

Neue Behandlungsmethoden zur Bekämpfung von schwarzem Hautkrebs

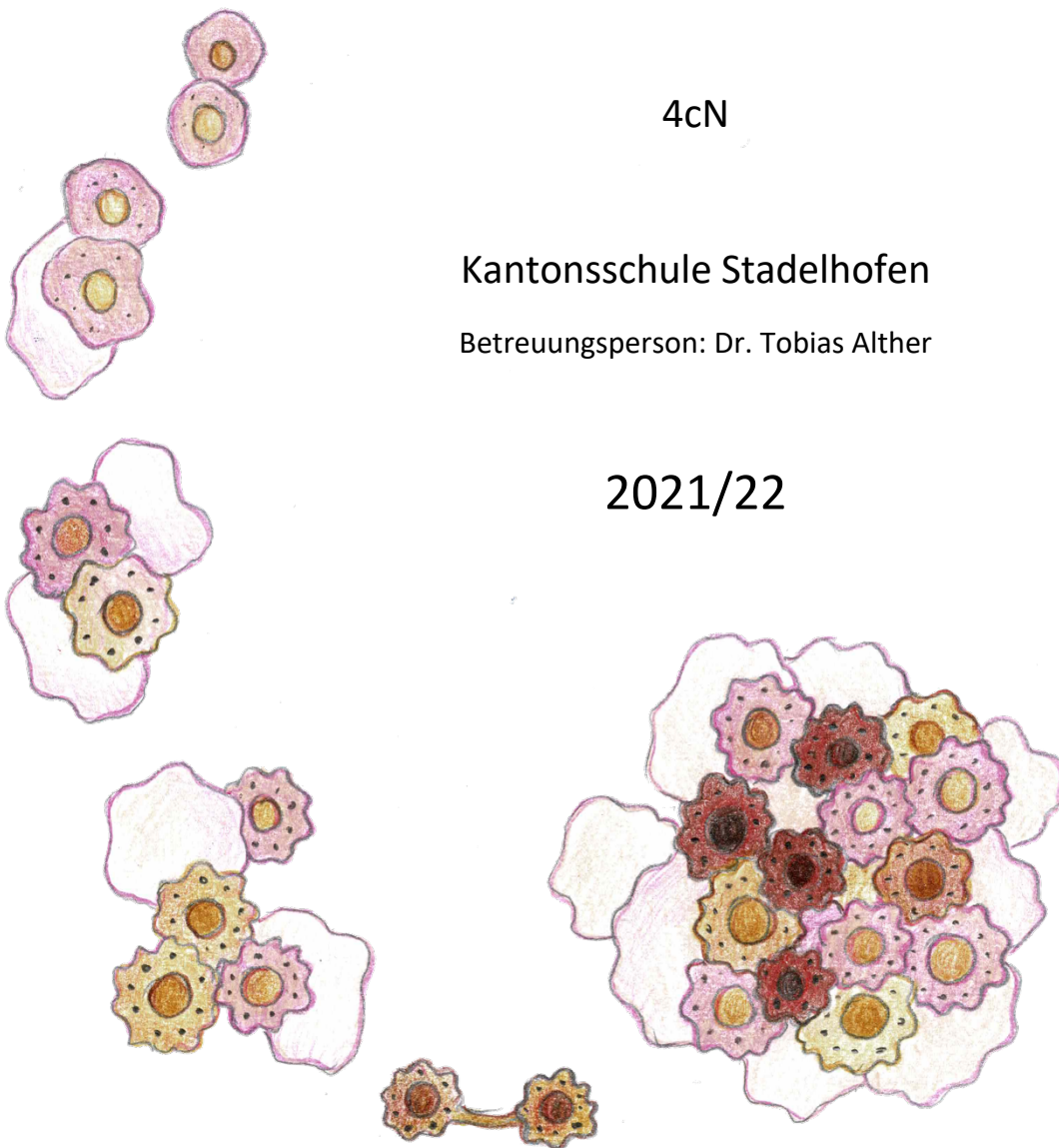
Carmen Marrucchiello

4cN

Kantonsschule Stadelhofen

Betreuungsperson: Dr. Tobias Alther

2021/22



Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	4
1.1	EINFÜHRUNG	4
1.1.1	Motivation	4
1.1.2	Fragestellungen	5
1.1.3	Methoden	5
1.2	GRUNDLAGEN	5
1.2.1	Krebs	5
1.2.2	Hautkrebs	6
1.2.3	Melanom	6
1.2.4	Zellwachstum reguliert durch pathways	7
1.2.5	Inhibitoren und Mutationsarten	8
2	PRAKTISCHE ARBEIT	10
2.1	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1.1	Zellassay	10
		11
2.1.1.1	Vorbereitung/Zellkultivierung	11
2.1.1.2	Zellkonzentration auswerten	12
2.1.1.3	Assay Vorbereitung	13
2.1.1.4	Masterplate und Behandlung	13
2.1.1.5	Resazurin-Resorufin Assay	14
2.1.1.6	Messungen	15
2.1.2	DNA Sequenzierung	15
2.1.2.1	DNA Aufreinigung	15
2.1.2.2	DNA Konzentration messen	17
2.1.2.3	PCR-mastermix herstellen	17
2.1.2.4	PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	18
2.1.2.5	Die Gelelektrophorese	18
2.1.2.6	Auswertung der Gelelektrophorese	19
2.1.2.7	PCR Produkt Reinigung	19
2.2	RESULTATE	20
2.2.1	Resazurin Messung	20
2.2.1.1	Zelllinie M990922	20
2.2.1.2	Zelllinie WM793B	21
2.2.1.3	Zelllinie M150506	21
2.2.1.4	Zelllinie M130227	22
2.2.1.5	Zelllinie M130219	22
2.2.2	Spheroids	23
2.2.3	Sequenzen	23
2.2.4	MEKi auf Zelllinien	24

2.3	DISKUSSION	25
2.3.1	<i>Interpretation</i>	25
2.3.1.1	Zelllinie M990922.....	25
2.3.1.2	Zelllinie WM793B.....	26
2.3.1.3	Zelllinie M150605.....	26
2.3.1.4	Zelllinie M130227.....	27
2.3.1.5	Zelllinie M130219.....	27
2.4	FRAGESTELLUNGEN BEANTWORTUNG.....	27
2.4.1	<i>Was ist die Wirkung des Inhibitors LGX 818 und MEK 162 auf die Krebszellen?</i>	28
2.4.2	<i>Wie kann die Wirkung des Inhibitors LGX 818 und MEK 162 auf die Hautkrebszellen nachgewiesen werden?</i>	28
2.4.3	<i>Ab welcher Konzentration des Inhibitors LGX 818 und MEK 162 ist eine Verbesserung sichtbar?</i> 28	
2.4.4	<i>Können auch NRAS mutierte Zellen mit dem Inhibitor LGX 818 gehemmt werden?</i>	28
2.4.5	<i>Wie können BRAF mutierte Krebszellen besser gehemmt werden?</i>	29
	<i>Kann die Formation einer Resistenz und Ausweichung über andere Wege verkleinert werden?</i>	29
2.4.6	<i>Schlussfolgerung</i>	29
3	EXKURS	30
3.1	EINBLICK IN DAS LEBEN MIT SCHWARZEM HAUTKREBS	30
3.1.1	<i>Patient 1</i>	30
3.1.2	<i>Patient 2</i>	30
3.1.3	<i>Fazit</i>	31
4	ZUSAMMENFASSUNG	32
5	SCHLUSSWORT	33
5.1	PERSÖNLICHER KOMMENTAR.....	33
5.2	DANKSAGUNGEN.....	33
6	VERZEICHNISSE	34
6.1	LITERATURVERZEICHNIS	34
6.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	35
6.3	TABELLENVERZEICHNIS	36
7	ANHANG.....	37
7.1	LEXIKON	37
7.2	ÜBERSETZUNGEN	38
7.3	TRANSKRIPTIONEN.....	38
7.3.1	<i>Interview Patient 1</i>	38
7.3.2	<i>Interview Patient 2</i>	40
	EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	44

1. Einleitung

1.1 Einführung

1.1.1 Motivation

Ich habe dieses Thema als meine Maturitätsarbeit gewählt, weil, als wir das Themengebiet Genetik im Unterricht durchgenommen haben, ich davon höchst fasziniert war und unbedingt mehr darüber in Erfahrung bringen wollte. Genregulation ist ein sehr spannendes, aber auch anspruchsvolles Gebiet in der Genetik. Es ist sehr vielfältig und wegen seiner Komplexität für mich äusserst faszinierend. Die Vorstellung, selbst in diesem Themengebiet Nachforschungen betreiben zu können, war für mich so motivierend, dass ich Kontakt mit Forschern gesucht habe. Über eine ehemalige Arbeitskollegin meines Biologielehrers Dr. Tobias Alther habe ich die Adresse des Hautkrebsforschers Dr. Andreas Dzung erhalten und bin mit ihm in Kontakt getreten. Er bot mir freundlicherweise die Möglichkeit, im Labor von Prof. Mitchell Paul Levesque von der Dermatologieabteilung des Universitätsspital Zürich zuerst unter Aufsicht und später selbstständig Versuche mit Hautkrebszellen durchzuführen. Ich möchte mich an dieser Stelle bereits bei Dr. Dzung und Prof. Levesque bedanken, dass mir die Ehre zuteil war, dass ich bei ihnen im Labor mit Zellen von Patienten arbeiten durfte und die ganzen Laborutensilien, Apparate und Materialien verwenden durfte, um für meine Maturaarbeit Einblicke in diese faszinierende Welt zu erhalten.

Während meiner Arbeit habe ich erfahren, dass Freunde der Familie an Hautkrebs erkrankt sind. Ich durfte ihnen dazu einige Fragen stellen. Die Interviews habe ich in diese Arbeit einfließen lassen, da sie eine andere Sichtweise auf das Thema Hautkrebs liefern.

Es interessiert mich, durch welche molekularen Mechanismen die Genregulation bei Krebszellen ausser Kontrolle gerät und wie solche Zellen bekämpft werden können. Daraus ergibt sich meine sehr umfassende, übergeordnete Fragestellung, welche Inhibitoren (Hemmstoffe) existieren, um Krebszellen zu behandeln und wie diese genau funktionieren. Dr. Dzung arbeitet u.a. mit LGX818, MEK162, NRAS und BRAF. Die genaue Bedeutung dieser Abkürzungen wird später auf der S. 8 genau erläutert. Bei LGX818 und MEK162 handelt es sich um zwei unterschiedliche zellwachstumshemmende chemische Substanzen. NRAS und BRAF sind Proteine, die entscheidend das Zellwachstum steuern. In abartigen Krebszellen enthalten sie oft Mutationen, die die normale Zellfunktionen stören können.

Für meine Maturitätsarbeit haben sich daraus folgende Fragestellungen ergeben:

1.1.2 Fragestellungen

- Was ist die Wirkung der Inhibitoren LGX 818 und MEK162 auf die Krebszellen?
- Wie kann die Wirkung des Inhibitors LGX 818 und MEK162 in Laborexperimenten auf die Hautkrebszellen nachgewiesen werden?
- Ab welcher Konzentration des Inhibitors LGX 818 und MEK162 ist eine Verbesserung sichtbar?
- Können auch NRAS mutierte Zellen mit dem Inhibitor LGX 818 gehemmt werden?
- Wie können BRAF mutierte Krebszellen besser gehemmt werden und mit einer höheren Wahrscheinlichkeit die Formation einer Resistenz und Ausweichung über andere Wege verkleinert werden?

1.1.3 Methoden

Mein Ziel ist es, mit Experimenten, mit denen man spezifisch Zellwachstum in kultivierten Krebszellen messen kann (Zellassay), zu beweisen, dass es mehrere Wege gibt, um Krebszellen zu hemmen und die unkontrollierte Zellteilung zu stoppen. Wenn Zellen an verschiedenen Genloci, d.h. an verschiedenen Stellen im Genom, mutieren, können sie nicht alle gleich behandelt werden. Diese müssen entweder kombiniert mit einem anderen Inhibitor behandelt werden oder einer Immuntherapie bekämpft werden.

1.2 Grundlagen

1.2.1 Krebs

Krebs ist ein autonomes, ungesteuertes und invasives Wachstum der körpereigenen Zellen. Es handelt sich dabei um eine genetische Krankheit. Die Krebszellen eines Menschen teilen sich durch den außer Kontrolle geratenen Wachstum etwa 100-mal schneller als die Zellen ohne Krebsmutation. Man unterscheidet bei Krebs zwischen gutartigen und bösartigen Tumoren. Bei Krebsmutationen entstehen zunächst Primärtumore. Das Entstehen eines solchen wird durch verschiedenen Risikofaktoren gefördert, zum Beispiel durch Rauchen. Der Teer und andere toxische Verbindungen führen dazu, dass Stellen in Genen angegriffen werden, die für die Regulation des Zellwachstums verantwortlich sind und außer Kontrolle geraten. Somit kann sich dann die Zelle unkontrolliert teilen, weil ihr Wachstum nicht mehr gestoppt wird. Weiter können sich Zellen von den Primärtumoren lösen und über Blut- und Lymphsysteme in den Körper gelangen. Wenn sie sich an einer Stelle im Körper dann festsetzen, werden dort

Sekundärtumoren (Metastasen) gebildet. Diese Ausbreitung der befallenen Zellen ist in vielen Fällen tödlich. Es ist aber nur eine kleine Anzahl abgelöster Zellen, die es schafft, unbemerkt vom Immunsystem durch den Körper transportiert zu werden, um dann Metastasen zu bilden. Metastasen stören verschiedenen Funktionen des Körpers, sie verdrängen gesundes Gewebe, legen Nerven lahm, verschliessen Organhohlräume und blockieren Lymph- und Blutgefäße [1].

1.2.2 Hautkrebs

Hautkrebs ist eine Krebserkrankung, die in der Haut auftritt. Es gibt zwei Arten zu unterscheiden. Der weisse Hautkrebs, der deutlich häufiger vorkommt und die wesentlich gefährlichere Art, der schwarze Hautkrebs. Risikofaktoren für Hautkrebs sind zum Beispiel wiederholte schwere Sonnenbrände oder auch zu langes Sonnenbaden.

1.2.3 Melanom

Melanom ist eine Art von Hautkrebs. Sie wird als gefährlichste aller Hautkrebserkrankungsformen bezeichnet. Es wird auch schwarzer Hautkrebs genannt. Dies kommt davon, da es nach den Melanozyten benannt ist. Melanozyten sind Zellen, die in unserer Haut vorhanden sind. Sie produzieren das Pigment Melanin. Dieses schützt die menschliche Haut vor ultraviolettem Licht (UV). UV-Licht ist der prominenteste Risikofaktor, der zu Hautkrebs führt, da es die DNA in unseren Zellen mit Mutationen versehen kann. Sobald Melanozyten genetische Mutationen, die zu unkontrollierten Zellwachstum führen, erkennen, entwickeln sich diese zu Melanom. Die Melanomzellen können weiteren Mutationen fördern oder bekommen, was zu einer Invasion führen kann. Dabei infiltrieren diese Melanomzellen Blut- und Lymphgefäße und verursachen die Bildung von Metastasen in weiter weg gelegenen Organen im Körper [2].

1.2.4 Zellwachstum reguliert durch *pathways*

Ein *pathway* ist eine Reihe an Reaktionen in einer Zelle die dazu führen, dass die Zelle einwandfrei funktionieren kann.

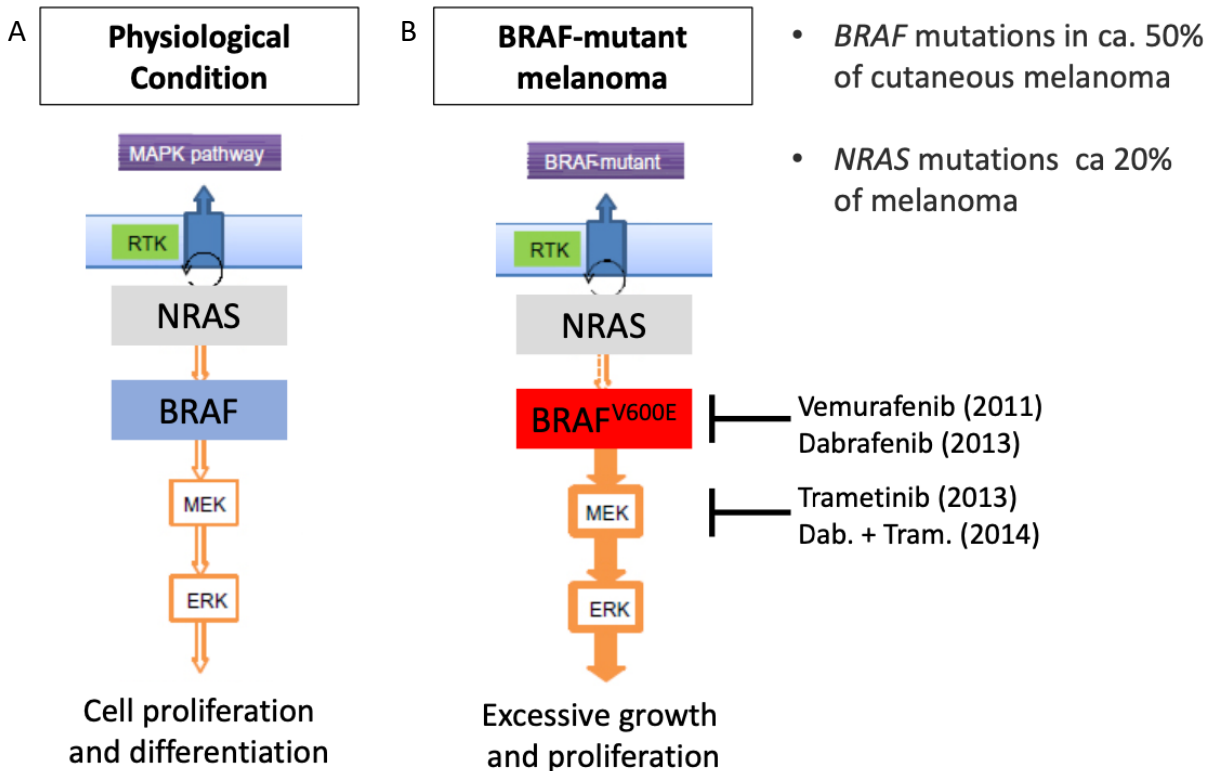


Abbildung 1: A) Normaler Zustand und Ablauf eines MAPK Pathway. B) BRAF mutierter Pathway. [2]

Bei der Abbildung 1A (linke Abbildung) kann man einen unter normalen physiologischen Konditionen handelnden MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) *pathway* erkennen. Es verläuft alles normal, wie es sein sollte. Das heisst, eine gut regulierte MAPK-Signalkaskade führt zu einer kontrollierten Zellvermehrung (*cell proliferation*). Man sieht das grüne Kästchen, welches mit RTK beschriftet ist. Das ist die *receptor tyrosine kinases* [3]. Es handelt sich um einen Rezeptor, der sich an der Zellmembran mit einem Liganden (ein Stoff, der spezifisch ein Rezeptor erkennt) bindet und so eine Wirkung auf die Zelle ausübt [4]. Dadurch wird in diesem Fall das NRAS Protein, durch Phosphorylierung aktiviert und so eine Signalkaskade ausgelöst. Die aktivierten NRAS-Proteine binden schliesslich an die BRAF-Proteine [5]. Diese wiederum aktivieren in weiteren Schritten der Signalkaskade andere Kinase Enzyme, wie die MEK und ERK Proteine, die dann zum kontrollierten Zellwachstum (*cell proliferation and differentiation*, in Abb. 1A) führt.

Beim zweiten *pathway* (rechte Abbildung 1) ist zu erkennen, dass der BRAF Regulator (das rote Kästchen) an der 600sten Stelle in der Sequenz das Val mit einer Glutaminsäure ersetzt

ist. Diese Mutation verursacht, dass unkontrolliert und ohne Aktivierung des NRAS-Proteins die Kinasen MEK und ERK ständig aktiviert werden, was zu unkontrolliertem Wachstum der Zelle (*excessive growth and proliferation*) führt. Das heisst, eine mutierte Zelle vermehrt sich unkontrolliert und verursacht, dass der Tumor wächst.

Man erkennt auch vier verschiedene Behandlungsmethoden, die schon in Laborversuchen angewendet wurden. Man versuchte Vemurafenib und Dabrafenib, welche beide BRAFi (BRAF Inhibitoren) sind, anzuwenden [6]. Doch verschiedene Mutationen fanden Umwege, um an die MEK Kinase zu kommen und diese zu aktivieren. Deshalb entwickelte man den spezifischen Inhibitor Trametinib und wendete den auf die MEK Kinase an, um sie zu hemmen. Da dies auch scheiterte, weil die Mutation dann auf den NRAS Regulator auswich, wendete man eine Kombination an Inhibitoren an, die dann erfolgreicher ausgingen als alle Behandlungsmethoden zuvor.

In meinen Experimenten habe ich Encorafenib und Binimetinib verwendet, welche zwei weitere Inhibitoren für BRAF und MEK sind.

1.2.5 Inhibitoren und Mutationsarten

Ein Inhibitor ist ein Hemmstoff, der eine oder mehrere Reaktionen hemmt. In meinen Untersuchungen habe ich folgende Inhibitoren auf folgenden Mutationen angewendet:

LGX818	Alternative Bezeichnung: Encorafenib. Dies ist ein spezifischer Inhibitor, der eine BRAF mutierte Zelle hemmt, in dem er eine Serin/Threonin-Kinase hemmt, was die Zellteilung inhibiert [8].
MEK162	heisst auch Binimetinib. Binimetinib ist ebenfalls ein Kinasehemmer zur Behandlung von nicht metastasierenden Mutationen. Meist wird es als Kombination mit Encorafenib verwendet. [10]
	In meinen Versuchen habe ich 10 nM Stocklösungen von beiden Inhibitoren gebraucht. Dabei wurden die Substanzen in 100 % DMSO gelöst.

BRAF mutiert	BRAF mutiert heisst, dass eine Mutation im BRAF Gen stattgefunden hat. Es wird eine Aminosäure ausgetauscht. Normalerweise steht dort ein Valin. Die BRAF Mutation, mit der ich gearbeitet habe, ist am Codon 600 mutiert. [7]
NRAS mutiert	Es ist ein kleines, GTP-bindendes Protein. Es hat eine zentrale Position im <i>pathway</i> , der in Position 1.2.4 erläutert wurde [11].

2 Praktische Arbeit

2.1 Material und Methoden

Im Folgenden werden die Materialien und Methoden für meine Laborversuche beschrieben. Ich werde in meiner Arbeit wiederholt englische Begriffe verwenden, da die Laborarbeit hauptsächlich auf Englisch verlief. Diverse Fachbegriffe und die englischen Begriffe werden im Anhang (S. 36) erläutert.

2.1.1 Zellaassay

Alle Zellen, die ich in diesem Experiment verwendet habe, sind von biologischer Abstammung. Das heisst, sie stammen alle von Patienten, die an Hautkrebs erkrankt sind. Es wurden einzelne Tumorzellen entnommen und bei optimalen Laborvoraussetzungen für ungehemmtes Wachstum kultiviert. Im Labor wurden schon ähnliche Versuche gemacht, wie die, die ich durchgeführt habe.

In meinen Experimenten handelt es sich um fünf verschiedene Zelllinien, nämlich um M990922, WM793B, M150506, M130227 und M130219. Fortan verwende ich diese Bezeichnungen für die entsprechenden Zellen. Wir haben auch mit der Zelllinie 130219A gearbeitet. Aber diese habe ich nicht weitergeführt, weil es technische Probleme damit gab. Die Eigenschaften der verschiedenen Zelllinien sind in der Tabelle zusammengefasst (Tab. 1). Im Folgenden verwende ich für das Wort «Zellen» auch den englischen Begriff «*cells*», weil im Labor diese Bezeichnung üblich ist. Zusätzlich habe ich den Versuch auch auf einer 96-*well-plate*, die *spheroids* formt, durchgeführt, um verschiedene Ansichten der Resultate zu erhalten.

Zelllinie (Abkürzung)	Eigenschaft (mutierte Stelle im Protein)	Erklärung der Mutation	Sensibilität auf Hemmstoff
M990922	BRAF V600E <i>mutated</i>	An Position 600 im Protein steht ein Valin (V) statt eine Glutaminsäure (E).	<i>sensibel</i>
WM793B	BRAF V600E <i>mutated</i>	An Position 600 im Protein steht ein Valin (V) statt eine Glutaminsäure (E).	<i>sensibel</i>
M150506	BRAF V600E <i>mutated</i>	An Position 600 im Protein steht ein Valin (V) statt eine Glutaminsäure (E).	<i>slightly resistant to inhibitor</i>

M130227	NRAS Q61R <i>mutated</i>	An Position 61 im Protein steht ein Glutamin (Q) statt ein Arginin (R).	<i>resistant</i>
M130219	NRAS Q61R <i>mutated</i>	An Position 61 im Protein steht ein Glutamin (Q) statt ein Arginin (R).	<i>resistant</i>
130219A		Experiment abgebrochen	

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien und deren Eigenschaften

2.1.1.1 Vorbereitung/Zellkultivierung

Als ersten Schritt habe ich die Zellen aus den Zellkulturflaschen gelöst und aufgeteilt. Gearbeitet wird steril unter einem speziellen Zellkultur-Abzug (*cell culture hood*, siehe Abb. 2), damit die Zellen nicht kontaminiert werden. Die Zellen werden in sterilen Zellkulturflaschen in einem Inkubator aufbewahrt, indem sie auf einer Idealtemperatur von 37°C und in der Gegenwart von 5 % CO₂ gehalten werden, so dass sie weiterleben und sich vermehren können. Zusätzlich werden die Zellen in einem speziellen Wachstumsmedium, in dem nachweislich Melanomzellen gut wachsen, gehalten. Dieses Medium wird immer wieder frisch angesetzt, und setzt sich zusammen aus den Bestandteilen, die in Tab. 2 angegeben sind.



Abbildung 2: Zellkultur-Abzugshaube, um Kontamination zu vermeiden [16]

Bestandteile	Endkonzentration	Volumen [in ca. 600 ml]
RPMI 1640 Supplementation (siehe Abb. 2)	-	500 ml
<i>Sodium pyruvate</i>	100 nM	5 ml
L-Glutamine	200 nM	10 ml
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	undefiniert	50 ml
<i>Lab-specific antibiotics/antimycotics</i>	-	500 µl

Tabelle 2: Zellkulturmedium für Melanomzellen (Quelle: pers. comm. Andres Dzung)

In meinen Versuchen habe ich das Medium in den Flaschen mit einem Sauger sorgfältig entfernt. Ich musste dabei darauf achten, die Zellen nicht mit wegzusaugen. Lebende Zellen haften sich aber am Boden der Kulturflasche fest. Deshalb gehen nur diejenigen verloren, die nicht wirklich fit oder abgestorben sind und im Medium schwimmen. Nachdem das Medium komplett abgesaugt ist, wird die Zellkulturflasche mit einer Phosphat-Pufferlösung (PBS, *Phosphat-buffered saline*)



Abbildung 3: RPMI 1640 Supplementation Flasche. Alle Komponente werden in diese Flasche gemischt. [13]

gewaschen. Ich habe 5 ml PBS mit einer Pipette vorsichtig reintröpfeln lassen, da die Zellen sonst abgewaschen werden. Das PBS wäscht die Zellen und entfernt die enthaltenen Ca^{2+} , Mg^{2+} und Proteine, die ansonsten später das Trypsin hemmen würden. Es wird 1 ml Trypsin dazugefügt und anschliessend für 1-5 Minuten im Inkubator gelagert. Das Enzym Trypsin ist ein Verdauungsenzym und führt dazu, dass sich die Verbindungen, die die Zellen geformt haben, um sich am Boden festzuhalten, gelöst werden und somit auch die Zellen vom Flaschenboden. Wenn dies nicht der Fall ist, muss man die Flasche einige Male leicht anschlagen, da mechanischer Stress die Zellen dazu bewegt, sich zu lösen. Als nächstes füllt man die Zellkulturflasche wieder mit Medium auf, um das Trypsin zu hemmen (allosterische Inhibition). Dann pipettiert man die Lösung mehrere Male auf und wieder raus, um eine homogene Lösung, mit ungefähr ausgeglichener Konzentration zu erhalten. Anschliessend werden die Zellen 1/10 aufgeteilt. 1/10 der Zellen werden in frischem Medium verdünnt und wieder in der Zellkulturflasche in den Inkubator gestellt, damit neue Zellen wachsen. Die restlichen 9/10 können zum Zellassay verwendet werden.

2.1.1.2 Zellkonzentration auswerten

Die Zellen werden jetzt in einem Reagenzröhrchen in die Zentrifuge (siehe Abb. 4) gestellt. Diese werden jetzt für 5 Minuten bei 1500 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Danach werden 10 μl Zelllösung

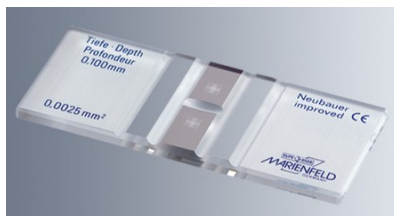


Abbildung 4: Neubauer Cytometer mit Raster zur Zellzählung. [14]

mit der Pipette zwischen das Cytometer (siehe Abb. 5) und das Glasplättchen pipettiert. Das



Abbildung 5: Eppendorf Zentrifuge [16]

Cytometer wird unter ein normales Mikroskop gelegt und die Zellkonzentration ausgewertet. Das Cytometer dient dem

Auszählen der Zellen: Man zählt die Anzahl Zellen in jedem der vier markierten Ecken und addiert diese, worauf die Summe durch 4 dividiert wird, um den Durchschnitt zu erhalten.

Nun müssen die Zellen für die Versuche richtig verdünnt werden. Dazu wird der Durchschnitt der Zellen zuerst mit dem Faktor 10^4 multipliziert, womit man die Zellzahl pro ml der gemessenen Stocklösung erhält. Danach kommt es darauf an, wie viele wells man jeweils mit wie viel Volumen füllen muss. In unseren Versuchsansätzen haben wir immer 2500 cells/well benutzt. Ich brauchte pro 96-well plate Zellen für 40 wells in schlussendlich je 90 μl Medium. Das heisst, das Total der Zellen für die ganze Platte berechnete ich mit 2500 cells/well * 40

wells. Dies ergibt 100'000 *cells*. Um das Volumen auszurechnen, das man insgesamt braucht, rechnet man $90 \mu\text{l} * 40 \text{ wells} = 3600 \mu\text{l}$.

2.1.1.3 Assay Vorbereitung

Die nächsten Schritte werden für jede Zelllinie gleich durchgeführt.

Es werden jetzt sterile *96-well-plates* (siehe Abb. 6) verwendet. In die äussersten Vertiefungen (*wells*) rundherum dieser Platten wird $100 \mu\text{l}$ steriles PBS gefüllt. Dies benötigt es, um zu verhindern, dass die inneren *wells* verschiedenen Mediumverdunstungsraten ausgesetzt sind. Wenn man diese Regel nicht befolgt, kann es zu ungenauen Resultaten führen.

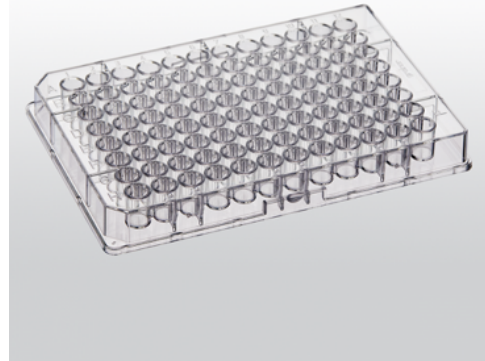


Abbildung 6: *96-well-plate*. Wird zur Durchführung des Zellassays benötigt. [15]

Die ersten 6 freien *wells* (B2-G2, auf S.13, Tabelle 3) werden mit $90 \mu\text{l}$ Medium befüllt. Die zweite Reihe, das heisst B3-G3,(Tab.3) mit $90 \mu\text{l}$ einer Lösung von Medium gemixt mit 1 % DMSO. Dazu werden $100 \mu\text{l}$ einer 100 %DMSO Lösung in 10 ml Medium verdünnt. DMSO steht für Dimehtylsulfoxid und ist ein organisches Lösungsmittel. Wie erwähnt, werden die Inhibitoren darin gelöst. Um einen unspezifischen Effekt des Lösungsmittels auf das Zellwachstum auszuschliessen, braucht man diese Kontrolle im Experiment. Das heisst man sieht sofort, ob das Experiment erfolgreich durchgeführt wurde oder nicht, Alle anderen *wells* werden mit der Zell-Mediumlösung gefüllt, die zuvor ausgerechnet und hergestellt wurde. Dafür verwendet man eine *multi-channel* Pipette. In jedes *well* wird jeweils auch $90 \mu\text{l}$ der Zelllösung gegeben. Schlussendlich werden die Platten für 24 Stunden zurück in den Inkubator gestellt, damit die Zellen wieder anhaften können.

2.1.1.4 Masterplate und Behandlung

Für das *treatment* mit den Inhibitoren wird eine separate *96-well-plate* (*masterplate*) vorbereitet. So vereinfacht man sich nicht nur die spätere Behandlung der Zellen, sondern alle Platten werden mit dem gleichen Gemisch der Inhibitoren behandelt.

Man gibt überall die gleiche Menge von $10 \mu\text{l}$ der Behandlungslösungen zu den Zellplatten. Das heisst, die *masterplate* muss mit einer Verdünnung der Inhibitoren von 1:100 hergestellt werden, sodass nachher in der Zelllinien-Platte ein Verhältnis von 1:1000 entsteht. Ich habe die Zellen mit dem BRAF-Inhibitor LGX 818 und dem MEK 162 behandelt. Ich habe 8

verschiedene Konzentrationen an Inhibitor gebraucht, welche in der Tabelle 3 ersichtlich sind.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
B	PBS	Medium	DMSO	1 nM	10 nM	100 nM	250 nM	500 nM	1000 nM	5000 nM	10000 nM	PBS	LGX818
C	PBS	Medium	DMSO	1 nM	10 nM	100 nM	250 nM	500 nM	1000 nM	5000 nM	10000 nM	PBS	
D	PBS	Medium	DMSO	1 nM	10 nM	100 nM	250 nM	500 nM	1000 nM	5000 nM	10000 nM	PBS	
E	PBS	Medium	DMSO	1 nM	5 nM	10 nM	100 nM	500 nM	1000 nM	5000 nM	10000 nM	PBS	MEK162
F	PBS	Medium	DMSO	1 nM	5 nM	10 nM	100 nM	500 nM	1000 nM	5000 nM	10000 nM	PBS	
G	PBS	Medium	DMSO	1 nM	5 nM	10 nM	100 nM	500 nM	1000 nM	5000 nM	10000 nM	PBS	
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	

Tabelle 3: Konzentration der Inhibitoren (Quelle: pers. comm. Andreas Dzung)

Somit bekomme ich nachher beim Behandeln eine Verdünnungsreihe und kann bestimmen ab, welcher Konzentration es einen deutlichen Effekt zu sehen gibt. Genau habe ich es so gemacht: es wird in jedes der 8 wells (von 4-11, je B-G, in Tab. 3) 99 µl Medium gefüllt und 1 µl Inhibitoren. Die schlussendlichen Konzentrationen der Inhibitoren werden in der Tabelle 3 deutlich. Das resultiert dann in 100 µl Lösung. Dies wird mit LGX 818 und mit MEK 162 gemacht. Anschliessend werden mit einer 10-µl *multi-channel* Pipette 10 µl der vorbereiteten *masterplate* aufgenommen und in die entsprechenden wells der Zelllinien 96-well-plate gegeben. Es wird in die ersten 3 horizontalen Reihen (4-11/B-D, Tab. 3) LGX 818 gegeben und in die nächsten 3 Reihen (4-11/E-G) MEK162 jeweils mit den verschiedenen Konzentrationen an Inhibitoren. Die 96-well-plates werden am Schluss für 72 h in den Inkubator gegeben. Das Zellwachstum wird mit den Inhibitoren gehemmt und bei der Idealtemperatur von 37°C und Zugabe von CO₂ können die Zellen ideal weiterleben.

2.1.1.5 Resazurin-Resorufin Assay

Das Resazurin ist eine chemische Verbindung, die in der Zelle durch metabolische Prozesse chemisch verändert wird. Dabei wird das ursprünglich farblose Resazurin zu einem fluoreszierenden Molekül. Diese Veränderung kann man spektrometrisch messen. Es ist so, je grösser das fluoreszierende Signal ist, umso metabolisch aktiver sind die Zellen, was in einem sehr linearen Verhältnis beobachtet werden kann. Ebenso, wenn die Zellen wachsen, erhält man grössere Werte.

Resazurin wird als Pulver gekauft. Im Labor wurde das Natriumsalz von Resazurin (Sigma, Cat.No. R7017) in PBS aufgelöst. Dazu wurden 150 mg mit 100 ml PBS versetzt. Die gelöste Resazurinlösung wird in *tubes* und im Gefrierschrank bei -20° C aufbewahrt. Das Resazurin habe ich schon vorbereitet vorgefunden. Die aufgetaute Resazurinlösung muss vor dem Versuch mit vorgewärmtem Medium noch verdünnt werden. Und zwar werden 9.9 ml Medium und 100 µl Resazurin in einer Wanne gemischt. Die Lösung wird mithilfe der Wanne

und der *multi-channel* Pipette zu allen *wells* gegeben, die mit Zellen befüllt sind. Genau gesagt, wurden 95 µl Resazurin-Medium Lösung dazugegeben. Die Platten werden für weitere 1.5h-2h im Inkubator gelagert.

2.1.1.6 Messungen

Die einzelnen Platten werden dann in den Tecan Spark Plate Reader (*Excitation wavelength* 535 nm, *Emission wavelength* 595 nm) gelegt und mit der Software auf die gewünschten Kriterien gemessen. Ich habe gemessen, wie blau bzw. rot die einzelnen *wells* sind. Je bläulicher sie sind, desto weniger Zellen leben noch (siehe Abb. 12, Seite 20). Die Messwerte des Tecan Spark Plate Reader habe ich dann in eine Excel Tabelle eingefügt und ausgerechnet. Zuerst habe ich einen Mittelwert der DMSO gelesenen Ergebnissen ausgerechnet. Die wurden dann als 100 % betrachtet. Anhand dieses Wertes können alle anderen Messwerte als Quotienten ausgerechnet werden. In den Figuren (Diagrammen) sind somit die Daten als *viability in %/control* aufgeführt. Mit dieser Art von Berechnung kann man auch einen IC50 Wert (Inhibition von 50 %) bestimmen. Das heisst, mit einer speziellen Computersoftware kann man die Konzentration eines Inhibitors bestimmen, die bei noch 50 % des Zellwachstums gemessen wurde. Mit diesem Wert können die Daten der verschiedenen Zelllinien verglichen werden.

2.1.2 DNA Sequenzierung

Ich habe die einzelnen Zellen in kleinen 1.5 ml *tubes* aufbewahrt. Da ich das Sequenzieren nach einer längeren Zeit nach dem Zellassay gemacht habe, musste ich die DNA in PBS runterzentrifugieren und somit das Zellpellet in ca. 50 µl PBS eingefrieren. Das Einfrieren dient zur sicheren Aufbewahrung der Zellen.

2.1.2.1 DNA Aufreinigung

Bei der DNA Aufreinigung habe ich ein Kit (Qiagen, QIAamp DNA Blood Minikit, Cat. No. 51104) verwendet. Das eingefrorenen Zellpellet wird wieder langsam bei Raumtemperatur aufgetaut. Es werden weitere 150 µl PBS hinzugefügt. Zu der Lösung werden 20 µl der Proteinase K (ein Enzym das Peptide angreift und damit spaltet) hinzugefügt und auf dem Vortex (Labor-Mixer) gemischt. Zu der entstanden Lösung habe ich 200 µl Buffer AL dazu pipettiert, dieser purifiziert die DNA. Anschliessend wird wieder gut gevortext. Die Endlösung wird für 10 min. bei 56° C inkubiert. Nach dem Inkubieren fügt man 200 µl Ethanol (100%) dazu und vortext es.

Anschliessend zentrifugiert man es für 1 min. in der Zentrifuge bei 1000 rcf (*relative centrifugal force*). Danach wird der Inhalt des 1.5 ml tubes in ein *mini spin column* (siehe Abb. 8) pipettiert und wieder mit gleichen Einstellungen zentrifugiert. Dabei fließt der Inhalt durch den Membranfilter, die sich in dem *tube* befindet und filtert die DNA raus. Der Überschuss im *wastetube* kann entsorgt werden und ein neues *wastetube* angehängt werden. Auf die Membran wird 500 µl Buffer AW1 pipettiert und wieder gleichermassen zentrifugiert. Das *wastetube* wird ausgewechselt durch ein frisches. Als nächster Schritt wird 500 µl eines anderen Buffers reinpipettiert und zwar Buffer AW2 (siehe

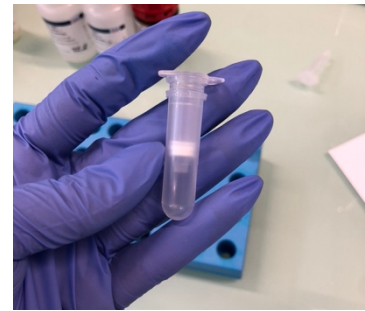


Abbildung 7: Mini Spin Column mit *wastetube* (=collection tube) [16]

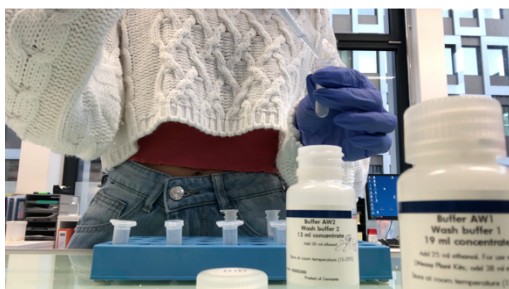


Abbildung 8: Behandlung der DNA im Mini Spin Column mit Buffer AW2. [16]

Abb. 7). Dieses Mal wird das *mini spin column* für 3 min. bei 6000 rcf zentrifugiert. Somit wird das *tube* gewaschen und ausgetrocknet und der Ethanol wird entfernt. Das *wastetube* wird wieder entfernt und richtig entsorgt. Ein neues wird an die *mini spin column* angehängt. Die *tube*-Zusammenführung wird jetzt zur Sicherheit noch einmal, ohne eine Flüssigkeit hinzufügen, bei 8000 rcf für 1 min. zentrifugiert. Mit diesem Schritt stellt man sicher, dass ganz sicher die ganze Flüssigkeit aus dem Membranfilter entfernt wird. Den letzten Überschuss und das *wastetube* können entsorgt werden. Die *mini spin column* wird in ein neues steriles 1.5 ml *tube* gesteckt und 50 µl 10nM Tris (=Buffer) auf den Membranfilter des *tubes* pipettiert und erneut für 5 min. bei 56° C inkubiert. Das Tris bewirkt, dass die DNA aus der Membran gelöst wird und durch den nächsten Schritt die DNA mit der Tris-Lösung in das sterile 1.5 ml *tube* zentrifugiert wird. Die Zentrifuge wird auf 1000 rcf und 1 min. eingestellt. Zum Schluss werden die *tubes* auf Eis gelegt, da DNA an Raumtemperatur zu denaturieren beginnt. Dann würde sie kürzer und beim Zufügen vom Mastermix könnten die Primer nicht mehr annealen (binden).

2.1.2.2 DNA Konzentration messen

Mit dem Spektrofotometer werden die enthaltenen Konzentrationen an DNA in einer Lösung nach dem Lambert Beer'schen Gesetz gemessen [12]. «Das Lambert-Beer'sche Gesetz erlaubt die Berechnung der Konzentration einer Lösung anhand der Absorption von monochromatischem Licht.» [9]. Es werden 1.5 µl Lösung in die Öffnung pipettiert (siehe Abb. 9). Das Gerät misst dann anhand von Lichtwellen die Konzentration. Das Absorptionsspektrum der DNA liegt bei 230 nm und 320 nm. Das Absorptionsmaximum liegt



Abbildung 9: Pipettieren der Lösung auf den Spektrofotometer. [16]

aber bei 260 nm und wird zur Messung der Konzentration verwendet. Der Wert 280 nm wird zur Bestimmung der Reinheit der DNA benutzt. Der Quotient des Ergebnisses bei 260 nm / Ergebnis von 280 nm wird als Zahl zwischen 1 und 2 dargestellt, dabei gilt von 1,8-2 eine reine und sauber extrahierte DNA-Probe. Unter 1.8 bedeutet, dass die Probe mit z.B. Proteinen verunreinigt ist.

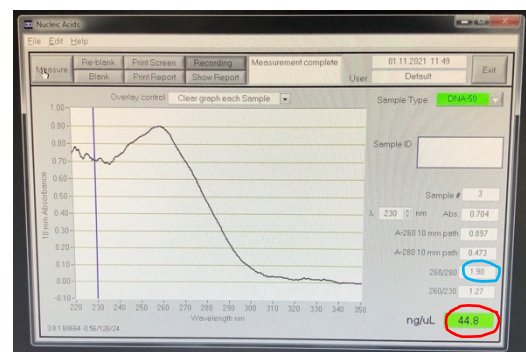


Abbildung 10: Verlauf der Wellenlängenabsorption der DNA-Probe der Zelllinie M990922. Der Quotient mit blau umkreist. Die Konzentration mit rot. [16]

Das Spektrofotometer ist so kalibriert, dass die DNA-Konzentration pro µl ausgerechnet wird (siehe Abb. 10).

2.1.2.3 PCR-mastermix herstellen

Das PCR-mastermix ist die Lösung, die die verschiedenen Komponenten enthält, um die DNA dann in der PCR zu elongieren (d.h. zu verlängern). Dieser besteht aus den Komponenten, die in der Tabelle 4 aufgeführt sind.

Komponente	Volumen für eine PCR-Reaktion (µl)	Für 7 PCR-Reaktionen (µl)
dH ₂ O	38	266
dNTP	5	35
10x	5	35
Primer	0.5	3.5
Taq	0.25	1.75

Tabelle 4: Komponente und ihres Volumen für PCR-Reaktionen

Der Ansatz wurde für sieben PCR-Reaktionen gemacht, da ich 3 BRAF mutierte Zellen und 2 NRAS mutierte Zellen hatte. Dazu brauchte ich noch zwei Kontrollen.

Es werden alle Zelllinien mit dem entsprechenden *PCR-mastermix* in ein *tube* zusammengefügt.

2.1.2.4 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die fertiggestellten *tubes* werden in eine PCR Maschine gestellt und ein entsprechendes Programm eingestellt. Das gewählte Programm heisst PCR M13 und besteht aus einer Denaturierungs-Phase, die die DNA auf 95° C aufheizt und somit die DNA aufbricht. Die Wasserstoffbrücken werden dabei zerstört und der DNA-Doppelstrang trennt sich in zwei Einzelstränge. An diese Stränge klammern sich die hinzugefügten Primer an. Die Primer passen nur an gewisse spezifische Stellen an die DNA-Einzelstränge. Dieser Schritt passiert bei einer höchst spezifischen Temperatur, die für jede PCR bestimmt werden muss. Bei dieser habe ich 55° C eingestellt. Dann wird es auf 72° C geheizt. Die Taq-Polymerase arbeitet am besten bei dieser Temperatur. Die Taq-Polymerase ist ein Enzym, das sich an die DNA hängt und beginnend von der Primersequenz in Richtung 3'->5' den zweiten Strang mit den dNTPs einfüllt. Die DNA wird nur so weit verlängert bis zur Stelle, an der der *reverse* Primer am anderen Einzelstrang festhängt. Schliesslich werden aus zwei Einzelsträngen dann zwei Doppelstränge. Dieser Vorgang wird für 40-mal wiederholt. Das PCR-Produkt wird bei einer Temperatur von 15° C in der Maschine gelagert bis man es herausnimmt.

2.1.2.5 Die Gelelektrophorese

Es wird ein *tray* in einer Presse eingeklemmt und eine Gel Mixtur hergestellt. Das Gel besteht aus einer 1%igen Agarose Konzentration. Dafür verwendet man zum Beispiel 1 g Agarose auf 100 ml TAE (Tris Acetat EDTA Puffer). Diese Lösung wird dann in das *tray* geleert und ein Kamm wird an eines der beiden Enden gesteckt, um kleine Löcher zu erstellen, in die später dann die PCR-Produkte pipettiert werden, zum Aushärten stehen gelassen. Danach wird das Gel in ein Elektrophorese Gerät gelegt und mit einem Laufpuffer (hier habe ich TAE verwendet) übergossen. In die kleinen Löcher habe ich alle Zelllinien verteilt und in 2 Löcher die Kontrolllösungen (siehe Abb. 11). Ich habe keinen Marker verwendet, da ich nur, um



Abbildung 11:
Gelelektrophorese-Gerät.
Die blauen Balken sind die
mit PCR-Produkt und
Farbstoff befüllten Löcher.
[16]

sicherzugehen, ob bei der PCR nichts schiefgelaufen ist, eine Gelelektrophorese durchgeführt

haben. Die Elektrophorese wird dann geschlossen und Strom wird angehängt. Es wird auf 80 V eingestellt und 20 min. laufen gelassen.

2.1.2.6 Auswertung der Gelelektrophorese

Das Gel wird mit einem speziellen Farbstoff behandelt, der fluoreszierend wird, wenn er an DNA oder PCR Produkte bindet. Dann wird das Gel in ein UV-Spektrometer gestellt und ausgewertet. Die PCR Produkte werden als stark leuchtende Banden erkannt.

2.1.2.7 PCR Produkt Reinigung

Es wird das PCR-Produkt in ein *mini spin column* mit einem *wastetube* angehängt, rein pipettiert. Ich hatte noch 45 µl PCR Produkt übrig also nahm ich alles ins *mini spin column* rüber. Dazu wird 500 µl der *preparation solution* gegeben. Diese bewirkt, dass die DNA besser an die Membran des *mini spin tubes* bindet und somit zu besseren Ergebnissen kommt. Anschliessend für 1 min. bei 12'000 rpm (*rounds per minute*) zentrifugiert. Der Überschuss wird aus dem *wastetube* geleert und 225 µl der *binding solution* hinzu pipettiert. Die *tubes* werden dann wiederum für 1 min. bei 12'000 rpm zentrifugiert. Der Überschuss wieder entsorgt. Als nächster Schritt werden 500 µl der *diluted wash solution* hinzugefügt und für 1 min. bei 13'200 rpm zentrifugiert und der Überschuss dann wieder entfernt. Als nächstes wird das *tube* mit dem *wastetube* ohne etwas Weiteres hinzuzufügen für 2 min. bei 13'200 rpm in die Zentrifuge gestellt. Um sicherzugehen, dass alle Flüssigkeit herauszentrifugiert wurde. Als vorletzten Schritt wird ein *mini spin column* in ein steriles 1,5 ml Drehverschluss *tube* gesteckt und mit 50 µl *elution solution* beträufelt. Zum Schluss wird es 1 min. bei Raumtemperatur inkubiert und dann wieder in die Zentrifuge getan und für 1 min. bei höchster Geschwindigkeit von 13'200 rpm. Nach dem Zentrifugieren liegt das gereinigte PCR Produkt im *tube* parat. Es werden alle *tubes* beschriftet und die *forward* und *reverse* Primer der NRAS und BRAF Zellen mit ins Labor geschickt, um sequenziert zu werden.

2.2 Resultate

2.2.1 Resazurin Messung

Alle 96-*well-plates* wurden mit einer Pipette auf identische Weise folgendermassen (Tab. 5) beladen:

1	100 µl PBS		7	250 nM LGX 818	100 nM MEK 162
2	100 µl Medium		8	500 nM LGX 818	500 nM MEK 162
3	100 µl DMSO		9	1000 nM LGX 818	1000 nM MEK 162
4	1 nM LGX 818	1 nM MEK 162	10	5000 nM LGX 818	5000 nM MEK 162
5	10 nM LGX 818	5 nM MEK 162	11	10000 nM LGX 818	10000 nM MEK 162
6	100 nM LGX 818	10 nM MEK 162	12	100 µl PBS	

Tabelle 5: Beladung und Konzentration der treatments

2.2.1.1 Zelllinie M990922

Der Resazurin Assay hat bei M990922 (Abb. 12) gezeigt, dass diese Zellen gut auf den Inhibitor LGX 818 reagiert haben. Die Linien A1-12, H1-12 sowie 1A-H und 12A-H sind Negativkontrollen; hier wurden keine Zellen ausgesät. Das Medium in dem die Zellen leben, enthält einen Farbindikator. Dieser ändert sich je nach CO₂-bzw. (Kohlen) Säurekonzentration. Blau bedeutet basisch bzw. wenig CO₂, rot bedeutet sauer bzw. viel CO₂. Die blaue

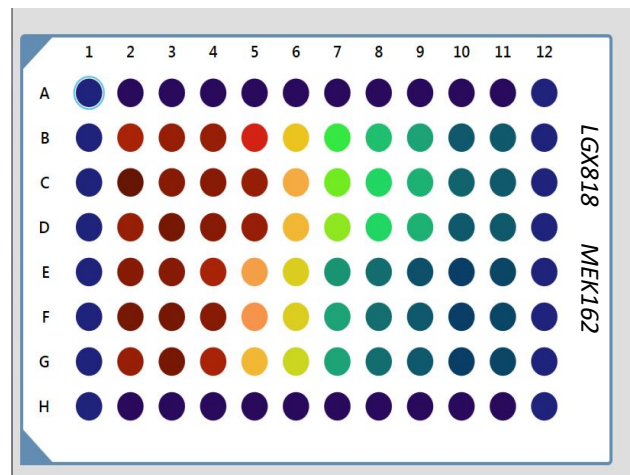


Abbildung 12: Resazurin Fluoreszenz Skala der Zelllinie M990922. [16]. Farbcodierung: blau = keine lebenden Zellen, rot = viele lebenden Zellen, grün/gelb = lebende Zellen

Färbung bedeutet demnach, dass keine Zellatmung stattgefunden hat, somit waren keine lebenden Zellen in diesem *well* vorhanden. Wenn ein *well* hingegen rot gefärbt ist, war viel metabolische Aktivität vorhanden und somit gab es viele lebenden Zellen. Grün steht für einen neutralen pH, demnach wurde wenig Zellatmung betrieben, was für einige lebende Zellen spricht. Man kann erkennen, dass der Anteil der lebenden Zellen abnimmt, je höher die Konzentration der Inhibitoren LGX 818 und MEK162 ist. Daraus können wir ableiten, dass diese Zellen sensibel auf die getesteten BRAFi und MEKi sind.

2.2.1.2 Zelllinie WM793B

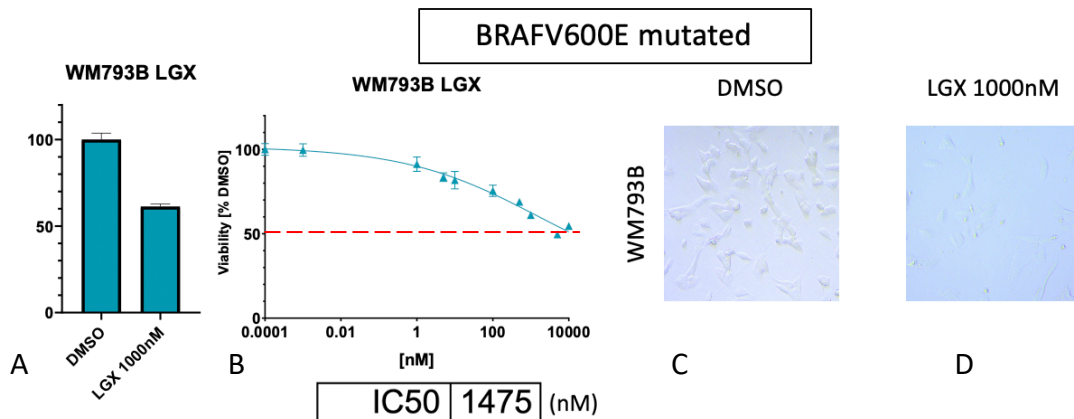
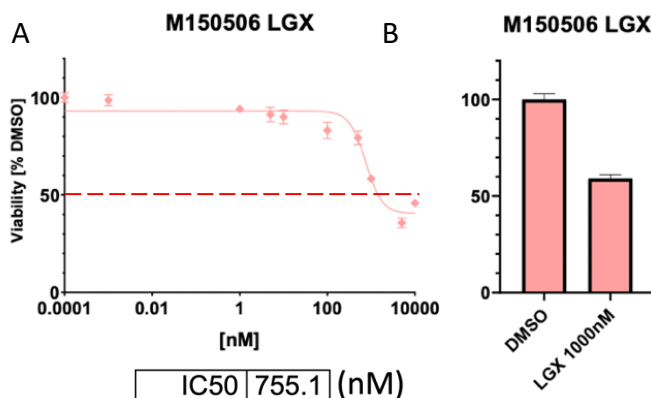


Abbildung 13: A) Säulendiagramm der Zellviabilität (Zelldichte) bei DMSO und bei 1000nM LGX 818-Zugabe. B) Liniendiagramm der Zellviabilität im Verlauf von 0.0001-10000nM Inhibitorzugabe. C) Bild der Zellviabilität bei DMSO. D) Bild der Zellen bei Zugabe von 1000nM LGX 818. [16]

Bei der Zelllinie WM793B hat die Resazurin Messung gezeigt, dass die Zellviability (Zelldichte) mit der Erhöhung der Konzentrationen des Inhibitors abgenommen hat. Dies zeigen auch die Diagramme, die man in Abb. 13 sieht. Das Säulendiagramm (Abb. 13 A) zeigt den Unterschied von DMSO zu dem *well* mit der Behandlung von 1000 nM LGX Inhibitor. Die Zellviabilität hat signifikant abgenommen. Daneben sieht man das Punktdiagramm, welches den abnehmenden Verlauf ebenso zeigt. Bei 0.0001 nM sieht man keinen Effekt des Inhibitors mehr auf das Zellwachstum. Unter den Diagrammen steht der errechnete IC50 Wert. Wie erwähnt, diese Zahl bestimmt bei welcher Konzentration der Inhibitor die Zellkonzentration auf die Hälfte senkt. In diesem Fall liegt er bei 1475 nM. Erst bei einer deutlichen Erhöhung der Konzentration ist eine Verbesserung zu sehen. Man erkennt diese auch an der rot gestrichelten Linie auf dem Liniendiagramm in Abbildung 13 B. Diese Zelllinie hat in früheren Versuchen sensibler auf den Inhibitor reagiert.

2.2.1.3 Zelllinie M150506



Bei den vorliegenden Diagrammen (Abbildung 14) sieht man, dass die Zelllinie M150506 eher resistent gegenüber des LGX Inhibitors ist. Die Zellviabilität sinkt erst ab einer sehr hohen Konzentration (> 100nM). Da ich am Anfang des Dokuments schon

Abbildung 14: A) Liniendiagramm der Zelllinie M150506 im Verlauf der Zugabe der verschiedenen Durgkonzentrationen. B) Säulendiagramm der Gegenüberstellung von DMSO und 1000nM LGX 818. [16]

definiert habe, dass diese Zelllinie leicht resistent gegenüber des Inhibitors ist, bestätigt das Experiment meine Vermutungen.

2.2.1.4 Zelllinie M130227

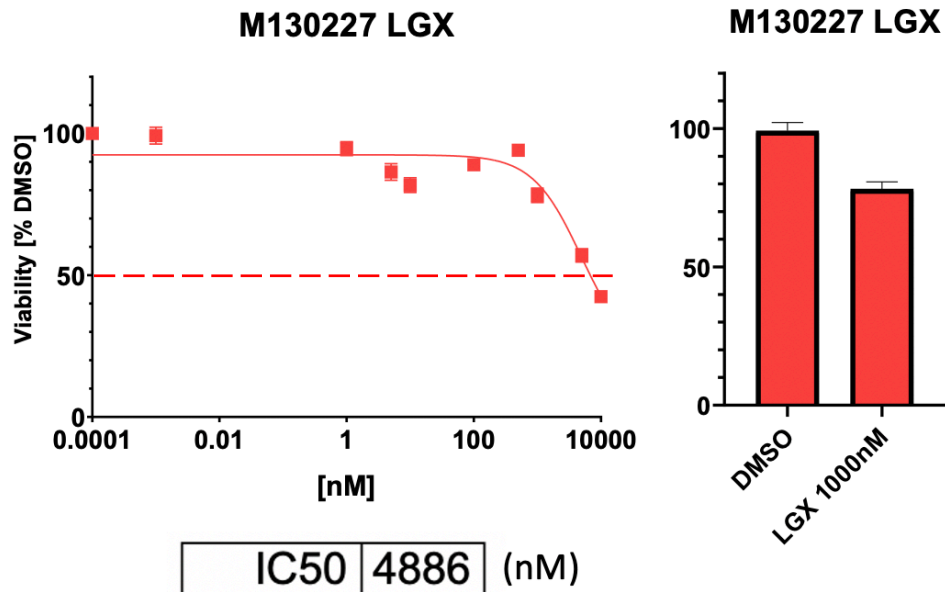


Abbildung 15: A) Liniendiagramm von M130227 im Verlauf der verschiedenen Inhibitorkonzentrationen. B) Säulendiagramm der Zelllinie M130227 bei DMSO und bei 1000nM LGX 818-Zugabe. [16]

Die Zelllinie M130227 ist NRAS mutiert und reagiert deshalb schlecht auf den LGX Inhibitor. Auf dem Liniendiagramm (Abbildung 15 A) sieht man sehr klar, dass die Zelllinie M130227, fast durch das ganze Diagramm eine gerade Linie vorzeigt. Die Kurve sinkt bei einer sehr hohen Konzentration an Inhibitor ab (>2500nM). Auf dem Säulendiagramm (Abb. 15 B) ist auch sichtbar, dass es nur einen kleinen Unterschied zwischen dem DMSO und dem LGX 818 1000nM behandelten *well* ergeben hat.

2.2.1.5 Zelllinie M130219

Bei dieser Zelllinie sieht man (Abbildung 16), dass die Zellviabilität bei 1000 nM LGX Inhibitor deutlich abgenommen hat. Das ist eine NRAS mutierte Zelllinie, welche grundsätzlich nicht auf den Inhibitor reagieren sollte. Man sieht auch an der IC50, dass schon ab einer tiefen Konzentration an Inhibitor die halbe Zellkonzentration erreicht ist.

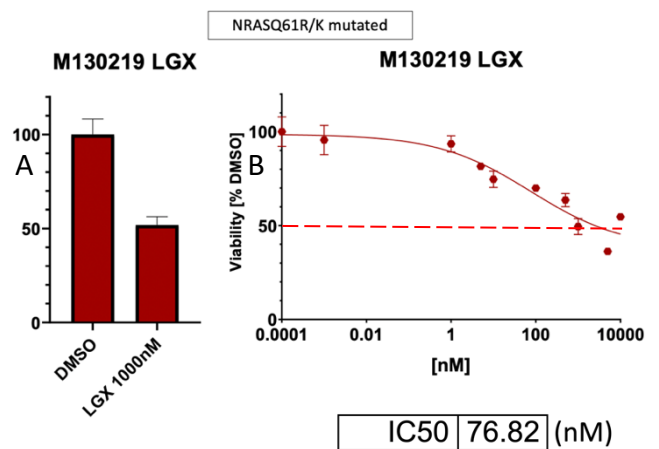


Abbildung 16: A) Säulendiagramm im Vergleich von DMSO und 1000nM LGX818. B) Liniendiagramm des Verlaufes der verschiedenen Inhibitor Konzentrationen. [16]

2.2.2 Spheroids

Zusätzlich zu den Resazurin *assays* habe ich *spheroids* der gleichen Zellen untersucht. Bei *spheroids* werden die Zellen wie gestapelte Tennisbälle zu einer Kugel zusammen geformt. Damit will man einen Tumor imitieren, um so ein möglichst angenähertes Resultat an die realen Voraussetzungen zu erhalten, wie die Inhibitoren die Zellen inhibieren würden. Die

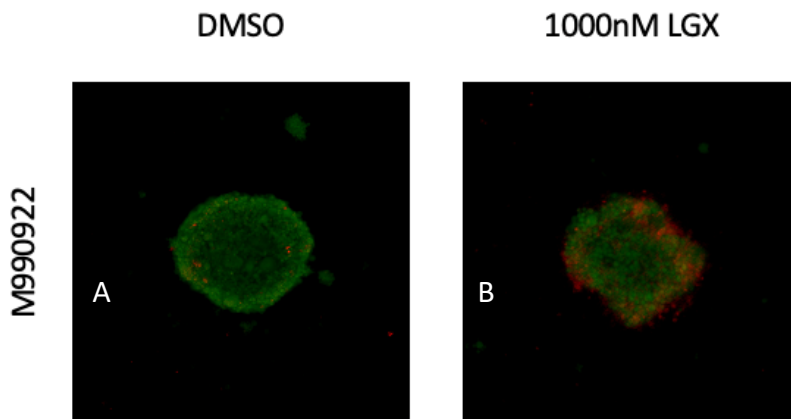


Abbildung 17: A) Spheroid der Zelllinie M990922 bei DMSO. B) Spheroid der mit 1000 nM LGX 818 behandelt wurde. Er zeigt rote Punkte auf, diese signalisieren tote Zellen. Die grünen Punkte bedeuten, dass die Zellen noch leben. [16]

erzielten Resultate verstärken die schon gemachten Aussagen zu den einzelnen Zelllinien.

Bei der Zelllinie M990922 hat es schon ab einer Konzentration von 1000 nM eine deutliche Farbänderung gegeben.

Das Säulendiagramm (Abbildung 18) widerspiegelt die aufgenommenen Bilder aus Abbildung 17. Auf dem Säulendiagramm erkennt man deutlich, dass bei DMSO mehrheitlich alle Zellen

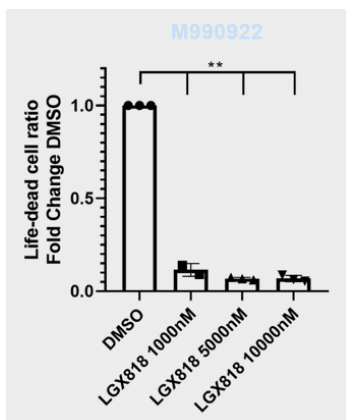


Abbildung 18: Säulendiagramm zu den bei Abbildung 16 aufgezeigten spheroids. [16]

noch leben. Bei dem Bild bei Abbildung 17 A) erkennt man, dass der *spheroid* meist grün ist. Das bedeutet die meisten Zellen leben.

Hier wird nur das Ergebnis der Zelllinie M990922 aufgezeigt, da ich bei dieser die schönsten Ergebnisse erhalten habe. Bei den restlichen Resultaten der anderen Zelllinien hat es die gleichen Ergebnisse, wie bei den Resazurin Assays ergeben.

2.2.3 Sequenzen

Das eingeschickte gereinigte PCR-Produkt hat gezeigt, dass M990922 eine Übereinstimmung mit der BRAF Mutation ergeben hat. Somit ist bewiesen, dass die Zelllinie M990922 eindeutig BRAF mutierte Zellen sind. Somit sollten sie mit LGXi (=LGX Inhibitoren) und MEKi (=MEK Inhibitoren) inhibiert werden können.

Bei der Zelllinie WM793B hat es das gleiche Ergebnis aufgezeigt. Diese Zellen sind einfach an einer anderen Stelle im Genom mutiert, aber immer noch auf dem Chromosom 7.

Die Zellen M150605 sind ebenfalls BRAF mutiert. Auf dem Chromosom 7 ist die Mutation zu finden.

Die Zelllinien M130227 und M130219 sind NRAS mutiert. Das Sequenzieren hat dies bestätigt, da die mutierte Stelle im Genom auf Chromosom 1 eine Übereinstimmigkeit mit dem NRAS mutierten Proto-Onkogen gezeigt hat.

2.2.4 MEKi auf Zelllinien

Ich habe mich in meinen Resultaten sehr stark auf die Wirkung von LGX 818 auf die verschiedenen Zellen fokussiert, daher möchte ich noch zusammenfassend die Wirkung von MEKi auf die Zellen darlegen.

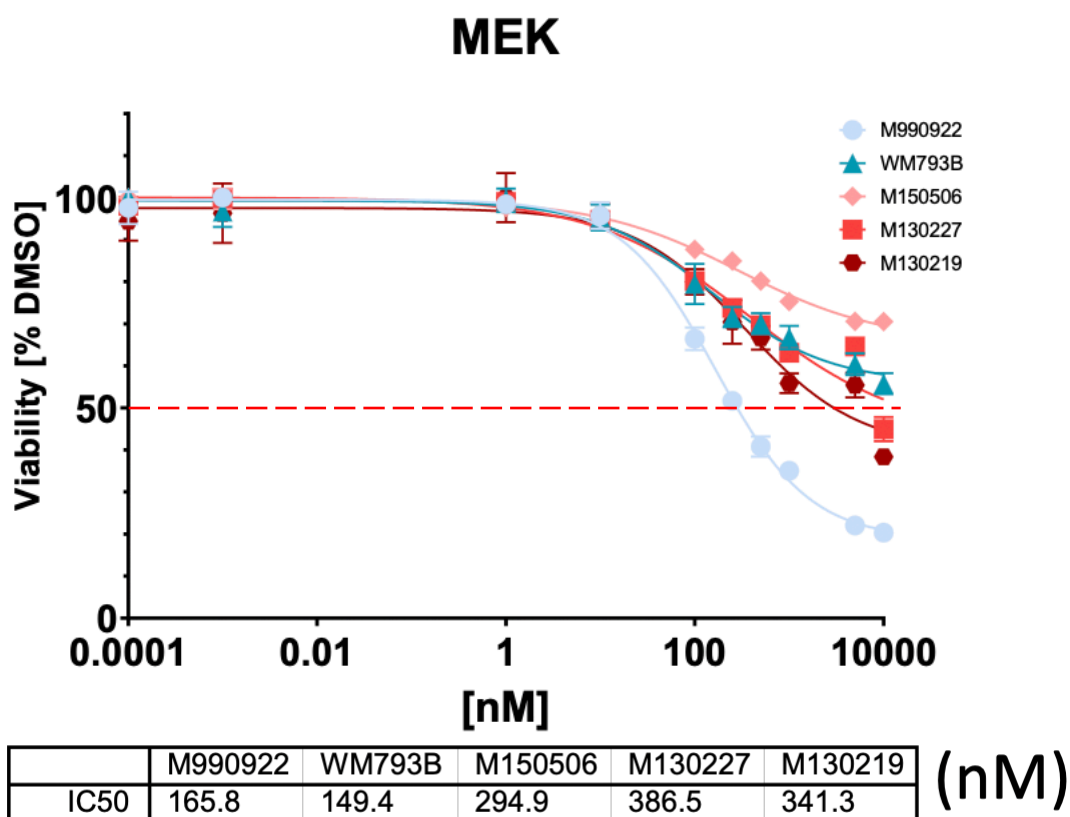


Abbildung 19: Gesamtübersicht der Zelllinien unter der Behandlung mit MEK162 [16]

Auf der Abbildung 19 kann man ablesen, dass alle Zelllinien ungefähr ab einer gleichen Konzentration an Inhibitor anfangen, eine Reaktion zu zeigen. M990922 zeigt wie auch beim LGX 818, dass diese sensibler sind auf die Inhibitoren als die anderen Zellen. Diese Erkenntnisse kann man auch bei den IC50 Werten erkennen.

2.3 Diskussion

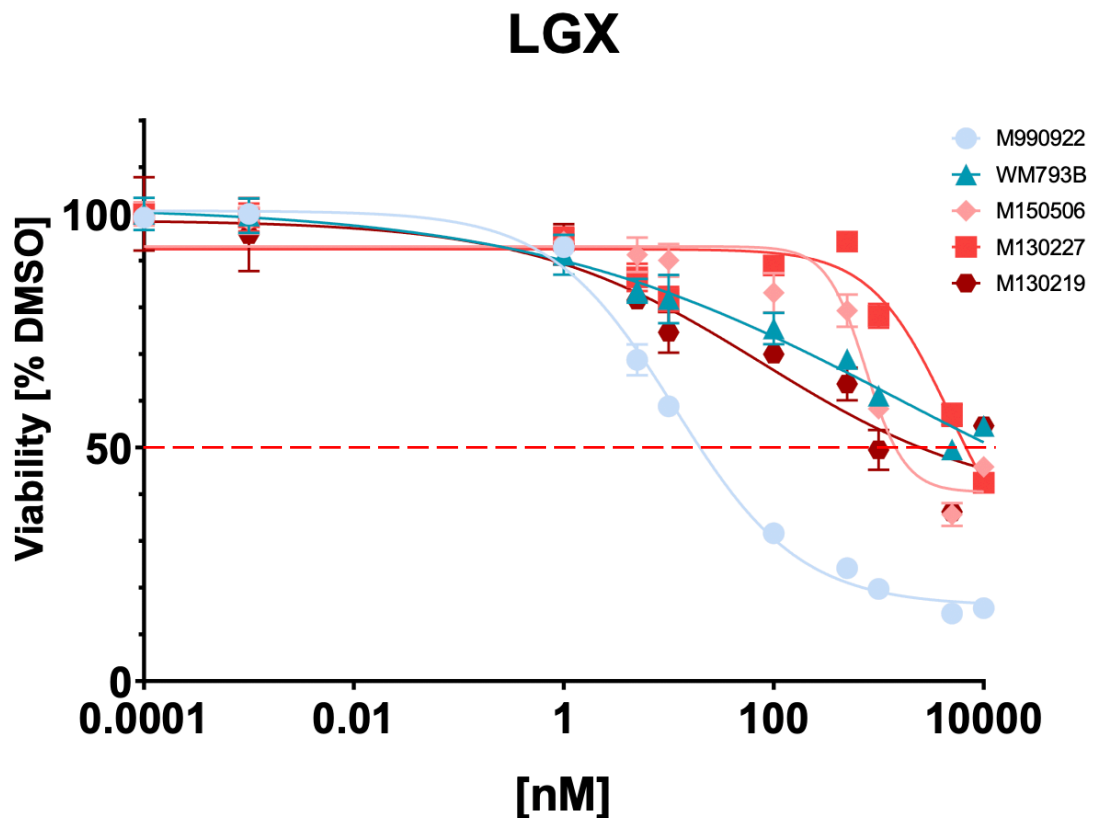
Im Folgenden werde ich noch mehr im Detail auf die Resultate eingehen und diese erläutern.

2.3.1 Interpretation

In meinen Versuchen habe ich diverse Inhibitoren auf fünf verschiedenen Zelllinien angewendet. Aus fünf Versuchen haben drei davon die erwartenden Ergebnisse erzielt. Bei den anderen beiden habe ich unterschiedliche Resultate erhalten. Im Folgenden werde ich die einzelnen Zelllinien genauer diskutieren.

2.3.1.1 Zelllinie M990922

Bei der Zelllinie M990922 haben die Ergebnisse ziemlich genau den Ergebnissen der früheren Versuche entsprochen. Die Zellen haben sehr sensibel auf den LGX Inhibitor reagiert und man kann eine deutliche Verbesserung der Zellviabilität der mutierten Zellen sehen (vgl. hellblaue Kurve in Abb. 20). Schon ab einer tiefen Konzentration an Behandlungsmedium (1 nM), beobachtet man eine Abnahme der Zellviabilität.



	M990922	WM793B	M150506	M130227	M130219
IC50	11.45	1475	755.1	4886	76.82

(nM)

Abbildung 20: Gesamtübersicht der 5 Zelllinien im Verlauf der verschiedenstark hinzugefügten Inhibitor Konzentrationen. [16]

Man sieht, dass die Zelllinie M990922 die einzige ist, deren Zellviabilität sehr stark abnimmt, und zwar schon ab 1 nM des Inhibitors. Das erkläre ich so, dass der Inhibitor gut in die Zellen eingedrungen ist, die Serin/Threonin-Kinase inhibiert und damit das Zellwachstum gehemmt hat.

2.3.1.2 Zelllinie WM793B

Die Zelllinie WM793B hat beim Experiment unerwartete Resultate gezeigt. Diese Zellen waren in früheren Versuchen sensibel auf den LGX Inhibitor. Meine Resultate haben das nicht aufgezeigt. Es gab nur eine leichte Hemmung. Bei dem Kurvendiagramm (türkis-grüne Kurve in Abbildung 20) sieht man, dass die Kurve sehr langsam im Gegensatz zur Zelllinie M990922 sinkt. Grundsätzlich hatte die Zelllinie WM793B früher ähnlich reagiert, wie M990922, da sie beide sensibel auf den BRAFi reagieren [2]. Es ist auszuschliessen, dass die Inhibitoren nicht mehr intakt gewesen sind, denn die gleichen Inhibitorlösungen wurden aus der gleichen *materplate* auf alle Zelllinien verteilt. Eine mögliche Ursache für die unerwarteten Resultate könnte allerdings auf ungenaues Pipettieren zurückzuführen sein. Eine mehr unrealistische Erklärung wäre, dass die Zellen weitermutiert sind und dann nicht mehr auf den Inhibitor reagieren. Die ist aber unrealistisch, weil das Labor keine solche Veränderungen festgestellt hat.

2.3.1.3 Zelllinie M150605

Die Zelllinie M150605 hat wie bei früheren Experimenten reagiert. Diese Zellen sind leicht resistent gegenüber dem LGX Inhibitor, was man auch bei den Zellbildern (Abb. 21A und B) sehen kann. Man sieht bei der DMSO Kontrolle, dass die Zellviabilität sehr hoch ist. Im Gegensatz bei dem Bild, auf dem die Zellen mit 1000 nM LGX 818 behandelt wurden (Abb. 21 B), sieht man eine deutlich verringerte Zelldichte. Das Diagramm zeigt ebenfalls die Zellviabilität Verringerung sehr gut. Es wird auf fast die Hälfte gesenkt. Im Gesamtdiagramm (S. 25, Abb. 20) erkennt man, dass die Zellviabilität von M150605 bei einer bisschen tieferen Konzentration des

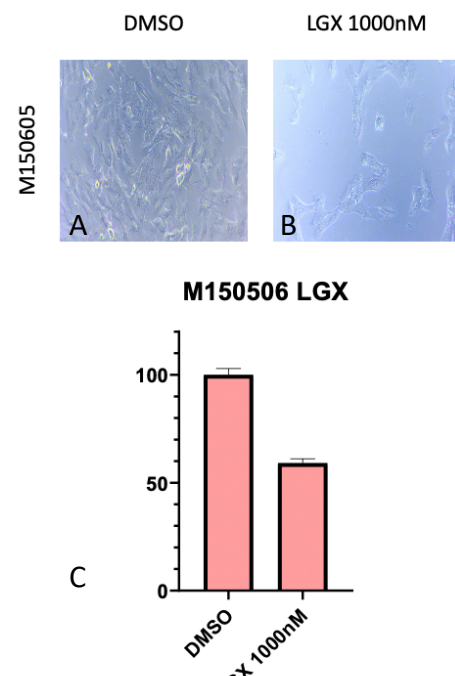


Abbildung 21: A) Mikroskopbild der Zellen bei DMSO Aussetzung. B) Mikroskopisches Bild der Zellen, wenn sie bei 1000nM LGX 818 ausgesetzt werden C) Säulendiagramm der Aussetzung der Zellen von DMSO und 1000nM LGX 818. Dieses widerspiegelt die Zellviabilität von A) und B). [16]

Inhibitors als M130227 anfängt zu sinken. Aber bei einer deutlich höheren Konzentration als M990922.

2.3.1.4 Zelllinie M130227

Die Zelllinie M130227 ist eine von den drei Zellen, die wie erwartet reagiert haben. Bei den Versuchen, die davor geführt wurden, waren die Zellen resistent gegenüber dem Inhibitor, da sie NRAS mutiert sind. Wie man bei den Zellbildern erkennt, sind ungefähr gleichviel Zellen vorhanden, sowohl in der DMSO Kontrolle als auch nach dem Behandeln mit LGX Inhibitoren. Die Mutation konnte mit

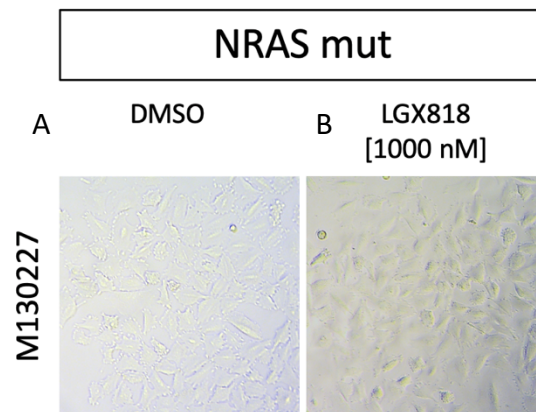


Abbildung 22: A) Zellbild der Zellen bei DMSO. B) Bild der Zellen bei Inhibition von 1000nM konzentrierten LGX 818. [16]

LGXi nicht gehemmt werden, da NRAS mutierte Zellen die Mutation an einer anderen Stelle im Genom haben als die BRAF mutierten Zellen. Die LGX Inhibitoren wirken nur auf die BRAF mutierten Zellen.

2.3.1.5 Zelllinie M130219

Die Zellen haben aufgezeigt, dass sie schwach resistent gegenüber des LGX Inhibitors sind und dadurch nicht komplett gehemmt werden. Diese Zellen waren in früheren Versuchen total resistent gegenüber des LGX Inhibitors. Da sie aber im Gesamtdiagramm (dunkelrote Kurve auf Abbildung 20, S.25) schon ab einer tiefen Konzentration anzeigen, dass die Zellviabilität abzunehmen beginnt, kann nicht deutlich gesagt werden, dass diese unter idealen Zuständen NRAS mutiert sind und somit nicht sensibel auf den LGX Inhibitor. Bei diesem Experiment könnte beim Pipettieren etwas schiefgelaufen sein oder andere Ungenauigkeiten (z.B. beim Auszählen der Zellen) zu diesem undeutlichen Ergebnis geführt haben.

2.4 Fragestellungen Beantwortung

Ich möchte nun zu meinen Fragestellungen (siehe 1.1.2) wieder Bezug nehmen und anhand von meinen ausgeführten Versuchen einzeln beantworten.

2.4.1 Was ist die Wirkung des Inhibitors LGX 818 und MEK 162 auf die Krebszellen?

Beide Inhibitoren dringen in die mutierten Zellen ein und hemmen den unkontrollierten Zellwachstum. Der Inhibitor LGX 818 hemmt nur einen gewissen *pathway* und es gibt Ausweichungen auf andere, wie zum Beispiel, wenn die MEK Kinase direkt betroffen wird und aktiviert wird. In diesem Fall muss der MEK-Inhibitor direkt an der betroffenen Stelle die unkontrollierte Aktivierung hemmen. So können LGX 818 und MEK 162 kombiniert eingesetzt werden.

2.4.2 Wie kann die Wirkung des Inhibitors LGX 818 und MEK 162 auf die Hautkrebszellen nachgewiesen werden?

Bei den Versuchen, die ich im Labor durchgeführt habe, habe ich die Zellen in verschiedenen *wells* pipettiert und dazu verschiedene Konzentrationen an Inhibitoren hinzugefügt. Vor dem Versuch habe ich die Zellkonzentration gemessen und notiert. Nach dem Behandeln und Einwirken habe ich erneut die Zellviabilität (=Zellkonzentration) gemessen. Die Ergebnisse waren deutlich. Wenn die Zellkonzentration tiefer war als bei der Ausgangslage, hat der Inhibitor gewirkt. Hat die Zelle den Inhibitor nicht aufgenommen, konnte der Inhibitor die Zellteilung nicht hemmen und somit hatte der Inhibitor keine Wirkung. Es waren mehr Zellen vorhanden als bei Beginn des Experimentes.

2.4.3 Ab welcher Konzentration des Inhibitors LGX 818 und MEK 162 ist eine Verbesserung sichtbar?

Die Wirkung der Inhibitoren hängt von der Art Mutation und der Sensibilität gegenüber den Inhibitoren ab. Wenn die Zellen BRAF mutiert sind und sensibel gegenüber des Inhibitors, kann die Zellteilung gut gehemmt werden und es wird eine Verbesserung deutlich. Das heisst der unkontrollierte Zellwachstum kann durch den Inhibitor wieder in Kontrolle gebracht werden. Bei sehr sensiblen Zelllinien wie M990922 ist schon ab einer tiefen Konzentration an LGXi (250nM) eine kontrolliertere Zellteilung sichtbar. MEKi verhält sich ungefähr gleich wie LGXi.

2.4.4 Können auch NRAS mutierte Zellen mit dem Inhibitor LGX 818 gehemmt werden?

Bei den Experimenten habe ich festgestellt, dass NRAS mutierte Zellen nicht optimal mit dem LGX 818 oder MEK 162 gehemmt werden können. Auf der Kaskadenabbildung auf Seite 7 kann man erkennen wie dies verläuft. Die Inhibitoren LGX 818 und MEK 162, die nicht für mutierte

NRAS Proteine entwickelt sind, können diese nicht hemmen. Somit kann wenig bis keine Verbesserung und somit Inhibition erkannt werden.

2.4.5 Wie können BRAF mutierte Krebszellen besser gehemmt werden?

Kann die Formation einer Resistenz und Ausweichung über andere Wege verkleinert werden? Wenn man MEK Inhibitoren zusätzlich zu dem LGX Inhibitor hinzufügt, wird eine häufige Ausweichung, die meist ausgelöst wird, gehemmt. Da der MEK Inhibitor einen anderen spezifischen *pathway* anpeilt und diesen somit hemmt. Während meinen Versuchen habe ich erfahren, dass zusätzlich zu einer Behandlung mit Inhibitoren auch eine Immuntherapie eingeführt werden kann. (pers. comm. Dzung)

2.4.6 Schlussfolgerung

Aus den Resultaten also folgere ich, dass das Wachstum von Melanomzellen mit gewissen Inhibitoren gehemmt werden kann. Wenn diese aber NRAS mutiert sind, reagieren sie nicht gut auf den Inhibitor und können nicht erfolgreich gehemmt werden. Das heisst, dass man sehr hohe Konzentrationen von Inhibitoren einsetzen müsste. Man kann aber eine/n Patientin/Patienten nicht mit einer beliebig hohen Dosis eines Medikamentes behandeln, damit die NRAS mutierten Zellen reagieren. Dies könnte aber zu anderen Nebenwirkungen führen.

Aus den Resultaten mit MEKi konnte ich schliessen, dass MEK Inhibitoren die Zelle auch hemmen können. Ich denke im Zusammenspiel mit LGX 818 würde es sicher bessere Erfolge als nur allein mit LGX 818, erzeugen. Da ich aber die Inhibitoren nur einzeln getestet habe, kann ich dies nur vermuten und anhand den durch Forschung erzielten Resultate wiedergeben. Dr. Andreas Dzung hat mir, als ich meine Experimente mit ihm durchführte, mitgeteilt, dass die Kombination der zwei Inhibitoren zu einer verzögerten und reduzierten Resistenz führt und so der erste Meilenstein in der Melanomtherapie ist.

3 Exkurs

3.1 Einblick in das Leben mit schwarzem Hautkrebs

Ich habe mich in meiner Arbeit mit Hautkrebszellen beschäftigt und auf molekularer-biochemischer Ebene zahlreiche Versuche gemacht. Es war mir ein Anliegen, nicht nur die «Forscherseite» von Hautkrebs zu sehen, sondern auch mehr über die Seite der Betroffenen zu erfahren. Die beiden vorgestellten Personen sind vor einigen Jahren an schwarzem Hautkrebs erkrankt und ich durfte Ihnen netterweise einige Fragen dazustellen. Ich habe dabei vieles Interessantes über den Umgang mit Hautkrebs erfahren.

3.1.1 Patient 1

Patient 1 hatte vor ungefähr einem Jahr, 2020, schwarzen Hautkrebs am unteren Rücken. Es handelte sich dabei um ein Muttermal, das sich mit der Zeit verändert hat und die Form und seine Grösse verändert hat. Er liess es herausoperieren und es verlief alles gut. Es musste keine weitere Behandlungsmethode eingeleitet werden. Als er damals mitgeteilt bekommen hatte, dass sich unter seinem Muttermal schwarzer Hautkrebs eingenistet habe, war er bisschen schockiert. Die Nachricht zu bekommen, dass man selbst an Hautkrebs leidet, ist nicht alltäglich und kann somit einen grossen Schreck in vielen Menschen verursachen. Patient 1 fühlte sich unsicher und wusste nicht genau was mit einer solchen Information anfangen, da er sich zuvor nie richtig mit dem Thema auseinandergesetzt hatte und er auch nie richtig informiert wurde. Er hat dann ein bisschen recherchiert und hat nur beängstigende Geschichten gefunden, die ihn dann abgeschreckt haben. Er hatte sich viele Gedanken gemacht, darunter auch welche, ob und wie lange er noch leben würde. Heute fühlt sich Patient 1 fit und munter und lebt sein Leben wie vor dem Vorfall ausser, dass er vorsichtiger mit dem Umgang mit der Sonne ist.

3.1.2 Patient 2

Patient 2 hatte 2015 schwarzen Hautkrebs an der Brust. Auch er liess es von einem Arzt begutachten als er merkte, dass es sich verändert hatte. Da er selber Arzt ist, war er da ein bisschen vorsichtiger als Andere das vielleicht gewesen wären. Er hatte in seinem Leben schon viele alltäglichere Operationen gehabt. Bei diesen hatte er keine Zweifel. Als er aber erfahren hatte, dass er an Hautkrebs erkrankt war, war er erschrocken. Er fand sich selber in einer Situation, in der er sich fragte, ob er die Operation und die Krankheit überleben würde. Das

erste Mal in seinem Leben fragte er sich, ob er bisher das Leben gelebt hatte, das er sich wünschte und die Dinge gemacht hat, die er unbedingt mal machen wollte und ob er ein guter Mensch gewesen sei. Gedanken wie, ob seine Familie und Kinder ihn lieben würden, gingen ihm durch den Kopf. Obwohl er eine 95% ige Chance zum Überleben hatte, machte er sich trotzdem Gedanken, ob er einer von denen 5 % sein könnte, die es nicht überleben. Er überstand die Operation sehr gut und war nach dem Abheilen wieder fit. Die einzigen Komplikationen, die es gab, waren, dass er es in einer Klinik entfernen lassen hatte und das Personal nicht auf einen so tiefen Eingriff geübt war. Er und seine Frau haben aber ihren Kindern nichts davon erzählt, dass ihr Vater Krebs hat. Sie machten sich Sorgen, dass wenn die Kinder im Internet einen Schwachsinn lesen würden, sich viel zu viele Sorgen machen würden. Patient 1 denkt, dass sich der Krebs daher gebildet haben können, weil er sehr befallen von Muttermalen ist und er nicht sehr vorsichtig war, was Sonnenschutz angeht. Nach der Operation schätzte er es sehr, wenn seine Frau ihn daran erinnerte, dass er sich eincremen sollte. Davor war er immer genervt.

3.1.3 Fazit

Ich habe nur zwei Patienten interviewt, aber ich habe schon nur bei diesen beiden einige Parallelen auffinden können. Zum Beispiel, dass beide sofort angefangen haben Überlebensraten Tabellen aus dem Internet zu suchen und sich diese für sich selber anzuschauen. Man fragt sich, ob man den Hautkrebs überleben wird. Beide sagten es ist ein Schwachsinn dies überhaupt zu denken. Ich finde es ist sehr nachvollziehbar, da es trotzdem diese 5% gibt, die den Krebs nicht überleben. Man sieht an beiden Interviews, dass sich nach dem Eingriff beide besser vor der Sonne schützen und auch ihr Leben mehr zu schätzen wissen.

4 Zusammenfassung

In meiner Arbeit habe ich anhand eines Resazurin-Resorufin Assays versucht zu beweisen, dass BRAF mutierte Melanomzellen mit dem LGX 818 Inhibitor, auch Encorafenib genannt, gehemmt werden können. Ich habe fünf verschiedenen Zelllinien untersucht. Drei dieser Zellen sind BRAF mutiert und die anderen zwei sind NRAS mutiert (Begriffe werden auf S.8/9 erläutert). Ich habe mit Hilfe Zellwachstumsexperimentes bewiesen, dass die NRAS mutierten Zellen nicht optimal mit dem LGXi inhibiert werden können. Zusätzlich habe ich getestet, ob die BRAF mutierten Zellen besser gehemmt werden können, wenn ein MEKi angewendet wird. Der MEK Inhibitor, auch Binimetinib bezeichnet, hat gezeigt, dass alle fünf Zellen, auch die NRAS mutierten, damit inhibiert werden können.

Zudem habe ich mit den gleichen fünf Zelllinien *spheroids* gebildet und anhand diesen, meine Ergebnisse bestätigt. Die *spheroids* gaben auch schöne Bilder und *live/dead ratios*.

Zur Bestätigung, dass die Zellen wirklich BRAF und NRAS mutiert sind, habe ich zusätzlich einen PCR-Versuch durchgeführt und anschliessend das gereinigte PCR-Produkt zum Sequenzieren in ein anderes Labor eingeschickt. Die Sequenzen haben alle den vorgängig bestimmten Mutationen entsprochen.

Neben der Arbeit im Labor habe ich mich mit zwei Personen getroffen, welche selbst von Hautkrebs betroffen waren. Dies ermöglichte mir einen anderen Blick auf das Thema zu werfen. Ich habe erfahren, dass auch wenn es eine hohe Überlebenschance für die tiefen Stadien von Hautkrebs gibt, sich die Patienten trotzdem die Gedanken machen, ob man den Eingriff überleben wird.

5 Schlusswort

5.1 Persönlicher Kommentar

Die Arbeit im Labor hat mir sehr gefallen und mich in meiner Studienwahl weitergebracht. Mir wurde vieles beigebracht und ich konnte neue Erfahrungen sammeln. Ich schätze es sehr, dass ich die Möglichkeit hatte in einem professionellen Labor für einige Tage zu arbeiten. Die Idee mit neuen Behandlungen anderen zu helfen, hat mich inspiriert. Die Erfahrung wird mir immer in Erinnerung bleiben und ich werde sicher an diese Arbeit zurückdenken, wenn ich die grosse Entscheidung, welchen Studiengang zu gehen, treffen werden.

5.2 Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle noch einmal ganz herzlich bei Herr Dr. Andreas Dzung bedanken, der mir das ganze Experiment ermöglicht hat. Er hat mich während des ganzen Zellassays, der den Hauptteil meiner Arbeit ausmachte, betreut und instruiert. Herr Dr. Andreas Dzung hat mir alle Protokolle, die Behandlungsmedien und Zellen und seinen Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt. Bei Herrn Prof. Mitchell Levesque möchte ich mich bedanken, dass er mir den Zutritt zum Labor und den ganzen Utensilien gewährt hat. Bei Corinne Stoffel möchte ich mich bedanken, für die Hilfe bei weiteren Fragen, die ich hatte, als Andreas Dzung nicht mehr im Labor beschäftigt war. Ich bedanke mich auch bei Mirka Schmid für die Betreuung an den zwei Tagen, als ich mit den Zelllinien eine PCR durchgeführt habe und dass sie mir das PCR-Produkt fürs Sequenzieren eingeschickt und ausgewertet hat. Ein Dankeschön an die zwei Interviewten Personen, die mir einen Einblick in einen Abschnitt ihres Lebens gewährt haben. Ich bedanke mich auch ganz herzlich bei meiner Mutter und bei Stephan, die meine ganze Arbeit mehrmals durchgelesen haben, um mir zu helfen diese fertigzustellen. Zuletzt ein grosses Dankeschön an meinen Betreuer der ganzen Maturaarbeit: Herr Dr. Tobias Alther. Danke, dass sie mich während des Biologieunterrichts so von der Genetik fasziniert haben und somit meine Maturaarbeit inspiriert haben. Danke für die herzliche und motivierende Betreuung während des ganzen Prozesses der Entstehung meiner Maturaarbeit. Ich bedanke mich natürlich auch bei allen, die daran Teil hatten und im Hintergrund mitgefiebert haben.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

- [1] J. Markl, Markl Biologie Oberstufe, Klett Schulbuchverlag, 2010.
- [2] A. Dzung, «Targeting STK11-Inactivation Induced Invasion and Harnessing – Catenin – CBP/P300 Signaling as a Potential Therapeutic Option in Cutaneous Melanoma,» Universität Zürich, 2020.
- [3] N. EDUCATION, «Scitable,» 2014. [Online]. Available: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/rtk-14050230/>. [Zugriff am 20 Dezember 2021].
- [4] «Antikörper-online.de,» [Online]. Available: <https://www.antikoerper-online.de/rtk-signalweg-pathway-8/>. [Zugriff am 20 Dezember 2021].
- [5] C. Höller, «Spektrum Onkologie,» 16 September 2016. [Online]. Available: <https://www.medmedia.at/spectrum-onkologie/b-raf-beim-melanom/>. [Zugriff am 20 Dezember 2021].
- [6] I. S. a. K. S. Smalley, «Cancer Discovery,» Februar 2018. [Online]. Available: <https://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/8/2/140>. [Zugriff am 20 Dezember 2021].
- [7] 11 Dezember 2018. [Online]. Available: <https://flexikon.doccheck.com/de/Encorafenib>. [Zugriff am 2 November 2021].
- [8] «Pharma Wiki,» 22 November 2019. [Online]. Available: <https://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Binimetinib>. [Zugriff am 2 November 2021].
- [9] «DocCheck Flexikon,» 22 November 2018. [Online]. Available: <https://flexikon.doccheck.com/de/BRAF>. [Zugriff am 18 Dezember 2021].
- [10] M. S. Teilgemeinschaftspraxis, «Informationsblatt Molekulare Pathologie,» [Online]. Available: http://www.molekularpathologie-suedbayern.de/files/Infos/RAS_im_Kolorektalen_Karzinom_V2.pdf. [Zugriff am 20 Dezember 2021].
- [11] K.-L. Bergbauer, «Freie Universität Berlin,» [Online]. Available: <https://www.vetmed.fu->

berlin.de/einrichtungen/institute/we03/biochemie_praktikum_versuche_blackboard/04nukleinsauren/dnakonz/index.html. [Zugriff am 10 Oktober 2021].

- [12] «DocCheck Flexikon,» 16 Juli 2015. [Online]. Available: https://flexikon.doccheck.com/de/Lambert-Beersches_Gesetz. [Zugriff am 10 Oktober 2021].
- [13] «fisher scientific,» 2021. [Online]. Available: <https://www.fishersci.ch/shop/products/rpmi-1640-medium-41/p-7076212>. [Zugriff am 15 September 2021].
- [14] «indiamart,» 2021. [Online]. Available: <https://www.indiamart.com/proddetail/blood-counting-chamber-neubauer-brightline-11799208762.html>. [Zugriff am 15 September 2021].
- [15] «sysmex,» 2021. [Online]. Available: <https://ch.sysmex-flowcytometry.com/consumables/sample-tubes-and-accessories/2948/96-well-plates>. [Zugriff am 2 September 2021].
- [16] C. Marrucchiello, Interviewee, [Interview]. 2021.

6.2 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: A) NORMALER ZUSTAND UND ABLAUF EINES MAPK PATHWAY. B) BRAF MUTIERTER PATHWAY. [2]	7
ABBILDUNG 2: ZELLKULTUR-ABZUGSHAUBE, UM KONTAMINATION ZU VERMEIDEN [16]	11
ABBILDUNG 3: RPMI 1640 SUPPLEMENTATION FLASCHE. ALLE KOMPONENTE WERDEN IN DIESE FLASCHE GEMISCHT. [13]	11
ABBILDUNG 5: NEUBAUER CYTOMETER MIT RASTER ZUR ZELLZÄHLUNG. [14]	12
ABBILDUNG 4: EPPENDORF ZENTRIFUGE [16]	12
ABBILDUNG 6: 96-WELL-PLATE. WIRD ZUR DURCHFÜHRUNG DES ZELLSASSAYS BENÖTIGT. [15]	13
ABBILDUNG 8: MINI SPIN COLUMN MIT WASTETUBE (=COLLECTION TUBE) [16]	16
ABBILDUNG 7: BEHANDLUNG DER DNA IM MINI SPIN COLUMN MIT BUFFER AW2. [16]	16
ABBILDUNG 9: PIPETTIEREN DER LÖSUNG AUF DEN SPEKTROFOTOMETER. [16]	17
ABBILDUNG 10: VERLAUF DER WELLENLÄNGENABSORPTION DER DNA-PROBE DER ZELLLINIE M990922. DER QUOTIENT MIT BLAU UMKREIST. DIE KONZENTRATION MIT ROT. [16]	17
ABBILDUNG 11: GELELEKTROPHORESE-GERÄT. DIE BLAUEN BALKEN SIND DIE MIT PCR-PRODUKT UND FARBSTOFF BEFÜLLTEN LÖCHER. [16]	18
ABBILDUNG 12: RESAZURIN FLUORESCENZ SKALA DER ZELLLINIE M990922. [16]. FARBCODIERUNG: BLAU = KEINE LEBENDEN ZELLEN, ROT = VIELE LEBENDEN ZELLEN, GRÜN/GELB = LEBENDE ZELLEN	20

ABBILDUNG 13: A) SÄULENDIAGRAMM DER ZELLVIABILITÄT (ZELLDICHTE) BEI DMSO UND BEI 1000nM LGX 818-ZUGABE. B) LINIENDIAGRAMM DER ZELLVIABILITÄT IM VERLAUF VON 0.0001-10000nM INHIBITORZUGABE. C) BILD DER ZELLVIABILITÄT BEI DMSO. D) BILD DER ZELLEN BEI ZUGABE VON 1000nM LGX 818. [16]	21
ABBILDUNG 14: A) LINIENDIAGRAMM DER ZELLINIE M150506 IM VERLAUF DER ZUGABE DER VERSCHIEDENEN DURGKONZENTRATIONEN. B) SÄULENDIAGRAMM DER GEGENÜBERSTELLUNG VON DMSO UND 1000nM LGX 818. [16] ..	21
ABBILDUNG 15: A) LINIENDIAGRAMM VON M130227 IM VERLAUF DER VERSCHIEDENEN INHIBITORKONZENTRATIONEN. B) SÄULENDIAGRAMM DER ZELLINIE M130227 BEI DMSO UND BEI 1000nM LGX 818-ZUGABE. [16]	22
ABBILDUNG 16: A) SÄULENDIAGRAMM IM VERGLEICH VON DMSO UND 1000nM LGX818. B) LINIENDIAGRAMM DES VERLAUFES DER VERSCHIEDENEN INHIBITOR KONZENTRATIONEN. [16]	22
ABBILDUNG 17: A) SPHEROID DER ZELLINIE M990922 BEI DMSO. B) SPHEROID DER MIT 1000 nM LGX 818 BEHANDELT WURDE. ER ZEIGT ROTE PUNKTE AUF, DIESE SIGNALISIEREN TOTE ZELLEN. DIE GRÜNEN PUNKTE BEDEUTEN, DASS DIE ZELLEN NOCH LEBEN. [16]	23
ABBILDUNG 18: SÄULENDIAGRAMM ZU DEN BEI ABBILDUNG 16 AUFGEZEIGTEN SPHEROIDS. [16]	23
ABBILDUNG 19: GESAMTÜBERSICHT DER ZELLINIEN UNTER DER BEHANDLUNG MIT MEK162 [16]	24
ABBILDUNG 20: GESAMTÜBERSICHT DER 5 ZELLINIEN IM VERLAUF DER VERSCHIEDENSTARK HINZUGEFÜGTEN INHIBITOR KONZENTRATIONEN. [16]	25
ABBILDUNG 21: A) MIKROSKOPBILD DER ZELLEN BEI DMSO AUSSETZUNG. B) MIKROSKOPISCHES BILD DER ZELLEN, WENN SIE BEI 1000nM LGX 818 AUSGESETZT WERDEN C) SÄULENDIAGRAMM DER AUSSETZUNG DER ZELLEN VON DMSO UND 1000nM LGX 818. DIESES WIEDERSPIEGELT DIE ZELLVIABILITÄT VON A) UND B). [16]	26
ABBILDUNG 22: A) ZELLBILD DER ZELLEN BEI DMSO. B) BILD DER ZELLEN BEI INHIBITION VON 1000nM KONZENTRIERTEN LGX 818. [16]	27
TITELBILD 1: KREBSZELLEN [16]	1

6.3 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: VERWENDETE ZELLINIEN UND DEREN EIGENSCHAFTEN	11
TABELLE 2: ZELLKULTURMEDIUM FÜR MELANOMZELLEN (QUELLE: PERS. COMM. ANDRES DZUNG)	11
TABELLE 3: KONZENTRATION DER INHIBITOREN (QUELLE: PERS. COMM. ANDREAS DZUNG)	14
TABELLE 4: KOMPONENTE UND IHRES VOLUMEN FÜR PCR-REAKTIONEN	17
TABELLE 5: BELADUNG UND KONZENTRATION DER TREATMENTS	20

7 Anhang

7.1 Lexikon

Zellassay	Wird als Untersuchung zum Nachweis einer bestimmten Substanz definiert. Bei meinem Versuch war es ein Resazurin Zell-Viabilitäts-Assay. Das ist ein Assay bei dem man anhand der Fluoreszenz die zellulären metabolischen Aktivitäten herauslesen kann.
Trypsin	Ist ein Verdauungsenzym. Das Trypsin, das ich im Labor verwendet habe, war noch mit EDTA versetzt.
EDTA	Komplexbildner, der 2-wertige Kationen komplexiert. Somit kann das Trypsin nicht mehr gehemmt werden.
Resazurin	Ist ein Farbstoff. Er wird zur Messung der Zellviabilität verwendet.
Spheroids	Spheroids werden in einer speziellen <i>96-well-plate</i> geformt. Die Platte bringt die Zellen dazu sich zu einer Kugel zu formen.
Proto Onkogen	Es handelt sich um Gene die die Zellteilung, die Entwicklung und das Zellwachstum steuern.
Medium	Ein Medium ist eine Flüssigkeit in der bestimmte Zellen aufbewahrt und gezüchtet werden können. Nur für dieses Medium bestimmte Zellen überleben in der Flüssigkeit. Ich habe Melanom-Medium benutzt.
<i>96-well-plate</i>	Wird in Abbildung 7 gezeigt. Es ist eine Platte mit 96 Aushöhlungen.
Cytometer	Wird auf Abbildung 6 abgebildet. Es handelt sich um eine Glasplatte die zwei Gitternetze hat, auf denen man Zellen zählen kann.
Tecan Spark Plate Reader	Spektrophotometer, das <i>96-well-plates</i> auf verschiedene Kriterien liest und Ergebnisse aufzeigt.
Well	Ein well ist eine Aushöhlung auf der <i>96-well-plate</i> . Man kann Flüssigkeiten einfüllen und inkubieren.

7.2 Übersetzungen

<i>mitogen-activated protein kinase</i>	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
<i>pathway</i>	Pfad/Weg
<i>cell proliferation and differentiation</i>	Zellvermehrung und -differenzierung
<i>receptor tyrosine kinases</i>	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
<i>excessive growth and proliferation</i>	Übermässiges Wachstum und Vermehrung
<i>cell/s</i>	Zelle/n
<i>well/s</i>	Aushöhlung/en
<i>well-plate/s</i>	Aushöhlungsplatten/Lochplatten
<i>spheroids</i>	Kugeln/Sphären
<i>cell culture hood</i>	Zellkulturhaube (siehe S. 11, Abb. 2)
<i>multi-channel</i>	mehrkanalig
<i>masterplate</i>	Masterplatte
<i>treatment</i>	Behandlung
<i>tube/s</i>	Röhrchen
<i>excitation wavelength</i>	Anregungswellenlänge
<i>emission wavelength</i>	Emissions-Wellenlänge
<i>viability</i>	Zelldichte
<i>control</i>	Kontrolle
<i>assay</i>	Untersuchung
<i>relative centrifugal force</i>	Relative Zentrifugalkraft
<i>mini spin column</i>	Mini-Schleudersäule (siehe S. 16, Abb.8)
<i>wastetube = collection tube</i>	Sammelröhrchen
<i>reverse</i>	rückwärts-
<i>tray</i>	Tablett/Behälter
<i>preparation solution</i>	Vorbereitungslösung
<i>rounds per minute</i>	Runden pro Minute
<i>binding solution</i>	Bindungslösung
<i>diluted wash solution</i>	verdünnte Waschlösung
<i>forward</i>	vorwärts-
<i>live/dead ratio/s</i>	Lebend/Tot-Verhältnis/se

7.3 Transkriptionen

7.3.1 Interview Patient 1

Vorfall: 2020, Dezember.

C: Wie hast du bemerkt, dass du Hautkrebs hattest?

R: Ich war vor 5 Jahren das letzte Mal in einer Kontrolle und die Hautärztin habe mir dann gesagt ich müsse das Muttermal, es ist auf dem Rücken, wo ich es selber nicht sehe, beobachten. Und etwa vor eineinhalb Jahren hat meine Frau gesagt ich solle wieder zur Kontrolle, weil es sich verändert hatte. Es war eher eckig geworden und grösser. Und dann

ging ich zum Hausarzt und die haben dann nach der Kontrolle festgestellt, dass es sich verändert hat.

C: Warst du viel an der Sonne, dass es sich verändert hat?

R: Jetzt nicht. Früher war ich oft an der Sonne oder hatte auch ohne T-Shirt auf dem Bau gearbeitet. Ehm in der letzten Zeit war ich einfach im Sommer, in den Sommerferien und hatte mich aber immer gut eingecremt.

C: Ist es familienbedingt? Hatte es schon jemand in deiner Familie zuvor?

R: Nein. Also mein Vater hat einfach weissen Hautkrebs. Ehm das ich vermutlich familienbedingt, aber den schwarzen Hautkrebs hat niemand bei mir in der Familie.

C: Du hast es rausoperieren gelassen. Und wie lange hat die Operation gedauert?

R: Ehm also zuerst war ich ambulant bei der Hausärztin, dann hat sie einen Teil rausgeschnitten und eingeschickt. Wo sie dann gemerkt haben, dass es Hautkrebs ist, musste ich noch einmal in den Spital, um mehr rauszuschneiden und diese Operation hat etwa 3 Stunden gedauert. Also, die Operation selber nicht, aber bis ich wieder wach war. Das ging etwa 3 Stunden.

C: Wie gross war denn Muttermal geworden?

R: Also das Muttermal war über ein Zentimeter, aber das hat man nicht gesehen. Das war hinter dem Muttermal so zu sagen und ich glaub die Regel ist, wenn es grösser als 1 Zentimeter ist, muss noch mehr rausgeschnitten werden, deswegen ging das auch los.

C: Hattest du andere Symptome?

R: Nein überhaupt gar keine.

C: Hat es dich in deinem alltäglichen Leben beeinträchtigt, als du herausgefunden hast, dass du Hautkrebs hast?

R: Nein. Auch überhaupt gar nicht. Nur natürlich nach der Operation hatte ich paar Tage als ich mich erholen musste von der Operation.

C: In dem Fall hat es deine Familie auch nicht beeinträchtigt?

R: Nein, also ich war dann einfach bisschen ausser Gefecht, als ich im Spital war und konnte nicht mithelfen, so. Aber nein sonst war...

C: Aber wenn man so erfährt, dass man Hautkrebs hat, ist das nicht ein kleiner Schock?

R: Doch. Das war ein sogar grosser Schock, oder so. Und zum Teil wusste ich gar nicht was das ist, schwarzer und weisser Hautkrebs. Zum Teil wurde ich vom Arzt informiert und zum Teil hatte ich im Internet auch nachgelesen und da wurde der Schock immer grösser oder ich hatte

dann aufgehört, weil da gibt's auch ganz viel verschiedene Geschichten darüber, die einem auch Angst machen können.

C: Wie war dein psychischer Zustand in dem Moment, respektive während der ganzen Zeitspanne?

R: Also am Anfang hatte ich auch Angst oder auch eine Ohnmacht, weil ich gar nicht wusste was ich jetzt machen kann oder ob ich jetzt sterben werde, da geht einem alles durch den Kopf. Also jetzt geht es mir sehr gut oder ich habe das wie abgeschlossen, weil sie es auch sauber ausgeschnitten haben

. Für mich ist jetzt wieder ein normales Leben, aber zu Beginn hatte ich grosse Angst auch und ja, wusste nicht wie weiter, ob es jetzt schon fertig sei oder ob... ja.

C: Weisst du wie es dazu gekommen ist, dass du Krebs bekommen hattest?

R: Nein, es könnte aber sein, eben früher hatte ich oft auf dem Bau gearbeitet, ohne T-Shirt und hatte auch einige Sonnenbrände erwischt. Vielleicht ist das der Hintergrund, aber ich weiss es nicht von wo es kommt.

C: Hast du nachdem es wieder gut war, hast du dein Leben verändert? Oder hast du eher darauf geschaut, dass du nicht mehr so viel an der Sonne bist?

R: Also eigentlich, das war jetzt gut vor einem Jahr, oder nein vor einem Jahr hatte ich es herausgeschnitten und wir wollten eigentlich an Weihnachten an die Sonne an die Wärme und das war mir dann zu schnell wieder und ich ging dann nicht, da ging nur meine Familie weg und ich werde mich jetzt auch darauf achten im Sommer nicht zu oft oder sicher geschützt an die Sonne zu gehen.

7.3.2 Interview Patient 2

Vorfall: 2015, Juli.

C: First question: How did you notice that you had Melanoma?

G: Well, I have a lot of moles and I was... I had been seeing a dermatologist. I don't know why I started in the first place but I've been seeing a dermatologist over the years and had gone maybe a few years without having seen him and I noticed myself a mole in a place that I can see easily looked different than it had in the past and pretty soon after I realized that it looked different I made an appointment with my dermatologist and went in and saw him.

C: And can you describe how different it looked?

G: Well, I noticed that it had gotten larger and that the borders of the mole looked a little bit more irregular than they had before. It just looked larger and it looked like it was a little bit

more elevated of my skin and the margins by that I mean the edges of it looked a little bit different than I had remembered in the past and I looked at it and said: this is different.

C: But did it itch or something?

G: No, it didn't... I mean nothing. If I hadn't have actually seen it, I would have never really known that it was changed. And luckily it was in a place that I can see. If it had been on my back or some place that I can't see every day, I might not have caught it as early.

C: Do you know what could have triggered it?

G: Ehm... yes. Two things. One is that I do have a lot of moles and I think when you have a lot of moles you are predisposed to getting Melanoma. Secondly, is of course UV-light, too much sun.

C: So, were you not cautious enough?

G: I don't think I was more... I mean... I like to lay in the sun but I mean I'm not the one who goes down to the beach every day and lays out in the sun but like when I go to the beach or go swimming or something I like to lay out in the sun but I'm not like a tanner per se. But probably I could've... I mean you're not cautious if you don't sunscreen every time, you're in the sun so I'm guilty of not being cautious simply for not using sunscreen every time I'm exposed to the sun.

C: And what was your mental state when you found out about it?

G: You mean when I got the results back from the...

C: I mean it's a big change in a life when you get to know that you have cancer.

G: Well it's interesting because I've had a lot of injuries in the past. When you have injuries it's not a big deal as far as you know your life expectancy. But all of a sudden, I was put in a class where even though I believed it was likely a low-grade cancer I was still looking at charts of life expectancy. And for me that was... I mean it's... It helps... It makes you realize like your mortality when all of a sudden, you're wondering: Am I gonna survive? Even though I knew that it was like 95% survival rate if it was what I thought that it was gonna be. Still you're thinking that 5-10% of people with what I have die from this. So, I mean I was comfortable with the fact that it was gonna be okay, but for me it was the first time as an adult thinking: I made eye from this. And it... You know it kinda freaked me out and it makes you think a lot about like your family and your kids and you know how... what has your life been so far and have you done the things you wanna do and do your children love you and have you been a good person and stuff like that. I mean even though I knew it was gonna be okay it still makes you... And it seems silly for a cancer like this to be thinking this type of things but nonetheless

when you're looking at a survival chart for yourself it makes you think of these things, So it's very unsettling. At that point I didn't know how deep it was or whether it was metastasized or not, but I was just kinda...

C: Did it have any impact on your family?

G: I don't think that the girls knew, you'd have to ask Birgitta.

B: No, mhmh. Maybe we didn't tell you that it was malignant melanoma because you hear a lot of things. There was no reason the necessarily tell you. (→ speaking to his daughter.)

Yeah, same feelings that he had, I guess.

G: I guess the same.

C: Did you have other symptoms?

G: No nothing. I had no symptoms, whatsoever other than the fact that I had this tumor on my chest that I noticed.

C: And were you able to do everything like normally?

G: You mean before or after?

C: During. So, like when you found out that you had cancer and then after the operation.

G: Right. So, before the operation, nothing changed because it was so small, I had no limitation, no physical limitations. After the operation... I mean I had it resected in his office and I'm kind of thinking that maybe that have not been the best place, because I could tell when they were doing it. You know being a doctor myself, that they were having some difficulties and having some complications with it and I think that they got in a little bit deeper (not deeper into my skin but deeper than they should have been in an office setting) but with that set everything went fine but after the surgery I think for a while I was just limited in walking around. You know I couldn't, because I had a bunch of stiches in here, I couldn't really stretch it very much and so I had to be very careful for a while just to not like split open the stiches but like after it healed, no limitations. Just during the time where I had stiches, I had to be careful not to put too much tension on them by doing any other than just routine walking around. So, no working out or anything.

C: And you said that you had no limitation before you cut it out. But I mean you know that you have something like on your chest and you feel that you have something there. Didn't it limitate you in any way?

G: No because I mean I kind of knew... No, I didn't just because I... I mean it was just a cancerous mole that wouldn't stop me from doing anything because it didn't limit anything. I

mean psychologically did I have any? No, I don't think I had any limitations before they cut it out.

C: Did it change your life in the end?

G: I'm much better at wearing sunscreen now. I mean normally I never. If I were to go for a run or for a mountain bike ride, I would never put sunscreen on ever.

C: But now you do?

G: I try to remember to. I carry it in my mountain bike bag. I try to put it on before I go out for a run or something and if I don't remember to put it on and Birgitta says: Put your sunscreen on. You know before it would kinda be a little bit of a nag but now I'm like: Oh, thank you for reminding me. Because I need to put sunscreen on. I mean I still do not always but... So, no more sungod.

C: Did anybody in your family have it before?

G: I don't think anyone had it before... Ahh I take that back. Well I don't know the answer to that question. I think so. I think my uncle and my dad. But I think my uncle had it in a large birthmark. And I think my dad had... Did my dad have? (talking to his wife)

B: Mhmm. He's only had the white. Not malignant melanoma. They've had you know actinic keratosis.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich diese Maturitätsarbeit selbständig verfasst habe und keine anderen Hilfsmittel als die im Quellenverzeichnis aufgelisteten Quellen verwendet habe.

Ort, Datum:

Carmen Marrucchiello