

**Kombination zielgerichteter MAP-Kinasen-Inhibition
mit RIG-I Stimulation in
BRAF-mutierten Melanom-Modellen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Christian Norbert Hartmann Grützner

aus Bonn

2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Gunther Hartmann
2. Gutachterin: Prof. Dr. Jennifer Landsberg

Tag der mündlichen Prüfung: 06.03.2026

Aus dem Institut für klinische Chemie und klinische Pharmakologie

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Deutsche Zusammenfassung	9
1.1 Einleitung	9
1.2 Material und Methoden	12
1.2.1 Zellkultur und Stimulation	12
1.2.2 Genexpressionsanalyse	13
1.2.3 Experimente mit primären Immunzellen	13
1.2.4 Mausmodelle	14
1.3 Ergebnisse	15
1.3.1 Induktion von Apoptose	15
1.3.2 Untersuchung der Immunogenität	17
1.3.3 Auswirkungen auf Immunzellen	19
1.3.4 Primäres Melanom-Mausmodell	20
1.3.5 Transplantiertes Melanom-Mausmodell	21
1.4 Diskussion	27
1.5 Zusammenfassung	31
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	32
2. Veröffentlichung	39
3. Erklärung zum Eigenanteil	40
4. Danksagung	41

Abkürzungsverzeichnis

3pRNA	5'-triphosphorylierte doppelsträngige RNA
BMDM	Murine induzierte Makrophagen aus Knochenmark (Murine bone marrow derived macrophages)
BRAF	Serin/Threonin-Proteinkinase (v-raf murines Sarkoma virales Onkogen Homolog B1)
C57BL/6J	C57 black 6 (Labormaus)
CA21	Doppelsträngige 21-Basen 5'-Cytosin-Adenin RNA
CCL5	CC-Chemokin-Ligand-5
CD	Oberflächenmerkmal (Cluster of Differentiation)
cDC	Konventionelle dendritische Zelle
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Modifizierte phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (Epidermal growth factor, EGF)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Serin/Threonin-Proteinkinase (Extracellular-signal Regulated Kinase)

FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting)
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal calf serum)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-Puffer
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP10	Interferon- γ -induced protein 10 (auch: C-X-C motif chemokine ligand 10, CXCL10)
KG	Körpergewicht
MAP-Kinasen	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cell
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (Pathogen-associated molecular pattern)
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
p/s	Penicillin und Streptomycin (als Zellkultur-Zusatz)
RAG1	Recombination activating gene 1

RIG-I	Retinoic acid inducible gene I
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Steigende Inzidenzen über die vergangenen Dekaden und eine schlechte Prognose in fortgeschrittenen Stadien sind charakteristisch für das malignes Melanom (Garbe et al., 2022a; Siegel et al., 2024). In frühen Stadien verspricht eine komplette Resektion Kuration. Bei nachgewiesener Metastasierung ist eine systemische Therapie in adjuvanter oder definitiver Intention indiziert. Hier sind über die vergangenen Jahre viele Optionen hinzugekommen. Dennoch stellen nicht-resektable Melanome eine große Herausforderung dar. Bei einem relevanten Teil der Patienten kann keine langfristige Tumorkontrolle erreicht werden (Garbe et al., 2022b).

Pathophysiologisch spielt die Kinase BRAF eine wichtige Rolle im Melanom. In etwa der Hälfte aller Melanome zeigt sich BRAF aktivierend mutiert. Circa 90 % der Mutationen bedingen einen Aminosäuren-Austausch an Position 600. Meist wird Valin (V) durch Glutaminsäure (E) ersetzt (BRAFFV600E). Dies führt zu einer konstitutiven Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs in Melanom-Zellen, indem die mutierte Kinase BRAF MEK phosphoryliert und schließlich ERK durch MEK phosphoryliert wird. Dies übersetzt sich in unkontrolliertes Überleben und Wachstum (Davies et al., 2002; Long et al., 2011). Die Aufklärung dieses Pathomechanismus mündete in die Entwicklung zielgerichteter Kinase-Inhibitoren (Chapman et al., 2011; Samatar und Poulikakos, 2014). Hierbei handelt es sich um niedermolekulare Verbindungen, welche oral verfügbar sind. Sofern möglich, stellt die kombinierte adjuvante oder definitive BRAF- und MEK-Inhibition einen etablierten Behandlungsstandard im fortgeschrittenen, BRAF-mutiertem Melanom dar (Hauschild et al., 2018; Robert et al., 2015). Trotz hoher initialer Ansprechraten zeigt sich selbst unter dualer Kinasen-Inhibition eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von lediglich etwa 30 %. (Garbe et al., 2022b)

Kurz nach Einführung der zielgerichteten Therapien veränderte eine weitere Substanzklasse die Therapielandschaft im malignen Melanom grundlegend. Mittels Immuncheckpoint-Inhibition gelang es immun-unterdrückende Signalwege zu durchbrechen und so eine adaptive anti-Tumor Immunantwort zu induzieren. Die

Zulassung des gegen CTLA-4 gerichteten Immuncheckpoint-Inhibitors Ipilimumab markierte den Beginn der klinischen Anwendung einer Substanzklasse, welche in vielen Tumorentitäten die Prognose deutlich verbesserte (Hodi et al., 2010). Neben der Blockade von CTLA-4 konnte auch die Unterdrückung von Immuncheckpoints der PD-1-Achse erfolgreich in die Klinik translatiert werden. Obgleich eine duale Immuncheckpoint-Inhibition mit vermehrten Nebenwirkungen einhergeht, konnte das Überleben weiter verbessert werden (Larkin et al., 2015). Langfristige Remissionen in einem relevanten Teil der Patienten erscheinen durchaus möglich, jedoch zeigen sich auch hier viele Patienten progredient oder die Therapie muss aufgrund von intolerabler Toxizität abgebrochen werden (Garbe et al., 2022b). Neue neoadjuvante Therapiekonzepte mit Immuncheckpoint-Inhibitoren unterstreichen die Möglichkeiten, die aus einer gezielten Immunmodulation resultieren (Blank et al., 2024; Patel et al., 2023).

Durch die Kombination etablierter Therapien konnte in vielen onkologischen Entitäten das Behandlungsergebnis weiter verbessert werden. Insbesondere Kombinationen aus verschiedenen Therapiemodalitäten haben das Potenzial sich möglicherweise synergistisch zu ergänzen. So gibt es gute präklinische Evidenz, welche eine Kombination von zielgerichteter Kinasen-Inhibition mit Immuntherapie unterstützt. Unter BRAF-Inhibition, teilweise auch unter MEK-Inhibition erhöhte Antigen-Expression, ein gesteigertes Immunzell-Infiltrat in einem weniger immunsuppressiven Tumormilieu legen Kombinationen mit Immuntherapien nahe, auch wenn paradoxe MAP-Kinasen-Aktivierung unter BRAF-Inhibition oder Immunzell-Inhibition unter MEK-Inhibition limitierend wirken könnten (Hu-Lieskovan et al., 2014). Erste Studien, die Kinasen- mit Immuncheckpoint-Inhibition kombinierten, konnten bislang keine überzeugenden Effekte auf das Gesamtüberleben zeigen, resultierten aber in relevant gesteigerter Toxizität (Ascierto et al., 2023; Dummer et al., 2022).

Das angeborene Immunsystem besitzt ein breites Repertoire an Rezeptoren, welche in der Lage sind pathogenassoziierte Muster (PAMP) zu erkennen. Dies ermöglicht eine erste, schnelle Reaktion gegen Pathogene, welche im Verlauf in eine zielgerichtetere, adaptive, jedoch auch später einsetzende Immunantwort übergehen kann. Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) ist einer dieser Rezeptoren. Er gehört zu der Gruppe der RIG-I-like-Rezeptoren und war der erste bekannte Vertreter dieser Gruppe. RIG-I ist nahezu

ubiquitär im Zytosol exprimiert. Hier erkennt RIG-I das nicht modifizierte 5'-triphosphorylierte Ende von Doppelstrang-RNA. Als Reaktion auf detektierte RNA werden vermittelt über das mitochondriale antivirale Signalprotein (MAVS) hauptsächlich proinflammatorische NF- κ B-, Typ-I- und Typ-III-IFN Antworten aktiviert. Es ist möglich RIG-I durch synthetische Liganden zu stimulieren (Bartok und Hartmann, 2020). Obgleich die Erkennung pathologischer Nukleinsäure-Muster durch RIG-I primär der Infektionsabwehr dient, zeigte sich artifizielle RIG-I Stimulation auch im Kontext onkologischer Erkrankungen als vielversprechend. Eine Typ-I- und Typ-III-Interferon-Antwort kann eine antineoplastische Immunreaktion initiieren und führt darüber hinaus insbesondere in malignen Zellen zur Apoptose (Besch et al., 2009; Poeck et al., 2008). Die durch RIG-I Stimulation induzierte Apoptose ist zudem immunogen (Duewell et al., 2014). Als immunogener Zelltod wird ein Zelltod bezeichnet, welcher in der Lage ist eine antitumorale Immunantwort auszulösen (Galluzzi et al., 2023). Bereits für verschiedene Entitäten wie beispielsweise für das Pankreaskarzinom, das Melanom, das Glioblastom, das Mammakarzinom oder aber für die akute myeloische Leukämie konnte präklinisch der Vorteil einer RIG-I Stimulation belegt werden (Elion et al., 2018; Ellermeier et al., 2013; Glas et al., 2013; Poeck et al., 2008; Ruzicka et al., 2020). Die vielversprechenden Daten führten schließlich zu ersten klinischen Studien. Hier zeigte sich eine gute Verträglichkeit, jedoch zeigte sich das Gesamtüberleben durch eine alleinige RIG-I Stimulation nicht verbessert (Moreno et al., 2022). Daher verschiebt sich der Fokus RIG-I agonistischer Therapien im Kontext onkologischer Erkrankungen zunehmend auf Kombinations-Ansätze. So konnte zuletzt im präklinischen Modell gezeigt werden, dass RIG-I Stimulation im Melanom das Gesamtüberleben einer Radiatio p53 abhängig steigert (Lambing et al., 2023).

Zielsetzung

Im fortgeschrittenen Melanom besteht weiterhin eine dringende Notwendigkeit, die therapeutische Prognose zu verbessern. Für den Ansatz BRAF- und MEK-Inhibition mit RIG-I Stimulation zu kombinieren fehlen jedoch Daten, obgleich die duale Kinasen-Inhibition dem aktuellen Behandlungsstandard im Melanom entspricht (Garbe et al., 2022b). Ziel der vorliegenden Arbeit war es vor diesem Hintergrund die Kombination aus zielgerichteter Therapie mittels MAP-Kinasen-Inhibition mit RIG-I Stimulation *in vitro*

sowie *in vivo* im BRAF-mutierten Melanom weiter zu untersuchen. Zunächst galt es herauszufinden, ob *in vitro* ein gesteigerter Zelltod erreicht wird. Es ist bekannt, dass durch RIG-I Stimulation ein immunogener Zelltod ausgelöst wird. Die damit verbundene möglicherweise proinflammatorische *in vitro* Zytokin-Antwort zu charakterisieren, stellte ein weiteres Ziel dieser Arbeit dar. Darüber hinaus galt es zu evaluieren, ob sich BRAF- und MEK-Inhibition im Kontext von RIG-I Stimulation inhibierend auf Immunzellen auswirken. Außerdem sollte herausgefunden werden, ob sich schlussendlich *in vivo* ein Überlebensvorteil translatiert. Hierfür sollten sowohl ein primäres murines Tumormodell mit induzierter autochthoner Tumorgenese als auch ein orthotropes, transplantiertes Mausmodell untersucht werden. Abschließend sollten Tumore des transplantierten Mausmodells im Hinblick auf eine Immunzellaktivierung untersucht werden.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Zellkultur und Stimulation

Für den *in vitro* Teil dieser Arbeit wurden die humane BRAFV600E-mutierte A375-Zelllinie sowie die BRAF-nicht-mutierte humane MA-MEL48-Zelllinie in DMEM mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS), 100 Units Penicillin sowie 100 µg Streptomycin pro mL Medium (p/s) (alles Thermo Fisher Scientific) kultiviert. Die YUMM1.7-Zelllinie weist die zur humanen BRAFV600E-Mutation homologe BRAFV637E-Mutation auf und wurde in DMEM/F-12, GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific) angereichert mit FCS, p/s und nicht-essentiellen Aminosäuren (Thermo Fisher Scientific) kultiviert. Alle Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert sowie regelmäßig auf Mykoplasmen-Kontamination hin untersucht. Die Stimulation von RIG-I erfolgte mittels chemisch synthetisierter 5'-triphosphorylierter Doppelstrang-RNA (3pRNA). Als Kontrolle diente eine inerte RNA CA21 (5'-CACACACACACACACACAC-3'). Zur Transfektion wurde die RNA mit dem lipidbasierten Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher Scientific) gemäß Herstellerangaben komplexiert. Dabrafenib (MedChem Express) und Trametinib (Selleck Chemicals) wurden in geringen Mengen DMSO gelöst und DMSO immer in der maximal eingesetzten Konzentration als Vehikel Kontrolle mitgeführt. Um durchflusszytometrisch den Zelltod zu quantifizieren, wurden in flachen 96-Well Zellkulturplatten (Techno Plastic Products) je 10.000 (YUMM1.7) bis 20.000 (A375 und MA-MEL48) Zellen expandierend

ausplattiert und wie angegeben behandelt. Für die Messung wurden die Zellen mittels Trypsins 0,25 % (Thermo Fisher Scientific) abgelöst und mit Annexin V Alexa Fluor® 647 (BioLegend) gefärbt, welches 1:30 in einem selbst hergestellten Annexin-Puffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) verdünnt wurde. Nach einem Wasch-Schritt wurden die Zellen in Annexin-Puffer resuspendiert und mit Aminoactinomycin D (Enzo Life Sciences) in einer finalen Konzentration von 1,25 µg/mL versetzt. Die Messung erfolgte in einem Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific).

Für die Quantifizierung der Zytokine in den Zellkulturexperimenten wurden LEGENDplex™ (BioLegend) Zytokin Multiplex-Assays verwendet. Humane Zytokine wurden mit dem „COVID-19 Cytokine Storm Panel (14-plex)“ Kit (BioLegend 741089) und murine Zytokine mit dem „Mouse Anti-Virus Response Panel (13-plex)“ Kit (BioLegend 740622) eingemessen. Die Reagenzien wurden verdünnt und die eingesetzten Volumina entsprechend angepasst. Die Analyse erfolgte unter Zuhilfenahme der cloudbasierten LEGENDplex™ Data Analysis Software Suite.

1.2.2 Genexpressionsanalyse

Für die RNA-Sequenzierung erfolgte zunächst eine RNA-Extraktion der gewonnenen Proben mittels des RNeasy Mini Kits (Qiagen). Die mRNA wurde mittels Poly-A Anreicherung unter Zuhilfenahme des NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs) aufbereitet. Das NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit wurde mit Sample Purification Beads und NEBNext® Multiplex-Oligos for Illumina® (alles New England Biolabs) zur Vorbereitung der Bibliothek verwendet. Die Sequenzierung erfolgte schließlich in einem Illumina NextSeq (Illumina). Für die weitere Auswertung sei auf Grützner et al. (2024) verwiesen.

1.2.3 Experimente mit primären Immunzellen

Alle Experimente mit humanen PBMC erfolgten mit Genehmigung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn (Aktenzeichen 515/20). Die Isolation von PBMC erfolgte mittels Ficoll®-Dichtegradienten-Zentrifugation (Cytiva). Jeweils 200.000 Zellen pro Well wurden in flachen 96-Well Zellkulturplatten gemäß den angegebenen Konditionen behandelt. Murine induzierte Makrophagen aus Knochenmark (Murine bone

marrow derived macrophages (BMDM)) wurden von C57BL/6J-Mäusen durch Kultivieren von murinen Knochenmarkszellen in Anwesenheit von 30 % L929 Überstand für sieben Tage gewonnen. Diese wurden in Konzentrationen von 100.000 Zellen pro Well ebenfalls in flachen 96-Well Zellkulturplatten ausplattiert und wie angegeben behandelt. Die Zytokin-Messungen im Rahmen der Experimente mit primären Immunzellen erfolgten mittels ELISA. Zur Quantifizierung des humanen IFN α wurden in 96-Well Mikrotiterplatten (high binding, von Greiner Bio-One) ein Anti-human-IFN α -Antikörper, ein humanes IFN α -Standard-Protein und ein HRP-konjugierter Anti-human-IFN α -Antikörper (alles Thermo Fisher Scientific) verwendet. Murines IFN α wurde in 96-Well Mikrotiterplatten (half area, high-binding von Greiner Bio-One) durch einen Ratte-anti-Maus-IFN α -Antikörper (Klon: RMMA-1, PBL Assay Science) gebunden. Mittels rekombinanten murinen IFN α wurde eine Standardkurve angelegt. Ein polyklonaler Hase-anti-Maus-IFN- α -Antikörper (PBL Assay Science) diente als Sekundärantikörper, an welchen ein Ziegen-anti-Hase-IgG-HRP-Konjugat-Antikörper (Bio-Rad Laboratories) gebunden wurde. So konnten die Zytokin-Konzentrationen in einer HRP-Reaktion quantifiziert werden.

1.2.4 Mausmodelle

Sämtliche *in vivo* Experimente erfolgten mit Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (Aktenzeichen: 81-02.04.2020.A156). Für die Versuche im primären Melanom-Mausmodell wurden B6.Cg-Tg(Tyr-cre/ERT2)13Bos *Braf^{tm1Mmcm} Pten^{tm1Hwu}/BosJ* (BRaf^{CA}, Pten^{loxP}, Tyr::CreERT²) Mäuse von Jackson Laboratory erworben und gezüchtet (RRID:IMSR_JAX:013590) (Dankort et al., 2009). Tieren beider Geschlechter wurde im Alter von 6 bis 8 Wochen topisch 2 μ L 5 mM 4-Hydroxytamoxifen (Sigma-Aldrich) appliziert, um dadurch das Melanom-Wachstum zu induzieren. Für die Versuche im transplantiertem Melanom-Mausmodell wurden 100.000 YUMM1.7-Zellen in Dulbecco's Balanced Salt Solution (DPBS, Thermo Fisher Scientific) gelöst und in die rechte Flanke von C57BL6/J Mäusen (Janvier Labs) intrakutan injiziert. Nach Etablierung der Tumore erfolgte eine randomisierte Einteilung in Therapiegruppen. Zwecks BRAF-Inhibition wurde Dabrafenib als Mesylat in einer Dosierung von 30 mg/kg KG, zwecks MEK-Inhibition Trametinib in einer Dosierung von 0,6 mg/kg KG (beides MedChem Express) in wässriger Suspension mit 0,5 % (w/v)

Hydroxypropylmethylcellulose und 0,2 % (v/v) Tween[®] 80 (beides Sigma-Aldrich) gastral verabreicht. Die Stimulation von RIG-I erfolgte mit dem gleichen Agonisten unter Verwendung der gleichen Kontroll-RNA, wie sie für die *in vitro* Experimente eingesetzt wurden. Es wurden jeweils 20 µg RNA intratumoral verabreicht. Für die Transfektion erfolgte eine Komplexierung der RNA mit jetPEI[®] (Polyplus Transfection) nach Herstellerangaben. Um die immunphänotypische Analyse der Tumore und der Tumordrainierenden Lymphknoten durchführen zu können, wurden diese nach Präparation für 20 Minuten in 2 mL Kollagenase 1 mg/mL (Roche) mit 1 % FCS (Thermo Fisher Scientific) bei 37 °C inkubiert und anschließend hieraus unter Zuhilfenahme eines 70 µm Siebs eine Zellsuspension gewonnen. Zur Ermittlung der viablen Zellen wurde das Zombie Aqua[™] Fixable Viability Kit (BioLegend) verwendet. Anschließend wurden die Zellen in selbst hergestellten FACS-Puffer bestehend aus DPBS mit 10 % FCS, 2 mM EDTA (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) und 0,05 % Natriumazid (Carl Roth) suspendiert und zur Reduktion unspezifischer Antikörperbildung mittels Anti-CD16/CD32 Antikörper (Mouse BD Fc Block[™], Becton Dickinson) eine Fc-Rezeptor-Blockade durchgeführt. Es wurden Oberflächenmerkmale mit folgenden Antikörper-Konjugaten mit Fluoreszenz-Farbstoffen gefärbt: PerCP-Anti-CD45, Brilliant Violet 785[™]-Anti-CD8a, Brilliant Violet 650[™]-Anti-NK1.1, Alexa Fluor[™] 647-Anti-CD69, Brilliant Violet 421[™]-Anti-CD11c, Brilliant Violet 650[™]-Anti CD11b, Alexa Fluor[™] 488-Anti MHC-II I-A/I-E, Brilliant Violet 785[™]-Anti CD86, PE/Cyanine7-Anti-CD69 (alles BioLegend), PE/Cyanine7-Anti-CD4 (Thermo Fisher Scientific) und PE-Anti-CD4 (Becton Dickinson). Nach Suspension in FACS-Puffer erfolgte die Messung in einem Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific). Die primäre Analyse sämtlicher Durchflusszytometrie-Daten erfolgte mittels der FlowJo Software 10.8.1 (Becton Dickinson).

Die statistische Auswertung erfolgte computergestützt mittels Prism 9 Software (Version 9.4.1) (GraphPad Software). Im Allgemeinen wurde ein $p < 0,05$ als signifikant erachtet.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Induktion von Apoptose

Initial wurde die Kombination aus RIG-I Stimulation mit alleiniger und kombinierter BRAF- und MEK-Inhibition in Hinblick auf den Zelltod analysiert. Es ist bekannt, dass beide

Therapiemodalitäten einen Zelltod induzieren können (Brägelmann et al., 2021). Hierfür wurden A375 sowie YUMM1.7 mit Inhibitoren behandelt und RIG-I simultan über die Transfektion einer 3pRNA stimuliert oder eine Kontroll-RNA (CA21) transfiziert. Als Zelllinie, die der BRAF-Inhibition nicht zugänglich ist, wurde MA-MEL48 verwendet. Durchflusszytometrisch wurde nach 48 Stunden die Apoptose quantifiziert, indem Phosphatidylserin mit fluoreszenzmarkiertem Annexin V und mittels 7-Amino-Actinomycin die DNA nekrotischer Zellen gefärbt wurde. Als vitale Fraktion wurden Zellen gewertet, die sich weder für Phosphatidylserin noch für DNA anfärben ließen. Es zeigte sich in A375 in den nicht RIG-I agonistisch behandelten Gruppen ein moderater jedoch signifikanter Anstieg der Fraktion toter Zellen unter kombinierter BRAF- und MEK-Inhibition (Abb. 1A). In MA-MEL48 zeigte sich ein signifikant gesteigerter Zelltod mit alleiniger MEK-Inhibition, welcher durch die zusätzliche BRAF-Inhibition leicht erhöht werden konnte (Abb. 1B). Eine alleinige BRAF-Inhibition zeigte erwartungsgemäß keine Effekte. In YUMM1.7-Zellen konnte sowohl die alleinige BRAF- oder MEK-Inhibition als auch deren Kombination die Fraktion toter Zellen steigern (Abb. 1C). Verglichen mit den nicht stimulierten Bedingungen zeigte die Kontroll-Transfektion keine relevanten Effekte. Wurde nun mittels 3pRNA RIG-I stimuliert, so ließ sich allein hierdurch in allen drei Zelllinien ein signifikant erhöhter Zelltod erreichen. Durch die Hinzunahme von BRAF-Inhibition konnte die Fraktion toter Zellen in A375 und in YUMM1.7 erwartungsgemäß nicht jedoch in MA-MEL48 weiter gesteigert werden. Die MEK-Inhibition führte in allen drei Zelllinien zur weiteren Steigerung des Zelltods. Zuletzt ließ sich mit einer etwa 80-prozentigen Fraktion toter Zellen in allen drei Zelllinien der ausgeprägteste Effekt in der Dreifachkombination aus BRAF- und MEK-Inhibition sowie RIG-I Stimulation feststellen, welcher in MA-MEL48 dem der Kombination aus MEK-Inhibition und RIG-Stimulation entsprach (Abb. 1).

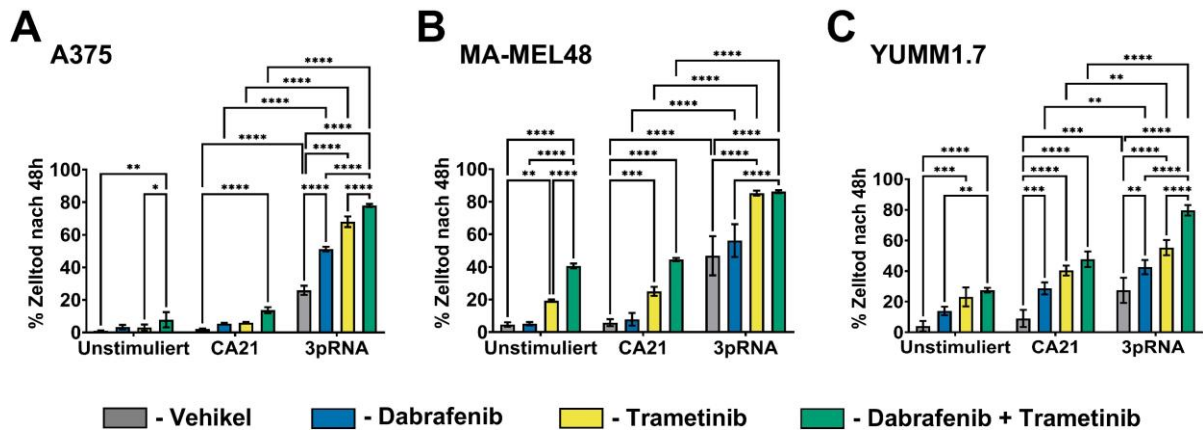


Abb.1: Zelltod gemessen nach 48 h. Versuchsaufbau: Die genannten Zelllinien wurden 24 h vor Behandlung expandierend ausplattiert. RIG-I wurde durch 1000 ng/mL 3pRNA unter Zuhilfenahme von Lipofectamin™ 2000 stimuliert. 1000 ng/mL inerte CA21-RNA diente als Transfektions-Kontrolle. Simultan wurden der BRAF-Inhibitor Dabrafenib in einer Konzentration von 1000 nM und/oder der MEK-Inhibitor Trametinib in einer Konzentration von 100 nM hinzugegeben. DMSO diente als Vehikel für die Inhibitoren. Der Zelltod wurde durchflusszytometrisch quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (N=3). Statistische Auswertung: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Turkey post hoc Test. Nur signifikante Vergleiche wurden gezeigt. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$. Gezeigt sind Mittelwerte mit SD. Adaptiert aus Grützner et al. (2024).

1.3.2 Untersuchung der Immunogenität

Es ist bekannt, dass durch RIG-I Stimulation eine immunogene Form des Zelltods ausgelöst wird (Düwell et al., 2014). Dieser ist unter anderem durch die Freisetzung inflammatorischer Zytokine im Rahmen einer Typ-I-IFN-Antwort, insbesondere durch IP10 gekennzeichnet (Galluzzi et al., 2023). Um zu analysieren, ob auch unter Kinasen-Inhibition der wie zuvor nachgewiesen durch RIG-I Stimulation gesteigerte Zelltod ebenfalls immunogen ist, wurden Multiplex-Zytokin-Assays verwendet. Innerhalb von 24 Stunden nach RIG-I Stimulation mit einer 3pRNA in einer Dosierung, wie sie für die Apoptose-Analysen verwendet wurde, zeigte sich erwartbar eine starke Freisetzung von IP10, IL6, CCL5 und IFN- α in humanen A375 und murinen YUMM1.7. Diese Zytokin-Signatur ließ sich ebenfalls in den mit Inhibitoren behandelten Gruppen nachweisen, obgleich sich die Konzentration der Zytokine unter Inhibition etwas vermindert zeigte (Abb. 2).

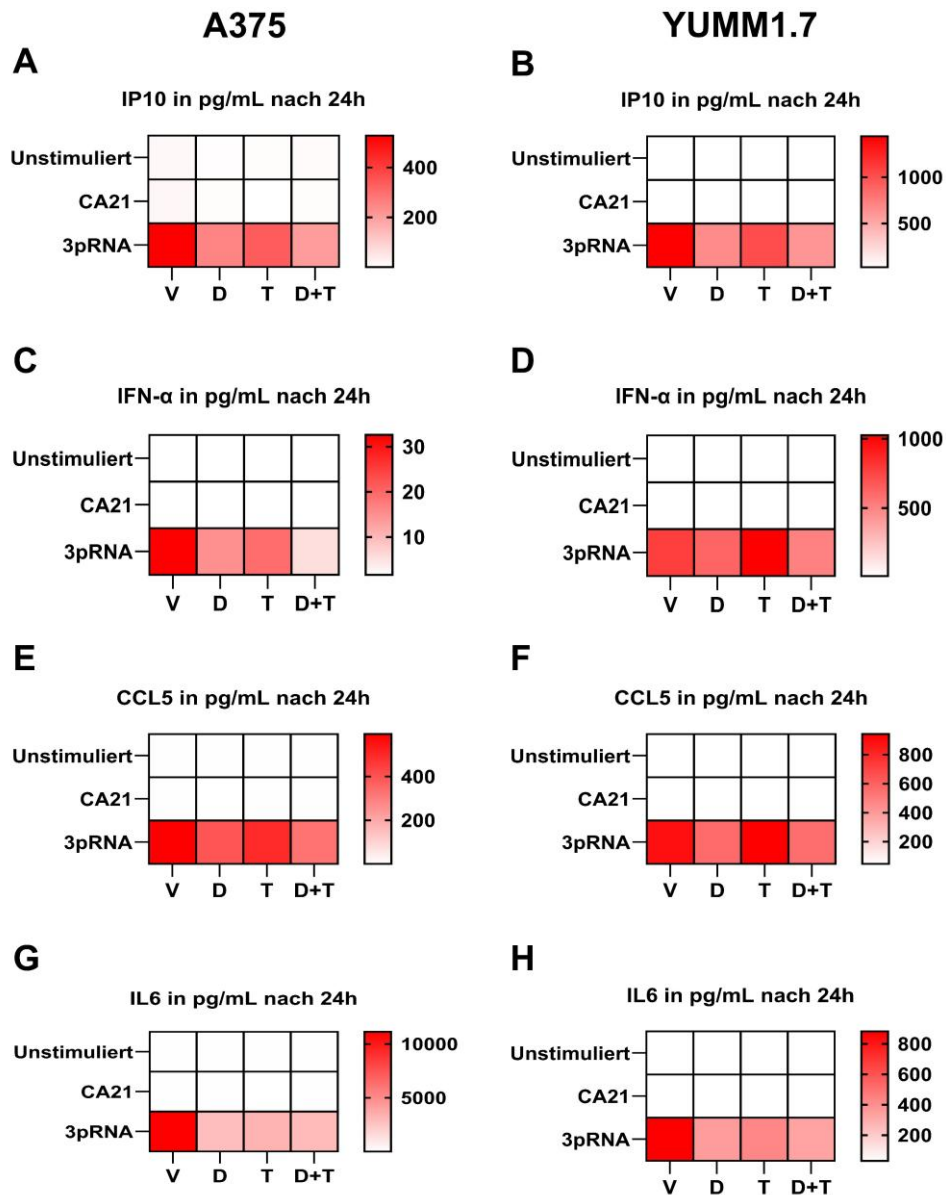


Abb. 2: Detailliertes Zytokin Profil 24 h nach Stimulation von A375 und YUMM 1.7. Der Versuchsaufbau entspricht dem in Abb. 1. RIG-I wurde durch 1000 ng/mL 3pRNA stimuliert. 1000 ng/mL inerte CA21-RNA diente als Transfektions-Kontrolle. Simultan wurden Dabrafenib (D) in einer Konzentration von 1000 nM und/oder Trametinib (T) in einer Konzentration von 100 nM hinzugegeben. DMSO diente als Vehikel (V) für die Inhibitoren. Die Zytokine wurden mittels Multiplex-Assays quantifiziert. (A) IP10 in A375. (B) IP10 in YUMM1.7. (C) IFN- α in A375. (D) IFN- α in YUMM1.7. (E) CCL5 in A375. (F) CCL5 in YUMM1.7. (G) IL6 in A375. (H) IL6 in YUMM1.7. Gezeigt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten (N=5). Adaptiert aus Grützner et al. (2024).

Weitergehende explorative Transkriptom-Analysen konnten diese Ergebnisse zusätzlich stützen (Grützner et al., 2024).

1.3.3 Auswirkungen auf Immunzellen

Vor dem Hintergrund der eingesetzten Inhibitoren wurde nun getestet, ob diese einen Einfluss auf Immunzellen, speziell auf die Responsivität nach RIG-I Stimulation, haben. Hierfür wurden zunächst humane PBMC aufgereinigt und in An- oder Abwesenheit von BRAF- und MEK-Inhibitoren mit 3pRNA RIG-I agonistisch oder mit CA21 als Kontroll-RNA transfiziert. 24 Stunden später wurde die Konzentration von IFN- α mittels ELISA gemessen. Es zeigte sich erwartbar eine deutliche Freisetzung von IFN- α nach Stimulation von RIG-I, nicht jedoch nach Transfektion mit CA21. Diese zeigte sich weiterhin nicht durch eine BRAF-Inhibition vermindert. Auch wenn die MEK-Inhibition eine leichte Verminderung des IFN- α bewirkte, zeigte sich diese nicht signifikant. Nur die doppelte Kinasen-Inhibition führte zu einer, im Vergleich zur gänzlich nicht therapierten Gruppe, signifikanten Verminderung von IFN- α . Verglichen mit der Vehikel-Kontrolle ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied (Abb. 3 A). Zur weiteren Validierung im murinen Modell wurde ein Versuch mit induzierten murinen Makrophagen (BMDM) durchgeführt, die wie zuvor beschrieben aus *in vitro* kultiviertem Knochenmark differenziert worden waren. Auch hier konnte erwartbar durch eine RIG-I Stimulation, nicht jedoch durch Transfektion von CA21, IFN- α freigesetzt werden. Die Anwesenheit eines BRAF-Inhibitors, eines MEK-Inhibitors oder beider Inhibitoren führte in diesem Versuch zu keiner relevanten Inhibition der IFN- α Freisetzung (Abb. 3 B).

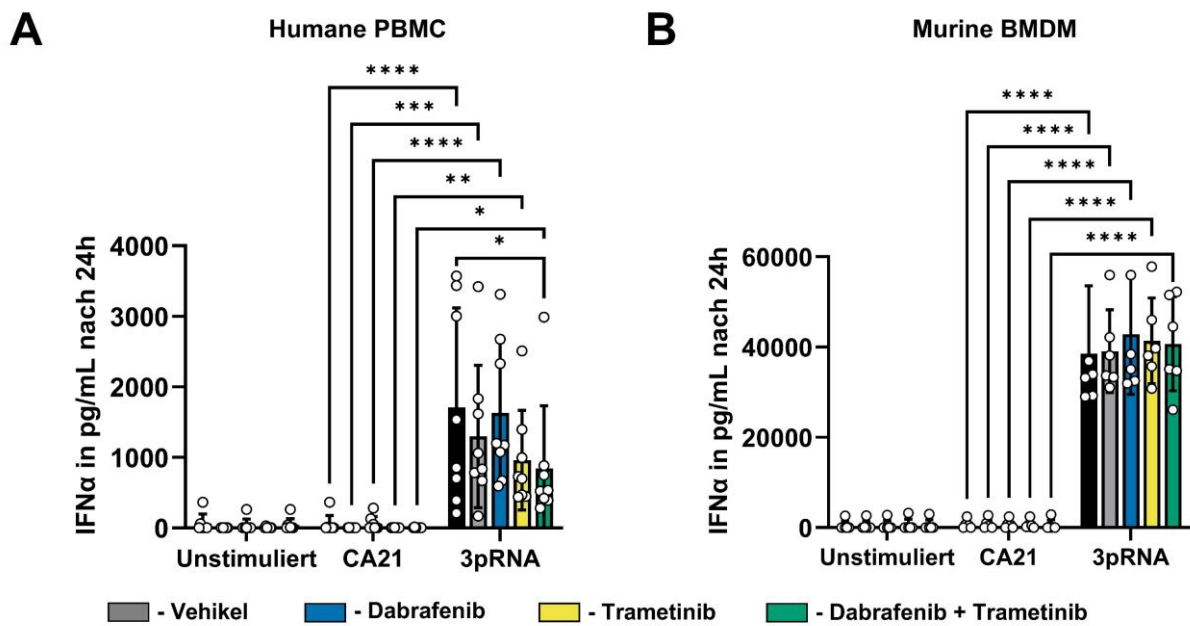


Abb. 3: Effekt von Kinasen-Inhibition auf RIG-I Stimulation in Immunzellen. Versuchsaufbau: Humane PBMC und murine BMDM wurden in An- oder Abwesenheit von Dabrafenib und Trametinib wie in den vorausgegangenen Versuchen mit 3pRNA stimuliert. Nach 24 h wurde mittels ELISA die Konzentration von IFN- α in den Überständen bestimmt. (A) Daten für humane PBMC von acht Donoren (N=8). (B) Daten für murine BMDM von sechs Versuchstieren (N=6). Statistische Auswertung: Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Turkey post hoc Test. Nur signifikante Vergleiche wurden gezeigt. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$. Gezeigt sind Mittelwerte mit SD. Adaptiert aus Grützner et al. (2024).

1.3.4 Primäres Melanom-Mausmodell

Um herauszufinden, ob sich ein *in vitro* gesteigerter, immunogener Zelltod auch in ein verlängertes Überleben translatiert, folgten *in vivo* Versuche. Durch die topische Behandlung von B6.Cg-Tg(Tyr-cre/ERT2)13Bos *Braf^{tm1Mmcm} Pten^{tm1Hwu}/BosJ* Mäusen mit 4-Hydroxytamoxifen kam es durch Cre-vermittelte Rekombination zeitgleich zur heterozygoten Ausprägung einer aktivierenden BRAF-Mutation, sowie zur homozygoten Deletion des Tumorsuppressors Pten. Wie mittlerweile auch durch den Distributor Jackson Laboratory angegeben, zeigt das Modell ein ausgeprägtes spontanes Tumorwachstum an unbehandelten Stellen und in Tamoxifen-naiven Mäusen (THE JACKSON LABORATORY, 2025). Dies erschwerte die Beurteilung des Tumorstatus der Mäuse bei Behandlungsstart und damit deren akkurate Eingruppierung. Daher wurden in

diesem Versuch nur drei Gruppen verglichen. Neben einer nicht therapierten Kontrollgruppe wurden zwei Gruppen täglich mit BRAF- und MEK-Inhibitoren behandelt und hier der Vergleich zwischen der zweimal wöchentlich intratumoral applizierten RIG-I agonistischen 3pRNA und der inerten CA21-Transfektionskontrolle evaluiert. Die Therapie wurde für drei Wochen durchgeführt. Auch wenn sich insbesondere im Vergleich zur Kontrollgruppe eine leichte Tendenz zu einem verlängertem Überleben in der mit Kinasen-Inhibition und RIG-I Stimulation behandelten Gruppe zeigte, so wurde dieser Unterschied, selbst ohne statistische Korrektur für Mehrfachvergleiche, bei der verfügbaren Gruppengröße nicht signifikant (siehe Abb. 4).

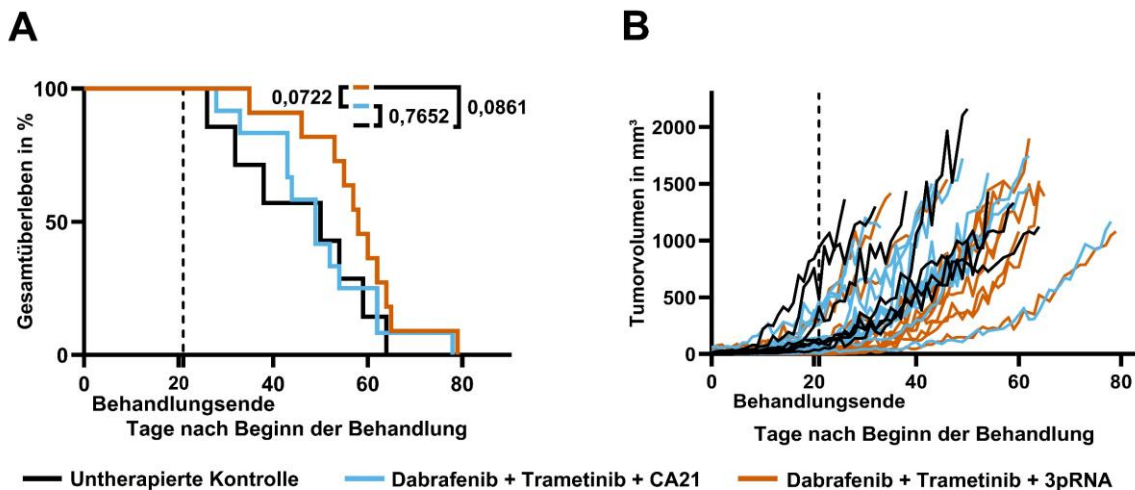


Abb. 4: Gesamtüberleben und Tumorwachstum im BRAf^{CA}, Pten^{loxP}, Tyr::CreERT² Mausmodell. Versuchsaufbau: Wie zuvor beschrieben, wurden Tumore induziert und für drei Wochen therapiert. (A) Gesamtüberleben. (B) Individuelle Tumor-Wachstumskurven. Statistik: Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test ohne Korrektur für Mehrfachvergleiche. Dabrafenib + Trametinib + 3pRNA N=11; Dabrafenib + Trametinib + CA21 N=12; Untherapierte Kontrolle N=7. Adaptiert aus Grützner et al. (2024).

1.3.5 Transplantiertes Melanom-Mausmodell

Es folgten *in vivo* Versuche, bei denen die zuvor verwendete Zelllinie YUMM1.7 in männliche C57BL/6J intrakutan in die Flanke transplantiert wurde. Die Tumorzelllinie wurde durch gezieltes Einbringen einer heterozygoten, zur humanen BRAFV600E-Mutation homologen Mutation sowie einer homozygoten Deletion von Pten und Cdkn2a in männlichen C57BL/6J etabliert. Sie ist daher zu diesem Stamm syngon und ermöglicht

Versuche in einem immunkompetenten Modell (Meeth et al., 2016). Im Vergleich zu anderen transplantierbaren murinen Melanom-Zelllinien zeigte sich eine hohe Rate an anwachsenden Tumoren. Nachdem die Tumore etwa 2-3 mm Durchmesser erreichten, erfolgte eine randomisierte Gruppeneinteilung. Für drei Wochen wurde analog dem Vorgehen im Versuch mit dem primären Melanom-Modell therapiert. Nach einem kurzen Beobachtungszeitraum, an Tag 11-15 nach Beendigung der Therapie, wurden erneut kontralateral in die Flanke YUMM1.7-Zellen eintransplantiert. Es folgte keine weitere Therapie und die Mäuse wurden lediglich beobachtet. Dies wurde durchgeführt, um eine mögliche erworbene Immunität zu evaluieren. Sobald ein Tumor einen Durchmesser von 15 mm erreichte, wurde die Maus geopfert. Wird zunächst das Gesamtüberleben betrachtet, unabhängig davon, ob eine Maus aufgrund des primären, therapierten Tumors oder des nach Abschluss der Therapie transplantierten Tumors geopfert wurde, so lassen sich mehrere Beobachtungen machen (Abb. 5 A): Werden die Gruppen ohne BRAF- oder MEK-Inhibition verglichen, so fällt auf, dass die alleinige intratumorale RIG-I Stimulation keinen Effekt auf das Überleben hatte. Auch die intratumorale Applikation der Kontroll-RNA zeigte keinen Effekt. Weiterhin konnte das Überleben durch BRAF-Inhibition verlängert werden, wie an dem Überleben der Gruppe, welche nur den BRAF-Inhibitor Dabrafenib und die Kontroll-RNA CA21 erhielt, im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen ist. Wurde nun anstelle von CA21 die RIG-I agonistische 3pRNA intratumoral appliziert, so konnte das Überleben signifikant weiter verlängert werden. Der in der klinischen Praxis monotherapeutisch nicht verwendete MEK-Inhibitor Trametinib konnte, in diesem Versuchsaufbau mit CA21, das Überleben nicht verlängern. Wurde Trametinib jedoch in Kombination mit der RIG-I agonistischen 3pRNA verwendet, so gelang es durchaus das Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant zu verlängern. Auch die Gruppe, welche mit der klinisch etablierten Kombination Dabrafenib und Trametinib behandelt wurde, zeigte ein signifikant verlängertes Überleben verglichen mit der Kontrollgruppe. Überzeugenderweise zeigte sich das signifikant längste Überleben in der Gruppe, welche mit Dabrafenib, Trametinib sowie mit 3pRNA behandelt wurde.

Es folgten detaillierte Auswertungen, welche zwischen den zwei Tumor-Inokulationen differenzierten (Abb. 5 B und C). Werden zunächst alle Überlebens-Ereignisse, welche mit dem zweiten, nach Abschluss der Therapie transplantierten, Tumor zusammenhängen, zensiert, so zeigt sich ein dem zuvor beschriebenen

Gesamtüberleben sehr ähnliches Bild (Abb. 5 B). Das Überleben insbesondere in den Gruppen, welche mit Dabrafenib und 3pRNA therapiert wurden, verbesserte sich leicht. Es zeigten sich jedoch keine von dem zuvor betrachteten Gesamtüberleben abweichend signifikante Unterschiede. Zuletzt wurde das Überleben in Zusammenhang mit dem nach Therapieabschluss transplantierten Tumor ausgewertet (Abb. 5 C). Festzustellen ist, dass insbesondere in den Gruppen, die insgesamt ein kurzes Überleben zeigten, kaum Tiere aufgrund des nach Therapieabschluss transplantierten Tumors die Abbruchkriterien erreichten, da das Wachstum der primär transplantierten Tumore bereits zum Ausscheiden führte und somit keine sinnvollen Aussagen getroffen werden können. Einzig in den Gruppen, welche mit Dabrafenib in An- oder Abwesenheit von Trametinib sowie 3pRNA therapiert wurden, waren mehrere Überlebensereignisse dem Zweitumor zuzuschreiben. Hier zeigte das Überleben jedoch keine Verbesserung im Unterschied zu der neu eingeführten untherapierten Kontrollgruppe. Somit ergab sich bei insgesamt wenigen Ereignissen kein Anhalt für eine erworbene Immunität gegen YUMM1.7 in diesem Versuchsaufbau.

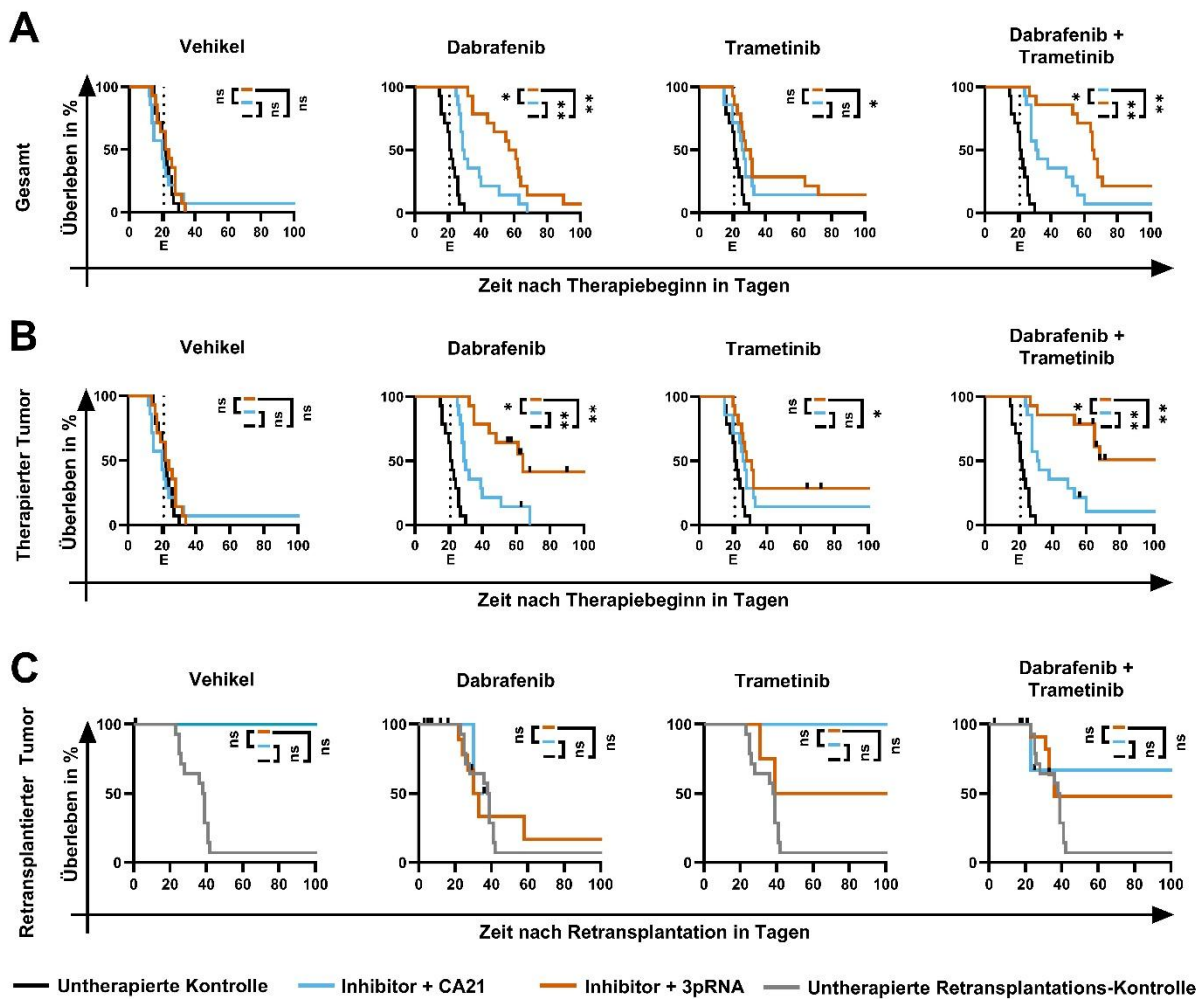


Abb. 5: Verbessertes Überleben durch RIG-I Stimulation im YUMM1.7-Transplantations-Modell. Tumore wurden wie zuvor beschrieben etabliert und wie angegeben für 21 Tage therapiert. Nach Abschluss einer 11 bis 15 Tage dauernden Beobachtungsphase erfolgte die kontralaterale erneute Transplantation von YUMM1.7 (Retransplantation) (A) Gesamtüberleben. (B) Überleben bezogen auf den initialen und therapierten Tumor. Ereignisse im Zusammenhang mit dem retransplantierten Tumor wurden zensiert. (C) Überleben bezogen auf den retransplantierten und nicht therapierten Tumor. Ereignisse im Zusammenhang mit dem initialen und therapierten Tumor wurden zensiert. Statistik: Log-Rang-Test mit Holm-Šidák-Korrektur für Mehrfachvergleiche (12): ns - nicht signifikant; * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$. Drei unabhängige Experimente mit kumulativ $N=14$ pro Gruppe. Adaptiert aus Grützner et al. (2024).

Zuletzt folgten Untersuchungen des tumorassoziierten Immunzell-Infiltrats. Hierfür wurden erneut YUMM1.7-Tumore in C57BL/6J etabliert und diese einmalig unter denselben Bedingungen wie für das Überlebensexperiment im Transplantations-Modell therapiert. Nach 16 Stunden folgten durchflusszytometrische Analysen des Tumorzellinfiltrats sowie der Lymphknoten, die den Tumor drainierten. Es wurden

durchflusszytometrisch CD4 positive, CD8 positive, Natürliche Killer (NK) Zellen sowie konventionelle (klassische) dendritische Zellen (cDC) untersucht. Hier zeigte sich in allen drei Zelltypen in den mit RIG-I Agonisten therapierten Gruppen eine signifikant erhöhte Positivität für CD69. Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen im Hinblick auf die Gabe von BRAF- oder MEK-Inhibitoren (Abb. 6).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es das Immunzellinfiltrat nach länger andauernder Therapie zu untersuchen. Nach Transplantation von YUMM1.7-Zellen wurde die Therapie wie in den vorausgehenden Überlebens-Experimenten für 14 Tage appliziert, da ab diesem Zeitpunkt bereits erste Tumore der Kontroll-Gruppe die Abbruch-Kriterien erreichten. Jedoch lag zu diesem Zeitpunkt in den Gruppen, welche in den vorangegangenen Experimenten ein gutes Überleben zeigten, keine relevante Tumormasse vor. So konnte das Tumor-Immunzellinfiltrat nicht vergleichend untersucht werden. Daher beschränkte sich die Analyse auf die Untersuchung der Tumor-drainierenden Lymphknoten 16 Stunden nachdem die letzte intratumorale Therapie verabreicht wurde. Es zeigte sich, ähnlich den Ergebnissen nach einmaliger Therapie, insgesamt eine verstärkte Immunzellaktivierung insbesondere in der NK-Zell- und in der CD8 positiven T-Zellfraktion. Auch hier ergaben sich keine deutlichen Unterschiede zwischen Gruppen mit und ohne Kinasen-Inhibition. Die Ergebnisse sind vor dem Hintergrund zu interpretieren, dass zu dem Zeitpunkt der Analyse die Tumormassen sehr ungleich verteilt waren.

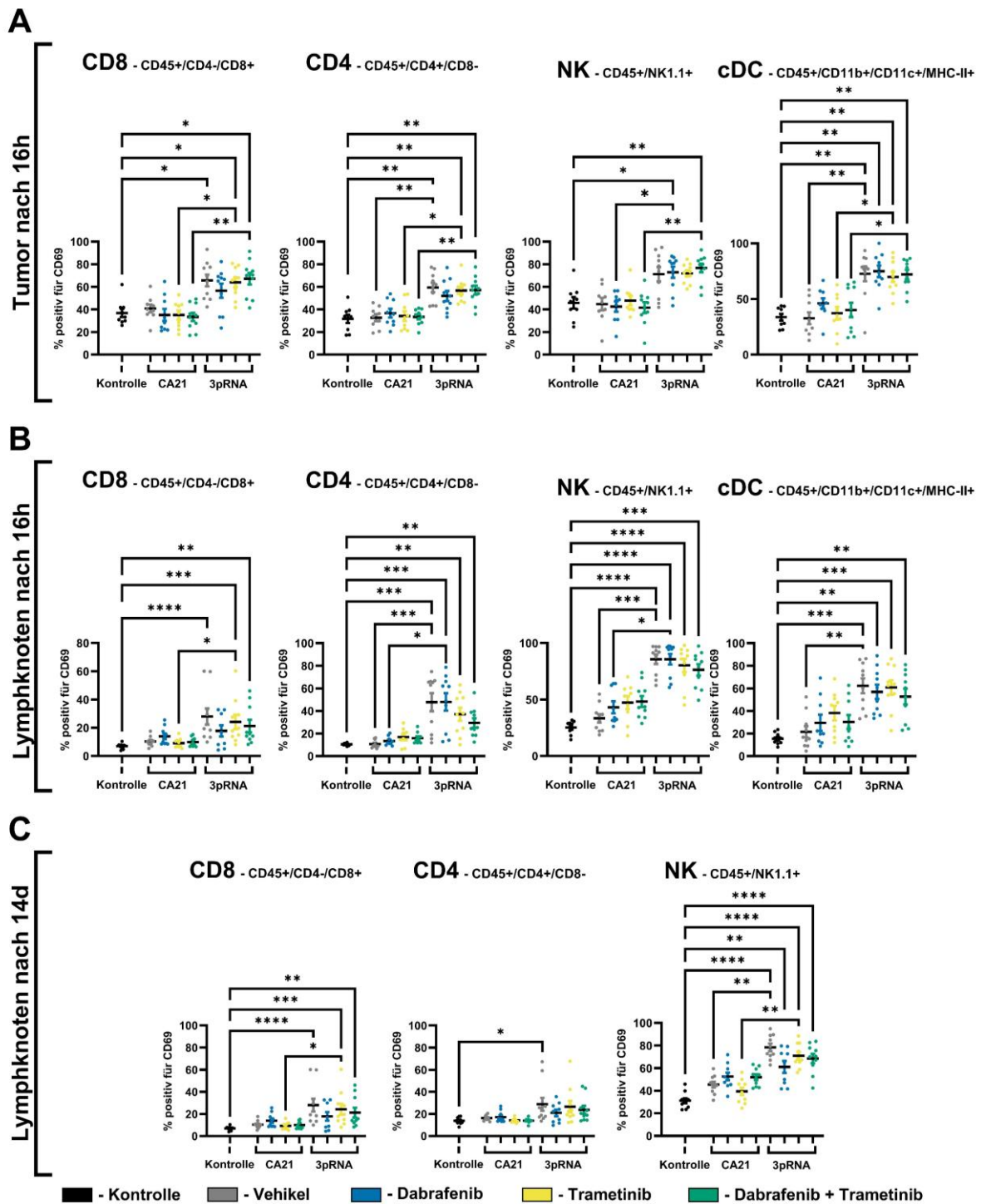


Abb. 6: Immunzellaktivierung im transplantierten Melanom-Mausmodell. YUMM1.7-Tumore wurden wie zuvor etabliert und therapiert. Es erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Immunzellaktivierung im Tumor (A) und im Lymphknoten (B) 16 Stunden nach Therapie. (C) Immunzellaktivierung im Lymphknoten nach 14 Tagen Therapie mit letzter RIG-I Stimulation an Tag 13. Statistik: Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Korrektur für Mehrfach-Vergleiche (15): * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$; **** - $p < 0.0001$. Drei unabhängige Experimente mit $N=9-10$ pro Gruppe. Gezeigt sind Mittelwerte mit SEM. Adaptiert aus Grützner et al. (2024).

1.4 Diskussion

Eine erste Arbeit von Brägelmann et al. (2021) konnte bereits zeigen, dass die Inhibition des MAP-Kinasen-Signalweges eine inflammatorische Reprogrammierung im Tumormikromilieu induziert. Diese sensibilisiert für eine RIG-I agonistische Therapie und führt zu einer verstärkten antitumoralen Antwort. Der umfangreiche *in vitro* Datensatz wird durch die hier vorliegende Arbeit bestätigt und ergänzt. Zudem lieferte die Studie von Brägelmann et al. (2021) bereits erste *in vivo* Daten für eine Anwendung des MEK-Inhibitors Trametinib mit RIG-I Stimulation in einem immun-defizienten Lungenkarzinom-Modell sowie für den EGFR-Inhibitor Osimertinib mit RIG-I Stimulation in humanisierten und nicht-humanisiertem Lungenkarzinom-Xenograft-Modellen. Die Kinasen-Inhibition wurde im Unterschied zu den in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Experimenten jedoch für unterschiedlich lange Zeiträume initial allein gegeben, bevor eine RIG-I Stimulation ergänzt wurde.

Die in der Zellkultur gewonnenen *in vitro* Apoptose Daten legen deutlich den Einsatz der Kombination aus Kinasen-Inhibition mit RIG-I Stimulation nahe. Sie ergänzen plausibel bereits vorliegende Daten (Brägelmann et al., 2021). In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass eine BRAF- oder MEK-Inhibition nicht nur Apoptose induziert, sondern zusätzlich die Proliferation der Tumorzelllinien inhibiert. Dieser zusätzliche Effekt auf die absolute Anzahl vitaler Zellen wird durch die relative Angabe der Fraktion toter Zellen nicht abgebildet. Ein klarer Synergismus kann somit aus diesem Datensatz nicht konstatiert werden.

Der Nachweis der Typ-I-Interferon Zytokin-Signatur ist Zeichen eines immunogenen Zelltods, welcher eine adaptive Immunantwort auslösen kann. Der Phänotyp des immunogenen Zelltodes bleibt trotz Anwendung von Kinase-Inhibitoren erhalten, wie die gezeigten Daten belegen. Absolut zeigte sich in den zusätzlich mit BRAF- oder MEK-Inhibition behandelten Konditionen die Konzentration der Zytokine allerdings leicht vermindert. Hier ist zu erwähnen, dass es unklar ist, welche Relevanz die absolute Zytokine-Menge, die durch die Tumorzellen sezerniert wird, insgesamt hat, auch wenn prinzipiell die durch maligne Zellen sezernierte Typ-I-IFN-Antwort im Kontext des immunogenen Zelltods relevant zu sein scheint (Sistigu et al., 2014). Zudem lässt sich eine verminderte Zytokin-Konzentration nach 24 Stunden teilweise auch auf eine durch

die Kinasen-Inhibition unterdrückte Proliferation und eine beginnend verminderte Vitalität zurückführen. Im Zusammenhang mit CCL5 ist einerseits zu erwähnen, dass es die Immunzellrekrutierung und Immunantwort verstärkt, es insbesondere im Zusammenhang mit Immuntherapie darüber hinaus aber auch Evidenz gibt, dass der CCL5-Signalweg Tumorwachstum und Metastasierung fördere (Aldinucci und Colombatti, 2014). Die Freisetzung von IL6 ist physiologisch zur Gefahrenabwehr nach PAMP-Stimulation wie beispielsweise einer Virusinfektion vorgesehen. Es gibt allerdings auch hier Evidenz, dass IL6 die Effektivität immuntherapeutischer Ansätze behindert (Soler et al., 2023). Leicht verminderte Zytokin-Konzentrationen in den mit Kinasen-Inhibition behandelten Bedingungen können daher nicht abschließend eingeordnet werden.

Auch residente oder sekundär einwandernde Immunzellen nehmen nach RIG-I agonistischer Therapie durch direkte und indirekte Stimulation Einfluss auf die Zytokin-Komposition im Tumor. Vor diesem Hintergrund ist auch die *in vivo* Komposition der transplantierten YUMM1.7-Tumore interessant. In der Literatur finden sich diesbezüglich Daten einer immunhistochemischen Analyse von YUMM1.7-Tumoren 30 Tage nach Injektion. Der Anteil CD45 positiver Leukozyten wurde hier auf 35 % bis 45 % der Tumormasse geschätzt. Hiervon waren die überwiegende Mehrheit F4/80 positive Makrophagen und nur 1 % Lymphozyten (Meeth et al., 2016). Im Allgemeinen sind es dendritische und monozytäre Zellen, welche primär durch RIG-I Stimulation aktiviert werden (Ablasser et al., 2009). Der Effekt dieser Zellen überwiegt mutmaßlich auch im Rahmen der humanen PBMC-Experimente. Als murines Korrelat wurden daher BMDM gewählt. Betrachtet man die erhaltene Zytokin-Sekretion vor dem Hintergrund der bei gleicher Konzentration deutlich erhöhten Apoptose von Tumorzellen in vorausgehenden Experimenten, so scheint die immun-stimulatorische Wirkung der RIG-I Stimulation nicht relevant vermindert. Zu erwähnen bleibt jedoch, dass in dieser Arbeit keine Daten über lang andauernde Kinasen-Inhibition und die damit einhergehenden Effekte auf Immunzellen vorgestellt wurden.

Die für die Anwendung der BRAF-Inhibition obligate BRAFV600- oder eine hierzu homologe Mutation begrenzt die Anzahl möglicher *in vivo* Modelle. Eine Option ist das Verwenden des primären Melanom-Modells mit autochthoner Tumorgenese. Dass sich hier letztendlich kein signifikanter Vorteil ergab, kann mehrere Gründe haben. Ein

multifokales, ausgeprägtes Tumorwachstum verwässerte möglicherweise die Ergebnisse. Das multifokale Tumorwachstum auch an Stellen ohne 4-Hydroxytamoxifen Behandlung, was mutmaßlich durch eine in diesem Modell nicht gänzlich kontrollierte Cre-Rekombinase-Aktivität zu erklären ist, führte zu Unsicherheiten hinsichtlich des Tumorstatus bei Therapieeinschluss (THE JACKSON LABORATORY, 2025). Außerdem wurde aus ethischen Überlegungen die Therapiedauer auf 21 Tage limitiert. Es bleibt offen, ob eine längere Therapie einen stärkeren und möglicherweise signifikanten Unterschied ergeben hätte, schließlich zeigten die Individual-Tumorwachstums-Kurven in der RIG-I agonistisch therapierten Gruppe den stärksten Anstieg nach Abschluss der Therapie.

Das Verwenden der zu C57BL/6J syngen YUMM1.7 im Rahmen von *in vivo* Experimenten ist eine weitere Möglichkeit definierte, in der humanen Melanom-Pathophysiologie relevante Mutationen experimentell zu untersuchen. Die für die Kinasen-Inhibition notwendige BRAF-Mutation ist in anderen klassischen transplantierbaren murinen Melanom-Linien wie B16 nicht zu finden. Das alleinige Einfügen der humanen BRAFV600E-Mutation genügt jedoch nicht zur Tumorinduktion im murinen Modell, was das Einführen weiterer Deletionen in Tumor-Suppressor Genen notwendig macht (Dankort et al., 2009; Meeth et al., 2016). Neben charakteristischen Mutationen und Deletionen sind Melanome jedoch auch durch eine insgesamt hohe Rate an somatischen Mutationen und damit einhergehenden Neoepitopen charakterisiert, was von besonderer Relevanz für immuntherapeutische Ansätze ist. Diese Charakteristik fehlt der YUMM1.7-Zelllinie (Meeth et al., 2016). Ein Indiz für die daraus resultierende geringere Immunogenität ist die sehr hohe Rate anwachsender Tumore nach Transplantation von YUMM1.7. Die alleinige RIG-I Stimulation konnte das Überleben nicht verlängern. Dies könnte ebenfalls auf die geringe Immunogenität zurückzuführen sein. So gibt es Daten einer anderen Arbeitsgruppe, welche in einem Transplantations-Tumormodell basierend auf der eng verwandten Tumor-Zelllinie YUMMER1.7 das Überleben mit einer RIG-I agonistischen Monotherapie durchaus verlängern konnte (Jiang et al., 2019). Die YUMMER1.7-Zelllinie ist aus der YUMM1.7-Zelllinie entstanden, indem diese UVB-Strahlung ausgesetzt wurde und anschließend ein Klon expandiert wurde. *In vivo* zeichnet sie sich aus durch teilweise spontane Tumor-Regressionen, ein stärkeres Wachstum nach T-Zell-Depletion oder in RAG1-defizienten Mäusen, einer

Wirksamkeit von Immuncheckpoint-Blockade sowie tatsächlich auch einer Tumorabstoßung bei erneuter Exposition (Wang et al., 2017). Die mutmaßlich fehlende Immunogenität, der YUMM1.7-Linie konnte in dieser Arbeit offensichtlich durch BRAF- oder MEK-Inhibition in überzeugender Weise überwunden werden. Die alleinige BRAF-Inhibition mit oder ohne MEK-Inhibition konnte das Überleben bereits erwartbar verlängern und rekapituliert damit gut die humane Therapierealität. Additive RIG-I Stimulation verbesserte dieses Ergebnis und illustriert die synergistische Wirkung dieser Kombination.

Auch wenn andere Arbeiten zeigen konnten, dass sich gegen die YUMMER1.7-Zelllinie *in vivo* vergleichsweise niederschwellig ein immunologisches Gedächtnis ausbildet, so liefert die vorliegende Arbeit für YUMM1.7 in dem gewählten Versuchsaufbau hierfür keinen Anhalt (Wang et al., 2017).

Da für die Applikation der Kinase-Inhibitoren eine tägliche gastrale Sondierung notwendig war, wurde aus ethischen Überlegungen die Dauer der Therapie auf drei Wochen begrenzt. Zusammen mit der nach Abschluss der Therapie erfolgten erneuten Tumor-Transplantation wurde auf diese Weise eine aggressive Tumorbilogie rekapituliert und diese tendenziell untertherapiert. Dies zeigt sich, wenn man die Überlebensereignisse, welche mit dem retransplantierten Tumor zusammenhängen, zensiert. Der Überlebensvorteil im Zusammenhang mit dem primären und therapierten Tumor kommt so stärker zur Geltung. Dennoch konnten die Ergebnisse überzeugen. In Hinblick auf einen genauen Wirkmechanismus kann die vorliegende Arbeit keine Antworten liefern.

Im Rahmen der *in vivo* Versuche wurde mit gleichbleibenden therapeutischen Dosierungen gearbeitet. Auch wenn es sich hier um gut etablierte Dosierungen handelt, so verbleibt die Frage nach der optimalen Dosierung unbeantwortet. Ein weiterer Punkt, der eine hohe Relevanz hat, ist die optimale Therapiesequenz. So liefern Brägelmann et al. (2021) eine starke Grundlage dafür, zunächst die Kinasen-Inhibition zu beginnen und anschließend die RIG-I Stimulation zu ergänzen. Insbesondere in den *in vivo* Daten wurden die beiden Therapiemodalitäten nicht mit gleichzeitigem Beginn angewendet. In dieser Arbeit konnte hingegen herausgearbeitet werden, dass auch die simultane Gabe von Kinasen-Inhibition und RIG-I Stimulation *in vivo* möglich und mit einem relevanten Überlebensvorteil verbunden ist. Dies lässt sich einfacher in die klinische Praxis

translatieren. Ebenfalls neu sind erstmals *in vivo* Daten dieses Kombinationsansatzes im Melanom. Eine weitere Ergänzung der bisher publizierten Daten stellt die Kombination aus RIG-I Stimulation und dualer Kinasen-Inhibition mit BRAF- und MEK-Inhibition dar, wie sie von Brägelmann et al. (2021) nicht evaluiert wurde, jedoch aktuell den Versorgungsstandard darstellt.

RIG-I Stimulation wurde hier als lokale Therapie appliziert, wie es sich für das Melanom anbietet. Die lokale Applikation kann insbesondere bei immunmodulatorischen Interventionen systemische Nebenwirkungen vermindern. An dieser Stelle sei erwähnt, dass es mit intraläsionalem IL2 und Talimogene Laherparepvec (T-VEC) bereits etablierte Immuntherapieoptionen im Melanom gibt, welche lokal verabreicht werden (Andtbacka et al., 2019; Garbe et al., 2022b). Um die angeborene Immunität zu stimulieren, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Der Vorteil an dem in dieser Arbeit verwendeten Liganden liegt darin, dass dieser klar definiert ist. Verglichen mit anderen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems kann über eine RIG-I Stimulation ein besonders starker Effekt auf die Zell-Vitalität ausgelöst werden (Brägelmann et al., 2021).

Als ergänzende lokale Therapie ist eine RIG-I Stimulation, wie diese Arbeit präklinisch zeigen konnte, eine sinnvolle Ergänzung zur Kinasen-Inhibition im BRAFV600E-mutiertem malignen Melanom. Sie reiht sich in die bestehende Evidenz ein und unterstützt die weitere klinische Entwicklung RIG-I agonistischer Therapien insbesondere als Kombinationspartner für andere etablierte Therapien.

1.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte eine Grundlage für die translationale Anwendung der Kombination aus zielgerichteter Inhibition der intrazellulären Kinasen BRAF und MEK sowie Stimulation des Nukleinsäure-Rezeptors RIG-I in BRAF-mutierten Melanomen gelegt werden. So konnte ein synergistischer Überlebensvorteil durch additive RIG-I Stimulation zusätzlich zu BRAF- und MEK-Inhibition im Mausmodell herausgearbeitet werden. Im Einklang mit bekannten Daten konnte gezeigt werden, dass die vielversprechende RIG-I agonistische Immuntherapie nicht nur eine robuste Immunzellaktivierung, sondern weiterhin auch in Anwesenheit der getesteten Kinasen-Inhibitoren einen immunogenen Zelltod auslöst. Diese sehr definierte immuntherapeutische Intervention einer RIG-I agonistischen Tumor-

Therapie mit einer breiten entitätsübergreifenden Anwendbarkeit zeigte sich zuletzt insbesondere als Kombinationspartner vorteilhaft. Die hier vorliegende Arbeit unterstützt ebenfalls die weitere translationale Entwicklung. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund der aktuell schnell voranschreitenden Entwicklung von immuntherapeutischen Ansätzen wie T-Zell-Therapien mit chimären Antigenrezeptoren (Chimeric Antigen Receptor T-Cells), Immuntherapien mit bispezifischen monoklonalen Antikörper-Konstrukten (Bispecific T-Cell Engagers) oder Therapien basierend auf Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (Tumor-Infiltrating Lymphocytes) zu betrachten.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Ablasser A, Poeck H, Anz D, Berger M, Schlee M, Kim S, Bourquin C, Goutagny N, Jiang Z, Fitzgerald KA, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G, Hornung V. Selection of Molecular Structure and Delivery of RNA Oligonucleotides to Activate TLR7 versus TLR8 and to Induce High Amounts of IL-12p70 in Primary Human Monocytes. *J Immunol* 2009: 6824–6833

Aldinucci D, Colombatti A. The Inflammatory Chemokine CCL5 and Cancer Progression. *Mediators Inflamm* 2014: 292376

Andtbacka RHI, Collichio F, Harrington KJ, Middleton MR, Downey G, Öhrling K, Kaufman HL. Final analyses of OPTiM: a randomized phase III trial of talimogene laherparepvec versus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in unresectable stage III–IV melanoma. *J Immunother Cancer* 2019: 145

Ascierto PA, Stroyakovskiy D, Gogas H, Robert C, Lewis K, Protsenko S, Pereira RP, Eigentler T, Rutkowski P, Demidov L, Zhukova N, Schachter J, Yan Y, Caro I, Hertig C, Xue C, Kusters L, McArthur GA, Gutzmer R. Overall survival with first-line atezolizumab in combination with vemurafenib and cobimetinib in BRAFV600 mutation-positive advanced melanoma (IMspire150): second interim analysis of a multicentre, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2023: 33–44

Bartok E, Hartmann G. Immune Sensing Mechanisms that Discriminate Self from Altered Self and Foreign Nucleic Acids. *Immunity* 2020: 54–77

Besch R, Poeck H, Hohenauer T, Senft D, Häcker G, Berking C, Hornung V, Endres S, Ruzicka T, Rothenfusser S, Hartmann G. Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest* 2009: 2399–2411

Blank CU, Lucas MW, Scolyer RA, Van De Wiel BA, Menzies AM, Lopez-Yurda M, Hoeijmakers LL, Saw RPM, Lijnsvelt JM, Maher NG, Pulleman SM, Gonzalez M, Torres Acosta A, Van Houdt WJ, Lo SN, Kuijpers AMJ, Spillane A, Klop WMC, Pennington TE, Zuur CL, Shannon KF, Seinstra BA, Rawson RV, Haanen JBAG, Ch'ng S, Naipal KAT, Stretch J, Van Thienen JV, Rtshiladze MA, Wilgenhof S, Kapoor R, Meerveld-Eggink A, Grijpink-Ongering LG, Van Akkooi ACJ, Reijers ILM, Gyorki DE, Grünhagen DJ, Speetjens FM, Vlieg SB, Placzke J, Spain L, Stassen RC, Amini-Adle M, Lebbé C, Faries MB, Robert C, Ascierto PA, Van Rijn R, Van Den Berkmortel FWPJ, Piersma D, Van Der Westhuizen A, Vreugdenhil G, Aarts MJB, Stevense-den Boer MAM, Atkinson V, Khattak M, Andrews MC, Van Den Eertwegh AJM, Boers-Sonderen MJ, Hospers GAP, Carlino MS, De Groot J-WB, Kapiteijn E, Suijkerbuijk KPM, Rutkowski P, Sandhu S, Van Der Veldt AAM, Long GV. Neoadjuvant Nivolumab and Ipilimumab in Resectable Stage III Melanoma. *N Engl J Med* 2024: 1696–1708

Brägelmann J, Lorenz C, Borchmann S, Nishii K, Wegner J, Meder L, Ostendorp J, Ast DF, Heimsoeth A, Nakasuka T, Hirabae A, Okawa S, Dammert MA, Plenker D, Klein S, Lohneis P, Gu J, Godfrey LK, Forster J, Trajkovic-Arsic M, Zillinger T, Haarmann M, Quaas A, Lennartz S, Schmiel M, D'Rozario J, Thomas ES, Li H, Schmitt CA, George J, Thomas RK, Von Karstedt S, Hartmann G, Büttner R, Ullrich RT, Siveke JT, Ohashi K, Schlee M, Sos ML. MAPK-pathway inhibition mediates inflammatory reprogramming and sensitizes tumors to targeted activation of innate immunity sensor RIG-I. *Nat Commun* 2021: 5505

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AMM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA, BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011: 2507–2516

Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE, You MJ, DePinho RA, McMahon M, Bosenberg M. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet* 2009: 544–552

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins G J, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JWC, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002: 949–954

Duewell P, Steger A, Lohr H, Bourhis H, Hoelz H, Kirchleitner SV, Stieg MR, Grassmann S, Kobold S, Siveke JT, Endres S, Schnurr M. RIG-I-like helicases induce immunogenic cell death of pancreatic cancer cells and sensitize tumors toward killing by CD8+ T cells. *Cell Death Differ* 2014: 1825–1837

Dummer R, Long GV, Robert C, Tawbi HA, Flaherty KT, Ascierto PA, Nathan PD, Rutkowski P, Leonov O, Dutriaux C, Mandalà M, Lorigan P, Ferrucci PF, Grob JJ, Meyer N, Gogas H, Stryakovsky D, Arance A, Brase JC, Green S, Haas T, Masood A, Gasal E, Ribas A, Schadendorf D. Randomized Phase III Trial Evaluating Spatalizumab Plus Dabrafenib and Trametinib for *BRAF* V600–Mutant Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 2022: 1428–1438

Elion DL, Jacobson ME, Hicks DJ, Rahman B, Sanchez V, Gonzales-Ericsson PI, Fedorova O, Pyle AM, Wilson JT, Cook RS. Therapeutically Active RIG-I Agonist Induces Immunogenic Tumor Cell Killing in Breast Cancers. *Cancer Res* 2018: 6183–6195

Ellermeier J, Wei J, Duewell P, Hoves S, Stieg MR, Adunka T, Noerenberg D, Anders H-J, Mayr D, Poeck H, Hartmann G, Endres S, Schnurr M. Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF- β 1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2013: 1709–1720

Galluzzi L, Kepp O, Hett E, Kroemer G, Marincola FM. Immunogenic cell death in cancer: concept and therapeutic implications. *J Transl Med* 2023: 162

Garbe C, Amaral T, Peris K, Hauschild A, Arenberger P, Basset-Seguin N, Bastholt L, Bataille V, Del Marmol V, Dréno B, Fargnoli MC, Forsea A-M, Grob J-J, Höller C, Kaufmann R, Kelleners-Smeets N, Lallas A, Lebbé C, Lytvynenko B, Malvey J, Moreno-Ramirez D, Nathan P, Pellacani G, Saiag P, Stratigos AJ, Van Akkooi ACJ, Vieira R, Zalaudek I, Lorigan P On behalf of the European Dermatology Forum (EDF), the European Association of Dermato-Oncology (EADO), the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 1: Diagnostics: Update 2022. *Eur J Cancer* 2022a: 236–255

Garbe C, Amaral T, Peris K, Hauschild A, Arenberger P, Basset-Seguin N, Bastholt L, Bataille V, Del Marmol V, Dréno B, Fargnoli M C, Forsea A-M, Grob J-J, Hoeller C, Kaufmann R, Kelleners-Smeets N, Lallas A, Lebbé C, Lytvynenko B, Malvey J, Moreno-Ramirez D, Nathan P, Pellacani G, Saiag P, Stratigos A J, Van Akkooi A C J, Vieira R, Zalaudek I, Lorigan P On behalf of the European Dermatology Forum (EDF), the European Association of Dermato-Oncology (EADO), the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 2: Treatment - Update 2022. *Eur J Cancer* 2022b: 256–284

Glas M, Coch C, Trageser D, Dassler J, Simon M, Koch P, Mertens J, Quandel T, Gorris R, Reinartz R, Wieland A, Von Lehe M, Pusch A, Roy K, Schlee M, Neumann H, Fimmers R, Herrlinger U, Brüstle O, Hartmann G, Besch R, Scheffler B. Targeting the Cytosolic Innate Immune Receptors RIG-I and MDA5 Effectively Counteracts Cancer Cell Heterogeneity in Glioblastoma. *Stem Cells* 2013: 1064–1074

Grützner C, Tan YP, Müller P, Schlee-Guimaraes TM, Jentzsch M, Schmid-Burgk JL, Renn M, Behrendt R, Hartmann G. Synthetic RIG-I agonist-mediated cancer immunotherapy synergizes with MAP kinase inhibition against BRAF-mutated melanoma. *Mol Ther Nucleic Acids* 2024: 102283

Hauschild A, Dummer R, Schadendorf D, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, Chiarion-Sileni V, Larkin J, Nyakas M, Dutriaux C, Haydon A, Robert C, Mortier L, Schachter J, Lesimple T, Plummer R, Dasgupta K, Haas T, Shilkrut M, Gasal E, Kefford R, Kirkwood JM, Long GV. Longer Follow-Up Confirms Relapse-Free Survival Benefit With Adjuvant Dabrafenib Plus Trametinib in Patients With Resected BRAF V600-Mutant Stage III Melanoma. *J Clin Oncol* 2018: 3441–3449

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, Van Den Eertwegh AJM, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* 2010: 711–723

Hu-Lieskovan S, Robert L, Homet Moreno B, Ribas A. Combining Targeted Therapy With Immunotherapy in BRAF -Mutant Melanoma: Promise and Challenges. *J Clin Oncol* 2014: 2248–2254

Jiang X, Muthusamy V, Fedorova O, Kong Y, Kim DJ, Bosenberg M, Pyle AM, Iwasaki A. Intratumoral delivery of RIG-I agonist SLR14 induces robust antitumor responses. *J Exp Med* 2019: 2854–2868

Lambing S, Tan YP, Vasileiadou P, Holdenrieder S, Müller P, Hagen C, Garbe S, Behrendt R, Schlee M, Van Den Boorn JG, Bartok E, Renn M, Hartmann G. RIG-I immunotherapy overcomes radioresistance in p53-positive malignant melanoma. *J Mol Cell Biol* 2023

Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, Ferrucci PF, Hill A, Wagstaff J, Carlino MS, Haanen JB, Maio M, Marquez-Rodas I, McArthur GA, Ascierto PA, Long GV, Callahan MK, Postow MA, Grossmann K, Sznol M, Dreno B, Bastholt L, Yang A, Rollin LM, Horak C, Hodi FS, Wolchok JD. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 2015: 23–34

Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, Hughes TM, Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2011: 1239–1246

Meeth K, Wang JX, Micevic G, Damsky W, Bosenberg MW. The YUMM lines: a series of congenic mouse melanoma cell lines with defined genetic alterations. *Pigment Cell Melanoma Res* 2016: 590–597

Moreno V, Calvo E, Middleton MR, Barlesi F, Gaudy-Marqueste C, Italiano A, Romano E, Marabelle A, Chartash E, Dobrenkov K, Zhou H, Connors EC, Zhang Y, Wermke M. Treatment with a retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) agonist as monotherapy and in combination with pembrolizumab in patients with advanced solid tumors: results from two phase 1 studies. *Cancer Immunol Immunother* 2022: 2985–2998

Patel SP, Othus M, Chen Y, Wright GP, Yost KJ, Hynstrom JR, Hu-Lieskovan S, Lao CD, Fecher LA, Truong T-G, Eisenstein JL, Chandra S, Sosman JA, Kendra KL, Wu RC, Devoe CE, Deutsch GB, Hegde A, Khalil M, Mangla A, Reese AM, Ross MI, Poklepovic AS, Phan GQ, Onitilo AA, Yasar DG, Powers BC, Doolittle GC, In GK, Kokot N, Gibney GT, Atkins MB, Shaheen M, Warneke JA, Ikeguchi A, Najera JE, Chmielowski B, Crompton JG, Floyd JD, Hsueh E, Margolin KA, Chow WA, Grossmann KF, Dietrich E, Prieto VG, Lowe MC, Buchbinder EI, Kirkwood JM, Korde L, Moon J, Sharon E, Sondak VK, Ribas A. Neoadjuvant–Adjuvant or Adjuvant-Only Pembrolizumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 2023: 813–823

Poeck H, Besch R, Maihoefer C, Renn M, Tormo D, Morskaya SS, Kirschnek S, Gaffal E, Landsberg J, Hellmuth J, Schmidt A, Anz D, Bscheider M, Schwerd T, Berking C, Bourquin C, Kalinke U, Kremmer E, Kato H, Akira S, Meyers R, Häcker G, Neuenhahn M, Busch D, Ruland J, Rothenfusser S, Prinz M, Hornung V, Endres S, Tüting T, Hartmann G. 5'-triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat Med* 2008: 1256–1263

Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, Lichinitser M, Dummer R, Grange F, Mortier L, Chiarion-Sileni V, Drucis K, Krajsova I, Hauschild A, Lorigan P, Wolter P, Long GV, Flaherty K, Nathan P, Ribas A, Martin A-M,

Sun P, Crist W, Legos J, Rubin SD, Little SM, Schadendorf D. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med* 2015: 30–39

Ruzicka M, Koenig LM, Formisano S, Boehmer DFR, Vick B, Heuer E-M, Mehl H, Kocheise L, Zeitlhöfler M, Ahlfeld J, Kobold S, Endres S, Subklewe M, Duesell P, Schnurr M, Jeremias I, Lichtenegger FS, Rothenfusser S. RIG-I-based immunotherapy enhances survival in preclinical AML models and sensitizes AML cells to checkpoint blockade. *Leukemia* 2020: 1017–1026

Samatar AA, Poulikakos PI. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2014: 928–942

Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin* 2024: 12–49

Sistigu A, Yamazaki T, Vacchelli E, Chaba K, Enot DP, Adam J, Vitale I, Goubar A, Baracco EE, Remédios C, Fend L, Hannani D, Aymeric L, Ma Y, Niso-Santano M, Kepp O, Schultze JL, Tüting T, Belardelli F, Bracci L, La Sorsa V, Ziccheddu G, Sestili P, Urbani F, Delorenzi M, Lacroix-Triki M, Quidville V, Conforti R, Spano J-P, Puztai L, Poirier-Colame V, Delaloge S, Penault-Llorca F, Ladoire S, Arnould L, Cyrta J, Dessoliers M-C, Eggermont A, Bianchi ME, Pittet M, Engblom C, Pfirschke C, Prévile X, Uzè G, Schreiber RD, Chow MT, Smyth MJ, Proietti E, André F, Kroemer G, Zitvogel L. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat Med* 2014: 1301–1309

Soler MF, Abaurrea A, Azcoaga P, Araujo AM, Caffarel MM. New perspectives in cancer immunotherapy: targeting IL-6 cytokine family. *J Immunother Cancer* 2023

THE JACKSON LABORATORY. 2025: B6.Cg-Tg(Tyr-cre/ERT2)13Bos Braftm1Mmcm Ptentm1Hwu/BosJ. <https://www.jax.org/strain/013590> (Zugriffsdatum: 22.05.2025)

Wang J, Perry CJ, Meeth K, Thakral D, Damsky W, Micevic G, Kaech S, Blenman K, Bosenberg M. UV -induced somatic mutations elicit a functional T cell response in the YUMMER 1.7 mouse melanoma model. *Pigment Cell Melanoma Res* 2017: 428–435

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Grützner C, Tan YP, Müller P, Schlee-Guimaraes TM, Jentzsch M, Schmid-Burgk JL, Renn M, Behrendt R, Hartmann G. Synthetic RIG-I agonist-mediated cancer immunotherapy synergizes with MAP kinase inhibition against BRAF-mutated melanoma. *Mol Ther Nucleic Acids* 2024: 102283

<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2024.102283>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für klinische Chemie und klinische Pharmakologie unter Betreuung von Prof. Gunther Hartmann durchgeführt. Die initiale Konzeption der Arbeit erfolgte durch Prof. Gunther Hartmann und Marcel Renn. Die Planung, Organisation und Durchführung sämtlicher Experimente erfolgten eigenständig mit Unterstützung durch Marcel Renn und Prof. Rayk Behrendt. Besonders ressourcenintensive und komplexe Experimente erfolgten mit Unterstützung durch Patrick Müller, Yu Pan Tan und Marcel Renn. Sämtliche Tierversuche wurden eigenständig unter Supervision von Marcel Renn und Prof. Rayk Behrendt durchgeführt. Die Tierversuche erfolgten im Haus für Experimentelle Therapie der Universität Bonn. Die statistische Auswertung erfolgte weitestgehend eigenständig. Das Transkriptom-Experiment wurde mit Unterstützung von Marius Jentsch und Prof. Jonathan L. Schmid-Burgk durchgeführt. Die Auswertung der Transkriptom-Daten erfolgte primär durch Thais Schlee-Guimaraes. Fortlaufend erfolgte die gemeinsame Interpretation der Daten und daraus resultierende Steuerung des Projekts mit Prof. Gunther Hartmann, Marcel Renn und Prof. Rayk Behrendt.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Gunther Hartmann für die Aufnahme an sein Institut, die Überlassung und Betreuung dieses Projekts danken. So durfte ich hier in den vergangenen Jahren sehr viel lernen. Marcel Renn möchte ich für die anfängliche Betreuung dieses Projekts und die Einführung in das molekularbiologische Arbeiten danken. Ein großer Dank gilt weiterhin Prof. Rayk Behrendt, der die Betreuung schließlich fortführte und mit dessen großzügiger Unterstützung und Engagement ich das Projekt erfolgreich abschließen durfte. Mein Dank richtet sich weiterhin an die Mitautoren der dieser Arbeit zugrundeliegenden Publikation, ohne deren Engagement die Ergebnisse nicht hätten veröffentlicht werden können. Allen früheren und aktuellen Mitgliedern des Instituts möchte ich gerne danken für die gemeinsame Zeit innerhalb und außerhalb des Labors an die ich mich sehr gerne erinnere. Auch für die großzügige finanzielle Unterstützung dieses Promotionsvorhabens durch die Else Kröner-Fresenius-Stiftung bin ich sehr dankbar. Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie, allem voran bei meinen Eltern, die mich fortwährend unterstützt und mir diesen Werdegang überhaupt erst ermöglicht haben. Zuletzt möchte ich mich noch bei Johanna Rätz für ihre bedingungslose Unterstützung während der letzten Jahre sehr bedanken.