nach Therapieabbruch bei Progression beschrieben [318]. Die unterschiedlichen Auswirkungen eines Therapieabbruchs könnten auf die große Tumorerheterogenität und Vielfalt der Resistenzmechanismen zurückzuführen sein [9, 10, 128, 145].

Neben den oben genannten Überlegungen werden auch der Wechsel zu einer anderen Kombinationstherapie bzw. das Hinzufügen eines dritten zielgerichteten Inhibitors zu der Behandlung mit BRAFi/MEKi diskutiert. Hierzu gibt es bereits einige präklinische Untersuchungen mit teilweise vielversprechenden Ergebnissen [154, 221, 319]. Denn auch wenn die den Resistenzen zugrunde liegenden Mechanismen sehr vielfältig sind, sind viele der betroffenen Effektorproteine durch bereits bekannte Therapeutika potenziell angreifbar. Mögliche Angriffspunkte gezielter Inhibitor-Therapien sind weitere Akteure des MAPK-Signalwegs wie z.B. ERK oder auch Mitglieder des PI3K-Signalwegs. Effekte eines ERKi und eines PI3Ki wurden in der vorliegenden Arbeit anfangs im Vergleich zu einer FGFRi-Behandlung untersucht. Beide zeigten sich jedoch in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen dem FGFRi in Hinsicht auf die Reduktion der Zellvitalität deutlich unterlegen (*Abb. 14*). Von therapeutischer Relevanz könnten ebenfalls CDK sein, die an Zellzyklus und Proliferation beteiligt sind, sowie verschiedene Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, wie z.B. EGFR und VEGFR, um nur einige zu nennen.

Ein ebenfalls schon länger verfolgter Ansatz ist die Kombination zielgerichteter Therapien mit Immuncheckpoint-Inhibitoren. Dies ist mit der Hoffnung verbunden, die Nachteile der jeweiligen Therapieprinzipien zu reduzieren und die Vorteile zu nutzen. So könnte der rasche und starke Therapieerfolg durch zielgerichtete Inhibitoren mit dem langzeitigen Ansprechen der Immuntherapien verbunden werden. Da die Behandlung mit einem MAPKi die körpereigene Immunreaktion gegen Melanozyten erhöht und zu einer Infiltration des Tumors mit zytotoxischen CD8-Lymphozyten führt, wären eventuell sogar

synergistische Effekte zu erwarten [320-323]. Zunächst schien sich diese Hoffnung nicht zu erfüllen: eine klinische Studie mit Vemurafenib und dem anti-CTLA4-Antikörper Ipilimumab musste aufgrund starker Hepatotoxizität abgebrochen werden [324], gleiches gilt für die Dreifachkombination Dabrafenib/Trametinib/Ipilimumab aufgrund von schwerwiegenden intestinalen Nebenwirkungen [325]. Eine kürzlich veröffentlichte klinische Studie untersuchte jedoch die Dreifachtherapie aus Dabrafenib/Trametinib/Pembrolizumab im Vergleich zu einer Behandlung mit Dabrafenib/Trametinib allein und konnte erste Erfolge verkünden. Die Dreifachtherapie führte zu einem um durchschnittlich 6 Monate verlängerten progressionsfreien Überleben, gleichzeitig aber auch zu einer doppelt so hohen Rate an schwerwiegenden Nebenwirkungen [326].

Auch bezüglich eines neuen Partners für die zielgerichteten Therapien wird die Frage diskutiert, ob eine primäre Kombinationstherapie mit drei verschiedenen Substanzen Vorteile gegenüber dem Hinzufügen einer dritten Substanz nach Resistenzentwicklung gegenüber BRAFi- und MEKi-Therapie zeigt. Folgt man dem Modell der klonalen Evolution, nach dem sich unter dem Selektionsdruck einer BRAFi/MEKi-Behandlung einzelne resistente Klone entwickeln, scheint ein von Beginn an breit aufgestelltes Therapiekonzept mit verschiedenen Angriffspunkten die Entwicklung von Resistenzen zu vermindern. Die Wahl des dritten Inhibitors könnte mit Hilfe von genetischen Analysen aus Tumorproben getroffen werden [120]. Das würde eventuell vermeiden, dass sich weitere Resistenzen aufgrund von Nischenbildung oder nicht geeigneten Therapien entwickeln. Erste Daten zur Kombinationstherapie mit Vemurafenib, Cobimetinib und dem PD-L1-Antikörper Atezolizumab liegen bereits vor und zeigen ein verlängertes progressionsfreies Überleben gegenüber einer Behandlung mit BRAFi/MEKi allein bei gleichzeitig akzeptablem Nebenwirkungsprofil [89].

4.5.2 FGFRi als Therapieoption nach BRAFi/MEKi-Resistenz?

Diese Arbeit konnte durch verschiedene *in vitro* Untersuchungen an parentalen, BRAFi-res und BRAFi/MEKi-res BRAF^{V600}-mutierten humanen Melanomzellen einen deutlichen antitumoralen Effekt des FGFRi Infigratinib darlegen. Hervorzuheben dabei ist, dass die stärksten Effekte bei den resistenten Zellen beobachtet wurden, und deutlich schwächer

bei den parentalen Zellen. Als molekulare Grundlage hierfür ließen sich verstärkte Aktivitäten von MAPK- und PI3K-Signalweg, die jeweils Zielstrukturen der FGFR sind, sowie erhöhte Genexpressionen von FGFR und einigen FGF in resistenten Zellen finden. Die Bedeutung insbesondere von FGFR2 und FGF7 für die Vitalität BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen ließ sich zudem durch RNA-Inhibition belegen, was die Vermutung einer gezielten Induktion von FGFR2 und FGF7 während der Resistenzentwicklung nahelegt, die wesentlich für das Überleben BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Melanomzellen sein könnte. Bemerkenswert ist zudem, dass die Effekte des FGFRi synergistisch mit BRAFi und MEKi wirkten und somit eventuell zu einer erneuten Sensibilisierung resistenter Zellen führen könnten. Basierend auf den Erkenntnissen dieser Arbeit ist die Behandlung mit dem FGFRi Infigratinib eine mögliche neue Therapieoption für das BRAF^{V600}-mutierte maligne Melanom nach erworbener BRAFi/MEKi-Resistenz.

Eine FGFRi-Therapie ist sowohl allein als auch in Kombination mit BRAFi und MEKi denkbar, evtl. wären auch alternierende Therapieregime von Vorteil, wie oben bereits dargelegt (*siehe 4.5.1*). Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse, ist vor allem die verstärkte Aktivität von FGFR2 über den spezifischen Liganden FGF7 von Bedeutung für BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen (*siehe 3.4*). Weiterführende Arbeiten könnten daher den Effekt einer spezifischen FGFR2-Inhibition untersuchen, die möglicherweise vergleichbare Erfolge bei geringeren Nebenwirkungen erzielen könnte. Hierzu gibt es bereits präklinische Studien an verschiedenen Tumorzellen [327]. Interessant wäre zudem die Untersuchung einer Kombination mit Infigratinib und PI3K- bzw. mTOR-Inhibitoren. In präklinischen Untersuchungen ist eine doppelte Blockade des MAPK- und PI3K-Signalwegs teilweise sehr vielversprechend [96, 262] und die Kombination mit ERKi und PI3Ki zeigte bei BRAFi-Resistenz bessere Effekte als die Behandlung mit einem MEKi [187]. Zudem konnten zahlreiche Studien die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs in Folge einer Resistenz gegenüber FGFRi identifizieren [328] und die Inhibition von mTOR zeigte synergistische Effekte mit einer FGFRi-Behandlung im hepatozellulären Karzinom [329]. Auch die hier vorgestellten Ergebnisse zeigten eine Überaktivität des PI3K/AKT-Signalwegs in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9 (*siehe 3.2.2*) und durch die Behandlung mit dem PI3Ki Buparlisib konnte ebenfalls eine deutliche Reduktion der Zellvitalität erreicht werden (*siehe 3.3.1*). Daher scheint es nicht abwegig, dass eine

Kombinationsbehandlung mit Infigratinib und Buparlisib die antitumoralen Effekte des FGFRi in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen noch verstärken könnte.

Die Entscheidung für eine Therapie mit Infigratinib könnte mit Hilfe eines Screenings auf Mutationen im FGFR-Signalweg getroffen werden, um den Therapieerfolg besser prognostizieren zu können. Für den Erfolg einer FGFRi-Therapie konnte insbesondere eine erhöhte mRNA-Expression der FGFR als entscheidender Faktor identifiziert werden [330]. Gemäß den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen könnte vor allem eine erhöhte Genexpression von FGFR2 von Interesse sein. Neben der klassischen Biopsie käme hierfür die Sequenzierung zirkulierender Tumor-DNA in Frage. Die Analyse zirkulierender Tumor-DNA könnte dem Problem der Tumorerheterogenität deutlich besser begegnen als herkömmliche Biopsien [332-334]. So ließen sich auch im Laufe der Inhibitortherapie erworbene Resistenzen gut überwachen und die Behandlung daraufhin individuell anpassen.

Nachdem Alterationen im FGFR-Status auch im Melanom weit verbreitet sind, eröffnen sich neue Möglichkeiten für zielgerichtete und personalisierte Therapien. Mehrere Studien untersuchen momentan die Effektivität verschiedener FGFRi sowie das Potenzial von FGFR oder FGF als Biomarker in verschiedenen Tumorentitäten [178, 335-337]. Im fortgeschrittenen Melanom untersucht die LOGIC-2-Studie u.a. die Kombination BRAFi/MEKi mit Infigratinib (NCT02159066).

Konzepte, die individuell auf die jeweilige Patientin/den jeweiligen Patienten zugeschnitten im Sinne einer personalisierten Medizin das bestmögliche Therapieregime ermitteln, sind angesichts der ausgeprägten Tumorerheterogenität des malignen Melanoms dringend erforderlich. Sie könnten ein weiterer Schritt hin zu einem größeren Therapieerfolg und besserer Lebensqualität für Betroffene sein. Weitere Studien zu neuen Therapiekombinationen werden derzeit durchgeführt (*siehe Tab. 2*), so dass effektive und zugleich verträgliche Kombinationsbehandlungen, die die Prognose von Patientinnen und Patienten in fortgeschrittenen Stadien weiter verbessern, in greifbare Nähe rücken.

Phase	Substanzen	Ziele	Progressionsfreies Überleben in Monaten	Unerwünschte Ereignisse Grad 3-4 in %	Referenz
II	Vemurafenib gefolgt von Ipilimumab	BRAF _i gefolgt von Anti-CTLA-4K	4,5	74	[338]
II	Encorafenib + MEK162 + LEE011/Infigratinib/ Buparlisib/INC280	sequenzielle TKi	-	-	NCT02159066 (LOGIC-2)
I/II	Vemurafenib + Buparlisib	BRAF _i + PI3Ki	-	67	NCT01512251
II	Trametinib + GSK2141795	BRAF _i + AKTi	2,8	25	NCT01941927
I/II	Vemurafenib + P1446A-05	BRAF _i + CDKi	-	-	NCT01841463
Ib	GDC-0941 + Cobimetinib	PI3Ki + MEKi	-	11	[339]
I	Buparlisib + MEK162	PI3Ki + MEKi	-	mind. 40	NCT02457793

Tab. 2: Klinische Studien zu neuen Kombinationstherapien

Dargestellt sind aktuelle klinische Studien zu Kombinationstherapien mit zielgerichteten Inhibitoren am metastasierten Melanom. Angegeben sind neben den Substanzen die jeweiligen Zielstrukturen sowie Effektivitäts- und Nebenwirkungsdaten. Spiegelstriche: bislang keine Daten berichtet.

4.5.3 Limitationen und Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse basieren allein auf *in vitro* durchgeführten Untersuchungen an hauptsächlich einer BRAF^{V600E}-mutierten Melanomzelllinie. Sie können so zwar erste wichtige Erkenntnisse liefern, dabei aber wesentliche Aspekte nicht berücksichtigen. Neben der Notwendigkeit der Überprüfung der hier dargestellten Ergebnisse an weiteren Zelllinien ist die Frage des therapeutischen Ansprechens *in vivo* vollkommen ungeklärt. Häufig zeigt sich ein deutlich geringeres Ansprechen *in vivo*, was u.a. auf ein komplexeres Tumormikromilieu sowie individuelle Voraussetzungen der Patientin/des Patienten zum Beispiel zur Bioverfügbarkeit zurückzuführen ist. Verbunden mit der Wirksamkeit der Therapie ist auch die Toxizität *in vivo* zu überprüfen. Bei einer Dreifach-Kombination muss hier insbesondere auf Interaktionen und Verstärkungen der Toxizität der einzelnen Substanzen geachtet werden. Erstaunlicherweise zeigte die Kombination mit BRAF_i und

MEKi weniger Nebenwirkungen als die Therapie mit einem der Medikamente allein [103, 104]. Dies lässt zumindest hoffen, dass Kombinationstherapien nicht in jedem Fall zu einer Verstärkung des Nebenwirkungsprofils führen müssen.

Fortführende Arbeiten, die den Effekt einer Kombination von FGFRi mit anderen Substanzklassen untersuchen, sind ebenfalls wünschenswert. Hierdurch könnten möglicherweise die antitumorale Wirksamkeit verstärkt, Ansprechraten verbessert und Resistenzen noch effektiver überwunden werden. Aktuell werden bereits klinische Studien mit der Kombination von FGFR- und Immuncheckpoint-Inhibitoren durchgeführt [340, 341]. Dieser Ansatz zielt auf die Bedeutung, die der FGFR-Signalweg für die Tumormikroumgebung hat. Die Interaktion zwischen Tumorzellen und Stromazellen ist wesentlich für die Tumorentwicklung und die Kommunikation über FGF-Liganden spielt dabei eine nicht unerhebliche Rolle [342, 343]. FGFRi können daher nicht nur über die direkte Inhibition der Rezeptoren, sondern auch indirekt über die Behinderung des Zusammenwirkens von Tumorzellen und Stromazellen antitumorale Effekte ausüben. Beispielsweise können FGFRi die FGF2-vermittelte Aktivierung von Fibroblasten hemmen [344], Immunzellen über die Inhibition von tumorassoziierten Fibroblasten (*cancer-associated fibroblasts*, CAFs) beeinflussen [345] und die FGF2/FGFR1-vermittelte Aktivierung von Endothelzellen und damit die Tumervaskularisation stören [176]. In Kombination mit Immuncheckpoint-Inhibitoren ließen sich diese Effekte möglicherweise noch verstärken.

Abschließend sei noch erwähnt, dass auch Resistenzentwicklungen gegenüber FGFRi ein immer wichtiger werdendes Thema und Grundlage aktueller Forschung sind. Zu dieser Frage kann die vorliegende Arbeit keinen Beitrag leisten, da mit den Behandlungszeiten von 72 h bzw. maximal 96 h für das Sphäroidmodell keine Langzeituntersuchungen durchgeführt wurden. Noch fehlen klinische Studien, die detailliert Resistenzmechanismen gegenüber FGFRi analysieren, Untersuchungen mit verschiedenen RTK lassen jedoch vermuten, dass erworbene Resistenzen auch hier ein wesentliches Problem darstellen könnten [346-348]. Eine FGFRi-Therapie kann zur Selektion von Zellklonen führen, die über die Aktivierung paralleler Signalwege wie EGFR-, MET-, RAS- und PI3K/AKT/mTOR-Signalweg eine Resistenz gegenüber FGFRi entwickelt haben [328, 329, 349]. Und auch die Tumorerheterogenität vor Therapiebeginn spielt erneut eine wichtige Rolle. Gerade fortgeschrittene inoperable Tumore, die für eine

FGFRi-Therapie in Frage kommen, haben bereits diverse Mutationen hinzugewonnen und unterschiedlich sensible Zellklone ausgebildet [350].

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit die *in-vitro*-Effektivität des FGFRi Infigratinib in BRAFi/MEKi-res Melanomzellen darlegen und die Bedeutung des FGF-FGFR-Signalwegs für BRAFi/MEKi-res Melanomzellen als potenzielle Zielstruktur für neue Therapieansätze näher beleuchten. Auf der Grundlage der vorliegenden Ergebnisse kann angenommen werden, dass der FGFRi Infigratinib ein vielversprechender Kombinationspartner für das BRAFi/MEKi-res Melanom sein könnte, was in künftigen Arbeiten weiter überprüft werden sollte. Zu den oben genannten offenen Fragen wird die aktuell durchgeführte LOGIC2-Studie (NCT02159066), eine klinische Phase-II-Studie, die u.a. Infigratinib in Kombination mit BRAFi und MEKi am BRAF-mutierten Melanom untersucht, sicherlich wichtige Erkenntnisse beitragen können.

Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist ein häufiger Hautkrebs mit einer hohen Mortalitätsrate und zeigt eine jährlich steigende Inzidenz mit zunehmend auch jungen Betroffenen. Neben UV-Strahlung zählen ein heller Hauttyp und zahlreiche melanozytäre Nävi, eine familiäre Prädisposition sowie Immunsuppression zu den Risikofaktoren. Während die Heilungschancen bei frühzeitiger chirurgischer Exzision exzellent sind, hat das fortgeschrittene metastasierte Melanom eine schlechte Prognose. Bis vor etwa 10 Jahren waren die Therapieoptionen im fortgeschrittenen Stadium äußerst begrenzt. Neben den sogenannten Immuncheckpoint-Inhibitoren eröffneten sich jedoch mit der Entdeckung von aktivierenden BRAF-Mutationen, die sich in etwa 50-60% aller Melanome finden und zu einer konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalwegs führen, neue Behandlungsmöglichkeiten in Form von zielgerichteten Kinase-Inhibitoren. Diese erzielten eine rasche Tumorregression bei hohen Ansprechraten und einem tolerablen Nebenwirkungsprofil. Mittlerweile zählt die Kombinationsbehandlung aus BRAF- und MEK-Inhibitoren zur Erstlinientherapie des BRAF-mutierten metastasierten Melanoms. Limitierend sind jedoch die regelmäßig auftretenden erworbenen Therapieresistenzen, die in etwa 50% der Patientinnen und Patienten zu einer Krankheitsprogression nach 11-12 Monaten führen.

Die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen sind vielfältig und in ihrer Komplexität noch nicht vollständig verstanden. Neben einer häufig beobachteten Reaktivierung des MAPK-Signalwegs finden sich u.a. verstärkte Aktivierungen paralleler Signalwege wie des PI3K/AKT-Signalwegs und eine erhöhte Expression verschiedener Rezeptortyrosinkinasen. Zumeist findet sich nicht nur eine der genannten Alterationen und in einem nicht unerheblichen Anteil BRAF/MEK-Inhibitor-resistenter Melanome lässt sich gar kein eindeutiger Resistenzmechanismus identifizieren. Erschwerend kommt hinzu, dass das Melanom eine ausgesprochen große inter- und intratumorale Heterogenität zeigt, die sowohl genetische als auch epigenetische und phänotypische Merkmale umfasst. Dies geht so weit, dass in ein und derselben Patientin/demselben Patienten verschiedene Subpopulationen von Tumorzellen mit einer unterschiedlichen Sensitivität gegenüber den Kinase-Inhibitoren existieren. Die Behandlung mit zielgerichteten Therapien kann zu einer

Selektion der resistenteren Populationen führen, was nach einigen Monaten in eine Krankheitsprogression mündet.

FGF-Rezeptoren gehören zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen und werden parakrin und autokrin über 22 verschiedene FGF-Liganden aktiviert. So regulieren FGF-Rezeptoren eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege wie den MAPK-, PI3K/AKT- und STAT-Signalweg. Über diese vermitteln sie wesentliche physiologische Vorgänge wie Überleben, Differenzierung, Proliferation und Migration der Zelle und spielen daher eine bedeutende Rolle während der Embryogenese, für die Gewebemöostase und Wundheilung sowie die Tumorentstehung und Metastasierung. Genetische Alterationen, die zu einer Deregulation des FGF-FGFR-Signalwegs führen, wurden in diversen Tumorentitäten beschrieben. Die Inhibition von FGF-Rezeptoren zeigte hier eine vielversprechende Wirkung.

Da FGFR-Rezeptoren wesentliche für die Melanomentstehung und die Resistenzentwicklung gegenüber BRAF- und MEK-Inhibitoren verantwortlichen Signalwege beeinflussen, hat die vorliegende Arbeit zum Ziel, den Effekt des FGFRi Infigratinib (BGJ-398) auf BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Melanomzellen zu untersuchen und möglicherweise zugrunde liegende Resistenz-vermittelnde Alterationen im FGF-FGFR-Signalweg zu identifizieren.

Dazu wurden zunächst BRAFi- und BRAFi/MEKi-res WM9-Melanomzellen generiert und die erworbene Resistenz über die Detektion der ERK-Aktivität überprüft. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Aktivität des MAPK-, PI3K/AKT- und WNT-Signalwegs sowie verschiedener Signalproteine in resistenten und parentalen Zellen verglichen. Hier zeigte sich eine Reaktivierung des MAPK- sowie eine verstärkte Aktivität des PI3K- und des WNT-Signalwegs in resistenten Zellen. Zudem fanden sich in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen Hinweise auf Zellzyklusarrest und eine verminderte translationale Aktivität bei gleichzeitig verstärkten anti-apoptotischen Eigenschaften.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Effekt einer Behandlung mit dem FGFRi Infigratinib allein und in Kombination mit BRAFi und MEKi auf Vitalität, Invasionskapazität, Zellzyklusarrest und Zelltod-Induktion in parentalen und BRAFi- bzw. BRAFi/MEKi-res Zellen untersucht. Die Zellvitalitäts-Analysen wurden vergleichend auch nach Behandlung mit einem PI3Ki Buparlisib (BKM120) und dem ERKi Raxoxertinib (GDC-0994) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass Infigratinib allein zu einer deutlichen

Reduktion der Vitalität in resistenten, nicht jedoch in parentalen Zellen führte. In BRAFi/MEKi-res Zellen zeigte sich Infigratinib deutlich effektiver als die Behandlung mit PI3Ki oder ERKi. Unter der Dreifachkombination FGFRi/BRAFi/MEKi kam es fast zum vollständigen Absterben BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen.

Western-Blot-Analysen ergaben, dass die Kombinationsbehandlung mit FGFRi/BRAFi/MEKi in allen Zellen den MAPK-Signalweg vollständig und in resistenten, nicht jedoch in parentalen Zellen zusätzlich den PI3K-Signalweg deutlich hemmte. In resistenten Zellen induzierte die Infigratinib-Behandlung zudem WNT4.

Mit Hilfe eines dreidimensionalen Sphäroid-Modells wurde anschließend die Invasionskapazität parentaler und resistenter Zellen analysiert. Es fand sich eine deutlich beschleunigte und verstärkte Migration resistenter gegenüber parentalen Zellen. Unter der Behandlung mit Infigratinib allein wurde die Invasion resistenter Zellen vollständig gehemmt, während parentale Sphäroide noch eine leichte Invasion zeigten. In Kombination mit BRAFi und MEKi kam es in allen Sphäroiden zur Inhibition der Migration und zusätzlich zum Absterben der resistenten Sphäroide.

Abschließend wurde der Einfluss des FGFRi auf Zellzyklusarrest und Zelltod-Induktion untersucht. Über Detektion von Cyclin D1 und pRb konnte ein Arrest resistenter, nicht jedoch parentaler Zellen in der G1-Phase nach Behandlung mit Infigratinib allein und noch stärker in Kombination mit BRAFi und MEKi gezeigt werden. Mittels Durchflusszytometrie fand sich nach Färbung mit AV und PJ eine deutliche Zelltodinduktion in resistenten, nicht jedoch in parentalen Zellen, die im Wesentlichen auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen war. Dies konnte nach Detektion von gespaltener PARP und Caspase 3 bestätigt werden. Insgesamt zeigten diese Ergebnisse somit eine durch Infigratinib vermittelte effektive Inhibition von MAPK- und PI3K-Signalweg, die zu einer deutlichen Reduktion der Zellvitalität, Inhibition der Invasion und Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen führte, während parentale Zellen weniger beeinflusst wurden.

Der dritte Teil der Arbeit widmete sich der Expressionsanalyse von FGF-Rezeptoren und -Liganden in parentalen und resistenten Zellen. Dazu wurde zunächst die Genexpression der FGFR1-5 mittels quantitativer Echtzeit-PCR bestimmt und die Ergebnisse über Western-Blot-Analyse überprüft. Die Daten ergaben eine deutlich erhöhte Expression für FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR5, während FGFR4 in resistenten Zellen geringer

exprimiert war. Der größte relative Unterschied zwischen parentalen und resistenten Zellen fand sich für FGFR2. Eine anschließende Expressionsanalyse von FGF1, FGF2, FGF7 und FGF10 ergab für alle FGF eine erhöhte Expression in resistenten gegenüber parentalen Zellen. Der größte relative Unterschied fand sich für FGF7 und FGF10, die die höchste Affinität für FGFR2 zeigen. Die Behandlung mit Infigratinib allein und noch stärker in Kombination mit BRAFi und MEKi führte zu einer deutlichen Induktion von FGFR2 in resistenten, nicht jedoch in parentalen Zellen.

Anschließend wurde mittels gezielter RNA-Inhibition der Einfluss einer Hemmung der einzelnen FGFR sowie FGF7 auf die Vitalität parentaler und resistenter Zellen untersucht. Hier bestätigte sich eine wesentliche Bedeutung von FGFR1 und FGFR2 sowie FGF7 für die Vitalität BRAFi- und BRAFi/MEKi-res, nicht jedoch parentaler Zellen. Die vorgelegten Ergebnisse konnten demnach eine Vitalität vermittelnde verstärkte Aktivität des FGF-FGFR-Signalwegs insbesondere über FGF7/FGFR2 in resistenten Zellen belegen. Abschließend wurde ein Teil der Ergebnisse an kurzzeitig kultivierten Melanomzellen, die aus einer kutanen Metastase gewonnen wurden, überprüft. Auch in diesen zwei Zelllinien zeigte die Kombination FGFRi/BRAFi/MEKi eine starke Reduktion der Zellvitalität und erwies sich damit effektiver als die Kombinationsbehandlungen mit PI3Ki und ERKi. Zudem konnte auch in diesen Zelllinien eine starke Proteinexpression von FGFR1 und FGFR2 gefunden werden.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit die Effektivität einer FGFR-Inhibition mit Infigratinib in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Melanomzellen bestätigen. Infigratinib sensibilisierte resistente Zellen erneut für BRAFi und MEKi, die Kombinationsbehandlung aus FGFRi/BRAFi/MEKi erzielte jeweils die größten Erfolge. Ein möglicher Mechanismus für die unterschiedliche Effektivität der Behandlung zwischen parentalen und resistenten Zellen konnte über die Expressionsanalysen von FGFR und FGF gefunden werden, die insbesondere eine erhöhte Expression von FGF7/FGFR2 in BRAFi- und BRAFi/MEKi-res Zellen aufdeckte. Hierbei könnte es sich möglicherweise um eine Resistenz-vermittelnde Anpassungsreaktion gegenüber der Behandlung mit BRAFi und MEKi handeln. Die vorliegenden Untersuchungen weisen somit auf die Bedeutung des FGF-FGFR-Signalwegs für die Resistenzentwicklung gegenüber BRAFi und MEKi und damit auf das Potenzial einer FGFR-Inhibition für das BRAFi/MEKi-res Melanom hin.

Literaturverzeichnis

1. Clark, W.H., Jr., et al., *The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin*. *Cancer Res*, 1969. **29**(3): p. 705-27.
2. Gandini, S., et al., *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure*. *Eur J Cancer*, 2005. **41**(1): p. 45-60.
3. Berking, C., [*The role of ultraviolet irradiation in malignant melanoma*]. *Hautarzt*, 2005. **56**(7): p. 687-96; quiz 697.
4. Gandini, S., et al., *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi*. *Eur J Cancer*, 2005. **41**(1): p. 28-44.
5. Gandini, S., et al., *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors*. *Eur J Cancer*, 2005. **41**(14): p. 2040-59.
6. McGregor, J.M., et al., *Cutaneous malignant melanoma and human immunodeficiency virus (HIV) infection: a report of three cases*. *Br J Dermatol*, 1992. **126**(5): p. 516-9.
7. Balch, C.M., et al., *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(36): p. 6199-206.
8. Robert-Koch-Institut. *Krebs in Deutschland für 2015/2016 - Malignes Melanom der Haut*. Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/kid_2019_c43_melanom.pdf;jsessionid=A715FE0C01203832E47090261A18BAC6.1_cid290?__blob=publicationFile.
9. Rizos, H., et al., *BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: spectrum and clinical impact*. *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(7): p. 1965-77.
10. Van Allen, E.M., et al., *The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma*. *Cancer Discov*, 2014. **4**(1): p. 94-109.
11. Knecht, A.K. and Bronner-Fraser, M., *Induction of the neural crest: a multigene process*. *Nat Rev Genet*, 2002. **3**(6): p. 453-61.
12. Sauka-Spengler, T. and Bronner-Fraser, M., *A gene regulatory network orchestrates neural crest formation*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(7): p. 557-68.
13. Selleck, M.A., T.Y. Scherson, and M. Bronner-Fraser, *Origins of neural crest cell diversity*. *Dev Biol*, 1993. **159**(1): p. 1-11.
14. Sauka-Spengler, T., et al., *Ancient evolutionary origin of the neural crest gene regulatory network*. *Dev Cell*, 2007. **13**(3): p. 405-20.
15. Endo, Y., Osumi, N. and Wakamatsu, Y., *Bimodal functions of Notch-mediated signaling are involved in neural crest formation during avian ectoderm development*. *Development*, 2002. **129**(4): p. 863-73.
16. Wehrle-Haller, B., *The role of Kit-ligand in melanocyte development and epidermal homeostasis*. *Pigment Cell Res*, 2003. **16**(3): p. 287-96.
17. Levy, C., M. Khaled, and D.E. Fisher, *MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene*. *Trends Mol Med*, 2006. **12**(9): p. 406-14.
18. Jimbow, K., et al., *Some aspects of melanin biology: 1950-1975*. *J Invest Dermatol*, 1976. **67**(1): p. 72-89.
19. Katz, M., I. Amit, and Y. Yarden, *Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1773**(8): p. 1161-76.

20. Rains, J.L. and Jain, S.K. *Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes*. Free Radic Biol Med, 2011. **50**(5): p. 567-75.
21. Garnett, M.J., et al., *Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanisms involving heterodimerization*. Mol Cell, 2005. **20**(6): p. 963-9.
22. Kohno, M. and J. Pouyssegur, *Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy*. Ann Med, 2006. **38**(3): p. 200-11.
23. Sturm, O.E., et al., *The mammalian MAPK/ERK pathway exhibits properties of a negative feedback amplifier*. Sci Signal, 2010. **3**(153): p. ra90.
24. Nazarian, R., et al., *Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation*. Nature, 2010. **468**(7326): p. 973-7.
25. Cantley, L.C., *The phosphoinositide 3-kinase pathway*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1655-7.
26. Porta, C., C. Paglino, and A. Mosca, *Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 64.
27. Tsao, H., et al., *Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma*. J Invest Dermatol, 2004. **122**(2): p. 337-41.
28. Hodis, E., et al., *A landscape of driver mutations in melanoma*. Cell, 2012. **150**(2): p. 251-63.
29. Goel, V.K., et al., *Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(1): p. 154-60.
30. Gallagher, S.J., et al., *Beta-catenin inhibits melanocyte migration but induces melanoma metastasis*. Oncogene, 2013. **32**(17): p. 2230-8.
31. Sinnberg, T., et al., *A Nexus Consisting of Beta-Catenin and Stat3 Attenuates BRAF Inhibitor Efficacy and Mediates Acquired Resistance to Vemurafenib*. EBioMedicine, 2016. **8**: p. 132-49.
32. Chien, A.J., et al., *Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(4): p. 1193-8.
33. Clevers, H., *Wnt/beta-catenin signaling in development and disease*. Cell, 2006. **127**(3): p. 469-80.
34. Klaus, A. and W. Birchmeier, *Wnt signalling and its impact on development and cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(5): p. 387-98.
35. Moon, R.T., et al., *Structurally related receptors and antagonists compete for secreted Wnt ligands*. Cell, 1997. **88**(6): p. 725-8.
36. Logan, C.Y. and R. Nusse, *The Wnt signaling pathway in development and disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 781-810.
37. He, X., et al., *LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way*. Development, 2004. **131**(8): p. 1663-77.
38. Bonvini, P., et al., *Nuclear beta-catenin displays GSK-3beta- and APC-independent proteasome sensitivity in melanoma cells*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1495**(3): p. 308-18.
39. Benoit, Y.D., et al., *Molecular pathways: epigenetic modulation of Wnt-glycogen synthase kinase-3 signaling to target human cancer stem cells*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(21): p. 5372-8.
40. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 785-9.

41. Chien, A.J., W.H. Conrad, and R.T. Moon, *A Wnt survival guide: from flies to human disease*. *J Invest Dermatol*, 2009. **129**(7): p. 1614-27.
42. Shimokawa, T., et al., *Involvement of the FGF18 gene in colorectal carcinogenesis, as a novel downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex*. *Cancer Res*, 2003. **63**(19): p. 6116-20.
43. Chamorro, M.N., et al., *FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development*. *EMBO J*, 2005. **24**(1): p. 73-84.
44. Pai, R., et al., *Inhibition of fibroblast growth factor 19 reduces tumor growth by modulating beta-catenin signaling*. *Cancer Res*, 2008. **68**(13): p. 5086-95.
45. Belleudi, F., et al., *KGF Promotes Paracrine Activation of the SCF/c-KIT Axis from Human Keratinocytes to Melanoma Cells*. *Transl Oncol*, 2010. **3**(2): p. 80-90.
46. Lawrence, M.S., et al., *Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes*. *Nature*, 2013. **499**(7457): p. 214-218.
47. Berger, M.F., et al., *Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations*. *Nature*, 2012. **485**(7399): p. 502-6.
48. Cohen, C., et al., *Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(12): p. 3728-33.
49. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. *Nature*, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
50. Long, G.V., et al., *Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(10): p. 1239-46.
51. Wan, P.T., et al., *Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF*. *Cell*, 2004. **116**(6): p. 855-67.
52. Hutchinson, K.E., et al., *BRAF fusions define a distinct molecular subset of melanomas with potential sensitivity to MEK inhibition*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(24): p. 6696-702.
53. Pollock, P.M., et al., *High frequency of BRAF mutations in nevi*. *Nat Genet*, 2003. **33**(1): p. 19-20.
54. Shain, A.H., et al., *The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(20): p. 1926-36.
55. Onken, M.D., et al., *Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008. **49**(12): p. 5230-4.
56. Moon, K.R., et al., *Genetic Alterations in Primary Acral Melanoma and Acral Melanocytic Nevus in Korea: Common Mutated Genes Show Distinct Cytomorphological Features*. *J Invest Dermatol*, 2018. **138**(4): p. 933-945.
57. Jakob, J.A., et al., *NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma*. *Cancer*, 2012. **118**(16): p. 4014-23.
58. Downward, J., *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(1): p. 11-22.
59. Padua, R.A., N. Barrass, and G.A. Currie, *A novel transforming gene in a human malignant melanoma cell line*. *Nature*, 1984. **311**(5987): p. 671-3.
60. Sensi, M., et al., *Mutually exclusive NRASQ61R and BRAFV600E mutations at the single-cell level in the same human melanoma*. *Oncogene*, 2006. **25**(24): p. 3357-64.
61. Shi, H., et al., *A novel AKT1 mutant amplifies an adaptive melanoma response to BRAF inhibition*. *Cancer Discov*, 2014. **4**(1): p. 69-79.

62. Flaherty, K.T., et al., *Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma*. N Engl J Med, 2012. **367**(2): p. 107-14.
63. Lyle, M. and G.V. Long, *Diagnosis and treatment of KIT-mutant metastatic melanoma*. J Clin Oncol, 2013. **31**(26): p. 3176-81.
64. Curtin, J.A., et al., *Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(26): p. 4340-6.
65. Todd, J.R., et al., *The MAPK pathway functions as a redundant survival signal that reinforces the PI3K cascade in c-Kit mutant melanoma*. Oncogene, 2014. **33**(2): p. 236-45.
66. Nissan, M.H., et al., *Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence*. Cancer Res, 2014. **74**(8): p. 2340-50.
67. Bishop, D.T., et al., *Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(12): p. 894-903.
68. Muthusamy, V., et al., *Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2006. **45**(5): p. 447-54.
69. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
70. Hale, E.K., et al., *Association of melanoma and neurocutaneous melanocytosis with large congenital melanocytic naevi--results from the NYU-LCMN registry*. Br J Dermatol, 2005. **152**(3): p. 512-7.
71. Clark, W.H., Jr., et al., *A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma*. Hum Pathol, 1984. **15**(12): p. 1147-65.
72. Tang, A., et al., *E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro*. J Cell Sci, 1994. **107 (Pt 4)**: p. 983-92.
73. Li, G., et al., *Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development*. Oncogene, 2001. **20**(56): p. 8125-35.
74. Jamal, S. and R.J. Schneider, *UV-induction of keratinocyte endothelin-1 downregulates E-cadherin in melanocytes and melanoma cells*. J Clin Invest, 2002. **110**(4): p. 443-52.
75. Berking, C., et al., *Induction of melanoma phenotypes in human skin by growth factors and ultraviolet B*. Cancer Res, 2004. **64**(3): p. 807-11.
76. Work, G., et al., *Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma*. J Am Acad Dermatol, 2019 Jan;80(1):208-250.
77. Vennepureddy, A., et al., *Novel Drugs and Combination Therapies for the Treatment of Metastatic Melanoma*. J Clin Med Res, 2016. **8**(2): p. 63-75.
78. Kee, D. and G. McArthur, *Targeted therapies for cutaneous melanoma*. Hematol Oncol Clin North Am, 2014. **28**(3): p. 491-505.
79. Sullivan, R.J. and M.B. Atkins, *Cytokine therapy in melanoma*. J Cutan Pathol, 2010. **37 Suppl 1**: p. 60-7.
80. Inman, B.A., et al., *Costimulation, coinhibition and cancer*. Curr Cancer Drug Targets, 2007. **7**(1): p. 15-30.
81. Hodi, F.S., et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(8): p. 711-23.
82. Robert, C., et al., *Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2011. **364**(26): p. 2517-26.

83. Wolchok, J.D., et al., *Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma*. N Engl J Med, 2013. **369**(2): p. 122-33.
84. Wolchok, J.D., et al., *Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma*. N Engl J Med, 2017. **377**(14): p. 1345-1356.
85. Hodi, F.S., et al., *Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2018. **19**(11): p. 1480-1492.
86. Callahan, M.K., et al., *Nivolumab Plus Ipilimumab in Patients With Advanced Melanoma: Updated Survival, Response, and Safety Data in a Phase I Dose-Escalation Study*. J Clin Oncol, 2018. **36**(4): p. 391-398.
87. Larkin, J., et al., *Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma*. N Engl J Med, 2019. **381**(16): p. 1535-1546.
88. Johnson, D.B., et al., *Acquired BRAF inhibitor resistance: A multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms*. Eur J Cancer, 2015. **51**(18): p. 2792-9.
89. Gutzmer, R., et al., *Atezolizumab, vemurafenib, and cobimetinib as first-line treatment for unresectable advanced BRAF(V600) mutation-positive melanoma (IMspire150): primary analysis of the randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial*. Lancet, 2020. **395**(10240): p. 1835-1844.
90. Larkin, J., et al., *Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma*. N Engl J Med, 2015. **373**(1): p. 23-34.
91. Robert, C., et al., *Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study*. Lancet Oncol, 2019. **20**(9): p. 1239-1251.
92. Tsai, J., et al., *Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 3041-6.
93. Chapman, P.B., et al., *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation*. N Engl J Med, 2011. **364**(26): p. 2507-16.
94. McArthur, G.A., et al., *Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study*. Lancet Oncol, 2014. **15**(3): p. 323-32.
95. Hauschild, A., et al., *Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial*. Lancet, 2012. **380**(9839): p. 358-65.
96. Dummer, R., J. Rinderknecht, and S.M. Goldinger, *Ultraviolet A and photosensitivity during vemurafenib therapy*. N Engl J Med, 2012. **366**(5): p. 480-1.
97. Zimmer, L., et al., *Atypical melanocytic proliferations and new primary melanomas in patients with advanced melanoma undergoing selective BRAF inhibition*. J Clin Oncol, 2012. **30**(19): p. 2375-83.
98. Solit, D.B., et al., *BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition*. Nature, 2006. **439**(7074): p. 358-62.
99. Urner-Bloch, U., et al., *Transient MEK inhibitor-associated retinopathy in metastatic melanoma*. Ann Oncol, 2014. **25**(7): p. 1437-41.
100. Flaherty, K.T., et al., *Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations*. N Engl J Med, 2012. **367**(18): p. 1694-703.

101. Robert, C., et al., *Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib*. N Engl J Med, 2015. **372**(1): p. 30-9.
102. Larkin, J., et al., *Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma*. N Engl J Med, 2014. **371**(20): p. 1867-76.
103. Long, G.V., et al., *Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma*. N Engl J Med, 2014. **371**(20): p. 1877-88.
104. Long, G.V., et al., *Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial*. Lancet, 2015. **386**(9992): p. 444-51.
105. Ascierto, P.A., et al., *Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAFV600-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2016.
106. Grob, J.J., et al., *Comparison of dabrafenib and trametinib combination therapy with vemurafenib monotherapy on health-related quality of life in patients with unresectable or metastatic cutaneous BRAF Val600-mutation-positive melanoma (COMBI-v): results of a phase 3, open-label, randomised trial*. Lancet Oncol, 2015. **16**(13): p. 1389-98.
107. Dummer, R., et al., *Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2018. **19**(5): p. 603-615.
108. Dummer, R., et al., *Overall survival in patients with BRAF-mutant melanoma receiving encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2018. **19**(10): p. 1315-1327.
109. Ascierto, P.A., et al., *MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study*. Lancet Oncol, 2013. **14**(3): p. 249-56.
110. Dummer, R., et al., *Binimetinib versus dacarbazine in patients with advanced NRAS-mutant melanoma (NEMO): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2017. **18**(4): p. 435-445.
111. Sosman, J.A., et al., *Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib*. N Engl J Med, 2012. **366**(8): p. 707-14.
112. Ribas, A., et al., *Combination of vemurafenib and cobimetinib in patients with advanced BRAF(V600)-mutated melanoma: a phase 1b study*. Lancet Oncol, 2014. **15**(9): p. 954-65.
113. Long, G.V., et al., *Overall Survival and Durable Responses in Patients With BRAF V600-Mutant Metastatic Melanoma Receiving Dabrafenib Combined With Trametinib*. J Clin Oncol, 2016. **34**(8): p. 871-8.
114. Garbe, C., et al., *Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects*. Oncologist, 2011. **16**(1): p. 5-24.
115. Ives, N.J., et al., *Adjuvant interferon-alpha for the treatment of high-risk melanoma: An individual patient data meta-analysis*. Eur J Cancer, 2017. **82**: p. 171-183.
116. Eggermont, A.M.M., et al., *Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma*. N Engl J Med, 2018. **378**(19): p. 1789-1801.

117. Eggermont, A.M.M., et al., *Adjuvant pembrolizumab versus placebo in resected stage III melanoma (EORTC 1325-MG/KEYNOTE-054): distant metastasis-free survival results from a double-blind, randomised, controlled, phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2021. **22**(5): p. 643-654.
118. Weber, J., et al., *Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma*. *N Engl J Med*, 2017. **377**(19): p. 1824-1835.
119. Long, G.V., et al., *Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma*. *N Engl J Med*, 2017. **377**(19): p. 1813-1823.
120. *Genomic Classification of Cutaneous Melanoma*. *Cell*, 2015. **161**(7): p. 1681-96.
121. Hoek, K.S., et al., *In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states*. *Cancer Res*, 2008. **68**(3): p. 650-6.
122. Kim, I.S., et al., *Microenvironment-derived factors driving metastatic plasticity in melanoma*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 14343.
123. Holohan, C., et al., *Cancer drug resistance: an evolving paradigm*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(10): p. 714-26.
124. Meacham, C.E. and S.J. Morrison, *Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity*. *Nature*, 2013. **501**(7467): p. 328-37.
125. Junttila, M.R. and F.J. de Sauvage, *Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response*. *Nature*, 2013. **501**(7467): p. 346-54.
126. Shackleton, M., *Moving targets that drive cancer progression*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(9): p. 885-6.
127. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. *Science*, 1976. **194**(4260): p. 23-8.
128. Shi, H., et al., *Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy*. *Cancer Discov*, 2014. **4**(1): p. 80-93.
129. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
130. Toh, T.B., J.J. Lim, and E.K. Chow, *Epigenetics in cancer stem cells*. *Mol Cancer*, 2017. **16**(1): p. 29.
131. Carreira, S., et al., *Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness*. *Genes Dev*, 2006. **20**(24): p. 3426-39.
132. Hill, R.P., *Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven*. *Cancer Res*, 2006. **66**(4): p. 1891-5.
133. Hoek, K.S., et al., *Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2008. **21**(6): p. 665-76.
134. Hoek, K.S. and C.R. Goding, *Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2010. **23**(6): p. 746-59.
135. O'Connell, M.P., et al., *Hypoxia induces phenotypic plasticity and therapy resistance in melanoma via the tyrosine kinase receptors ROR1 and ROR2*. *Cancer Discov*, 2013. **3**(12): p. 1378-93.
136. Hoek, K.S., et al., *Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature*. *Pigment Cell Res*, 2006. **19**(4): p. 290-302.
137. Jain, R.K., *Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(17): p. 2205-18.
138. Quail, D.F. and J.A. Joyce, *Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis*. *Nat Med*, 2013. **19**(11): p. 1423-37.

139. Straussman, R., et al., *Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion*. *Nature*, 2012. **487**(7408): p. 500-4.
140. Obenauf, A.C., et al., *Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression*. *Nature*, 2015. **520**(7547): p. 368-72.
141. Johannessen, C.M., et al., *COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation*. *Nature*, 2010. **468**(7326): p. 968-72.
142. Sun, C., et al., *Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma*. *Nature*, 2014. **508**(7494): p. 118-22.
143. Hirata, E., et al., *Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin beta1/FAK signaling*. *Cancer Cell*, 2015. **27**(4): p. 574-88.
144. Shi, H., et al., *Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance*. *Nat Commun*, 2012. **3**: p. 724.
145. Long, G.V., et al., *Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 5694.
146. Poulikakos, P.I., et al., *RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E)*. *Nature*, 2011. **480**(7377): p. 387-90.
147. Carlino, M.S., et al., *Preexisting MEK1P124 mutations diminish response to BRAF inhibitors in metastatic melanoma patients*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(1): p. 98-105.
148. Wagle, N., et al., *MAP kinase pathway alterations in BRAF-mutant melanoma patients with acquired resistance to combined RAF/MEK inhibition*. *Cancer Discov*, 2014. **4**(1): p. 61-8.
149. Whittaker, S.R., et al., *A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition*. *Cancer Discov*, 2013. **3**(3): p. 350-62.
150. Montagut, C., et al., *Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma*. *Cancer Res*, 2008. **68**(12): p. 4853-61.
151. Deng, W., et al., *Role and therapeutic potential of PI3K-mTOR signaling in de novo resistance to BRAF inhibition*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2012. **25**(2): p. 248-58.
152. Nathanson, K.L., et al., *Tumor genetic analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436)*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(17): p. 4868-78.
153. Shao, Y. and A.E. Aplin, *Akt3-mediated resistance to apoptosis in B-RAF-targeted melanoma cells*. *Cancer Res*, 2010. **70**(16): p. 6670-81.
154. Villanueva, J., et al., *Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K*. *Cancer Cell*, 2010. **18**(6): p. 683-95.
155. Wang, J., et al., *Epigenetic changes of EGFR have an important role in BRAF inhibitor-resistant cutaneous melanomas*. *J Invest Dermatol*, 2015. **135**(2): p. 532-41.
156. Yadav, V., et al., *Reactivation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway by FGF receptor 3 (FGFR3)/Ras mediates resistance to vemurafenib in human B-RAF V600E mutant melanoma*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(33): p. 28087-98.

157. Lito, P., et al., *Relief of profound feedback inhibition of mitogenic signaling by RAF inhibitors attenuates their activity in BRAFV600E melanomas*. *Cancer Cell*, 2012. **22**(5): p. 668-82.
158. Birck, A., et al., *Expression of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in primary and metastatic melanoma from the same patients*. *Melanoma Res*, 1999. **9**(4): p. 375-81.
159. Halaban, R., et al., *bFGF as an autocrine growth factor for human melanomas*. *Oncogene Res*, 1988. **3**(2): p. 177-86.
160. Halaban, R., et al., *Paracrine stimulation of melanocytes by keratinocytes through basic fibroblast growth factor*. *Ann N Y Acad Sci*, 1988. **548**: p. 180-90.
161. Eswarakumar, V.P., I. Lax, and J. Schlessinger, *Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005. **16**(2): p. 139-49.
162. Turner, N. and R. Grose, *Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(2): p. 116-29.
163. Beenken, A. and M. Mohammadi, *The FGF family: biology, pathophysiology and therapy*. *Nat Rev Drug Discov*, 2009. **8**(3): p. 235-53.
164. Powers, C.J., S.W. McLeskey, and A. Wellstein, *Fibroblast growth factors, their receptors and signaling*. *Endocr Relat Cancer*, 2000. **7**(3): p. 165-97.
165. Holzmann, K., et al., *Alternative Splicing of Fibroblast Growth Factor Receptor IgIII Loops in Cancer*. *J Nucleic Acids*, 2012. **2012**: p. 950508.
166. Belov, A.A. and M. Mohammadi, *Molecular mechanisms of fibroblast growth factor signaling in physiology and pathology*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. **5**(6).
167. Acevedo, V.D., M. Ittmann, and D.M. Spencer, *Paths of FGFR-driven tumorigenesis*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(4): p. 580-8.
168. Dailey, L., et al., *Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005. **16**(2): p. 233-47.
169. Becker, D., et al., *Inhibition of the fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR-1) gene in human melanocytes and malignant melanomas leads to inhibition of proliferation and signs indicative of differentiation*. *Oncogene*, 1992. **7**(11): p. 2303-13.
170. Presta, M., et al., *Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005. **16**(2): p. 159-78.
171. Helsten, T., et al., *The FGFR Landscape in Cancer: Analysis of 4,853 Tumors by Next-Generation Sequencing*. *Clin Cancer Res*, 2016. **22**(1): p. 259-67.
172. Jeffers, M., W.J. LaRochelle, and H.S. Lichtenstein, *Fibroblast growth factors in cancer: therapeutic possibilities*. *Expert Opin Ther Targets*, 2002. **6**(4): p. 469-82.
173. Grimm, J., et al., *BRAF inhibition causes resilience of melanoma cell lines by inducing the secretion of FGF1*. *Oncogenesis*, 2018. **7**(9): p. 71.
174. Metzner, T., et al., *Fibroblast growth factor receptors as therapeutic targets in human melanoma: synergism with BRAF inhibition*. *J Invest Dermatol*, 2011. **131**(10): p. 2087-95.
175. Dieci, M.V., et al., *Fibroblast growth factor receptor inhibitors as a cancer treatment: from a biologic rationale to medical perspectives*. *Cancer Discov*, 2013. **3**(3): p. 264-79.

176. Huynh, H., et al., *Infigratinib Mediates Vascular Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy in Hepatocellular Carcinoma*. *Hepatology*, 2019. **69**(3): p. 943-958.
177. Nogova, L., et al., *Evaluation of BGJ398, a Fibroblast Growth Factor Receptor 1-3 Kinase Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Tumors Harboring Genetic Alterations in Fibroblast Growth Factor Receptors: Results of a Global Phase I, Dose-Escalation and Dose-Expansion Study*. *J Clin Oncol*, 2017. **35**(2): p. 157-165.
178. Javle, M., et al., *Phase II Study of BGJ398 in Patients With FGFR-Altered Advanced Cholangiocarcinoma*. *J Clin Oncol*, 2018. **36**(3): p. 276-282.
179. Chae, Y.K., et al., *Inhibition of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) pathway: the current landscape and barriers to clinical application*. *Oncotarget*, 2017. **8**(9): p. 16052-16074.
180. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
181. Reynolds, A., et al., *Rational siRNA design for RNA interference*. *Nat Biotechnol*, 2004. **22**(3): p. 326-30.
182. Ui-Tei, K., et al., *Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(3): p. 936-48.
183. Aguisa-Toure, A.H. and G. Li, *Genetic alterations of PTEN in human melanoma*. *Cell Mol Life Sci*, 2012. **69**(9): p. 1475-91.
184. Roesch, A., et al., *A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth*. *Cell*, 2010. **141**(4): p. 583-94.
185. Webster, M.R., et al., *Wnt5A promotes an adaptive, senescent-like stress response, while continuing to drive invasion in melanoma cells*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2015. **28**(2): p. 184-95.
186. Giuliano, S., et al., *Microphthalmia-associated transcription factor controls the DNA damage response and a lineage-specific senescence program in melanomas*. *Cancer Res*, 2010. **70**(9): p. 3813-22.
187. Jeffs, A.R., et al., *A gene expression signature of invasive potential in metastatic melanoma cells*. *PLoS One*, 2009. **4**(12): p. e8461.
188. Ahn, A., Chatterjee, A. and Eccles, M.R., *The Slow Cycling Phenotype: A Growing Problem for Treatment Resistance in Melanoma*. *Mol Cancer Ther*, 2017. **16**(6): p. 1002-1009.
189. Haferkamp, S., et al., *Vemurafenib induces senescence features in melanoma cells*. *J Invest Dermatol*, 2013. **133**(6): p. 1601-9.
190. Zubrilov, I., et al., *Vemurafenib resistance selects for highly malignant brain and lung-metastasizing melanoma cells*. *Cancer Lett*, 2015. **361**(1): p. 86-96.
191. Musa, J., et al., *Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1): a master regulator of mRNA translation involved in tumorigenesis*. *Oncogene*, 2016. **35**(36): p. 4675-88.
192. Qin, X., B. Jiang, and Y. Zhang, *4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein*. *Cell Cycle*, 2016. **15**(6): p. 781-6.
193. Wisdom, R., R.S. Johnson, and C. Moore, *c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms*. *EMBO J*, 1999. **18**(1): p. 188-97.

194. Behrens, A., M. Sibilio, and E.F. Wagner, *Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation*. *Nat Genet*, 1999. **21**(3): p. 326-9.
195. Adisheshaiah, P., et al., *ERK signaling regulates tumor promoter induced c-Jun recruitment at the Fra-1 promoter*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **371**(2): p. 304-8.
196. Gurzov, E.N., et al., *Targeting c-Jun and JunB proteins as potential anticancer cell therapy*. *Oncogene*, 2008. **27**(5): p. 641-52.
197. Kortylewski, M., R. Jove, and H. Yu, *Targeting STAT3 affects melanoma on multiple fronts*. *Cancer Metastasis Rev*, 2005. **24**(2): p. 315-27.
198. Niu, G., et al., *Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth*. *Oncogene*, 2002. **21**(46): p. 7001-10.
199. Xie, T.X., et al., *Activation of stat3 in human melanoma promotes brain metastasis*. *Cancer Res*, 2006. **66**(6): p. 3188-96.
200. Stiewe, T., *The p53 family in differentiation and tumorigenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(3): p. 165-8.
201. Terzian, T., et al., *p53 prevents progression of nevi to melanoma predominantly through cell cycle regulation*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2010. **23**(6): p. 781-94.
202. Ivanov, V.N., A. Bhoumik, and Z. Ronai, *Death receptors and melanoma resistance to apoptosis*. *Oncogene*, 2003. **22**(20): p. 3152-61.
203. Wang, C.Y., et al., *NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation*. *Science*, 1998. **281**(5383): p. 1680-3.
204. Bernard, D., et al., *Rel/NF-kappaB transcription factors protect against tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by up-regulating the TRAIL decoy receptor DcR1*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(29): p. 27322-8.
205. Hinz, M., et al., *NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(4): p. 2690-8.
206. Norris, J.L. and A.S. Baldwin, Jr., *Oncogenic Ras enhances NF-kappaB transcriptional activity through Raf-dependent and Raf-independent mitogen-activated protein kinase signaling pathways*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(20): p. 13841-6.
207. Koul, D., et al., *Tumor suppressor MMAC/PTEN inhibits cytokine-induced NFkappaB activation without interfering with the IkappaB degradation pathway*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(14): p. 11402-8.
208. Dhawan, P., et al., *Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor-kappaB and tumor progression*. *Cancer Res*, 2002. **62**(24): p. 7335-42.
209. Rouse, J., et al., *A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins*. *Cell*, 1994. **78**(6): p. 1027-37.
210. Lee, J.C., et al., *A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis*. *Nature*, 1994. **372**(6508): p. 739-46.
211. Yee, A.S., et al., *The HBP1 transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression*. *Gene*, 2004. **336**(1): p. 1-13.

212. Faust, D., et al., *Differential p38-dependent signalling in response to cellular stress and mitogenic stimulation in fibroblasts*. *Cell Commun Signal*, 2012. **10**: p. 6.
213. Wang, W., et al., *Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(10): p. 3389-403.
214. Haq, R., et al., *Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence*. *Cancer Res*, 2002. **62**(17): p. 5076-82.
215. Fulda, S. and D. Vucic, *Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. **11**(2): p. 109-24.
216. Witt, A. and D. Vucic, *Diverse ubiquitin linkages regulate RIP kinases-mediated inflammatory and cell death signaling*. *Cell Death Differ*, 2017. **24**(7): p. 1160-1171.
217. Villanueva, J., et al., *Concurrent MEK2 mutation and BRAF amplification confer resistance to BRAF and MEK inhibitors in melanoma*. *Cell Rep*, 2013. **4**(6): p. 1090-9.
218. Guagnano, V., et al., *Discovery of 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), a potent and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor family of receptor tyrosine kinase*. *J Med Chem*, 2011. **54**(20): p. 7066-83.
219. Guagnano, V., et al., *FGFR genetic alterations predict for sensitivity to NVP-BGJ398, a selective pan-FGFR inhibitor*. *Cancer Discov*, 2012. **2**(12): p. 1118-33.
220. Wong, D.J., et al., *Antitumor activity of the ERK inhibitor SCH772984 [corrected] against BRAF mutant, NRAS mutant and wild-type melanoma*. *Mol Cancer*, 2014. **13**: p. 194.
221. Carlino, M.S., et al., *Differential activity of MEK and ERK inhibitors in BRAF inhibitor resistant melanoma*. *Mol Oncol*, 2014. **8**(3): p. 544-54.
222. Burger, M.T., et al., *Identification of NVP-BKM120 as a Potent, Selective, Orally Bioavailable Class I PI3 Kinase Inhibitor for Treating Cancer*. *ACS Med Chem Lett*, 2011. **2**(10): p. 774-9.
223. Maira, S.M., et al., *Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor*. *Mol Cancer Ther*, 2012. **11**(2): p. 317-28.
224. Bendell, J.C., et al., *Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(3): p. 282-90.
225. Niessner, H., et al., *PI3K pathway inhibition achieves potent antitumor activity in melanoma brain metastases in vitro and in vivo*. *Clin Cancer Res*, 2016 Dec 1;22(23):5818-5828.
226. Delmas, A., et al., *The c-Jun/RHOB/AKT pathway confers resistance of BRAF-mutant melanoma cells to MAPK inhibitors*. *Oncotarget*, 2015. **6**(17): p. 15250-64.
227. Atefi, M., et al., *Reversing melanoma cross-resistance to BRAF and MEK inhibitors by co-targeting the AKT/mTOR pathway*. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e28973.

228. Ouyang, L., et al., *Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis*. Cell Prolif, 2012. **45**(6): p. 487-98.
229. Kunz-Schughart, L.A., et al., *The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model*. J Biomol Screen, 2004. **9**(4): p. 273-85.
230. Nigg, E.A., *Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle*. Bioessays, 1995. **17**(6): p. 471-80.
231. Giacinti, C. and A. Giordano, *RB and cell cycle progression*. Oncogene, 2006. **25**(38): p. 5220-7.
232. Ingersoll, R.G., et al., *Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2): genomic sequence and variations*. Cytogenet Cell Genet, 2001. **94**(3-4): p. 121-6.
233. Kadamur, G. and E.M. Ross, *Mammalian phospholipase C*. Annu Rev Physiol, 2013. **75**: p. 127-54.
234. Feng, L., I. Reynisdottir, and J. Reynisson, *The effect of PLC-gamma2 inhibitors on the growth of human tumour cells*. Eur J Med Chem, 2012. **54**: p. 463-9.
235. Mohammadi, M., et al., *A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(10): p. 5068-78.
236. Ornitz, D.M., et al., *Receptor specificity of the fibroblast growth factor family*. J Biol Chem, 1996. **271**(25): p. 15292-7.
237. Yayon, A., et al., *A confined variable region confers ligand specificity on fibroblast growth factor receptors: implications for the origin of the immunoglobulin fold*. EMBO J, 1992. **11**(5): p. 1885-90.
238. Zhang, X., et al., *Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family*. J Biol Chem, 2006. **281**(23): p. 15694-700.
239. Flaherty, K.T., et al., *Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(9): p. 809-19.
240. Haass, N.K., et al., *Real-time cell cycle imaging during melanoma growth, invasion, and drug response*. Pigment Cell Melanoma Res, 2014. **27**(5): p. 764-76.
241. Moore, N., J. Houghton, and S. Lyle, *Slow-cycling therapy-resistant cancer cells*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(10): p. 1822-30.
242. Hartman, M.L. and M. Czyz, *MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(7): p. 1249-60.
243. Perego, M., et al., *A slow-cycling subpopulation of melanoma cells with highly invasive properties*. Oncogene, 2018. **37**(3): p. 302-312.
244. Muller, J., et al., *Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5712.
245. Wellbrock, C., et al., *Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2734.
246. Arozarena, I., M.P. Smith, and C. Wellbrock, *Targeting MITF in the tolerance-phase*. Oncotarget, 2016. **7**(34): p. 54094-54095.
247. Berking, C. and M. Herlyn, *Human skin reconstruct models: a new application for studies of melanocyte and melanoma biology*. Histol Histopathol, 2001. **16**(2): p. 669-74.
248. Haqq, C., et al., *The gene expression signatures of melanoma progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(17): p. 6092-7.

249. Hsu, M.Y., et al., *Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas*. J Invest Dermatol Symp Proc, 1996. **1**(2): p. 188-94.
250. Chen, B., et al., *BRAFV600E negatively regulates the AKT pathway in melanoma cell lines*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42598.
251. Gopal, Y.N., et al., *Inhibition of mTORC1/2 overcomes resistance to MAPK pathway inhibitors mediated by PGC1alpha and oxidative phosphorylation in melanoma*. Cancer Res, 2014. **74**(23): p. 7037-47.
252. Shi, H., et al., *Combinatorial treatments that overcome PDGFRbeta-driven resistance of melanoma cells to V600EB-RAF inhibition*. Cancer Res, 2011. **71**(15): p. 5067-74.
253. Bachmann, I.M., et al., *Importance of P-cadherin, beta-catenin, and Wnt5a/frizzled for progression of melanocytic tumors and prognosis in cutaneous melanoma*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(24 Pt 1): p. 8606-14.
254. Kageshita, T., et al., *Loss of beta-catenin expression associated with disease progression in malignant melanoma*. Br J Dermatol, 2001. **145**(2): p. 210-6.
255. Cervenka, I., et al., *Mitogen-activated protein kinases promote WNT/beta-catenin signaling via phosphorylation of LRP6*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(1): p. 179-89.
256. Davidson, G., et al., *Cell cycle control of wnt receptor activation*. Dev Cell, 2009. **17**(6): p. 788-99.
257. Sherwood, V., et al., *WNT5A-mediated beta-catenin-independent signalling is a novel regulator of cancer cell metabolism*. Carcinogenesis, 2014. **35**(4): p. 784-94.
258. Anastas, J.N., et al., *WNT5A enhances resistance of melanoma cells to targeted BRAF inhibitors*. J Clin Invest, 2014. **124**(7): p. 2877-90.
259. Da Forno, P.D., et al., *WNT5A expression increases during melanoma progression and correlates with outcome*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(18): p. 5825-32.
260. Weinstein, I.B. and A.K. Joe, *Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy*. Nat Clin Pract Oncol, 2006. **3**(8): p. 448-57.
261. Grose, R. and C. Dickson, *Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(2): p. 179-86.
262. Greulich, H. and P.M. Pollock, *Targeting mutant fibroblast growth factor receptors in cancer*. Trends Mol Med, 2011. **17**(5): p. 283-92.
263. Cihoric, N., et al., *Prognostic role of FGFR1 amplification in early-stage non-small cell lung cancer*. Br J Cancer, 2014. **110**(12): p. 2914-22.
264. Yang, W., et al., *Prognostic value of FGFR1 gene copy number in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis*. J Thorac Dis, 2014. **6**(6): p. 803-9.
265. Lee, H.J., et al., *Low prognostic implication of fibroblast growth factor family activation in triple-negative breast cancer subsets*. Ann Surg Oncol, 2014. **21**(5): p. 1561-8.
266. Matsumoto, K., et al., *FGFR2 gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer*. Br J Cancer, 2012. **106**(4): p. 727-32.
267. Dutt, A., et al., *Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(25): p. 8713-7.
268. Byron, S.A., et al., *FGFR2 point mutations in 466 endometrioid endometrial tumors: relationship with MSI, KRAS, PIK3CA, CTNNB1 mutations and clinicopathological features*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30801.

269. Hernandez, S., et al., *Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas*. J Clin Oncol, 2006. **24**(22): p. 3664-71.
270. Helsten, T., M. Schwaederle, and R. Kurzrock, *Fibroblast growth factor receptor signaling in hereditary and neoplastic disease: biologic and clinical implications*. Cancer Metastasis Rev, 2015. **34**(3): p. 479-96.
271. Ahmed, N.U., et al., *Expression of fibroblast growth factor receptors in naevus-cell naevus and malignant melanoma*. Melanoma Res, 1997. **7**(4): p. 299-305.
272. Wang, V.E., et al., *Adaptive Resistance to Dual BRAF/MEK Inhibition in BRAF-Driven Tumors through Autocrine FGFR Pathway Activation*. Clin Cancer Res, 2019. **25**(23): p. 7202-7217.
273. Giehl, K.A., et al., *Protein expression of melanocyte growth factors (bFGF, SCF) and their receptors (FGFR-1, c-kit) in nevi and melanoma*. J Cutan Pathol, 2007. **34**(1): p. 7-14.
274. Huang, T., et al., *FGF7/FGFR2 signal promotes invasion and migration in human gastric cancer through upregulation of thrombospondin-1*. Int J Oncol, 2017. **50**(5): p. 1501-1512.
275. Nomura, S., et al., *FGF10/FGFR2 signal induces cell migration and invasion in pancreatic cancer*. Br J Cancer, 2008. **99**(2): p. 305-13.
276. Behrens, C., et al., *Immunohistochemical expression of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the pathogenesis of lung cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(19): p. 6014-22.
277. Bane, A.L., et al., *Expression profiling of familial breast cancers demonstrates higher expression of FGFR2 in BRCA2-associated tumors*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **117**(1): p. 183-91.
278. Tokunaga, R., et al., *Fibroblast growth factor receptor 2 expression, but not its genetic amplification, is associated with tumor growth and worse survival in esophagogastric junction adenocarcinoma*. Oncotarget, 2016. **7**(15): p. 19748-61.
279. Sommer, A., et al., *Preclinical Efficacy of the Auristatin-Based Antibody-Drug Conjugate BAY 1187982 for the Treatment of FGFR2-Positive Solid Tumors*. Cancer Res, 2016. **76**(21): p. 6331-6339.
280. Harimoto, N., et al., *The significance of fibroblast growth factor receptor 2 expression in differentiation of hepatocellular carcinoma*. Oncology, 2010. **78**(5-6): p. 361-8.
281. Byron, S.A., et al., *Inhibition of activated fibroblast growth factor receptor 2 in endometrial cancer cells induces cell death despite PTEN abrogation*. Cancer Res, 2008. **68**(17): p. 6902-7.
282. Byron, S.A. and P.M. Pollock, *FGFR2 as a molecular target in endometrial cancer*. Future Oncol, 2009. **5**(1): p. 27-32.
283. Dell, K.R. and L.T. Williams, *A novel form of fibroblast growth factor receptor 2. Alternative splicing of the third immunoglobulin-like domain confers ligand binding specificity*. J Biol Chem, 1992. **267**(29): p. 21225-9.
284. Cha, J.Y., et al., *Involvement of fibroblast growth factor receptor 2 isoform switching in mammary oncogenesis*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(3): p. 435-45.
285. Mak, G., H.T. Arkenau, and M. Chin, *Resistance surveillance in a BRAF mutant melanoma patient on long-term BRAF-inhibitor treatment*. Melanoma Res, 2014. **24**(4): p. 408-12.

286. Gartside, M.G., et al., *Loss-of-function fibroblast growth factor receptor-2 mutations in melanoma*. Mol Cancer Res, 2009. **7**(1): p. 41-54.
287. Rother, J. and D. Jones, *Molecular markers of tumor progression in melanoma*. Curr Genomics, 2009. **10**(4): p. 231-9.
288. Chen, X.H., et al., *Risk of aggressive breast cancer in women of Han nationality carrying TGFB1 rs1982073 C allele and FGFR2 rs1219648 G allele in North China*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **125**(2): p. 575-82.
289. Katoh, M., *Dysregulation of stem cell signaling network due to germline mutation, SNP, Helicobacter pylori infection, epigenetic change and genetic alteration in gastric cancer*. Cancer Biol Ther, 2007. **6**(6): p. 832-9.
290. Sonvilla, G., et al., *FGF18 in colorectal tumour cells: autocrine and paracrine effects*. Carcinogenesis, 2008. **29**(1): p. 15-24.
291. Ghassemi, S., et al., *FGF5 is expressed in melanoma and enhances malignancy in vitro and in vivo*. Oncotarget, 2017. **8**(50): p. 87750-87762.
292. Kaipainen, A., et al., *Enhanced expression of the tie receptor tyrosine kinase messenger RNA in the vascular endothelium of metastatic melanomas*. Cancer Res, 1994. **54**(24): p. 6571-7.
293. Wang, Y. and D. Becker, *Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth*. Nat Med, 1997. **3**(8): p. 887-93.
294. Nesbit, M., et al., *Basic fibroblast growth factor induces a transformed phenotype in normal human melanocytes*. Oncogene, 1999. **18**(47): p. 6469-76.
295. Reed, J.A., N.S. McNutt, and A.P. Albino, *Differential expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in melanocytic lesions demonstrated by in situ hybridization. Implications for tumor progression*. Am J Pathol, 1994. **144**(2): p. 329-36.
296. Scott, G., et al., *Localization of basic fibroblast growth factor mRNA in melanocytic lesions by in situ hybridization*. J Invest Dermatol, 1991. **96**(3): p. 318-22.
297. Seghezzi, G., et al., *Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis*. J Cell Biol, 1998. **141**(7): p. 1659-73.
298. Straume, O. and L.A. Akslen, *Importance of vascular phenotype by basic fibroblast growth factor, and influence of the angiogenic factors basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor-1 and ephrin-A1/EphA2 on melanoma progression*. Am J Pathol, 2002. **160**(3): p. 1009-19.
299. Nakazawa, K., M. Yashiro, and K. Hirakawa, *Keratinocyte growth factor produced by gastric fibroblasts specifically stimulates proliferation of cancer cells from scirrhous gastric carcinoma*. Cancer Res, 2003. **63**(24): p. 8848-52.
300. Yayon, A., et al., *Suppression of autocrine cell proliferation and tumorigenesis of human melanoma cells and fibroblast growth factor transformed fibroblasts by a kinase-deficient FGF receptor 1: evidence for the involvement of Src-family kinases*. Oncogene, 1997. **14**(25): p. 2999-3009.
301. Becker, D., C.B. Meier, and M. Herlyn, *Proliferation of human malignant melanomas is inhibited by antisense oligodeoxynucleotides targeted against basic fibroblast growth factor*. EMBO J, 1989. **8**(12): p. 3685-91.

302. Ozen, M., E.E. Medrano, and M. Ittmann, *Inhibition of proliferation and survival of melanoma cells by adenoviral-mediated expression of dominant negative fibroblast growth factor receptor*. *Melanoma Res*, 2004. **14**(1): p. 13-21.
303. Meier, F., et al., *Fibroblast growth factor-2 but not Mel-CAM and/or beta3 integrin promotes progression of melanocytes to melanoma*. *Exp Dermatol*, 2003. **12**(3): p. 296-306.
304. Zalesna, I., et al., *Exogenous growth factors bFGF, EGF and HGF do not influence viability and phenotype of V600EBRAF melanoma cells and their response to vemurafenib and trametinib in vitro*. *PLoS One*, 2017. **12**(8): p. e0183498.
305. Valesky, M., et al., *Noninvasive dynamic fluorescence imaging of human melanomas reveals that targeted inhibition of bFGF or FGFR-1 in melanoma cells blocks tumor growth by apoptosis*. *Mol Med*, 2002. **8**(2): p. 103-12.
306. Marino, G., et al., *Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(2): p. 81-94.
307. Mowers, E.E., M.N. Sharifi, and K.F. Macleod, *Autophagy in cancer metastasis*. *Oncogene*, 2017. **36**(12): p. 1619-1630.
308. Jung, C.H., et al., *mTOR regulation of autophagy*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(7): p. 1287-95.
309. Caramel, J., et al., *A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma*. *Cancer Cell*, 2013. **24**(4): p. 466-80.
310. Kim, K.B., et al., *Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor Trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(4): p. 482-9.
311. Johnson, D.B., et al., *Combined BRAF (Dabrafenib) and MEK inhibition (Trametinib) in patients with BRAFV600-mutant melanoma experiencing progression with single-agent BRAF inhibitor*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(33): p. 3697-704.
312. Hartsough, E., Y. Shao, and A.E. Aplin, *Resistance to RAF inhibitors revisited*. *J Invest Dermatol*, 2014. **134**(2): p. 319-25.
313. Moriceau, G., et al., *Tunable-combinatorial mechanisms of acquired resistance limit the efficacy of BRAF/MEK cotargeting but result in melanoma drug addiction*. *Cancer Cell*, 2015. **27**(2): p. 240-56.
314. Das Thakur, M., et al., *Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance*. *Nature*, 2013. **494**(7436): p. 251-5.
315. Das Thakur, M. and D.D. Stuart, *Molecular pathways: response and resistance to BRAF and MEK inhibitors in BRAF(V600E) tumors*. *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(5): p. 1074-80.
316. Chan, M.M., et al., *The nature and management of metastatic melanoma after progression on BRAF inhibitors: effects of extended BRAF inhibition*. *Cancer*, 2014. **120**(20): p. 3142-53.
317. Scholtens, A., et al., *Vemurafenib for BRAF V600 mutated advanced melanoma: results of treatment beyond progression*. *Eur J Cancer*, 2015. **51**(5): p. 642-52.
318. Carlino, M.S., et al., *Antiproliferative effects of continued mitogen-activated protein kinase pathway inhibition following acquired resistance to BRAF and/or MEK inhibition in melanoma*. *Mol Cancer Ther*, 2013. **12**(7): p. 1332-42.

319. Greger, J.G., et al., *Combinations of BRAF, MEK, and PI3K/mTOR inhibitors overcome acquired resistance to the BRAF inhibitor GSK2118436 dabrafenib, mediated by NRAS or MEK mutations*. *Mol Cancer Ther*, 2012. **11**(4): p. 909-20.
320. Hu-Lieskovan, S., et al., *Combining targeted therapy with immunotherapy in BRAF-mutant melanoma: promise and challenges*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(21): p. 2248-54.
321. Boni, A., et al., *Selective BRAFV600E inhibition enhances T-cell recognition of melanoma without affecting lymphocyte function*. *Cancer Res*, 2010. **70**(13): p. 5213-9.
322. Frederick, D.T., et al., *BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(5): p. 1225-31.
323. Donia, M., et al., *BRAF inhibition improves tumor recognition by the immune system: Potential implications for combinatorial therapies against melanoma involving adoptive T-cell transfer*. *Oncoimmunology*, 2012. **1**(9): p. 1476-1483.
324. Ribas, A., et al., *Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab*. *N Engl J Med*, 2013. **368**(14): p. 1365-6.
325. Minor, D.R., et al., *Severe gastrointestinal toxicity with administration of trametinib in combination with dabrafenib and ipilimumab*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2015. **28**(5): p. 611-2.
326. Ascierto, P.A., et al., *Dabrafenib, trametinib and pembrolizumab or placebo in BRAF-mutant melanoma*. *Nat Med*, 2019. **25**(6): p. 941-946.
327. Wickstroem, K., et al., *Preclinical Combination Studies of an FGFR2 Targeted Thorium-227 Conjugate and the ATR Inhibitor BAY 1895344*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2019. **105**(2): p. 410-422.
328. Hu, Y., et al., *Essential role of AKT in tumor cells addicted to FGFR*. *Anticancer Drugs*, 2014. **25**(2): p. 183-8.
329. Scheller, T., et al., *mTOR inhibition improves fibroblast growth factor receptor targeting in hepatocellular carcinoma*. *Br J Cancer*, 2015. **112**(5): p. 841-50.
330. Fromme, J.E., et al., *FGFR3 mRNA overexpression defines a subset of oligometastatic colorectal cancers with worse prognosis*. *Oncotarget*, 2018. **9**(63): p. 32204-32218.
331. Barata, P.C., et al., *Next-generation sequencing (NGS) of cell-free circulating tumor DNA and tumor tissue in patients with advanced urothelial cancer: a pilot assessment of concordance*. *Ann Oncol*, 2017. **28**(10): p. 2458-2463.
332. Yong, E., *Cancer biomarkers: Written in blood*. *Nature*, 2014. **511**(7511): p. 524-6.
333. Lanman, R.B., et al., *Analytical and Clinical Validation of a Digital Sequencing Panel for Quantitative, Highly Accurate Evaluation of Cell-Free Circulating Tumor DNA*. *PLoS One*, 2015. **10**(10): p. e0140712.
334. Bettegowda, C., et al., *Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(224): p. 224ra24.
335. Voss, M.H., et al., *A Phase I, Open-Label, Multicenter, Dose-escalation Study of the Oral Selective FGFR Inhibitor Debio 1347 in Patients with Advanced Solid Tumors Harboring FGFR Gene Alterations*. *Clin Cancer Res*, 2019. **25**(9): p. 2699-2707.
336. Nishina, T., et al., *Safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamics of erdafitinib, a pan-fibroblast growth factor receptor (FGFR) tyrosine kinase inhibitor, in*

- patients with advanced or refractory solid tumors. *Invest New Drugs*, 2018. **36**(3): p. 424-434.
337. Lorient, Y., et al., *Erdafitinib in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma*. *N Engl J Med*, 2019. **381**(4): p. 338-348.
338. Amin, A., et al., *Phase II study of vemurafenib followed by ipilimumab in patients with previously untreated BRAF-mutated metastatic melanoma*. *J Immunother Cancer*, 2016. **4**: p. 44.
339. Shapiro, G.I., et al., *Phase Ib study of the MEK inhibitor cobimetinib (GDC-0973) in combination with the PI3K inhibitor pictilisib (GDC-0941) in patients with advanced solid tumors*. *Invest New Drugs*, 2020. **38**(2): p. 419-432.
340. Kelly, C.M., et al., *A phase Ib study of BGJ398, a pan-FGFR kinase inhibitor in combination with imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumor*. *Invest New Drugs*, 2019. **37**(2): p. 282-290.
341. Morales-Barrera, R., et al., *Targeting fibroblast growth factor receptors and immune checkpoint inhibitors for the treatment of advanced bladder cancer: New direction and New Hope*. *Cancer Treat Rev*, 2016. **50**: p. 208-216.
342. Traer, E., et al., *FGF2 from Marrow Microenvironment Promotes Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia*. *Cancer Res*, 2016. **76**(22): p. 6471-6482.
343. Li, Q., et al., *Paracrine Fibroblast Growth Factor Initiates Oncogenic Synergy with Epithelial FGFR/Src Transformation in Prostate Tumor Progression*. *Neoplasia*, 2018. **20**(3): p. 233-243.
344. Procopio, M.G., et al., *Combined CSL and p53 downregulation promotes cancer-associated fibroblast activation*. *Nat Cell Biol*, 2015. **17**(9): p. 1193-204.
345. Kato, M., *FGFR inhibitors: Effects on cancer cells, tumor microenvironment and whole-body homeostasis (Review)*. *Int J Mol Med*, 2016. **38**(1): p. 3-15.
346. Camidge, D.R., W. Pao, and L.V. Sequist, *Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014. **11**(8): p. 473-81.
347. Schmitt, M.W., L.A. Loeb, and J.J. Salk, *The influence of subclonal resistance mutations on targeted cancer therapy*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016. **13**(6): p. 335-47.
348. Goyal, L., et al., *Polyclonal Secondary FGFR2 Mutations Drive Acquired Resistance to FGFR Inhibition in Patients with FGFR2 Fusion-Positive Cholangiocarcinoma*. *Cancer Discov*, 2017. **7**(3): p. 252-263.
349. Herrera-Abreu, M.T., et al., *Parallel RNA interference screens identify EGFR activation as an escape mechanism in FGFR3-mutant cancer*. *Cancer Discov*, 2013. **3**(9): p. 1058-71.
350. Shi, J.Y., et al., *Inferring the progression of multifocal liver cancer from spatial and temporal genomic heterogeneity*. *Oncotarget*, 2016. **7**(3): p. 2867-77.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation auf vielfältige Art und Weise unterstützt haben.

Meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Carola Berking, danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, für die Bereitstellung von außergewöhnlichen technischen und persönlichen Voraussetzungen, für ihr Vertrauen und ihren fachlichen Rat.

Ein besonderer Dank gilt meinen Betreuern Dr. Saskia Graf und PD Dr. Markus Heppt für ihre Geduld und Herzlichkeit, ihre konstruktive Kritik und ihre enorme Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit.

Zugleich danke ich dem gesamten Laborteam, insbesondere Claudia Kammerbauer, Dr. Eva Hornig und Anja Wessely, die mich sorgfältig in die Methoden der Zellkultur eingearbeitet und ihr Wissen und Können mit mir geteilt haben. Ihr stets offenes Ohr und ihre aufmunternden Worte haben wesentlich zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Für die Beratung bei der statistischen Auswertung danke ich ganz besonders meiner Freundin Dorothee Pöhlchen.

Ich danke von Herzen meinen Eltern, die mir unermüdlich mit Rat und Tat zur Seite standen, meiner Schwester für ihre gestalterische Unterstützung und nicht zuletzt meinem Mann, der mich immer wieder ermutigt und mir die nötigen Freiräume geschaffen hat.

Affidavit

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Zielgerichtete Kombinationstherapie von
BRAF- und MEK-Inhibitor resistenten Melanomzellen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Augsburg, 22.03.2024

Ort, Datum

Annamarie Strieder

Unterschrift Doktorandin

Publikationsliste

Pochert N, Schneider M, Ansorge N, **Strieder A**, Sagasser J, Reiger M, Traidl-Hoffmann C, Neumann A, Jeschke U, Dannecker C, Kühn T, Ditsch N. *Seroma after Simple Mastectomy in Breast Cancer-The Role of CD4+ T Helper Cells and the Evidence as a Possible Specific Immune Process*. Int J Mol Sci, 2022. 27;23(9):4848.

Garrido F, Wild CM, Mittelberger J, Dobler F, Schneider M, Ansorge N, Köpke M, **Strieder A**, Ditsch N, Jeschke U, Dannecker C. *The Role of Chemokines in Cervical Cancers*. Medicina (Kaunas), 2021. 57(11):1141.

Graf SA, Heppt MV, Wessely A, Krebs S, Kammerbauer C, Hornig E, **Strieder A**, Blum H, Bosserhoff AK, Berking C. *The myelin protein PMP2 is regulated by SOX10 and drives melanoma cell invasion*. Pigment Cell Melanoma Res, 2019. 32(3):424-434.