

Identifizierung des Mutationsspektrums und Charakterisierung relevanter Mutationen im Multiplen Myelom



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von

Susann Weißbach

aus

Chemnitz

Würzburg 2015

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Rosenwald

Gutachter: PD Dr. Robert Hock

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation „Identifizierung des Mutationspektrums und Charakterisierung relevanter Mutationen im Multiplen Myelom“ selbständig angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie die diesen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Ausführungen als solche kenntlich gemacht zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Des Weiteren habe ich noch keine akademischen Grade erworben oder versucht zu erwerben.

Würzburg, den 26.03.2015

Susann Weißbach

Danksagung

Meine Doktorarbeit wurde nicht erstellt im Solo, Duett oder Quintett, sondern im Zusammenwirken mit vielen Talentierten. Sie dirigierten, agierten und motivierten. Das Konzert war geprägt von reden und lachen, diskutieren und machen, Ideen generieren und Pläne strukturieren.

In diesem Sinne möchte ich mich allen voran bei Herrn Prof. Dr. Andreas Rosenwald, Leiter des Pathologischen Instituts und Herrn PD Dr. Hock, Fakultät für Biologie, welche mir jederzeit für konstruktive Gespräche zur Verfügung standen, für die Betreuung der Doktorarbeit bedanken.

Besonders dankbar bin ich Frau Dr. Ellen Leich für die zahlreichen thematischen und wissenschaftlichen Hinweise, Ratschläge und Hilfestellungen in der Experimentier- und Schreibphase, wobei sie mit vielen hilfreichen Kommentaren und konstruktiver Kritik maßgeblich zum Gelingen der Doktorarbeit beitrug.

Das wachsende wissenschaftliche Team des Pathologischen Instituts der vergangenen Jahre war eine große Bereicherung für vielfältige Diskussionsbeiträge und Basis für eine unerschöpfliche Anzahl an Tipps, welche meiner Arbeit oft einen neuen Schwung verliehen. Dabei möchte ich mich vor allem bei Jordan Pischmarov für die unermüdlichen Diskussionen über bioinformatische Grundlagen sowie bei Assoc. Prof. Dr. Shuji Momose, Dr. Hilka Rauert-Wunderlich und Sarah Keppler bedanken. Die helfenden Hände der unermüdlichen TAs Theodora Nedeva, Tina Grieb und Johanna Hammer waren eine große Unterstützung bei so manchem kniffligem Experiment und haben mir auch auf die Schulter geklopft. Ich möchte mich bei euch für die gute Zusammenarbeit, den Rückhalt und das tolle Arbeitsklima bedanken.

Eine essentielle Grundlage für das Gelingen dieser Arbeit bildete die erfolgreiche Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Bargou (CCC, Uniklinikum Würzburg) zur Etablierung des *knockdown*-Experimentes. Des Weiteren danke ich PD Dr. Christian Langer (Innere Medizin III, Uniklinikum Ulm), PD Dr. Stefan Knop und Prof. Dr. Hermann Einsele (Innere Medizin II, Uniklinikum Würzburg) für die Bereitstellung des Probenmaterials und der zytogenetischen sowie klinischen Daten der untersuchten MM-Patienten. Für die Lentivirus-Experimente durften wir großzügigerweise die S2-Labore von PD Dr. Jochen Bodem (Virologie, Universität Würzburg) benutzen. Ich bin für die erfolgreiche Zusammenarbeit sehr dankbar.

Nicht zuletzt möchte ich mich für die dauerhafte Unterstützung bei meinen Eltern Heike und Mario Weißbach, meiner Schwester Cindy Weißbach, meiner Tante Anke Mannsfeld und meinem Onkel Detlev Knop als auch bei meinen Großeltern Gerhard und Heidrun Mannsfeld sowie Christine und Klaus Weißbach bedanken. Sie gaben mir in allen Lebenslagen den wichtigen liebevollen Rückhalt und unterstützten mich immer im Erreichen meiner Ziele. Zu großem Dank bin ich meinem Lebensgefährten Simon Diegmann verpflichtet, welcher mir den notwendigen Ruhepol gab.

Inhalt

Eidesstattliche Erklärung	I
Danksagung	II
1. Zusammenfassung	1
2. Summary	3
3. Einleitung	5
3.1. Das Multiple Myelom	5
3.1.1. Definition	5
3.1.2. B-Zell-Differenzierung und Initiierung des Multiplen Myeloms	5
3.1.3. Primäre und sekundäre genetische Events	8
3.1.4. ‚clonal tiding‘	8
3.1.5. Risikoklassifizierung und Therapie mit Bortezomib	9
3.2. <i>DIS3</i>	10
3.2.1. Aufbau und Struktur	10
3.2.2. Funktion und Lokalisierung in der Zelle	10
3.2.3. <i>DIS3</i> in humanen Tumoren	13
3.3. <i>KRAS</i>	14
3.3.1. Aufbau und Struktur	14
3.3.2. Funktion, Regulierung des GTPase-Zyklus und RAS-Lokalisierung in der Zelle	15
3.3.3. <i>KRAS</i> in humanen Tumoren	17
4. Ziel der Arbeit	18
5. Materialien	19
5.1. Zelllinien	19
5.1.1. Humane Zelllinien	19
5.1.2. Prokaryotische Zellen	19
5.2. Patientenmaterial	19
5.2.1. Patienten mit Multiplem Myelom (<i>whole exome sequencing</i> -Ansatz)	19
5.2.2. Patienten mit Multiplem Myelom der DSMM-XI-Studie (Amplikon-Sequenzierungsansatz)	19
5.3. <i>whole exome sequencing</i> -Daten	20
5.4. Oligonukleotide	21
5.4.1. Primer	21
5.4.2. siRNAs	23
5.5. Plasmide	23
5.6. Größenmarker	23
5.7. Antibiotika	23
5.8. Medien für die Zellkultur	23
5.9. Enzyme	24
5.10. Antikörper	25
5.10.1. Erstantikörper	25
5.10.2. Zweitantikörper	25
5.11. Kits	26
5.12. Puffer/Lösungen	26
5.13. Chemikalien/Reagenzien	28
5.14. Geräte	30
5.15. Verbrauchsmaterialien	31

5.16. Software und Datenbanken	32
6. Methoden	33
6.1. Zellkultur humaner Zelllinien	33
6.2. Microarrays	33
6.2.1. Erstellung und Auswertung von Genexpressionsdaten	33
6.2.2. Erstellung und Auswertung von <i>copy number</i> -Daten	34
6.3. <i>whole exome sequencing</i>	35
6.3.1. Daten-Analyse und -Filterung.....	35
6.3.2. Validierung mit Sanger-Sequenzierung.....	36
6.3.3. Charakterisierung mit String und GSEA.....	36
6.4. Amplikon-Sequenzierung von <i>KRAS</i> und <i>DIS3</i>	37
6.4.1. <i>library</i> -Präparation und Amplikon-Sequenzierung	37
6.4.2. Daten-Analyse und -Filterung.....	38
6.4.3. Mutationsvalidierung mit <i>High Resolution Melting-Assay</i> und Sanger-Sequenzierung	38
6.4.4. Mutationscharakterisierung	40
6.4.5. Statistische Daten-Auswertung.....	41
6.5. Lentivirale Expression von <i>KRAS</i> -Mutationen in Multiplen Myelom-Zelllinien	41
6.5.1. <i>Gateway</i> -Klonierung.....	41
6.5.1.1. Primer Design für attB-PCR-Produkte	42
6.5.1.2. Generierung der attB-PCR-Produkte.....	42
6.5.1.3. BP-Rekombination in Spender-Vektor	43
6.5.1.4. LR-Rekombination in Expressionsvektor	45
6.5.1.5. Validierung der Vektoren	46
6.5.2. Ermittlung geeigneter Zelllinien des Multiplen Myeloms.....	46
6.5.3. Ermittlung geeigneter Polybrene®-Konzentration	47
6.5.4. Ermittlung geeigneter Blasticidin-Konzentration	47
6.5.5. Lentivirus-Produktion durch Transfektion in HEK293FT	47
6.5.6. Titerbestimmung	48
6.5.7. Transduktion und Selektion der Zelllinien.....	48
6.5.8. Validierung der Zelllinien.....	48
6.6. siRNA vermittelter <i>knockdown</i> von <i>KRAS</i> in der Zelllinie AMO1.....	49
6.7. Western Blot.....	49
6.7.1. Herstellung von Gesamtzelllysaten	49
6.7.2. Proteinmengenbestimmung und Proteinvorbereitung	50
6.7.3. Protein-Elektrotransfer	50
6.7.4. Immundetektion von <i>KRAS</i> und ausgewählter nachgestellter Proteine des Signalweges..	51
6.8. Durchflusszytometrie (FACS).....	52
7. Ergebnisse	53
7.1. <i>whole exome sequencing</i> -Ansatz	53
7.1.1. Filterung und Validierung	53
7.1.2. Häufig mutierte Gene im Multiplen Myelom	53
7.1.3. Korrelation von häufig mutierten Genen mit <i>copy number</i> - und Genexpressionsdaten....	53
7.1.4. Akkumulation von mutierten Genen in Signalwegen.....	54
7.1.5. Mutationen in Adhäsionsmolekülen, Rezeptortyrosinkinasen und <i>downstream</i> -Effektoren	55
7.2. Amplikon-Sequenzierungsansatz	59

7.2.1. Analyse, Filterung und Validierung der <i>DIS3</i> - und <i>KRAS</i> -Daten	59
7.2.2. Detektion neuer Mutationen und drei <i>hot spot</i> -Mutationen in <i>DIS3</i>	65
7.2.3. Bestätigung der Mutationsverteilung über <i>KRAS</i>	68
7.2.4. Das Vorkommen von <i>DIS3</i> - und <i>KRAS</i> -Mutationen in Haupt- und Nebenklon	70
7.2.5. Korrelation von <i>DIS3</i> - und <i>KRAS</i> -mutierten Fällen mit zytogenetischen Aberrationen.....	73
7.2.6. Einfluss zytogenetischer Alterationen auf den klinischen Verlauf	74
7.2.7. Einfluss von Haupt- und Nebenklonen auf den klinischen Verlauf	76
7.3. Funktionelle Untersuchung ausgewählter Mutationen in <i>KRAS</i>	77
7.3.1. Generierung von Entry- und Expressionsvektoren.....	77
7.3.2. Funktionalität der pLenti6.3- <i>KRAS</i> -Konstrukte	79
7.3.3. Vorbereitung der Zelllinien für die lentivirale Transduktion.....	81
7.3.4. Etablierung von stabilen Zelllinien mit <i>KRAS</i> -Varianten.....	84
7.3.5. <i>KRAS-knockdown</i> in der Zelllinie AMO1	88
8. Diskussion	91
8.1. <i>whole exome sequencing</i> -Daten offenbaren Gemeinsamkeiten des heterogenen Multiplen Myeloms in betroffenen Signalwegen	91
8.2. Biologische Bedeutung von <i>DIS3</i> -Mutationen für das Multiple Myelom.....	94
8.3. Biologische Bedeutung von <i>KRAS</i> -Mutationen für das Multiple Myelom	96
8.4. Prognostische Bedeutung von zytogenetischen Alterationen	99
8.5. Klinische Bedeutung von <i>KRAS</i> - und <i>DIS3</i> -Mutationen im Multiplen Myelom.....	101
9. Ausblick.....	103
10. Literaturverzeichnis	105
11. Anhang.....	112
12. Abkürzungsverzeichnis.....	130
13. Publikationen/ Poster	133

1. Zusammenfassung

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne B-Zell-Erkrankung, welche von einer großen Heterogenität auf der biologischen und klinischen Ebene sowie in der Therapieantwort geprägt ist. Durch die biologische Interpretation von *whole exome sequencing* (WES)-Daten der Tumor- und Normalproben von fünf MM-Patienten und sechs MM-Zelllinien (ZL) sowie dem Einbezug von publizierten *next generation sequencing* (NGS)-Daten von 38 MM-Patienten konnten in dieser Dissertation sowohl somatische tumorrelevante Mutationen identifiziert als auch ein MM-spezifisches Signaltransduktionsnetzwerk definiert werden. Interessanterweise wurde in fast 100 % der MM-Patienten mindestens eine Mutation und in ~50 % der MM-Patienten sogar mehr als eine Mutation innerhalb dieses Netzwerkes beobachtet, was auf eine inter- und intra-individuelle Signalweg-Redundanz hinweist, die für die individuelle Therapieentscheidung möglicherweise von Bedeutung sein könnte. Außerdem konnte bestätigt werden, dass identische, positionsspezifische und genspezifische Mutationen im MM selten wiederholt auftreten. Als häufig mutierte Gene im MM konnten *KRAS*, *NRAS*, *LRP1B*, *FAM46C*, *WHSC1*, *ALOX12B*, *DIS3* und *PKHD1* identifiziert werden. Interessanterweise wurde die *DIS3*-Mutation in der MM-ZL OPM2 gemeinsam mit einer *copy neutral loss of heterozygosity* (CNLOH) im *DIS3*-Lokus detektiert, und in der MM-ZL AMO1 wurde eine noch nicht näher charakterisierte *KRAS*-Mutation in Exon 4 in Verbindung mit einem *copy number* (CN)-Zugewinn und einer erhöhten *KRAS*-Genexpression gefunden. *DIS3* ist ein enzymatisch aktiver Teil des humanen RNA-Exosom-Komplexes und *KRAS* ein zentrales Protein im RTK-Signalweg, wodurch genetische Aberrationen in diesen Genen möglicherweise in der Entstehung oder Progression des MMs eine zentrale Rolle spielen. Daher wurde die gesamte *coding sequence* (CDS) der Gene *DIS3* und *KRAS* an Tumorproben eines einheitlich behandelten Patientensets der DSMM-XI-Studie mit einem Amplikon-Tiefen-Sequenzierungsansatz untersucht. Das Patientenset bestand aus 81 MM-Patienten mit verfügbaren zytogenetischen und klinischen Daten. Dies ergab Aufschluss über die Verteilung der Mutationen innerhalb der Gene und dem Vorkommen der Mutationen in Haupt- und Nebenklonen des Tumors. Des Weiteren wurde die Assoziation der Mutationen mit weiteren klassischen zytogenetischen Alterationen (z.B. Deletion von Chr 13q14, t(4;14)-Translokation) untersucht und der Einfluss der Mutationen in Haupt- und Nebenklonen auf den klinischen Verlauf und die Therapieantwort bestimmt. Besonders hervorzuheben war dabei die Entdeckung von sieben neuen Mutationen sowie drei zuvor unbeschriebenen *hot spot*-Mutationen an den Aminosäure (AS)-Positionen p.D488, p.E665 und p.R780 in *DIS3*. Es wurde des Weiteren die Assoziation von *DIS3*-Mutationen mit einer Chr 13q14-Deletion und mit *IGH*-Translokationen bestätigt. Interessanterweise wurde ein niedrigeres medianes *overall survival* (OS) für MM-Patienten mit einer *DIS3*-Mutation sowie auch eine schlechtere Therapieantwort für MM-Patienten mit einer *DIS3*-Mutation im Nebeklon im Vergleich zum Hauptklon

beobachtet. In *KRAS* konnten die bereits publizierten Mutationen bestätigt und keine Auswirkungen der *KRAS*-Mutationen in Haupt- oder Nebenklon auf den klinischen Verlauf oder die Therapieantwort erkannt werden. Erste siRNA vermittelte *knockdown*-Experimente von *KRAS* und Überexpressionsexperimente von *KRAS*-Wildtyp (WT) und der *KRAS*-Mutationen p.G12A, p.A146T und p.A146V mittels lentiviraler Transfektion zeigten eine Abhängigkeit der Phosphorylierung von MEK1/2 und ERK1/2 von dem *KRAS*-Mutationsstatus.

Zusammenfassend liefert die vorliegende Dissertation einen detaillierten Einblick in die molekularen Strukturen des MMs, vor allem im Hinblick auf die Rolle von DIS3 und *KRAS* bei der Tumorentwicklung und dem klinischen Verlauf.

2. Summary

Multiple Myeloma (MM) is a malignant B-cell neoplasm that is characterized by a great heterogeneity on the biological and clinical level as well as by a heterogeneous response to therapeutic approaches. Biological interpretation of whole exome sequencing (WES) data of tumor and normal samples of five MM patients and six MM cell lines (CL), as well as the inclusion of published next generation sequencing (NGS) data of 38 MM patients, identified somatic tumor relevant mutations as well as a signal transduction network that was commonly affected in MM. Interestingly, almost 100 % of the MM patients harbored one mutation and ~50 % of the MM patients harbored more than one mutation in different genes of this defined network, which predicted an inter- and intra-individual pathway redundancy that might be of particular importance for individual therapeutic approaches. Furthermore, it was confirmed that the recurrent occurrence of point-specific mutations and even gene specific mutations are rare events in MM. *KRAS*, *NRAS*, *LRP1B*, *FAM46C*, *WHSC1*, *ALOX12B*, *DIS3* and *PKHD1* were among the most recurrently mutated genes in MM. Of note, one of the *DIS3* mutations was accompanied by a copy neutral loss of heterozygosity (CNLOH) in the CL OPM2 and a so far undefined exon 4 mutation in *KRAS* was associated with an increased copy number (CN) and gene expression level of *KRAS* in the CL AMO1. *DIS3* is one of the active parts of the human RNA exosome complex and *KRAS* is a central protein in the RTK pathway leading to the hypothesis that one or more genetic aberrations within these genes may play an important role in the development and progression of MM. To further investigate this hypothesis the whole coding sequence (CDS) of *DIS3* and *KRAS* of tumor samples of a uniquely treated patient set of the DSMM XI was sequenced using an amplicon deep sequencing approach. The study included 81 MM patients for whom cytogenetic and clinical data were available. This approach revealed information about the mutational landscape within *DIS3* and *KRAS* and the occurrence of mutations in major and minor clones. In addition, we were able to investigate the association of the *DIS3* and *KRAS* mutations with additional cytogenetic alterations (such as deletion of chr 13q14, translocation t(4;14)) and we studied the impact of mutations in major and minor clones on the clinical outcome and response to therapy. In particular, we discovered seven unknown mutations and three previously undescribed hot spot mutations at amino acid positions p.D488, p.E665 and p.R780 in *DIS3*. An association of *DIS3* mutations with deletion of chr 13q14 and *IGH*-translocations, that was described previously, was confirmed. Interestingly, a trend towards a lower median overall survival of MM patients with a *DIS3* mutation was observed. Patients with a *DIS3* mutation in the minor clone also showed a worse response to therapy as compared to patients with a mutation in the major clone. Published mutations in *KRAS* were confirmed. Moreover, we revealed no impact of these mutations (in major or minor clones) on the clinical outcome or response to therapy. First siRNA mediated knockdown experiments on *KRAS* and lentivirus mediated overexpression of

KRAS WT and mutated *KRAS* (p.G12A, p.A146T and p.A146V) showed that the phosphorylation status of MEK1/2 and ERK1/2 is dependent on the mutation status of *KRAS*.

In summary, this present doctoral thesis allowed more detailed insights into the molecular structure of MM, specifically with regard to the role of DIS3 and *KRAS* in tumor development and outcome.

3. Einleitung

3.1. Das Multiple Myelom

3.1.1. Definition

Das Multiple Myelom (MM), auch unter dem Begriff Plasmazell-Myelom bekannt, wird nach der *World Health Organisation* (WHO) von 2008 als Knochenmark-basierte, multifokal auftretende B-Zell-Erkrankung definiert, welche mit einer Anreicherung von funktionslosen monoklonalen Paraproteinen (M-Proteine) im Blut und/oder Urin assoziiert ist [1]. Die M-Proteine werden in ~97 % der MM-Patienten detektiert und in die Antikörperklassen Immunglobuline (Ig) IgG, IgA, IgD, IgE und IgM unterteilt [1]. Am häufigsten sind dabei IgG mit ~50 % und IgA mit ~20 % vertreten [1]. Das Auftreten von großen Mengen an monoklonalen Immunglobulinen und die maligne Proliferation der monoklonalen Plasmazellen führen zu Hyperkalzämie, Nierenfunktionsstörung, Anämie, Knochenschädigung und Organversagen bei den MM-Patienten [2]. Die Einteilung des Krankheitsstadiums erfolgt unter Berücksichtigung der Werte für Serum- β 2-Mikroglobulin und Serum-Albumin nach dem *International Staging System* (ISS) [3]. MM-Patienten weisen nach Auftreten der Erkrankung eine durchschnittliche Überlebensrate von drei bis vier Jahren auf, die jedoch im Einzelfall mit einer Spanne von sechs Monaten bis zu zehn Jahren stark differiert [1]. Das durchschnittliche Lebensalter liegt zum Zeitpunkt der Diagnose bei 70 Jahren [1]. Die Prognoseabschätzung wird beruhend auf dem Alter des Patienten, dem Stadium der Krankheit, der Aggressivität der Erkrankung und der Therapieantwort vorgenommen [4]. Das MM kommt nur in etwa 1 % aller malignen Tumoren vor. Jedoch ist es nach den Non-Hodgkin-Lymphomen die zweithäufigste Neoplasie innerhalb der hämatologischen Erkrankungen [5]. Mögliche Auslöser für die maligne Transformation der B-Zellen sind Mutagenese Events, welche durch die Exposition mit toxischen Substanzen, Radioaktivität oder auch durch Infektionen hervorgerufen werden können [1].

3.1.2. B-Zell-Differenzierung und Initiierung des Multiplen Myeloms

Eine MM-Zelle ist eine entartete Plasma B-Zelle, welche wie die B-Zelle einen Reifungsprozess im Keimzentrum durchläuft (Abbildung 1). In der frühen Entwicklung erfährt die B-Vorläuferzelle im Knochenmark eine Umordnung der hypervariablen Gensegmente (V-Region) zur Ausbildung der schweren und leichten Ig-Ketten des B-Zell-Rezeptors (BZR), welche die Antigen-spezifität der B-Zelle bestimmen. Zunächst werden die Gensegmente V, D, J der schweren Kette und anschließend die V und J Segmente der leichten Kette umgeordnet. Dieser Vorgang wird auch als VDJ-Rekombination bezeichnet. Bei einer erfolgreichen Umlagerung der Gene exprimiert die B-Vorläuferzelle einen funktionellen BZR und verlässt das Knochenmark als reife, naive B-Zelle. Durch die Bindung eines Antigens an den BZR wird die naive B-Zelle aktiviert und wandert als Teil der T-Zell-abhängigen Immunantwort in das Keimzentrum. Im Keimzentrum durchläuft die aktivierte B-Zelle eine Affinitätsreifung

hinsichtlich des Antigens. In der *dark zone* des Keimzentrums erfolgt eine klonale Vermehrung der B-Zelle und die V-Region erhält zur Ausbildung der schweren Kette des Igs zusätzlich somatische Hypermutationen (SHM) in Form von Punktmutationen, Deletionen oder Duplikationen. Ziel ist es, eine höhere Spezifität der Antikörper gegen die Antigene zu erreichen. B-Zellen, welche einen Vorteil in der Antigen-spezifität durch die somatische Hypermutation erhalten haben, werden vorwiegend in der *light zone* des Keimzentrums selektiert. Dort stehen die B-Zellen in einem engen Kontakt mit T-Zellen und folliculären dendritischen Zellen. Ein Teil der B-Zellen durchläuft eine *class-switch*-Rekombination (CSR). Dabei werden die unterschiedlichen *switch*-Regionen, welche vor den jeweiligen C-Regionen der schweren Kette des Igs liegen, ausgetauscht. Dadurch können verschiedene Ig-Isotypen mit der gleichen Antigen-spezifität produziert werden. Danach verlassen die B-Zellen das Keimzentrum als Gedächtniszellen oder wandern als Antikörper-produzierende Plasmazellen in das Knochenmark zurück und können dort in Nischen als langlebige Plasmazellen überleben. [6-8]

Während dieser B-Zell-Differenzierung können verschiedene genetische Veränderungen zu einer entarteten Plasmazelle führen. Die Prozesse von SHM und CSR erfolgen auf der Basis von Doppelstrang-Brüchen in den V-Regionen durch die *activation-induced deaminase* (AID). Als Nebeneffekt können sich diese Doppelstrangbrüche mit anderen Doppelstrangbrüchen im Genom verbinden, welches chromosomale Translokationen zur Folge haben kann. Diese aberranten chromosomalen Translokationen sind ein typisches Kennzeichen von MM-Patienten und können zur Deregulation von Onkogenen führen. Außerdem können durch den AID-gesteuerten Doppelstrang-Bruch auch Mutationen außerhalb des Ig-Bereiches initiiert werden. Des Weiteren müssen für die Reifung einer Antigen-aktivierten B-Zelle im Keimzentrum bis hin zu einer Antikörper-produzierenden Plasmazelle im Knochenmark, Zellfunktionen, die für die Antikörperbildung unwichtig sind, herunterreguliert werden. Außerdem werden die Schlüsselprogramme für die Antikörperbildung angeschaltet. Eine Deregulierung dieses Netzwerkes aus Genen und Signalwegen kann eine potentielle maligne Transformation hervorrufen. [6-9]

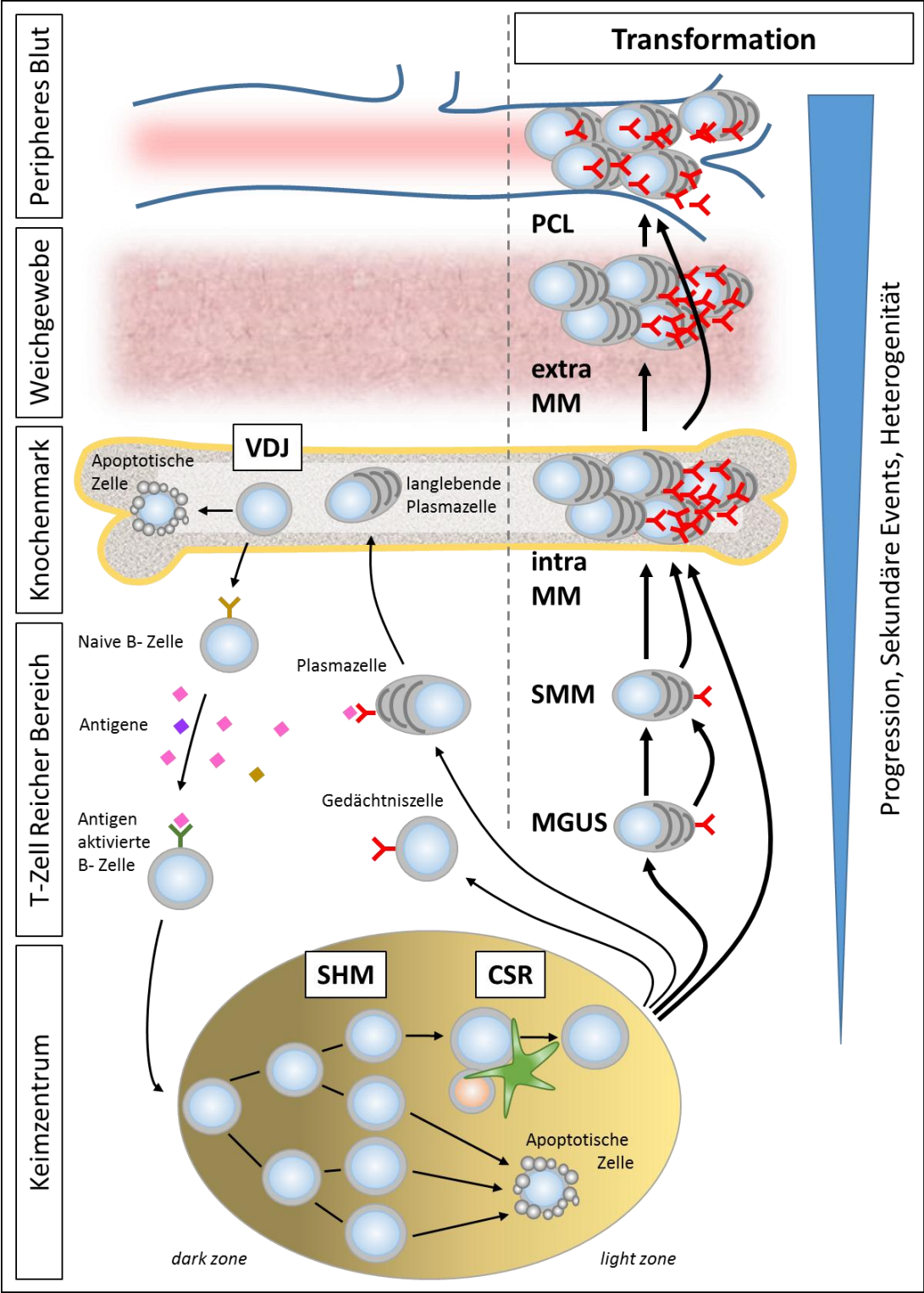


Abbildung 1: Schematische Darstellung der B-Zell-Reifung und MM-Progression

Ausbildung einer reifen naiven B-Zelle mit funktionstüchtigem BZR durch VDJ-Rekombination. Aktivierung der B-Zelle durch Antigene. Klonale Expansion und Erhöhung der Spezifität durch SHM in *dark zone* des Keimzentrums. Selektion der Klone nach Spezifität und Produktion verschiedener Ig-Isotypen durch CSR in *light zone* des Keimzentrums. Dort liegen Zellen in engem Kontakt zu T-Zellen (orange) und dendritischen Zellen (grün). Ausbildung von funktionstüchtigen Gedächtniszellen, Plasmazellen und langlebigen Plasmazellen. Als Nebenprodukte können entartete Plasmazellen entstehen, welche zum MGUS, SMM, intramedullärem MM (intra MM), extramedullärem MM (extra MM) und PCL führen können. Modifiziert nach Küppers *et al.* [7] und Bergsagel *et al.* [9].

3.1.3. Primäre und sekundäre genetische Events

Die erwähnten genetischen Veränderungen, welche die Entartung der B-Zelle auslösen bzw. sich während der Progression von der entarteten B-Zelle über monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS), zum schwelenden Multiplen Myelom (SMM), zum Multiplen Myelom (MM) und letztendlich zur Plasmazell-Leukämie (PCL) anhäufen (Abbildung 1), werden in primäre und sekundäre genetische Events unterteilt. [2, 6, 9]

Zu den primären Events gehören die *IGH*-Translokationen, welche zu Rearrangements mit Chromosom (Chr) 4 (MMSET/ FGFR3), Chr 6 (CCND3), Chr 11 (CCND1), Chr 16 (cMAF), und Chr 20 (MAFB) führen. Außerdem treten auch Trisomien der Chr 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21 auf. Das MM wird auf Grund dessen in hyperdiploide und nicht-hyperdiploide Formen unterschieden. Weitere *IGH*-Translokationen (z.B. Translokation zu Chr 8 (MYC)) oder Zugewinne von den Chromosomenabschnitten 1q, 12p und 17q, Deletionen von den chromosomalen Bereichen 1p, 6q, 8p, 11q, 13, 14q, 16q und 17p sowie *single nucleotide variants* (SNV) werden zu den sekundären Events gezählt. [2, 6, 9]

3.1.4. ‚clonal tiding‘

Während der mehrstufigen Transformation innerhalb der verschiedenen Stadien der Krankheitsentwicklung, akkumulieren viele verschiedene genetische Events in dem Tumor über die Zeit. Die Krankheitsentwicklung vom MGUS über SMM zum MM verläuft nicht linear, sondern nach der darwinischen-Evolutionstheorie hauptsächlich verzweigt. Dies führt zu einer großen Heterogenität des MMs auf dem biologischen und klinischen Level sowie in der Therapieantwort. Diese Unterschiede liegen einerseits zwischen den MM-Patienten und andererseits innerhalb des Tumors eines MM-Patienten vor. [2, 6, 10-12]

Der Tumor setzt sich aus mehreren genetisch verschiedenen Haupt- und Nebenklonen zusammen. Die Dominanz der einzelnen Zellklone innerhalb des Tumors steigt und fällt in Abhängigkeit des Selektionsvorteils gegenüber Proliferation, Variabilität oder auch der Tumorumgebung (z.B. Gewebe), kanzerogene Belastungen (z.B. UV-Licht, Tabak etc.) und auch dem Anti-Tumor-Therapieansatz [13]. Auf Grund dessen können, nach einer vermeintlich erfolgreichen Therapiebehandlung, Wiedererkrankungen auftreten, denn Klone, welche zum Zeitpunkt der Diagnose als Nebeklon im Hintergrund vorliegen, können während der Progression oder nach der Therapiebehandlung zum Hauptklon heranwachsen [2]. Dieses Wechselspiel aus Haupt- und Nebeklon wird als ‚clonal tiding‘ bezeichnet. [11, 12, 14]

3.1.5. Risikoklassifizierung und Therapie mit Bortezomib

Die Entscheidung über die Art eines Therapieansatzes wird zukünftig durch die Unterteilung der Erkrankung in Risikoklassen unter Verwendung der *Mayo Stratification for Myeloma and Risk-Adapted Therapy* (SMART) unterstützt. Auf Grundlage von zytogenetischen Markern werden die diagnostizierten MMs in Standard-, intermediäre- und Hoch-Risiko-Erkrankungen unterteilt (Tabelle 1). [4]

Tabelle 1: Risikoklassifizierung (nach Rajkumar *et al.* [4])

Standard-Risiko	intermediäres-Risiko	Hoch-Risiko
Trisomien t(11;14) t(6;14)	t(4;14)	Chr 17p-Deletion t(14;16) t(14;20)

Die Behandlung von intermediären- und Hoch-Risiko-MM-Patienten erfolgt in Kombination mit Bortezomib [4]. Bortezomib ist ein reversibler 26S-Proteasom-Inhibitor. Das 26S-Proteasom ist ein Teil der Proteinqualitätskontrolle in der Zelle. Durch die Inhibierung des Proteasoms wird möglicherweise die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB blockiert. NF-κB weist einen anti-apoptotischen Effekt auf und wird kontinuierlich in MM-Zellen exprimiert. Die Folge der Inhibierung ist eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber Apoptose und anderen Therapiemöglichkeiten. [15] Bortezomib wird in Kombination mit Dexamethason, Prednison, Lenalidomid, Thalidomid, Cyclophosphamid und Melphalan eingesetzt [4].

3.2. *DIS3*

3.2.1. Aufbau und Struktur

Das humane Gen *DIS3* ist auf Chr 13q22.1 lokalisiert und kodiert zwei verschiedene Transkriptvarianten: Variante a (NM_001128226.2) mit 928 Aminosäuren (AS) und Variante b (NM_014953.4) mit 958 AS. *DIS3* besitzt 22 Exons, von welchen Exon 3 in Variante a und Exon 2 in Variante b durch *splicing*-Prozesse verloren gehen. *DIS3* wird auch als *RRP44* bezeichnet und besitzt einen Aufbau, der vergleichbar ist mit dem ausführlich untersuchten *Dis3* (*Rrp44*) Protein von *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Das humane *DIS3* besitzt eine *PiLT N-terminal* (PIN)-Domäne und eine RNase II/R (RNB)-Domäne, welche der RNase II/R-Domäne von *Escherichia coli* (*E. coli*) ähnelt. Die RNB-Domäne wird von drei *oligonucleotide-binding* (OB)-Domänen umrahmt, den beiden *cold-shock* (CSD)-Domänen CSD1, CSD2 auf der N-terminalen sowie der S1-Domäne auf der C-terminalen Seite. Zusätzlich befindet sich eine *cystein-rich* (CR3)-Domäne am N-terminalen Ende der PIN-Domäne [16].

Das humane Multi-Domänen-Protein *DIS3* weist auf Grund der RNB-Domäne ein 3'→5' gerichtete Exonukleaseaktivität und basierend auf der PIN-Domäne eine Endonukleaseaktivität auf. Es bildet neben *DIS3L1* und *RRP6* eine funktionell aktive Untereinheit des humanen Exosom-Komplexes [16, 17]. Jedoch besitzt nur *DIS3* eine Exo- und Endonukleaseaktivität. Das eukaryotische Exosom besteht aus neun Untereinheiten, wobei die sechs unterschiedlichen RNase-PH-ähnlichen Proteine *Rrp41*, *Rrp42*, *Rrp43*, *Rrp45*, *Rrp46* und *Mtr3* einen Ring formen und von den drei KH/S1-Domänen-Proteinen *Cs14*, *Rrp4* und *Rrp40* stabilisiert werden (Abbildung 2 A) [18]. Im Gegensatz zu dem Exosom in Bakterien und Archaeen hat das eukaryotische Exosom keine eigene Nukleaseaktivität [18, 19], so dass es auf zusätzliche funktionell-aktive Proteine wie *Dis3/Rrp44* zugreift.

3.2.2. Funktion und Lokalisierung in der Zelle

Die funktionellen Untereinheiten des Exosoms unterscheiden sich zusätzlich in ihrer subzellulären Lokalisierung in der humanen Zelle [16]. *DIS3* tritt vorwiegend im Zellkern, aber nicht im Nucleolus, und mit einem geringen Anteil auch im Zytoplasma auf. *RRP6* ist hauptsächlich im Nucleolus und ebenso gering wie *DIS3* im Zytoplasma zu detektieren [16]. *DIS3L1* wurde ausschließlich im Zytoplasma beobachtet. *Knockdown*-Experimente der einzelnen funktionellen Proteine in der humanen ZL HeLa zeigten eine wechselseitige Kompensation in der Stärke der Proteinexpression [16]. Die Substrate und Funktionen von *DIS3* und dem Exosom wurden in humanen Zellen bisher kaum untersucht, aber detailliert in *S. cerevisiae* studiert.

Das Exosom in *S. cerevisiae* operiert im Zellkern und Zytoplasma der Zelle und ist auf Grund der 3'→5' Prozessierung und der Endonukleasefunktion an verschiedenen Ribonukleinsäure (RNA)-Metabolismen beteiligt. Im Zellkern ist das Exosom an dem Reifungsprozess von 5.8S

rRNA, snRNA, snoRNA und der Degradation von Nebenprodukten der RNA-Prozessierung beteiligt (Abbildung 2 B). Außerdem eliminiert es aberrante Transkripte in RNA-Kontroll-Signalwegen (Abbildung 2 C) und spielt eine wichtige Rolle in der Translations-Qualitätskontrolle durch den Abbau von *nonsense*-, *nonstop*- und *no-go*-mRNAs. Des Weiteren ist das Exosom im Zytoplasma an dem Abbau von mRNA-Zwischenprodukten, welche während der RNA-Interferenz durch den RISC-Komplex entstehen, beteiligt. [20-24] Die Funktionalität des Exosoms beruht auf der Interaktion mit den enzymatisch aktiven DIS3- und RRP6-Proteinen [25]. In DIS3 ist die CR3-Domäne sowie die PIN-Domäne essentiell wichtig für die Interaktion mit dem Exosom [26]. Die OB-Domäne S1 ist bekannt für ihre Bedeutung in der Substratbindung und Proteinaktivität [27]. Die enzymatisch aktive PIN- und RNB-Domäne in DIS3 ist für den Abbau der RNA zuständig, wobei die Exonukleaseaktivität einen Abbau des Substrates vom 3'-Ende des RNA-Stranges und die Endonukleaseaktivität eine Spaltung innerhalb des RNA-Stranges ermöglicht [28-30].

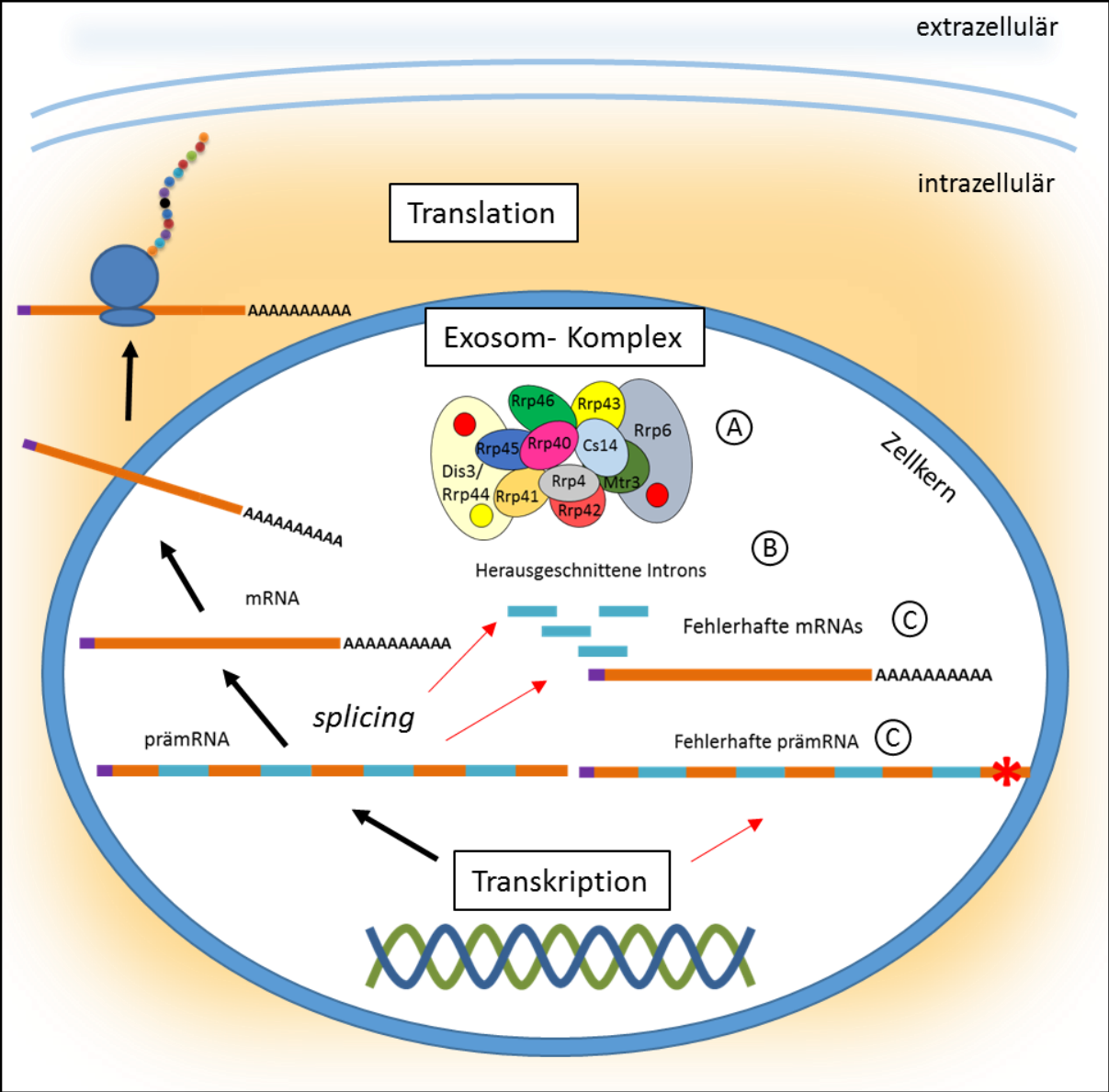


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Funktion des Exosom-Komplexes

Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktion des Exosom-Komplexes im Zusammenwirken mit Dis3 (Rrp44) und Rrp6 im Zellkern von *S. cerevisiae*. Dis3 (Rrp44) und Rrp6 besitzen beide eine Exonukleaseaktivität (roter Punkt). Für Dis3 (Rrp44) ist eine zusätzliche Endonukleaseaktivität bekannt (gelber Punkt). A: Eukaryotischer Exosom-Komplex, bestehend aus neun Untereinheiten und zwei funktionell aktiven Untereinheiten. B: Degradation und Prozessierung von Introns. C: Degradation und Prozessierung von aberranten prä-mRNAs und modifizierten mRNAs. Modifiziert nach Sloan *et al.* [23] und Liu *et al.* [18].

3.2.3. *DIS3* in humanen Tumoren

DIS3 ist möglicherweise maßgeblich an der Entstehung und Entwicklung von verschiedenen humanen Tumoren beteiligt [31]. Im kolorektalen Karzinom (CRC) wurde eine Überexpression von *DIS3* als Ergebnis eines Zugewinnes von Chr 13q festgestellt. Ein *knockdown* von *DIS3* beeinflusste die tumorerzeugende Charakteristik von CRC und identifizierte *DIS3* als Onkogen im CRC-Verlauf [32-34]. Außerdem wurden durch *next generation sequencing* (NGS)-Ansätze *DIS3*-Mutationen im Medulloblastom [35], in der akuten myeloischen Leukämie [36] und dem Multiplen Myelom [37-39] festgestellt.

Im MM wurden *DIS3*-Mutationen als potentielle *driver*-Mutationen beschrieben [38]. Die gefundenen *DIS3*-Mutationen sind mit *IGH*-Translokationen und Chr 13q-Deletionen einschließlich des *DIS3*-Lokus im MM assoziiert [39]. Hierbei wurde eine Akkumulation der Mutationen in der enzymatisch aktiven RNB-Domäne beschrieben [37]. Jedoch ist bisher keine *hot spot*-Mutation bekannt. Untersuchungen von *DIS3*-Mutationen in der RNB-Domäne von *S. cerevisiae* ergaben, dass die Mutationen einen Einfluss auf die Exonukleaseaktivität und den RNA-Metabolismus haben sowie eine Wachstumshemmung hervorrufen [19, 40, 41]. *Knockout*-Experimente von *DIS3* in der Huhn-B-Zelllinie DT40 Cre1 ergaben, dass *DIS3* bedeutend für das Überleben der Zelle ist und durch keine anderen Ribonukleasen ersetzt werden kann [40].

Es wurde bisher keine finale Aussage über die Rolle von *DIS3*, in Kombination mit *loss of function*-Mutationen und einer *loss of heterozygosity* (LOH), als Onkogen oder Tumorsuppressorgen in dem MM-Verlauf getroffen [37, 38]. Überdies wurden MM-Screeningansätze nach *DIS3*-Mutationen bislang nur an Patienten durchgeführt, die nach ihrem *IGH*-Status vorselektiert wurden [39], oder an nicht einheitlich behandelten Patientensets ohne Korrelation zu klinischen Parametern [37, 38, 42].

3.3. KRAS

3.3.1. Aufbau und Struktur

Das humane Onkogen *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog*) ist auf Chr 12p.1 lokalisiert und besteht aus sechs exonischen Regionen [43, 44]. Auf Grund von *splicing*-Prozessen nach der Transkription entstehen die zwei Transkriptionsvarianten a (NM_033360.2 mit Exon 5) und b (NM_004985.3 ohne Exon 5). Exon 6 wird in KRAS a nicht in die AS-Sequenz umgeschrieben, kodiert jedoch die C-terminale Region von KRAS b, wobei die *splice*-Variante b am häufigsten entsteht. Es entstehen die monomeren KRAS-Proteine mit einer Größe von 188/189 AS und einer atomaren Masse von ~21,6 kDa [44, 45].

KRAS gehört neben HRAS und NRAS zu der RAS-Super-Familie, welche in die RAS-, RHO-, RAB-, ARF-, RAN- und G α -Familien unterteilt wird [46, 47]. Die RAS-Super-Familie umfasst mehr als 150 humane Proteine [46]. KRAS ist der RAS-Unterfamilie zugeordnet, welche aus 35 Proteinen mit Größen zwischen 183 – 340 AS besteht [47]. Die RAS-Super-Familie gehört zu der Gruppe der GTPasen, welche die gleichen biochemischen Aktivitäten in der Bindung und Hydrolyse von Guanosintriphosphat (GTP) in der Zelle aufzeigen [48]. Die Affinität der RAS-Super-Familie beruht auf Ähnlichkeiten in den funktionellen Domänen, Lipidmodifizierungen, der Struktur und dem GTPase-Zyklus [46]. Der GTPase-Zyklus beschreibt die hochaffine wechselnde Bindung des GTPase-Proteins von Guanin-Nukleotiden sowie der Hydrolyse von GTP zu Guanosindiphosphat (GDP).

KRAS besitzt essentielle Domänen wie die fünf G-Boxen, *switch* I und II sowie Interaktionsbereiche für Effektoren und für die Regulatoren: *GTPase activating proteins* (GAP), *guanine nucleotide exchange factors* (GEF) und *guanine nucleotide dissociation inhibitors* (GDI) [47]. Die fünf G-Box-Domänen von KRAS sind G1, G2, G3, G4 und G5, von welchen G1, G3, G4 und G5 eine hohe Konservierung in der RAS-Unterfamilie aufweisen [47]. Diese G-Boxen sind wichtige funktionelle Bereiche, welche durch die Bindung von GDP/GTP und Mg²⁺ die intrinsische GTPase-Aktivität und den Konformationswechsel steuern [47-49]. Im Detail ist die G1-Box eine Bindungsstelle für die Purin-Nukleotide von GDP/GTP. Diese Interaktion wird mit einem spezifischen Kontakt der G4-Box mit dem Guanin-Ring von GTP durch Bindung von Wasserstoff stabilisiert. Die G3-Box enthält eine Asparaginsäure, die den wichtigen Kofaktor Mg²⁺ bindet. Dieser Kofaktor ist notwendig für die Guanin-Nukleotid-Bindung und die GTP-Hydrolyse [47, 50]. Die G5-Box steht nur in einem indirekten Zusammenhang mit den Guanin-Nukleotiden. Die G2-Box liegt in der *switch* I-Region von KRAS. Die *switch* I- und *switch* II-Regionen sind Loops, welche sich in Abhängigkeit der Bindung von GDP oder GTP umorientieren und somit wesentliche Komponenten für die Bindungsoberfläche für Effektoren liefern [51, 52].

3.3.2. Funktion, Regulierung des GTPase-Zyklus und RAS-Lokalisierung in der Zelle

In allen RAS-Proteinen verändern die *switch* I- und II-Regionen ihre Konformation in Abhängigkeit von der Nukleotid-Bindung von GDP/GTP. In dem GTP-gebundenen Status bilden sie eine transiente hochaffine Oberfläche für *downstream*-Effektoren, wie PI3K, RAF, RAL, RIN, TIAM und PLC ϵ und schalten somit verschiedene klassische Signalwege wie den MEK/ERK oder PI3K/AKT an [44, 53-55]. Dadurch haben die RAS-Proteine einen Einfluss auf die Proliferation, den Zellzyklus und das Überleben der Zelle [53]. Durch die GTPase-Aktivität der RAS-Proteine wird GTP unter der Abspaltung eines Phosphatrestes zu GDP hydrolysiert, welches zu einer Umorientierung der Bindungsstellen für die Effektoren und somit zu einer Ablösung der Effektoren und einer Abschwächung der *downstream*-Signalwege führt [47].

Die Aktivierung von RAS erfolgt durch einen langsamen, intrinsischen Austausch von gebundenem GDP durch GTP. Daher liegt RAS vorwiegend in einem GDP-gebundenen und dadurch inaktiven Zustand vor (Abbildung 3 A). RAS wird außerdem durch einen stimulus-induzierten Mechanismus aktiviert (Abbildung 3 B). Dabei wird die Ablösung von GDP durch GEFs beschleunigt, wodurch die Bindung von GTP und dadurch die Aktivierung von RAS gefördert wird [47, 56, 57]. Die Aktivierung wird reguliert, indem die GEFs auf spezifische *upstream*-Signale reagieren. Ein bekanntes Beispiel ist das Ansprechen des GEF *son of sevenless homolog 1* (SOS1) auf die Phosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) [58, 59]. Dadurch bildet RAS wie KRAS eine zentrale Rolle in RTK-assoziierten-Signalwegen [57, 60]. Die intrinsische Hydrolyse von gebundenem GTP zu GDP verläuft sehr langsam, welches eine verlängerte Aktivierung des *downstream*-Signalweges zur Folge hätte. Durch die Bindung von verschiedenen GAPs an aktives RAS wird die GTPase-Aktivität verstärkt, welches zu einer schnelleren Inaktivierung führt (Abbildung 3 F) [57, 61]. Der inaktive Zustand von RAS kann durch GDIs verlängert werden (Abbildung 3 C) [62]. Die GDIs binden an inaktives RAS und verhindern die Ablösung von GDP [57]. Bisher sind GDIs nur im Zusammenhang mit RHO- und RAB-Proteinen bekannt [47, 63]. Jedoch besitzt auch KRAS einen möglichen Interaktionsbereich für GDIs. Die Auflösung des RAS-GDI-Komplexes kann wiederum von GDI *displacement factors* (GDFs) umgesetzt werden (Abbildung 3 D) [64]. Die Signalwege sind von der richtigen intrazellulären Lokalisierung von RAS abhängig [65, 66].

Viele RAS-Proteine, darunter auch KRAS, weisen aufgrund von verschiedenen Lipid-Modifikationen eine Assoziation zur Zellmembran auf [67]. Diese Lipidmodifikationen entstehen in einer posttranslationalen Modifizierung. Dabei wird eine kovalente Anheftung einer Farnesol-Gruppe an den Cysteinyrest am C-Terminus von KRAS durch Prenylierung bewirkt [65]. Das Chaperon PDE δ kann diese Farnesol-Gruppe von KRAS binden und somit dessen richtige intrazelluläre Organisation unterstützen [66]. Die Bindung und der Transport

ist dabei unabhängig vom GDP/GTP-Status, wird aber durch eine zusätzliche Interaktion mit Arl2/Arl3 reguliert [68].

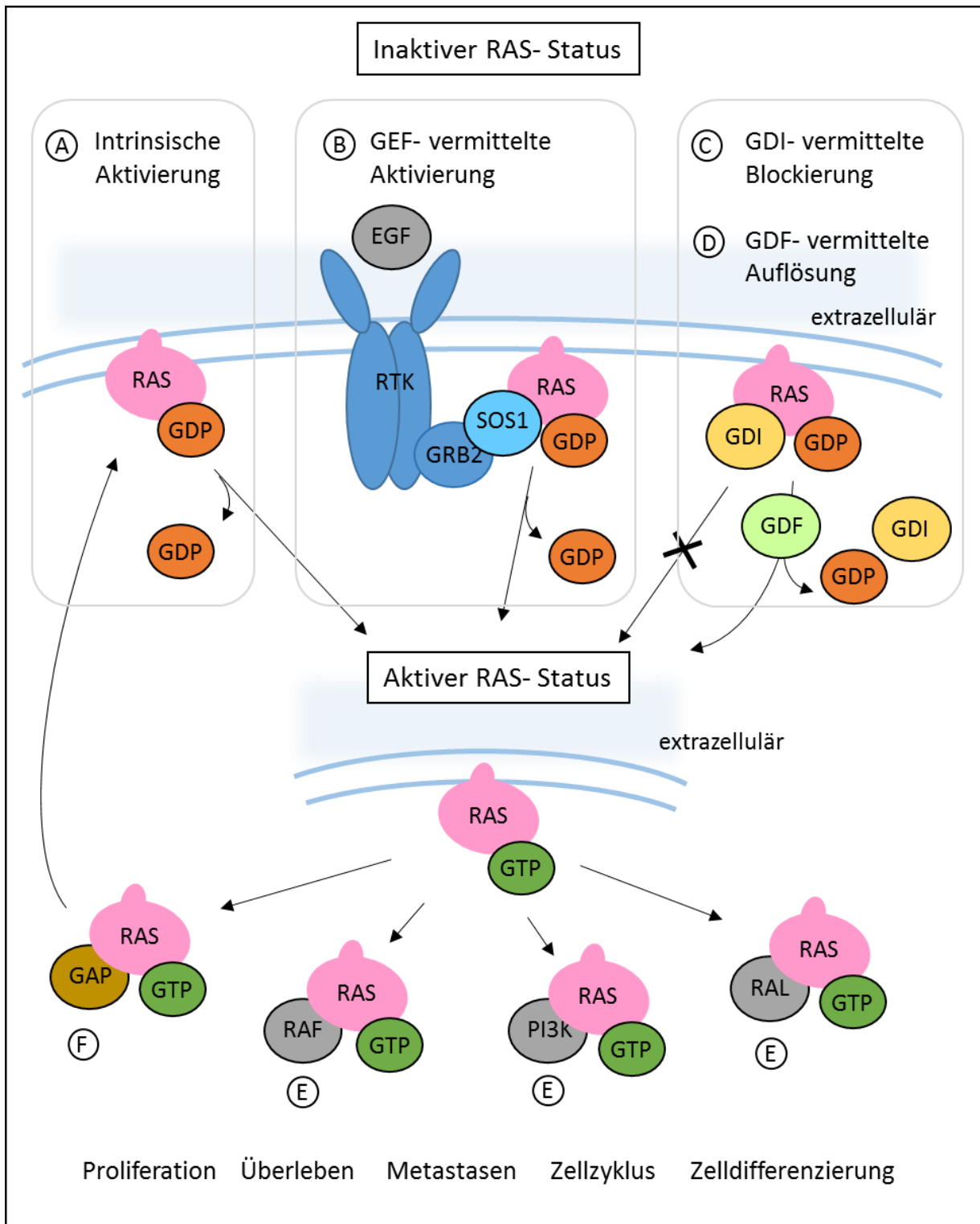


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aktivierung von RAS

Schematische Darstellung der Regulation des RAS-Status in der Zelle. Aktivierung von GDP (orange)-gebundenem RAS (rosa) durch A: Intrinsische Aktivierung oder B: GEF-vermittelte Aktivierung am Beispiel SOS1 (hellblau) durch RTKs (dunkelblau). C: Blockierung der Aktivierung von RAS durch GDIs (gelb). D: Aufhebung des RAS-GDI-Komplexes durch GDFs (hellgrün). E: Klassische Effektoren (grau) von GTP (grün)-gebundenem RAS. F: GAP (ocker)-vermittelte GTP-Hydrolyse. Modifiziert nach Colicelli *et al.* [47].

3.3.3. KRAS in humanen Tumoren

Es ist bekannt, dass eine über- oder dauerhafte Aktivierung von KRAS zur Überaktivierung der *downstream*-Signalwege in den Zellen führt und somit in Abhängigkeit des Gewebes einen Einfluss auf die Tumorgenese hat [44, 47, 69]. Eine erhöhte Aktivierung kann durch verschiedene Mechanismen wie durch eine Überexprimierung von KRAS, erhöhte *upstream*-Signale der RTKs, Deletionen von Negativregulatoren (GAPs) oder der Überexpression von Positivregulatoren (GEFs) ausgelöst werden [47]. Auch können Mutationen in KRAS wie an AS-Position p.A146 den GDP/GTP-Austausch beeinflussen oder an den AS-Positionen p.G12, p.Q61 die GTPase-Aktivität und die GTP-Hydrolyse herabsetzen und somit eine verlängerte Aktivierung von KRAS herbeiführen [44, 47, 70].

Onkogene KRAS-Mutationen sind in vielen Tumorarten verbreitet, wobei die Häufigkeit von der Tumorentität abhängt. In >90 % des duktales Pankreas-Adenokarzinoms (PDAC) [71], in ~30 - 40 % des CRCs [72], in ~15 - 20 % des nicht-kleinzelligem Lungenkarzinoms [73] und in ~20 % des Multiplen Myeloms [37] ist eine KRAS-Mutation vorhanden. Dabei sind am häufigsten Codon 12 und 13 in Exon 2, neben Codon 61 in Exon 3 und Codon 117, 146 in Exon 4, in humanen Tumoren betroffen [44, 53, 72]. Die KRAS-Mutationen können den Erfolg eines Therapieansatzes beeinflussen. Es wurde im CRC festgestellt, dass Patienten mit einer KRAS-Mutation eine schlechtere Therapieantwort auf die EGFR-Inhibitoren, wie Cetuximab, aufgrund einer höheren Phosphorylierung der *downstream*-Signalwege im Gegensatz zu KRAS-WT Patienten aufweisen [74, 75]. Im MM wurden klinische und funktionelle Studien bisher hauptsächlich auf Exon 2- und Exon 3-Mutationen bezogen [76-80] bzw. wurden die Screeningansätze an kleinen Studienkohorten ohne klinischen oder zytogenetischen Bezug durchgeführt [81].

4. Ziel der Arbeit

1. Am Multiplen Myelom (MM) erkrankte Patienten weisen eine starke Heterogenität im Verlauf der Krankheit, der Therapieantwort, in dem Vorkommen von zytogenetischen Alterationen sowie dem Auftreten von Mutationen auf. Eine Anwendung eines einheitlichen erfolgreichen Therapieansatzes ist daher nur bedingt möglich. Anhand von sechs MM-Zelllinien (ZL) und fünf Tumorpatientenproben sollen auf Genom-Ebene, unter Verwendung von *whole exome sequencing* (WES)-Daten und der Erhebung von *copy number*- und Genexpressionsdaten, tumorrelevante Gemeinsamkeiten aus dem Mutationsspektrum der MM-Zellen herausgearbeitet und charakterisiert werden.
2. Die in den MM-Zellen hochfrequent mutierten Gene *DIS3* und *KRAS*, welche durch den WES-Ansatz als tumorrelevant identifiziert wurden, sollen erstmals zum Zeitpunkt der Diagnose an einem großen, einheitlich behandelten MM-Patientenset mit verfügbaren Normalproben und auch klinischen und zytogenetischen Daten untersucht werden, um den Einfluss der mutierten Gene auf den klinischen Verlauf und die Therapieantwort abzuleiten. Dazu sollen von der vollständigen *coding sequence* (CDS) der Gene *target-resequencing*-Daten angefertigt, ausgewertet und mit dem klinischen Verlauf, der Therapieantwort und anderen klassischen zytogenetischen Aberrationen korreliert werden.
3. *KRAS* ist ein Schlüsselfaktor in den RTK-*downstream*-Signalwegen, welche mit dem WES-Ansatz als häufig mutiert identifiziert wurden. Außerdem ist *KRAS* eines der am häufigsten mutierten Gene im MM. Dabei akkumulieren die Mutationen vorwiegend in Exon 2 und selten in Exon 4, so dass nur wenig über die funktionelle Bedeutung der Exon 4-Mutation im MM bekannt ist. Daher sollen diese Mutationen in Exon 4 von *KRAS* hinsichtlich ihres Einflusses auf die Phosphorylierung der *downstream*-Signalwege untersucht werden.

5. Materialien

5.1. Zelllinien

5.1.1. Humane Zelllinien

Die humanen Multiplen Myelom-Zelllinien (MM-ZL) L363, JIN3, KMS11, KMS12BM, MOLP8, OPM2, U266, NCIH929, RPMI8226 und AMO1 wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) und die MM-ZL MM1.S von LGC Biolabs (Wesel, Deutschland) käuflich erworben. Die MM-ZL INA6 wurde von Prof. Martin Gramatzki (Kiel, Deutschland) und die ZL des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL-ZL) HLY-1 von Dr. Talal Al Saati (Purpan Hospital, Toulouse, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Die ZL HEK293FT aus der humanen embryonalen Niere wurde mit dem ViraPower™ Lentiviral Expression System von Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) erworben.

5.1.2. Prokaryotische Zellen

Die chemisch kompetenten One Shot Stbl3 (#C737303) *E. coli* und TOP10 One Shot (#C404003) *E. coli* wurden von Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

5.2. Patientenmaterial

Die MM-Zellen der jeweiligen Patienten wurden unter Anwendung von CD138+ Microbeads aus den entnommenen Knochenmarksaspiraten angereichert [82]. Die zugehörigen Normalproben (Nicht-Tumor) der Patienten wurden aus peripherem Blut oder Knochenmark gewonnen.

5.2.1. Patienten mit Multiplem Myelom (*whole exome sequencing*-Ansatz)

Es wurden Proben von fünf Patienten für den WES-Ansatz verwendet. Die Proben wurden von drei unbehandelten und von zwei mit mehreren vorhergehenden Therapien behandelten Patienten entnommen. Einer der unbehandelten Patienten wies eine anaplastische Morphologie auf. Von den beiden behandelten Patienten zeigten beide eine extramedulläre Verbreitung der MM-Zellen auf, und einer von ihnen hatte eine Plasmazell-Leukämie. Von den Patienten liegen Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungsdaten (FISH) für die Detektion von Translokationen, Insertionen und Deletionen vor. Die Studie wurde vom Ethik-Komitee der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg (Referenz Nummer: 18/09, Genehmigung erneuert am 09.03.2009) genehmigt. [83]

5.2.2. Patienten mit Multiplem Myelom der DSMM-XI-Studie (Amplikon-Sequenzierungsansatz)

Die Studienkohorte umfasste 81 Proben von Patienten mit neu diagnostiziertem, symptomatischen MM der DSMM (Deutsche Studiengruppe Multiples Myelom) -XI-Studie und Fälle des Pathologischen Instituts Würzburg (S_Tabelle 1). Diese Patienten wurden initial mit

drei Zyklen von Bortezomib, intravenösen Cyclophosphamid und Dexamethason, mit anschließender Stammzellmobilisierung, Hochdosis (HD)-Chemotherapie und autologer Stammzelltransplantation behandelt [84]. Alle Proben wurden zum Zeitpunkt der Diagnose entnommen. Die Studie wurde vom Ethik-Komitee der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg (Referenz Nummer: 18/09, Genehmigung erneuert am 09.03.2009) und der Universität Ulm (Anmeldungs-Nummer: 307/08, Datum der Genehmigung: 21.01.2009) genehmigt und registriert bei ClinicalTrials (gov.numberNCT00833560). Für die Studie liegen klinische (Erstdiagnose, OS, PFS, EFS) und zytogenetische Daten (FISH-Daten: Translokation, Deletion, Insertion; *copy number*-Daten) vor (S_Tabelle 11). [84, 85]

5.3. *whole exome sequencing*-Daten

Es wurden *whole exome sequencing* (WES)-Daten von den MM-ZL OPM2, AMO1, JIN3, L363, U266, MM1.S sowie von Tumor- und Normalproben von fünf an MM erkrankten Patienten zur Identifizierung des Mutationsspektrums im MM verwendet. Die Daten wurden auf dem Gallx (Illumina) durch Verwendung des *Paired End DNA Sample Preparation Kit* (Illumina, San Diego, USA) und der V1 und V2 SeqCap EZ Exome Library SR von Nimblegen (Roche, Mannheim, Deutschland) generiert. Die Daten wurden mit der *Off-Line Base Caller* Software und GERALD von Illumina konvertiert und mit dem *Burrows Wheeler Aligner* gegen das Referenzgenom hg19 abgeglichen. Das *SNV-calling* erfolgte mit der *Genome Analysis Toolkit Pipeline* mit anschließender SeattleSeq 131-Annotierung. [83]

5.4. Oligonukleotide

5.4.1. Primer

Die Primer für die Erstellung der *library* durch den Access Array wurden von Fluidigm (Amsterdam, Niederlande) entworfen und synthetisiert (Tabelle 2). Die Access Array Barcodes (#100-1771) für die 454 GS Roche Junior Sequenzierung wurden auch von Fluidigm (Amsterdam, Niederlande) bezogen.

Tabelle 2: Access Array Primer

Gen	Chr	Von -	Bis (hg19)	Exon	forward Primer 5' - 3'	reverse Primer 5' - 3'	bp	GC
DIS3	13	73355679	73356033	1	TTCCCTGTCATACCCCTTGT	CTAGATTGACGCCCTTTTGTGGA	355	66
DIS3	13	73355187	73355522	2	AGCTCTGTCAAACATAAAATCCTGT	CTAACTCCTGGTGTCTCTCTGC	336	41
DIS3	13	73354929	73355311	3	CCCGAATTTTGCTAATCCTGTGG	AGGGTTTAGTGACTATTGTCTCGTT	383	35
DIS3	13	73352260	73352602	4	GGCCTAATGATTATTTTACACGCATT	TGGTTAAGCATTATGTGCTAAGAGT	343	35
DIS3	13	73351336	73351713	5	GCCTACTCAGGTTAATGGGAAT	ACTGTCCGAAACAAGACTATCCA	378	33
DIS3	13	73349875	73350259	6	TGCGCAAAGATTTAAAAAATACCTGA	CGGCATCTTTGGTTTGCTCTT	385	30
DIS3	13	73349271	73349624	7	TGAAACTTGTTTCCAAAGCTGAC	AGATTCCATAGAGATATTCAGAGTGTATG	354	36
DIS3	13	73348007	73348386	8	TGGAGGCAAAAGAAAGGCTATAAGT	GAATGTCTGTGGTTTGGTTTGGC	380	33
DIS3	13	73347673	73348018	9	ACATGCTACTTACCAGGTCACTTT	CTTTTGCCTCCATCCTCAGATTT	346	32
DIS3	13	73346630	73347007	10	AGTGTCTGCCACATAGAAAAACT	GGCGTTTCTAATAATGCCTCTTG	378	36
DIS3	13	73346163	73346541	11	ACATATGGCCAATAGCGTGACG	GTGTTGTCATCAAGAAAATACAGC	379	33
DIS3	13	73345751	73346078	12	AATCTTCCCCTTGACTTTCACAA	CCCAGTCAAGCATATTGACATCC	328	33
DIS3	13	73345027	73345395	13	AGCCATGAAACGAACCTTTGAAT	AGCAGAACACTCTTTTCTTCTCT	369	33
DIS3	13	73344802	73345168	14	CGCAGCTGGGGACTTTTTAG	ACCTGATTCCCATAACAAATACTCT	367	26
DIS3	13	73342805	73343130	15	TGGAAGCTAGAAGAAACAGGAGT	GTAGTGAAAGTAGGAGGACATATTGA	326	30
DIS3	13	73339963	73340340	16	TTTCTGTCTTTGAAGCCAAT	AAACAGCAGATGGTCATAAGCC	378	31
DIS3	13	73337489	73337856	17	ACAAACAATAAACCTTTATGGAAATATGAAT	AGGAAATGCTCTTATTATCTTCTTGGT	368	32
DIS3	13	73335929	73336305	18	CGATGAAACATGACATCTCGTGA	ATGGTGCTCTTCCCTCTTTTTG	377	36
DIS3	13	73335755	73336113	19	TTCTAGCAGTATCGACAAAAGGC	CACTATGGCTTAGCGTCTCCAAT	359	37
DIS3	13	73335435	73335810	20	CCATTTATGAACTCTCAAAGAAAAAGTGC	CGTGATCAGTGGCTTTTCATAC	376	30
DIS3	13	73334493	73334844	21	ATCCCGTGGCCTAAAGAAATCAG	ACAAAGCCTCAAATGTAAGGAAGC	352	35
DIS3	13	73333675	73334047	22	AGTTGCTGTCTGCTACTGTATT	ACCTTATTTCCCCCATTTGTCAT	373	32
KRAS	12	25398126	25398510	2	TCATGAAAATGGTTCAGAGAAACCT	TACGATACACGTCTGCAGTCAAC	385	34
KRAS	12	25380030	25380388	3	ACAGGGATATTACCTACCTATAAACA	AGGTGCATGTAATAATCCAGAC	359	35
KRAS	12	25378379	25378750	4	CCATGGACTGGATTAAGAAGC	TGTGTTACTAATGACTGTGCTATAACT	372	33
KRAS	12	25368300	25368677	5	TGTTGCCACCTGTTACCTTTA	ACAAACCAGGATTCTAGCCATA	378	34
KRAS	12	25362610	25362971	6	AGTCTGCATGGAGCAGGAAAAA	ATTCAGTTGCCTGAAGAGAAACA	362	28

Die Primer für die Validierung der WES- und Amplikon-Daten durch PCR und Sanger-Sequenzierung wurden von Integrated DNA Technologies (Leuven, Belgien) synthetisiert (Tabelle 3). Die Primer für die Validierung der WES-Daten sind im Anhang aufgelistet (S_Tabelle 3).

Tabelle 3: Primer für Validierung der Amplikon-Daten mit Sanger-Sequenzierung

Gen	Chr	Von -	Bis (hg19)	Exon	forward Primer 5' - 3'	reverse Primer 5' - 3'	bp	MgCl ₂
DIS3	13	73335798	73336005	19	AGCCACTGATGCACGTTG	AAGCACATATTAGTACTGACATACC	207	1,5 mM
KRAS	12	25398250	25398510	2	TAGCTGTATCGTCAAGGCAC	TACGATACACGTCTGCAGTCAAC	261	3,0 mM
KRAS	12	25378397	25378615	4	GAAGCAATGCCCTCTCAAGA	AACAGGCTCAGGACTTAGCA	219	2,5 mM

Die mit HPLC aufgereinigten Primer für den *High Resolution Melting-Assay* (HRM) (Tabelle 4) und die Klonierung (Tabelle 5) wurden von Eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 4: Primer für Validierung der Amplikon-Daten mit HRM

Gen	Chr	Von -	Bis (hg19)	Exon	forward Primer 5' - 3'	reverse Primer 5' - 3'	bp	MgCl ₂
<i>DIS3</i>	13	73355858	73356033	1	ATGTCGTCTCGCAGGTAGTG	CTAGATTGACGCCTTTTGTCTGGA	149	3,5 mM
<i>DIS3</i>	13	73354929	73355060	3	CCCGAATTTTGTCTAATCTGTGG	CCCGTATATAAACGCATCCGAGA	132	3,0 mM
<i>DIS3</i>	13	73352260	73352457	4	GGCCTAATGATTATTTTTACACGCATT	CGAGTAGCAGCAAAATGGTACAATGA	198	3,0 mM
<i>DIS3</i>	13	73352442	73352602	4	TCATTGTACCATTTTGTCTACTCG	TGGTTAAGCATTATGTGCTAAGAGT	171	2,5 mM
<i>DIS3</i>	13	73352442	73352518	4	TCATTGTACCATTTTGTCTACTCG	AGAAACCTATGTAGAACAAGAACAGG	87	2,5 mM
<i>DIS3</i>	13	73352484	73352602	4	CATTTTCTCCCTGTCTTGTCTACA	TGGTTAAGCATTATGTGCTAAGAGT	119	3,0 mM
<i>DIS3</i>	13	73351566	73351713	5	CAGACAAACAAGCAAGACGATCTA	ACTGTCGAAACAAGACTATCCA	148	3,0 mM
<i>DIS3</i>	13	73349875	73350111	6	TGCGCAAAGATTTAAAAAACTACCTGA	CTTGAAGCTACAGTATGGATTCATGG	237	3,0 mM
<i>DIS3</i>	13	73349307	73349417	7	CAAAGCTACACAGACAAAAAAAATCC	TCTGTGGTTTTACATGATGAAGGTC	111	3,0 mM
<i>DIS3</i>	13	73349393	73349537	7	GACCTTCATCATGTAAAACACAGAGA	CGTGCCCTCTGTTGTTTTAAAC	145	3,0 mM
<i>DIS3</i>	13	73347789	73347880	9	CATCCCCACATAAAATTAATCTTTAAGC	TTCCACATTAGAAGGACGGAG	92	2,5 mM
<i>DIS3</i>	13	73347881	73348018	9	CTAATGTGGAAGCCTGTCTGGT	CTTTTGCCTCCATCCTCAGATTT	138	2,0 mM
<i>DIS3</i>	13	73346850	73347007	10	GGCATCTTTGGCAGAAAACCTAAGAAC	GGCGTTTCTAATAATGCCTCTTGG	158	3,0 mM
<i>DIS3</i>	13	73346291	73346396	11	GAATACCTCCAAATTTCCATTTTCAGATT	AGACCTGAGGCATCTGTGTATTG	106	2,0 mM
<i>DIS3</i>	13	73345210	73345395	13	CAGAAATACCTGTCCACGTACATT	AGCAGAACTCTTTTCTTCTTGG	186	2,5 mM
<i>DIS3</i>	13	73342805	73342980	15	TACAAACCTAAGTTCCTTGGTCTGC	GCTAGTTTATTAGTCCACGGAGAC	176	3,0 mM
<i>DIS3</i>	13	73337650	73337856	17	CGAAGCAGAGCATGTTCCAGAAA	AGGAAATGCTCTTATTATCTTCTTGGT	207	3,0 mM
<i>DIS3</i>	13	73335929	73336153	18	CGATGAACAATGACATCTGCGTA	AGCTGTGACTTCTGTTCTGGAATG	225	3,0 mM
<i>DIS3</i>	13	73336129	73336305	18	CATTCCAGAACAGAAGTACACAGCT	ATGGTGCTCTCCCTCCTTTTTG	177	3,0 mM
<i>DIS3</i>	13	73335435	73335647	20	CCATTTATGAACTCTCAAAGAAAAGTGC	AGCAAAGGAATAGTAAGTGAAGAAGCC	213	2,5 mM
<i>DIS3</i>	13	73334495	73334703	21	CCCGTGGCCTAAAGAAATCAGT	CATCAGAAGATCCGAATGTCCCT	208	2,5 mM
<i>DIS3</i>	13	73333844	73333933	22	CTGTATCACACACTTAGGCTTAGAAGTG	ACCTTATTTCCCCCATTTGCAT	204	2,5 mM
<i>KRAS</i>	12	25380229	25380388	3	CCTCCCCAGTCTCATGTAC	AGGTGCACTGAATAATCCAGAC	160	2,0mM
<i>KRAS</i>	12	25378596	25378686	4	TGCTAAGTCCTGAGCCTGTT	GGACTCTGAAGATGTACCTATGG	91	2,5 mM
<i>KRAS</i>	12	25378664	25378750	4	CCATAGGTACATCTCAGAGTCC	TGTGTTACTAATGACTGTGCTATAACT	87	3,5 mM
<i>KRAS</i>	12	25362610	25362849	6	AGTCTGCATGGAGCAGGAAAAAA	TCAGGGTGTGATGATGCCT	240	3,0mM

Tabelle 5: Primer für Fusion-PCR für die Klonierungsansätze

Primer	Sequenz 5' - 3'
a	CCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGACTGAATATAAACTTGTGGTAG
b	GAAAGCTGGGTCTTACATAATTACACACTTTGTCTTTG
c	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGAAGGAGATAGAACCATGGGTAAGCCTATCCCTAAC
d	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
e	TTCGAAGGAGATAGAACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC
f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGAAGGAGAT
g	TTTATATTCAGTCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG
h	GAGCTGTACAAGACTGAATATAAACTTGTGGTAG
CMV F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
M13 F	TGTAAAACGACGGCCAGT

5.4.2. siRNAs

Es wurde eine *KRAS*-spezifische, mit Alexa-Fluor-488-gelabelte, *stealth* siRNA von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) bezogen, welche an beide Transkripte von *KRAS* bindet (Tabelle 6). Die *AllStar Negativ Control* siRNA wurde von Qiagen (Hilden, Deutschland) bezogen.

Tabelle 6: siRNA

Name	Sequenz 5' - 3'	Gen	Exon
Stealth RNAi™ hss180200	GACGATACAGCTAATTCAGAATCAT	<i>KRAS</i>	2

5.5. Plasmide

Tabelle 7: Plasmide

Name	Selektion		Hersteller
	Klonierung	Infektion	
pDONR221 (#12536017)	Kanamycin		Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
pLenti6.2-GW/EmGFP (#V36920)	Ampicillin	Blasticidin	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
pLenti6.3/V5-DEST(#V533-06)	Ampicillin	Blasticidin	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

5.6. Größenmarker

Tabelle 8: Größenmarker

Name	Hersteller
GeneRuler 100 bp DNA ladder (#SM0241)	ThermoScientific, Rockford, USA
GeneRuler 1 kb DNA ladder ready to use (#SM0313)	ThermoScientific, Rockford, USA
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (#26619)	ThermoScientific, Rockford, USA

5.7. Antibiotika

Tabelle 9: Antibiotika

Name	Hersteller
Kanamycin für Molekularbiologie (#T832.1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin (#10835242001)	Roche, Mannheim, Deutschland
Blasticidin (#A11139-03)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Geneticin® Selective Antibiotic 50 mg/ml (#10131035)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin (#P06-07100)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland

5.8. Medien für die Zellkultur

Tabelle 10: Medien für Kultur humaner Zelllinien

Name	Hersteller
RPMI-1640 W/O L-Glutamine (CE) (#31870025)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
DMEM (HG) W/O NA Pyr (CE) (#41965039)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
OptiMEM 1 (CE) (#31985047)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Sodium Pyruvate MEM 100 mM (CE) (#11360039)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Non Ess Amino Acids (100x) (CE) (#11140035)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
FBS, EU professional (#P30-8500)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
L-Glutamin 200 mM (#P04-80100)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland

RPMI-1640 Vollmedium war versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 2 mmol/l Glutamin. Das Einfriermedium bestand aus 70 % RPMI-1640, 20 % FCS und 10 % DMSO. DMEM Vollmedium war versetzt mit 10 % FCS, 6 mM L-Glutamin, 1 mM MEM Natrium Pyruvate und 0,1 mM MEM *Non-Essential Amino Acids*.

Tabelle 11: Medien für Kultur eukaryotischer Zellen

Name	Hersteller
LB-Medium für Molekularbiologie (#X968.1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar für Molekularbiologie (#X969.1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

LB-Flüssigmedium bestand aus 25 g Trockenmedium in 1 l H₂O und wurde für 20 min bei 121 °C und 103 kPa autoklaviert. LB-Platten wurden aus 40 g LB-Agar in 1 l H₂O, welches für 20 min bei 121 °C und 103 kPa autoklaviert, mit Selektionsmarker versehen und in Kulturschalen gegossen. Die LB-Platten und das LB-Flüssigmedium enthielten für die Klonierung die Selektionsmarker Ampicillin (LB-Amp: 100 mg/ml) oder Kanamycin (LB-Kan: 50 mg/ml) (siehe 5.7.).

5.9. Enzyme

Tabelle 12: Enzyme

Name	Hersteller
Taq DNA Polymerase (native) (#EP0282)	ThermoScientific, Rockford, USA
Dnase I (#EN0521)	ThermoScientific, Rockford, USA
BP Clonase II Enzyme Mix (#11789100)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
LR Clonase II Enzyme Mix (#11791100)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
EcoRI-HF (#R3101S)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
PvuI-HF (#R3150S)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
MfeI-HF (#R3589S)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Nsp I (#R0602L)	New England Biolab, Hitchin, UK
Sty I (#R0500S)	New England Biolab, Hitchin, UK
T4 DNA Ligase (#M0202L)	New England Biolab, Hitchin, UK

5.10. Antikörper

5.10.1. Erstantikörper

Tabelle 13: Erstantikörper

Name	kDa	Spezies	Hersteller
KRAS sc-30 (#F234)	21	<i>Mouse</i>	Santa Cruz, Dallas, USA
MEK1/2 (#9122)	45	<i>Rabbit</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Phospho-MEK1/2 (S217/221)(#9154)	45	<i>Rabbit</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
p44/42 (ERK1/2) (#9102)	42; 44	<i>Rabbit</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Phospho-p44/42- (ERK1/2)(T202/Y204)(#9101)	42; 44	<i>Rabbit</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
STAT3 (#9132)	79; 86	<i>Rabbit</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Phospho-STAT3 (Tyr705) (#9138)	79; 86	<i>Mouse</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
AKT (#4691)	60	<i>Rabbit</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Phospho-AKT (S473) (#4060)	60	<i>Rabbit</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
mTOR (#2972)	289	<i>Rabbit</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Phospho-mTOR (S2448) (#2971)	289	<i>Rabbit</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Phospho-PI3K (Y458)/p55 (#4228)	60; 85	<i>Rabbit</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
p70 S6 Kinase (49D7) (#2708)	70; 85	<i>Rabbit</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Phospho-p70 S6 Kinase (T389)(#9234)	70; 85	<i>Rabbit</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Tubulin α AB-2 (DM1A)(#MS-581-PO)	57	<i>Mouse</i>	NeoMarkers, Fremont, USA
Anti-V5 (#13202)	-	<i>Rabbit</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Anti-V5-FITC (#R96325)	-	-	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Annexin V APC (#31490016)	-	-	AL-ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland

5.10.2. Zweitantikörper

Für die Erstantikörper von New England Biolabs wurde der Zweitantikörper von derselben Firma verwendet und für die Erstantikörper von Santa Cruz wurden die Zweitantikörper von Dako verwendet.

Tabelle 14: Zweitantikörper

Name	Hersteller
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse (#P0260)	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-Mouse (#7076)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Anti-Rabbit (#7074)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland

5.11. Kits

Tabelle 15: Kits

Name	Hersteller
All Prep DNA/RNA Mini Kit (#80204)	Qiagen, Hilden, Deutschland
First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1611)	ThermoScientific, Rockford, USA
MinElute PCR Purification Kit (#28004)	Qiagen, Hilden, Deutschland
MinElute Gel Extraction Kit (#28604)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Abi Prism® BigDyeTerm v3.1 CycleSeq Kit (#4337456)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Qubit®dsDNA HS Assay Kit (#Q3285)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
GS Junior Titanium emPCR Kit Lib-A (#05996520001)	Roche, Mannheim, Deutschland
GS Junior Titanium Sequencing Kit (#05996554001)	Roche, Mannheim, Deutschland
GS Junior Titanium PicoTiterPlate Kit (#05996619001)	Roche, Mannheim, Deutschland
LightCycler 480 High Resolution Melting Master (#04909631001)	Roche, Mannheim, Deutschland
ViraPower Hiperform Lenti GW Kit (#K533000)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Qia Spin Miniprep Kit (#27104)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Nucleo Bond® Xtra Midi (#740410.10)	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Affymetrix Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty Assay Kit 5.0/6.0 (#901013)	Affymetrix, Santa Clara, USA
Titanium DNA amplification Kit (#639240)	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
GeneChip®Hybridization, Wash, and Stain Kit (#900720)	Affymetrix, Santa Clara, USA
3'IVT Express Kit (#901228)	Affymetrix, Santa Clara, USA
Agilent RNA 6000 Nano Kit (#5067-1511)	Agilent, Santa Clara, USA
Cell Proliferation Kit I (MTT) (#11465007001)	Roche, Mannheim, Deutschland
High Sensitivity DNA Reagents, included chips (#5067-4326)	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Venor®GeM OneStep (#11-8025)	Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland
FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack (#04-738-292-001)	Roche, Mannheim, Deutschland

5.12. Puffer/Lösungen

Tabelle 16: Puffer/Lösungen

Name	Komponente	Volumen	Konzentration
2X Lysispuffer	HEPES pH 8,0	800,0 µl	40 mM
	NaCl	2,8 ml	700 mM
	MgCl ₂	40,0 µl	2 mM
	EDTA pH 8,0	40,0 µl	1 mM
	EGTA pH 8,0	8,0 µl	0,2 mM
	H ₂ O	ad 20,0 ml	
Lysispuffer	2X Lysispuffer	500,0 µl	1X
	PMSF (1 mg/ml)	0,6 µl	0,6 µg/ml
	Pefablock (10 mg/ml)	10,0 µl	0,1 mM
	Aprotinin (1 mg/ml)	1,0 µl	1 µg/ml
	Na-O-Vandat (100 mM)	10,0 µl	1 mM
	DTT	5,0 µl	
	NP-40 (10 %)	100,0 µl	0,1 %
	H ₂ O	364,0 µl	

Name	Komponente	Volumen	Konzentration
2X Ladepuffer	Tris pH 6,8 (1 M)	1,0 ml	100 mM
	Glycerol	2,0 ml	20 %
	SDS	4,0 ml	8 %
	β-Mercapto-Ethanol	1,0 ml	10 %
	Bromphenolblau	0,05 ml	0,01 %
	H ₂ O	<i>ad</i> 10,0 ml	
50X TAE	Tris (ultrapur)	242,0 g	2 M
	0,5 M EDTA pH 8,0	100,0 ml	0,05 M
	Essigsäure 100 %	57,1 ml	5,71 %
	H ₂ O	<i>ad</i> 1000,0 ml	
1X TAE	50X TAE	20,0 ml	1X
		980,0 ml	
10X TBS (pH = 7,6)	Tris (ultrapur)	121,0 g	0,02 M
	NaCl	400,0 g	8 %
	H ₂ O	<i>ad</i> 5000,0 ml	
1X TBS Tween	10X TBS pH 7,6	100,0 ml	1X
	Tween 20	1,0 ml	0,1 %
	H ₂ O	<i>ad</i> 1000,0 ml	
10X Western-Puffer	Glycin	144,0 g	1,92 M
	Tris (ultrapure)	30,3 g	250 mM
	dest H ₂ O	<i>ad</i> 1000,0 ml	
1X Laufpuffer	Western-Puffer 10X	100,0 ml	1X
	SDS 20 %	5,0 ml	0,1 %
	dest H ₂ O	<i>ad</i> 1000,0 ml	
1X Blot-Puffer	Western-Puffer 10X	100,0 ml	1X
	Methanol	200,0 ml	20 %
	SDS 20 %	1,5 ml	0,03 %
	dest H ₂ O	<i>ad</i> 1000,0 ml	
Trenngel-Puffer (pH = 8,8)	Tris (ultrapure)	91,0 g	1,5 M
	SDS 20 %	10,0 ml	0,4 %
	dest H ₂ O	<i>ad</i> 500,0 ml	
Sammelgel-Puffer (pH = 6,8)	Tris (ultrapure)	6,05 g	0,5 M
	SDS 20 %	2,0 ml	0,4 %
	dest H ₂ O	<i>ad</i> 100,0 ml	
FACS-Puffer	PBS	10,0 ml	
	BSA	0,05 g	0,5 %

Name	Komponente	Volumen	Konzentration
Annexin-FACS-Puffer (pH = 7,4)	NaCl	0,818 g	1,4 M
	CaCl ₂	0,036 g	25 mM
	HEPES	0,238 g	0,1 M
	H ₂ O	ad 100,0 ml	
<i>Wash A: Non-Stringent Wash Buffer</i>	20X SSPE	300,0 ml	6X
	10 % Tween-20	1,0 ml	0,01 %
	H ₂ O	ad 1000,0 ml	
<i>Wash B: Stringent Wash Buffer</i>	20X SSPE	30,0 ml	0,6X
	10 % Tween-20	1,0 ml	0,01 %
	H ₂ O	ad 1000,0 ml	
<i>12X MES Stock Buffer (pH 6,5 – 6,7)</i>	MES Hydrat	70,4 g	1,25 M
	MES Natriumsalz	193,3 g	0,89 M
	H ₂ O	ad 1000,0 ml	
<i>1X Array Holding Buffer</i>	12X MES stock buffer	8,3 ml	1X
	5 M NaCl	18,5 ml	1 M
	10 % Tween-20	0,1 ml	0,01 %
	H ₂ O	ad 100,0 ml	

5.13. Chemikalien/Reagenzien

Tabelle 17: Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
Access Array Harvest Solution 1X (#100-1031)	Fluidigm, Amsterdam, Niederlande
Access Array Loading Reagent 20X (#100-0883)	Fluidigm, Amsterdam, Niederlande
AccuGene Molecular Biology Water (#831200)	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
AccuGENE Molecular Biology Water (#BE51200)	LONZA, Verviers, Belgien
Agarose MP (#CA45)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Agencourt AMPure XP Reagent (#A63881)	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Agencourt AMPure XP Reagent beads (#A63880)	Beckman Coulter Genomics, USA
Albumin-Fraktion V pH7.0 BSA (#A1391)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat APS >98 % (#A3678)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Anti-Streptavidin (#VC-BA-0500-MC05)	Adipogen, Liestal, Schweiz
Aprotinin (#A2131)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Bio-Magermilch-Pulver	Heirler-Cenovis, Radolfzell, Deutschland
Bradford Reagent (#B6916)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Buffer EB (#19086)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Control Line Fluid Syringes (#89000020)	Fluidigm, Amsterdam, Niederlande
CutSmart™ 10X Puffer (#B72045)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Denhardt's Solution 50x (#D2532)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid DMSO 99.5 % (#A994)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (#A3599)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DNA ExitusPlus IF (#A7409)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DNA Loading Dye 6x (#R0611)	ThermoScientific, Rockford, USA
DNA Suspension Buffer (#T0223)	TEKnova, Hollister, USA
dNTP Mix 2mM (#R0242)	ThermoScientific, Rockford, USA
DTT (#A2948)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (#D8537)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Name	Hersteller
EDTA pH 8,0, 0,5 M (#A3145)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
EDTA TE Buffer, pH 8.0 (#T0223)	TekNova, Hollister, USA
EGTA pH 8,0 (#A0878)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 100 % (#100063)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100 % absolute (#A3678)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
GelRed (#M3199.0500)	Genaxxon bioscience, Ulm, Deutschland
Glycerin >99 % (#G5516)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycerin Rotipuran >99.5% (#3783)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCl Salzsäure rauchend 37 % (#A0659)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HEPES >99.5 % (#54457)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
HEPES pH8,0 1M (#A6906)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Hexadimethrine bromide (Polybrene®) (#H9268)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hi-DiTM Formamide (#4311320)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Igepal® CA-630 (#I3021)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Iso-Propanol Molecular biology grade (#A3928)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid KCl (#A3582)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (#A3620)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MES Hydrat (#M5287)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
MES Natriumsalz (#M5057)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol (#A0688)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (#A3597)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumhypochloridlösung 12 %CL (#9062.3)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumorthovanadat (#A2196)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
OptiPrep™ (#12FLS05)	Progen, Heidelberg, Deutschland
Perfabloc SC (#76307)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid PMSF (#6367.4)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Propidiumiodid Lösung 1.0 mg/ml (#P4864)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
RNaseZap® Rnase Decontamination Solution (#AM9780)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) (#3029.2)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
R-phycoerythrin conjugate (SAPE) (#S866)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
SDS-Solution 10 % (#A0676)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Sephadex® G-50 (#650150)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sodium azide (#71289)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sodium Chloride 5 M (#182449)	Lonza, Braine-l'Alleud, Belgien
Sodium hydroxide solution (#72068)	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Sodiumdodecylsulfat SDS (#L6026)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol C2H6OS (#A1108)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
SSPE 20x (#182454)	Lonza, Braine-l'Alleud, Belgien
Surfact-Amps 20 (#28320)	ThermoFisherScientific, Bonn, Deutschland
TEMED (#A1148)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylammonium chloride solution (#T3411)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris ultrapure 99.9 % (#A1086)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Wash Buffer A (#900721)	Affymetrix, Santa Clara, USA
Wash Buffer B (#900722)	Affymetrix, Santa Clara, USA

5.14. Geräte

Tabelle 18: Verwendete Geräte

Name	Typ, Hersteller
Abzugshaube	Hera, Safe, Heraeus
Access Array Load + Prime + Harvest	IFC Controller AX, Fluidigm
Access Array Thermal Cycling	FC1 Cyclers, Fluidigm
DNA-Gel Elektrophorese Kammer	Roth
FACS	BD FACS Canto II Flow Cytometer, BD Biosciences
FACS Cell Sorter	BD FACSAira III cell sorter, BD Biosciences
Fluidik Station	Affymetrix, GeneChip Fluidics Station 450/450DX
Fluorometer	Qubit®, Invitrogen
Gel Dokumentationssystem	Universal Hood II Gel Doc, Biorad
Heizblock	Hypex™, ScieGene
Heizblock	Thermo Stat plus, Eppendorf
Hybridisierungs-ofen	GeneChip Hybridization Oven 640, Affymetrix
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMIRE2/EBQ100 Isolated
Inkubator	Hera Cell 150, Heraeus, Thermo Scientific
Inkubator	TH-15, Edmund Bühler
Inkubator	B15, Heraeus
Kapillar- Elektrophorese	2100 Bioanalyzer, Agilent
Kühl Zentrifuge	5415 R, Eppendorf
Lichtmikroskop	Wilovert®
Magnetische Rührheizplatte	MR 3001 K, Heidolph
Magnetischer Partikel-Konzentrator	DynaMag™-2, Invitrogen
Magnetischer Partikel-Konzentrator	96 Well Magnetic ring stand, Applied Biosystems
Microarray Scanner	GeneChip Scanner 7G, Affymetrix
Mikrowelle	NN3256, Panasonic
Micropipettor	Eppendorf Research
Micropipettor	Gilson
Multimode Mikroplatten-Reader	Fluostar Omega, BMG Labtech
Orbital Schüttler	Unimax 1010, Heidolph
pH-Elektrode	inolab, WTW, series
Pipettier-Hilfe	Accu-Jet®, Brand
Power Supply	E835, Consort
Power Supply	Power Pac 200, BIO-RAD
Protein-Gel Elektrophorese System	Mini-PROTEAN®Tetra System, BIO-RAD
Pumpe	N86 K.18 KNF Lab Laboport
Real-time PCR	Cobas Z480, Roche
Schüttler	KS-15, Edmund Bühler
Sequenzierer (NGS)	GS Roche Junior, Roche
Sequenzierer (Sanger)	ABI Prism® 3130-Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems
Sonifizierer	Biorupter™ UCD-200, Diagenode
Spektrophotometer	Nanodrop ND-1000, peQLab
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf
Thermostyler	Gene Amp®PCR System 9700, Applied Biosystems
Thermostyler	Mastercycler gradient, Eppendorf
Thermostyler	Mastercycler personal, Eppendorf
Tischzentrifuge	sprout™, Biozym Scientific GmbH
Tube Rotator	L28, fix 10 U/min, Hartenstein
UTTD Tube Drive Control	IKA® ULTRA TURRAX® Tube Drive Control
UV-Lampe	UVC 30, Thermo Scientific

Name	Typ, Hersteller
Vakuum-Zentrifuge	DNA 110, Savant
Vortexmischer	IKA MS 3
Vortexmischer	Vortex Genie 2, Scientific Industries
Waage	LC 1500, Labor Center
Wasserbad	GFL®
Wasserbad	Typ F 3 S, Haake
Western Blot Dokumentationssystem	Fusion SL, Vilber Lourmat
Western Blot Semi Dry transfer System	TransBlot SD Semi Dry Transfer Cell, BioRad
Western Blot Wet transfer System	PerfectBlue Tank-Elektroblotter Web S, peQLab
Zentrifuge	5415D, Eppendorf
Zentrifuge	Multifuge 1 S-R, Heraeus, Thermo Scientific
Zentrifuge	Funktion I line, Labofuge 400R, Heraeus

5.15. Verbrauchsmaterialien

Die Gewebekulturflaschen, *well*-Platten und serologischen Pipetten für die Kultivierung von Zellen wurden von Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) und Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) bezogen. Sterile Filterspitzen wurden von Nerbe Plus (Winsen, Deutschland) erworben.

Tabelle 19: Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
0,2 ml 8-Strip PCR Tube, Individually attached domed Caps (#11402-2908)	Starlab, Hamburg, Deutschland
15 Well 1 mm	Biorad, Hercules, USA
48.48 Access Array IFCs	Fluidigm, Amsterdam, Niederlande
5 ml PS Round Bottom Tube (#352052)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Biosphere Safe Seal Tube 1.5 ml (#72.706.200)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Safe Seal Tube 2 ml (#72.695.200)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Blottingpapier Whatman 3 MM Chr (#GB3M)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Cell Stare Tube 15 ml, PP, conical Bottom (#188271)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Cryo 1 °C Freezing Container (#5100-0001)	ThermoScientific, Rockford, USA
Elektroporationsküvetten, 2 mm (#71-2020)	PeQLab, Erlangen, Deutschland
GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array (#900470)	Affymetrix, Santa Clara, USA
Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (#901182)	Affymetrix, Santa Clara, USA
Kimtech (#05511)	Kimerly-Clark, Reigate, UK
LightCycler 480 Multiwell Plate 96, white (#04729692001)	Roche, Mannheim, Deutschland
LightCycler 480 Sealing Foil (#04729757001)	Roche, Mannheim, Deutschland
Microseal 'B' Adhesive Seals (#MSB-1001)	Biorad, Hercules, USA
MicroTube Tough-Spots (#K164.1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mini Protean® Short Plates (#1653308)	Biorad, Hercules, USA
Mini Protean® Spacer Plates 1.0 mm (#1653311)	Biorad, Hercules, USA
Multiplate 96-Well Unskirted PCR Plates (#MLP-9601)	Biorad, Hercules, USA
Multiply-Pro 0.5 ml Biosphere (#72.735.100)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Parafilm "M" (#PF10)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas (#PP07)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland

Name	Hersteller
PCR-Gefäße 8er-Streifen (#732-0545)	VWR, Radnor, USA
Petrischale GBO (#PP35)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Qubit Assay Tubes (#Q32856)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Reagenzröhrchen/2-Positionen Verschluss PS Runder Boden (#120161)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Röhre 50 ml, PP (#62.559.001)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Schraubreaktionsgefäße (#R150)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Schraubverschluss aus PP (#RS14)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Seal and Sample Aluminium Foil Lids (#538619)	Beckman Coulter, Brea, USA
Transfer-Membran, 0.45 µm (#NC04)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Zählkammer nach Neubauer (#ZK03)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Zellschaber mit Drehkopf, 30 cm (#ZS32)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland

5.16. Software und Datenbanken

Tabelle 20: Software und Datenbanken

Name	Hersteller
2100 Expert Version B.02.08.SI648 (SR1)	Agilent
ApE A plasmid editor	http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/
BD FACSDiva Software v6.1.3	BD Biosciences
Catalogue of somatic mutations in cancer (COSMIC)	http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/
ChromasLite Version 2.01	http://technelysium.com
Chromosome Analysis Suite	http://www.affymetrix.com
ClustalX2	http://www.clustal.org/
dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/
Expasy	http://expasy.org/
Flowing software 2.0	http://www.floatingsoftware.com/
Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)	http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp
Genotyping Console™ Software	http://www.affymetrix.com
GS Amplicon Variant Analyzer (AVA)	Roche, Mannheim, Deutschland
GS Run Processor	Roche, Mannheim, Deutschland
liftOver	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver
LightCycler®480 GeneScanning 1.5.0	Roche, Mannheim, Deutschland
LightCycler®480 Software release 1.5.0	Roche, Mannheim, Deutschland
My Cancer Genome	http://www.mycancergenome.org
NCBI Basic Local Alignment Search Tool Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
OligoAnalyzer 3.1	http://eu.idtdna.com
PolyPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
PrimerQuest	http://eu.idtdna.com
PsiPred	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/
Sciencegateway	http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw/
SeattleSeq Annotation 137	http://snp.gs.washington.edu/SeattleSeqAnnotation137/
STRING	http://string-db.org/
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/

6. Methoden

6.1. Zellkultur humaner Zelllinien

Alle MM-ZL wurden in RPMI-1640 Vollmedium gehalten, bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und aller drei bis vier Tage passagiert. Die INA-6 Kulturen erhielten zusätzlich 2 ng/ml rekombinantes humanes Interleukin 6 (IL-6), und das Medium für die NCIH929 Kulturen enthielt eine finale Konzentration von 0,05 mM 2-Mercapto-Ethanol. Die humanen adhärenenten HEK293FT-Zellen wurden in DMEM Vollmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert und aller drei Tage mit Trypsin ge-splittet.

Es wurde nach Erhalt der Zellen eine Zellbank bestehend aus *master stock* und *working stock* aufgebaut, um den Zugriff auf frühe Passagen zu ermöglichen. Die Zellen wurden dazu in Einfriermedium in Stickstofftanks gelagert und nach dem Auftauen zuerst in sterilem PBS gewaschen und dann in Vollmedium kultiviert. Die Zellen wurden bis zu vier Monate in Kultur gehalten und regelmäßig auf Kontamination mit Mykoplasmen mit dem PCR-basiertem VenorGEM One-Step System überprüft.

6.2. Microarrays

Es wurden Genexpressions (GE)- und *copy number* (CN)-Microarrays von den 12 MM-ZL AMO1, U226, OPM2, JIN3, L363, MM1.S, KMS11, KMS12BM, RPMI8226, NCIH929, INA6 und MOLP8 mit der Affymetrix Technologie angefertigt. Die benötigte DNA und RNA wurde mit dem DNA/RNA Mini Kit aus Zellpellets nach Standardprotokoll gewonnen.

6.2.1. Erstellung und Auswertung von Genexpressionsdaten

Für eine erfolgreiche Durchführung wurden die RNA-Proben zuvor mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit auf dem Bioanalyzer auf ihren Grad der Degradation mittels *RNA integrity number* (RIN) überprüft. Für das Protokoll sollte der RIN-Wert zwischen 9 - 10 liegen. Dieser entspricht einer vollständig intakten RNA. Außerdem liegt bei einer vollständigen RNA das Verhältnis 28S:18S rRNA bei 2:1. Die Reinheit und Konzentration der RNA wurde mit dem Nanodrop bestimmt. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} sollte zwischen 1,7 - 2,1 liegen und es wurden 100 ng an RNA eingesetzt. Die GE-Daten der 12 MM-ZL wurden mit den GeneChip 3' IVT Express Kit auf den HG U133 Plus 2.0 GE-Microarrays von Affymetrix nach Standardprotokoll generiert. Die IVT erfolgte bei 16 h.

Die *cell intensity files* der einzelnen Microarrays wurden mit der Affymetrix® Expression Console™ Software durch MAS5.0 normalisiert, um einen Vergleich zwischen den Microarrays zu ermöglichen. Verschiedene folgende Parameter dürfen nicht von der Norm abweichen und sich zwischen den einzelnen Microarrays nicht stark unterscheiden. Der *scale factor* muss >15 sein und zwischen den Microarrays <3 differieren. Die internen Hybridisierungskontrollen

AFFX-r2-Ec-bioB, -bioC, -bioD, die poly-A Kontrollen AFFX-r2-Bs-Dap, -Lys, -Phe, -Thr sowie mehr als 30 % der Probesets sollten präsent sein. Die RNA-Degradationskontrolle GAPDH (3'/5') sollte ~ 1 und HSAC07 (3'/5') < 3 sein. Die Signale wurden in \log_2 -Werte umgewandelt und gegen das Referenzgenom hg19 annotiert. Für das zu untersuchende Gen wurden die Probesets, unter der Berücksichtigung der unterschiedlichen Spezifität der Probesets gegen das Gen, herausgefiltert (Tabelle 21).

Tabelle 21: Spezifität der Probesets des U133 Plus 2.0 Microarrays (modifiziert nach Affymetrix [86])

Probeset-Endung	Spezifität
_at	Erkennt ein Transkript in einem Gen
_a_at	Erkennt verschiedene Transkripte eines Gens
_s_at	Erkennt verschiedene Transkripte von verschiedenen Genen
_x_at	Cross-Hybridisierung mit nicht-verwandten Sequenzen

Aus den Werten der Probesets eines Gens wurde je ZL der Mittelwert gebildet. Aus diesen Mittelwerten aller ZL wurde der Median je Gen berechnet. Um eine stärkere oder schwächere Expression des Gens in einer ZL gegenüber den anderen ZL zu erkennen, wurde von dem Median der Mittelwert für das Gen je ZL abgezogen.

6.2.2. Erstellung und Auswertung von *copy number*-Daten

Die CN- und *loss of heterozygosity* (LOH)-Daten wurden durch den *cytogenetics copy number assay* mit SNP6.0 Microarrays von Affymetrix nach Durchführung der Standardprotokolle erstellt.

Alle *cell intensity files* der 12 Microarrays wurden gemeinsam mit der Affymetrix® Genotyping Console™ Software zunächst auf ihre Qualität überprüft. Der *contrast QC (random)*-Wert gibt die Qualität der Auflösung der *single nucleotid polymorphism* (SNP)-Signale an und damit, wie gut das Datenset in den homozygoten oder heterozygoten Genotyp unterschieden werden kann. Der Wert sollte nach den Richtwerten von Affymetrix $> 1,7$ sein. Danach wurden die Daten mit dem Referenzgenom hg19 annotiert sowie eine CN/LOH-Analyse durchgeführt und diese in CNCHP *files* konvertiert. Mit dem *median of the absolute values of all pairwise differences* (MAPD)-Wert wurde angegeben, wie hoch das Rauschen in den SNP6.0 Microarrays ist. Der MAPD-Wert sollte nach den Richtwerten von Affymetrix zwischen 0,2 – 0,3 liegen. Unter Verwendung der *Chromosome Analysis Suite* (Chas) Software konnten die CN- und LOH-Daten visuell dargestellt werden. Deletionen und Insertionen wurden ab 50 betroffenen Markern und ab einer Größe von 400 kbp identifiziert und in den betroffenen Chromosomenabschnitten dargestellt.

6.3. *whole exome sequencing*

6.3.1. Daten-Analyse und -Filterung

Nach dem *single nucleotide variants (SNV)-calling* wurden durch weitere Filterungsschritte die tumorrelevanten SNVs aus dem Datenset mit Hilfe der in SeattleSeq Version 131 integrierten Software Tools extrahiert. Dafür wurden aus dem Datenset zuerst SNVs entfernt, welche als *single nucleotide polymorphism (SNP)* in der 1000 Genome Datenbank und/oder der dbSNP Datenbank vorkamen. Es wurde für die Filterung angenommen, dass SNPs möglicherweise eine geringere Bedeutung für die Tumorgenese haben. Im nächsten Filterungsschritt wurden nur *non-synonymous* SNVs behalten, welche eine Veränderung der Aminosäure (AS)-Sequenz in den jeweiligen Transkripten hervorrufen. Alle SNVs, welche nach PolyPhen 1 als gutartig hinsichtlich der strukturellen Konsequenz galten, wurden danach entfernt. Für die weitere Filterung wurden nur die SNVs beachtet, welche, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Transkripte, eine schädigende Wirkung auf die Proteinstruktur hatten. Die detektierten SNVs der Normalprobe wurden dann von der zugehörigen Tumorprobe extrahiert, um tumorrelevante somatische SNVs zu identifizieren. Um primäre tumorrelevante SNVs aus den Daten der sechs MM-ZL zu erhalten, wurden die ZL-Daten mit den Patientendaten abgeglichen. Dazu wurden die Patientendaten durch das Einbeziehen von fertig gefilterten Mutationsdaten von 38 MM-Patienten, welche im Anhang von Chapman *et al.* veröffentlicht wurden [37], erweitert. Für weitere Analysen wurden in diesem Forschungsansatz die Gene berücksichtigt, welche durch eine SNV von mindestens einem der fünf MM-Patienten bzw. durch eine SNV von einer der sechs MM-ZL mit zusätzlich einer SNV von mindestens einem der publizierten 38 MM-Patienten betroffen waren. Außerdem wurde der Fokus auf die Gene gelegt, welche durch SNVs betroffen sind, die zu funktionellen Änderungen des Proteins führen könnten. Diese Vorhersage wurde mit der zusätzlichen Anwendung von drei in SeattleSeq 131 implementierten bioinformatischen Prädiktoren getroffen [87]. Für diese Prädiktoren, PhastCons (0 - 1), GERP (-11.6 - +5.82) und Polyphen 2 (gutartig, vermutlich schädlich, möglicherweise schädlich), wurde angenommen, dass der niedrigste *score* 0 % und der höchste *score* 100 % entspricht. Der Grenzwert wurde für GERP und PhastCons auf 65 % gesetzt und alle SNVs, die nach PolyPhen 2 nicht schädlich waren, wurden aus den weiteren Analysen entfernt. Für weitere Interpretationen wurden die CN- und GE-Daten für die MM-ZL herangezogen. Informationen zu betroffenen Proteindomänen wurden über die NCBI Nukleotid Datenbank bezogen.

6.3.2. Validierung mit Sanger-Sequenzierung

Tabelle 22: PCR und Sanger-PCR

PCR-Ansatz			PCR Programm			
Komponente	Volumen (μ l)	Konzentration	T ($^{\circ}$ C)	Zeit (min : s)	Zyklen	
1. PCR	DNA 100 - 300 ng/ μ l	1,0	Prä-Inkubation			
	<i>forward</i> Primer 10 μ M	0,5	94	03:00	1	
	<i>reverse</i> Primer 10 μ M	0,5	Amplifizierung			
	PCR Puffer 10X	10,0	94	00:45		
	MgCl ₂ 25 mM	1,0-3,0	55 - 60	00:30	40	
	dNTPs 2 mM	2,5	72	01:00/1 kb		
	<i>Taq</i> DNA Polymerase 5 U/ μ l	0,2	Finale Elongation			
	H ₂ O	<i>ad</i> 25,0	72	10:00	1	
	Gesamtvolumen	25,0	Kühlung			
			4	∞	1	
2. Sanger-PCR	Komponente	Volumen (μ l)	Konzentration	T ($^{\circ}$ C)	Zeit (min : s)	Zyklen
	PCR Product 50 ng/ μ l	1,0		Prä-Inkubation		
	Ready Reaction Mix	2,0		96	01:00	1
	Primer 1 μ M	1,6	0,16 μ M	Kettenabbruch		
	H ₂ O	5,4		96	00:15	
	Gesamtvolumen	10,0		50	00:10	30
				60	04:00	
				Kühlung		
				4	∞	1

Für die technische Validierung der generierten Daten wurden zufällig ausgewählte SNVs mit PCR und Sanger-Sequenzierung überprüft (Tabelle 22). Die Primer wurden mit dem OligoAnalyzer 3.1 für Schmelztemperaturen von 60 $^{\circ}$ C mit einer Produktlänge von 200 – 800 bp entworfen. Die Software ermöglichte eine Überprüfung auf *hairpins*, *self*- und *hetero-dimers* sowie durch die Implementierung von NCBI Blast eine Überprüfung auf ihre Spezifität. 5 μ l der amplifizierten PCR-Produkte, versetzt mit 1 μ l DNA Loading Dye 6X, wurden über 1,0 - 1,5 %-ige Agarosegele, versetzt mit GelRed, durch elektrophoretische Auftrennung bei 120 V für 30 min durch einen DNA-Größenmarker auf ihre Größe hin überprüft. Die Produkte wurden aus dem PCR-Mix mit dem MinElute PCR Purification Kit oder bei dem Auftreten von Sekundärprodukten direkt aus dem Gel mit dem MinElute Gel Extraction Kit von Qiagen nach Standardprotokoll aufgereinigt. Mit dem aufgereinigten PCR-Produkt und dem *forward* oder *reverse* Primer wurde dann eine Sanger-PCR mit der Kettenabbruch-Methode durchgeführt. Der Sanger-PCR-Mix wurde über Sephadex-Säulen aufgereinigt, in 22 μ l Hi-DiTM Formamide aufgenommen und auf dem ABI Prism[®] 3130-Avant Genetic Analyzer sequenziert. Die Auswertung der Sanger-Sequenzen erfolgt mit der ChromasLite Software Version 2.01.

6.3.3. Charakterisierung mit String und GSEA

Um neue tumorrelevante Signalwege im MM zu entdecken, wurde einerseits die Beziehung zwischen den mutierten Proteinen untersucht und andererseits das Datenset auf eine Anreicherung der mutierten Gene in bestimmten Signalwegen überprüft. Dafür wurden die

Genlisten, welche durch den Filterungsansatz entstanden, und die mutierten Gene aus den Daten von Chapman *et al.* [37] genutzt. Für die Bestimmung, ob eine Akkumulation der Gene in Signalwegen vorliegt, wurden die Genlisten in die *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) Software der *Molecular Signature Database* eingespeist und die Signalweg-Annotierung durch eine Überlappung mit der C2-Genset Sammlung und einem FDR q-Wert <0,05 berechnet [88]. Die C2-Sammlung setzte sich zusammen aus 3272 Gensets basierend auf verschiedenen Datenbanken, wie Reactome, KEGG, BioCarta, Canonical Pathways sowie Expertenmeinungen und PubMed-Publikationen. Das Signalnetzwerk zwischen den mutierten Proteinen wurde durch manuelle Literaturrecherche und mit der String 9.0 Datenbank im *confidence* und *evidence* Modus mit einem mittleren (0,400) und niedrigen (0,150) *confidence score* untersucht [89]. Die Liniendicke zwischen den Proteinen gibt die Stärke der Verbindung zwischen diesen an. Die Linienfarbe gibt die Art des Beweises, wie z.B. Datenbanken, Experimente und Koexpression, für die Verbindung zwischen den Proteinen an.

6.4. Amplikon-Sequenzierung von *KRAS* und *DIS3*

6.4.1. *library*-Präparation und Amplikon-Sequenzierung

Die DNA von den Tumorproben, den zugehörigen Normalproben und den ZL wurde mit dem DNA/RNA Mini Kit von Qiagen gewonnen.

Die *DNA-library*-Präparation der gesamten *coding sequence* (CDS) von *DIS3* (NM_001128226.2, NM_014953.4) und *KRAS* (NM_004985.4, NM_033360.3) wurde mit einer 4-Primer PCR mit getaggten exonspezifischen- und 454 Barcode-Primern generiert. Es wurden Amplikons mit einer Länge <500 bp und einem GC-Gehalt <60 % generiert. Jeder MM-Tumorprobe und MM-ZL wurde ein spezifischer 454-Barcode (MID) zugeordnet, um eine Multiplex-Sequenzierung zu ermöglichen. Die probenspezifischen 454-Barcode getaggten Amplikons wurden aus ~50 ng DNA der Probe mit dem *FastStart High Fidelity PCR System* auf dem 48.48 Access Array™ IFC unter Verwendung des Fluidigm FC1 Cyler Systems nach Bedienungsanleitung erstellt. Alle gepoolten Amplikons einer Probe wurden zweimal mit Ampure XP Beads in einem Verhältnis von 1:1,6 aufgereinigt. Die Größe und Qualität der Amplikonpools wurde mit dem *High Sensitivity DNA Kit* auf dem Bioanalyzer kontrolliert. Die Konzentration der Amplikonpools wurde mit dem Qubit dsDNA HS Kit in Duplikaten bestimmt.

Für die Amplikon-Tiefen-Sequenzierung, in diesem Ansatz meist in einem 12-plex-Format, wurden die Amplikonpools von 12 Proben equimolar gepoolt. Diese wurden mit einem Einsatz von einem Molekül der *DNA-library pro capture bead* durch die emPCR mit dem GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib A) amplifiziert und auf dem Roche 454 GS Junior nach Bedienungsanleitung sequenziert. Niedrig abgedeckte Bereiche wurden mit Sanger-Sequenzierung resequenziert.

6.4.2. Daten-Analyse und -Filterung

Die elektronische Bildverarbeitung, das *base-calling* und die Erstellung der Lesesequenzen erfolgte mit den Standardparametern des *offline* GS Run Prozessors. Die Qualität der einzelnen Sequenzier-Läufe wurde durch die Grenzwerte von verschiedenen Parametern beurteilt. Ein hochqualitativer Lauf weist Parameter mit *Raw Wells* <250 000, *Key Pass Percentage* >90 %, *Library Pass Filter* >30 %, *Dot Filtration* <5 % und *Mixed Filtration* <15 % auf. Die geringste Anforderung ist *Passed Filter Wells* >50 000. Das Demultiplexen der Proben und das Alignment der Lesesequenzen zu der Referenzsequenz hg19 wurde mit der *GS Amplicon Variant Analysis* (AVA) Software und dem *University of California, Santa Cruz* (UCSC) Genome Browser [90] durchgeführt. Die Detektion, Identifizierung und Quantifizierung von Punktmutationen, wie Substitutionen als auch Insertionen und Deletionen (InDels), erfolgte auch mit der AVA Software. Die genutzten Standardeinstellungen in der AVA Software für das *variant-calling* waren eine minimale Anzahl an Lesesequenzen von 2 und ein minimaler Lesesequenz-Anteil von 0,25 % an mutierten Lesesequenzen. Diese *variant allele frequency* (VAF) wurde von der AVA Software berechnet. Die Substitutionen wurden mit dem Referenzgenome hg19 mit der SeattleSeq Version 137 [91] abgeglichen, um *non-synonymous* Mutationen in der CDS von *DIS3* und *KRAS* zu identifizieren. Die Detektion von InDels war in SeattleSeq 137 nicht implementiert. Daher wurde deren Lokalisation manuell kalkuliert. Die *non-synonymous* Mutationen wurden mit 1000 Genomes und der dbSNP 137 Datenbank in *single nucleotide polymorphism* (SNPs) und tumorrelevante *single nucleotide variants* (SNVs) unterschieden [92, 93]. Für die technische Validierung der SNVs mit dem sensitiven *High Resolution Melting* (HRM)-Assay wurde der Grenzwert der VAF >5 % gesetzt, um subklonale SNVs mit niedrigen VAFs detektieren zu können.

6.4.3. Mutationsvalidierung mit *High Resolution Melting*-Assay und Sanger-Sequenzierung

Für die technische Validierung der mit Amplikon-Sequenzierung generierten Daten wurden zunächst die detektierten Varianten der MM-ZL AMO1, U266, JJN3, L363, MM1.S und OPM2 mit deren WES-Daten abgeglichen. Danach wurden die neu identifizierten SNVs und SNPs, die in mehr als 5 % der Lesesequenzen und in den *forward* und *reverse* Lesesequenzen vorkamen, überprüft. Alle *DIS3*-SNVs wurden mit der HRM und der Sanger-Sequenzierung (siehe Abschnitt 6.2.2.), überprüft. Nur für *DIS3* Exon 19 konnte kein HRM Primerset entworfen werden, wodurch SNVs in diesem Bereich ausschließlich mit Sanger-Sequenzierung überprüft werden konnten. Die Überprüfung der *KRAS*-SNVs erfolgte für Mutationen mit VAF <20 % mit dem sensitiven HRM-Assay und zusätzlich mittels Sanger Sequenzierung. *KRAS*-SNVs mit VAF größer als 20 % wurden nur mit der Sanger-Sequenzierung überprüft. Zusätzlich wurden drei Varianten getestet, die nur in *forward* oder *reverse* Lesesequenzen vorkamen. Die Sensitivität der Sanger-Sequenzierung gegenüber der HRM wurde zuvor mit einem Assay für die Mutation an Position Chr 13: 73355008 in *DIS3* getestet und verglichen. Dazu wurden in

unterschiedlichen Verhältnissen DNA-Gemische aus den ZL AMO1 (*DIS3*-Wildtyp (WT)) und OPM2 (homozygote *DIS3*-SNV) hergestellt, um VAFs von 2,5 - 50 % zu imitieren.

Tabelle 23: HRM-Ansatz

Komponente	Volumen (μ l)	Konzentration
DNA 1 ng/ μ l	5,0	0,25 ng/ μ l
Master Mix 2X	10,0	1x
Primer Mix 4 μ M	1,0	0,2 μ M
MgCl ₂ 25 mM	0,8 - 2,8	1,0 - 3,5 mM
H ₂ O	<i>ad</i> 20,0	
Gesamtvolumen	20,0	

Für die Überprüfung einer identifizierten Mutation mit dem LightCycler® 480 HRM Master wurden genspezifische Primer mit einer Schmelztemperatur von 60 °C für eine Amplikonlänge von 100 – 300 bp entworfen. Diese umrahmten ausschließlich die zu untersuchende Mutation. Jeder HRM-Assay wurde auf die MgCl₂-Konzentration eingestellt, welche keine Primerdimer und Sekundärprodukte in der Schmelzkurve sowie für die Amplifikationskurve ein Plateau von FU >30 und c_p <30 aufwies (Tabelle 23). Als Kontrollgruppe für den Assay wurden drei MM-ZL verwendet, welche in dem amplifizierten Bereich des Assays keine genetischen Veränderungen aufzeigten und deren Amplifikationskurven eine gleiche Plateauhöhe sowie einen gleichen c_p-Wert hatten. Der spezifische HRM-Assay wurde in einer 96-well-Platte mit der Tumorprobe, der zugehörigen Normalprobe sowie der Kontrollgruppe in Triplikaten aufgetragen. Die Amplifikation, HRM und Detektion des SYBR Green I Signales erfolgte auf dem Cobas Z480 (Roche, Mannheim) (Tabelle 24). Im Falle einer homozygoten Mutation wurde die Tumorprobe mit WT-DNA im Verhältnis 1:1 gemischt. Der c_p-Wert und die Plateauhöhe der Amplifikationskurven sowie die Schmelzkurven wurden mit der LightCycler® 480 Software 1.5.0 ermittelt. Für eine zuverlässige Auswertung sollten die c_p-Werte zwischen den zu vergleichenden Gruppen eine Differenz ≤ 5 aufweisen. Die hoch aufgelösten Schmelzkurven wurden mit der LightCycler® 480 Gene Scanning Software Version 1.5.0 im Analysemodus Comn/Vars unter Verwendung der Standardeinstellungen für die Normalisierung und einer Sensitivität von 0,6 ausgewertet. Die Patientenproben wurden durch den Vergleich mit der Kontrollgruppe dem WT- oder Mutationsstatus zugeordnet.

Tabelle 24: HRM Programm

T (°C)	Zeit (min : s)	Zyklen	Detektions-Modus	Anstiegsrate (°C/s)	Erfassung (per °C)	Sek T (°C)	Schritt Größe (°C)	Verzögerung (Zyklen)
Prä-Inkubation								
95	10:00	1	Aus					
Amplifikation <i>Touch Down</i>								
95	00:10		Aus	4,4		0	0	0
65	00:15	45	Aus	2,2		53	0,5	1
72	00:10		Einfach	4,4		0	0	0
<i>High Resolution Melting</i>								
95	01:00		Aus	4,4				
40	01:00		Aus	2,2				
65	00:01	1	Aus	1				
95			Kontinuierlich	0,02	25			
Kühlung								
40	00:10	1	Aus	2,2				

6.4.4. Mutationscharakterisierung

Die detektierten SNVs wurden durch die Anwendung der bioinformatischen Prädiktoren GERP (*score*: -12,3 - 6,17), PhastCons (*score*: 0 - 1) und PolyPhen (*score*: 0 - 1) auf ihre funktionelle Bedeutung untersucht [87]. Die Berechnung dieser Prädiktoren ist in SeattleSeq Version 137 implementiert. Der *score* für den Grad der funktionellen Schädigung wurde durch die Höhe der Konservierung (GERP, PhastCons) des mutierten Sequenzabschnittes und dem Einfluss der SNVs auf die Proteinstruktur (PolyPhen) ermittelt. Alle Mutationen mit einem *score* von je >80 % wurden in diesem Ansatz als funktionell bedeutend eingestuft.

Weiterhin wurde die funktionelle Relevanz der SNVs charakterisiert, indem die SNVs der betroffenen Proteindomäne zugeordnet wurden. Die Proteindomänen-Information wurde für DIS3 aus Tomecki *et al.* [16] und für KRAS aus der NCBI Nukleotide Datenbank (NCBI Referenz Sequenz: NM_004985.3) entnommen. Der Grad der Konservierung der Proteindomänen wurde durch den Abgleich mit anderen Entitäten durch ClustalX2.1 [94] bestimmt. Die SNV initiierten Strukturveränderungen wurden mit PsiPred Version 3.3 [95, 96] ermittelt.

Für die Detektion neuer SNVs oder *hot spot*-Mutationen im MM wurden die Daten mit der Datenbank *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer* (COSMIC) sowie *My Cancer Genomics* und bereits veröffentlichten Sequenzierstudien im MM [37-39, 42, 97] abgeglichen. Für den Abgleich wurden die Sequenzier-Daten, beruhend auf unterschiedlichen humanen Genom-Versionen (hg18/19), mit liftOver [98] und SeattleSeq137 re-analysiert.

Die Zuordnung der SNVs zu Haupt- und Nebenklon des Tumors erfolgte durch die Tumor-Populationsrate (TPR), welche aus der berechneten VAF, der CN und der Tumorzellreinheit (TCP) wie folgt ermittelt wurde:

Wenn:

CN = 1

CN = 2 und
VAF ~50 % (heterozygote SNV)

CN = 2 und
VAF ~100 % (homozygote SNV)

$$TPR = \frac{VAF \cdot 1}{TCP}$$

$$TPR = \frac{VAF \cdot 2}{TCP}$$

$$TPR = \frac{VAF}{TCP}$$

Formel 1: Berechnung der TPR

6.4.5. Statistische Daten-Auswertung

Die statistische Auswertung der Sequenzierstudie mit den klinischen und zytogenetischen Daten erfolgte mit der SPSS Software. Die Korrelation zwischen den nominalen Variablen *DIS3*, *KRAS* mit anderen zytogenetischen Aberrationen und der Therapieantwort, wurde durch Kreuztabellen mit dem Pearson Chi-Square Test und dem Fisher's-Exakt-Test durchgeführt. Für die monovariante Überlebensstatistik wurden der Kaplan-Meier und der Log-Rank-Test verwendet, um signifikante Unterschiede im Überleben festzustellen. Die multivariate Überlebensstatistik wurde mit der vorwärts und rückwärts bedingten Cox Regression mit dem Wald-Test durchgeführt. *P*-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

6.5. Lentivirale Expression von *KRAS*-Mutationen in Multiplen Myelom-Zelllinien

Die Erzeugung stabiler ZL zur Überexpression von mutiertem EmGFP- bzw. V5-getaggten *KRAS* erfolgte mit dem ViraPower™ Lentiviral Expression System von Life Technologies.

6.5.1. Gateway-Klonierung

Die Generierung des modifizierten Expressionsvektors für das lentivirale System erfolgte mit der Gateway-Klonierung. Die zu inserierende Sequenz wurde mit attB-Rekombinationsstellen flankiert und über BP-Rekombination in den Spender-Vektor pDONR221 kloniert. Anschließend wurde über die LR-Rekombination die gewünschte Sequenz in den Expressionsvektor pLenti6.3/V5-Dest eingebracht.

6.5.1.1. Primer Design für attB-PCR-Produkte

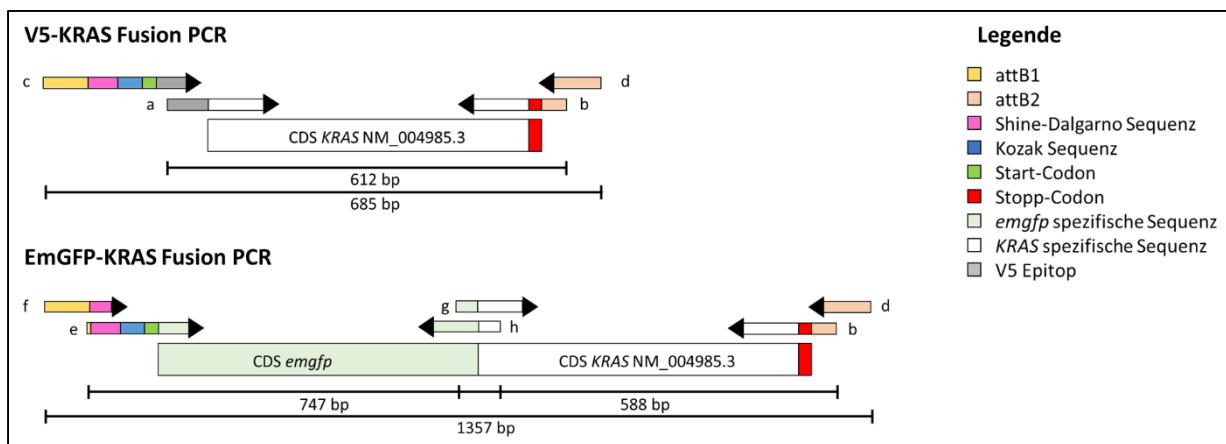


Abbildung 4: Primer für die Generierung von V5-KRAS- und EmGFP-KRAS-Fusionsproteinen.

Schematisch vereinfachte Darstellung der modifizierten Primer für die Amplifizierung der attB-KRAS-PCR-Produkte durch eine 4-Primer-PCR. Die Primer-Sequenzen sind in Tabelle 5 unter 5.4.1 zu finden.

Es wurden *KRAS*- (NM_004985.3) und *emgfp*-spezifische PCR-Primer für die Konstruktion der Fusionsproteine V5-KRAS und EmGFP-KRAS entworfen (Abbildung 4). Die designten Primer hängen die für die BP-Rekombination notwendigen attB-Rekombinationsstellen an. Auf Grund der hohen bp-Länge der Anhänge wurden je zwei *forward* (a + c, e + f) und *reverse* (b + d) Primer designt, welche durch Überlappungen miteinander verbunden werden konnten. Die Shine-Dalgarno Sequenz, die Kozak Sequenz und ein Start-Codon, welche für die spätere Expression des Proteins von Bedeutung sind, wurden hinzugefügt (a + c + e + f). Das V5-Epitop, für das V5-KRAS-Konstrukt, wurde *in frame* zwischen Start-Codon und Beginn der CDS von *KRAS* eingebracht (a + c). Für das EmGFP-KRAS-Konstrukt wurde die codierende Sequenz von *emgfp* und *KRAS* im gleichen Leseraster durch Überlappungssequenzen zusammengefügt (g + h).

6.5.1.2. Generierung der attB-PCR-Produkte

Als *template* für das *emgfp*-Produkt wurde der Vivid Colors pLenti6.2-GW/EmGFP-Vektor verwendet, welcher die kodierende Sequenz von *emgfp* enthält. Aus dem Patientenmaterial P30 (p.A146V), P79 (p.Y64D) und den MM-ZL AMO1 (p.A146T) und MM1.S (p.G12A), welche die zu untersuchende *KRAS*-Mutation enthielten, wurde mit dem Qiagen *All Prep Kit* RNA isoliert. Die RNA wurde mit Oligo (dT)₁₈ Primern des *First Strand cDNA Synthesis Kit* von Thermo Scientific nach Handbuch in cDNA umgeschrieben und als *template* für die kodierende Sequenz von *KRAS* verwendet. In einer 1. PCR wurden die CDS-Fragmente von *KRAS* für das V5-KRAS-Konstrukt mit den Primern a + b, für das EmGFP-KRAS-Konstrukt mit den Primern g + b und die CDS von *emgfp* mit den Primern e + h mit dem *FastStart High Fidelity PCR System* von Roche amplifiziert (Tabelle 25). Über eine 2. PCR wurden die restlichen Anhänge für das V5-KRAS-Konstrukt über die Primer c + d sowie für das EmGFP-KRAS-Konstrukt mit den

Primern f + d angebracht und die Fragmente von *emgfp* und *KRAS* für das EmGFP-KRAS-Konstrukt miteinander verknüpft (Tabelle 25).

Tabelle 25: Fusion-PCR

Fusion-PCR-Ansatz			Fusion-PCR Programm			
Komponente	Volumen (µl)	Konzentration	T (°C)	Zeit (min : s) Zyklen		
1. PCR	cDNA	2,0	Prä-Inkubation			
	<i>forward</i> Primer	1,0	0,2 µM	95	02:00	1
	<i>reverse</i> Primer	1,0	0,2 µM	Amplifizierung		
	Fast Start HF Buffer,+MgCl ₂ 10X	5,0	1,8 mM MgCl ₂	95	00:30	
	DMSO	2,5	5%	50	00:30	10
	dNTPs	1,0	200 mM	72	00:40	
	Fast Start HF Enzyme Blend 5 U/µl	0,5	0,05 U/µl	Finale Elongation		
	H ₂ O	37,0		72	04:00	1
	Gesamtvolumen	50,0		Kühlung		
				4	∞	1
2. PCR	Komponente	Volumen (µl)	Konzentration	T (°C)	Zeit (min : s) Zyklen	
	1. PCR	10,0		Prä-Inkubation		
	<i>forward</i> Primer	4,0	0,8 µM	95	01:00	1
	<i>reverse</i> Primer	4,0	0,8 µM	Amplifizierung		
	Fast Start HF Buffer,+MgCl ₂ 10X	4,0	1,8 mM MgCl ₂	95	00:30	
	DMSO	2,0	5%	45	00:30	5
	dNTPs	0,8	200 mM	72	00:45	
	Fast Start HF Enzyme Blend 5 U/µl	0,4	0,05 U/µl	Amplifizierung		
	H ₂ O	24,8		95	00:30	
	Gesamtvolumen	50,0		55	00:30	20
			72	00:45		
			Finale Elongation			
			72	04:00	1	
			Kühlung			
			4	∞	1	

Die amplifizierten attB-PCR-Produkte wurden über 1,0 %-ige Agarosegele auf ihre Größe hin überprüft und mit einer 30 %-igen PEG 8000/MgCl₂ 30 mM-Lösung nach dem PEG-Aufreinigungsprotokoll von Life Technologies aufgereinigt. Die Konzentration der attB-PCR-Produkte wurde mit dem Nanodrop bestimmt. Die attB-PCR-Produkte wurden über Sanger-Sequenzierung auf die zu untersuchenden Mutationen hin überprüft.

6.5.1.3. BP-Rekombination in Spender-Vektor

Um eine optimale Effizienz der BP-Reaktion zu erzielen, wurde die gleiche molare Menge von 50 fmol an attB-PCR-Produkt sowie pDONR221 eingesetzt. Unter Verwendung folgender Formel wurde, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen bp-Längen der V5-KRAS- und EmGFP-KRAS-Konstrukte und der zuvor bestimmten Konzentration, das einzusetzende Volumen des attB-PCR-Produktes ermittelt.

$$\frac{50 \text{ fmol} \cdot \text{bp} - \text{Länge} \cdot 660 \frac{\text{fg}}{\text{fmol}} \cdot \frac{1 \text{ ng}}{10^6 \text{ fg}}}{\text{Konzentration} \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}} = x \mu\text{l}$$

Formel 2: Berechnung des Mengen-Einsatzes an attB-PCR-Produkt für die BP-Rekombination**Tabelle 26: BP-Rekombination von pDONR221 und attB-PCR-Produkt**

BP-Rekombination-Ansatz			BP-Rekombination Programm			
Komponente	Volumen (μl)	Konzentration	T (°C)	Zeit (h : min)	Zyklen	
1. Schritt	pDONR221 150 ng/μl	1,0	5 fmol/μl	25	01:00	1
	attB-PCR-Produkt	x	5 fmol/μl			
	BP ClonaseII Enzyme Mix	1,0	1X			
	TE Puffer	ad 10,0				
Gesamtvolumen		10,0				
BP-Rekombination-Ansatz			BP-Rekombination Programm			
Komponente	Volumen (μl)	Konzentration	T (°C)	Zeit (h : min)	Zyklen	
2. Schritt	1. Schritt	10,0	37	00:10	1	
	Proteinase K 2 μg/μl	1,0				~182 ng/μl
	Gesamtvolumen					11,0

Nach Durchführung der BP-Rekombination (Tabelle 26) wurde je 1 μl des BP-Ansatzes in 50 μl TOPO10 *E. coli* transformiert, indem die Reaktion für 30 min auf Eis und anschließend für 30 s bei 42 °C inkubiert wurde. 250 μl SOC-Medium wurde auf die Zellen gegeben und diese für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Je 10 μl bzw. 100 μl der transformierten Bakterien wurden auf LB-Kan-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Es wurde immer eine zusätzliche Negativkontrolle mitgeführt, in welche kein BP Clonase II Enzyme Mix zugegeben wurde. Es entstanden die Entry-Vektoren pDONR221-V5-KRAS und pDONR221-EmGFP-KRAS. Je Konstrukt wurde von fünf Einzelzellkolonien eine Flüssigkultur mit 5 ml LB-Kan-Medium über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator angesetzt. Unter Verwendung des Qia Spin Miniprep Kit von Qiagen wurde aus der Flüssigkultur das eingebrachte Plasmid nach Handbuch isoliert, in EB-Puffer eluiert und die Konzentration mit dem Nanodrop bestimmt. Daraufhin wurde mit einem Restriktionsverdau (Tabelle 27) und einer Sanger-Sequenzierung überprüft ob die attB-PCR-Produkte erfolgreich und in richtiger Leserichtung in den Spender-Vektor pDONR221 kloniert wurden.

Tabelle 27: Überprüfung der pDONR221-KRAS-Konstrukte durch Restriktionsverdau

Restriktionsverdau-Ansatz			Restriktionsverdau Programm		
Komponente	Volumen (μl)	Konzentration	T (°C)	Zeit (h : min)	Zyklen
pDONR221-KRAS 300 ng	x	30 ng/μl	37	01:00	1
Cutsmart Puffer 10X	1,0	1X			
EcoRI-HF	0,2	0,4 U/μl			
PvuI-HF	0,2	0,4 U/μl			
H ₂ O	ad 10,0				
Gesamtvolumen		10,0			

Für den Restriktionsverdau wurden zwei Enzyme gewählt, von welchen das Enzym PvuI-HF in dem pDONR221-Bereich und das Enzym EcoRI-HF in dem KRAS-Bereich schneidet und somit je Konstrukt bei erfolgreicher Klonierung zwei unterschiedliche Produkte erzeugt wurden. Der Restriktionsverdau wurde mit elektrophoretischer Auftrennung auf einem 1,0 %-igen Agarosegel überprüft. Die positiven Klone wurden mit dem M13 *forward* Primer, welcher in dem pDONR221 bindet, und dem *reverse* Primer b auf die einzubringenden Mutationen und das Leseraster hin überprüft.

6.5.1.4. LR-Rekombination in Expressionsvektor

Nach erfolgreicher BP-Rekombination enthielt der pDONR221-Vektor das KRAS-Konstrukt flankiert mit attL-Rekombinationsstellen, welche für die LR-Rekombination notwendig sind. Für die LR-Rekombination wurden die pDONR221-KRAS-Konstrukte verwendet, welche die zu untersuchenden Mutationen enthielten. Zusätzlich wurde ein Konstrukt ohne Mutation als KRAS-WT genutzt.

Tabelle 28: LR-Rekombination von pLenti 6.3 und pDONR221-KRAS-Konstrukt

LR-Rekombination-Ansatz				LR-Rekombination Programm		
	Komponente	Volumen (µl)	Konzentration	T (°C)	Zeit (h : min)	Zyklen
1. Schritt	pLenti6.3	150 ng/µl	1,0	15 ng/µl	Inkubation	25
	pDONR221-KRAS	x	15 ng/µl	15 ng/µl		
	LR ClonaseII Enzyme Mix	1,0	1X			
	TE Puffer	ad 10,0				
	Gesamtvolumen	10,0				
2. Schritt	Komponente	Volumen (µl)	Konzentration	T (°C)	Zeit (h : min)	Zyklen
	1. Schritt	10,0			Inkubation	37
	Proteinase K	2 µg/µl	1,0	~182 ng/µl		
	Gesamtvolumen	11,0				

Je 2 µl der LR-Reaktion (Tabelle 28) wurde in 50 µl der OneShotStbl3 *E. coli* transformiert, indem das Zell-LR Reaktionsgemisch für 30 min auf Eis und anschließend 30 s bei 42 °C inkubiert wurde. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Bakterien für 1 h bei 37 °C, 200 rpm geschüttelt. Je 10 µl bzw. 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es entstanden die Expressionsvektoren pLenti6.3-V5-KRAS und pLenti6.3-EmGFP-KRAS. Von je fünf Einzelzellkolonien pro Konstrukt wurden Flüssigkulturen mit 5 ml LB-Amp-Medium angesetzt und dann über Nacht bei 37 °C, 200 rpm inkubiert. Die Plasmide wurden mit dem Qia Spin Miniprep Kit von Qiagen isoliert, in EB-Puffer gelöst und die Konzentration mit dem Nanodrop bestimmt.

Tabelle 29: Überprüfung der pLenti6.3-KRAS-Konstrukte durch Restriktionsverdau

Restriktionsverdau-Ansatz			Restriktionsverdau Programm		
Komponente	Volumen (μ l)	Konzentration	T ($^{\circ}$ C)	Zeit (h : min)	Zyklen
pLenti6.3-KRAS 300 ng	x	30 ng/ μ l	Inkubation		
Cutsmart Puffer 10X	1,0	1X	37	01:00	1
EcoRI-HF	0,2	0,4 U/ μ l			
Mfel-HF	0,2	0,4 U/ μ l			
H ₂ O	<i>ad</i> 10,0				
Gesamtvolumen	10,0				

Die Überprüfung über den Restriktionsverdau (Tabelle 29) mit dem Enzym EcoRI-HF, welches in dem KRAS-Bereich und dem pLenti6.3-Bereich schneidet, und dem Enzym Mfel-HF, welches nur in dem pLenti6.3-Bereich schneidet, ergab je Konstrukt drei verschiedene Restriktionsprodukte. Der Restriktionsverdau wurde auf einem 1 %-igen Agarosegel überprüft. Die positiven Klone wurden über Sanger-Sequenzierung mit dem CMV *forward* Primer, welcher an den pLenti6.3-Vektor bindet, und dem *reverse* Primer b auf Sequenz, Leserichtung und Orientierung überprüft. Aus den positiven Einzelzellkolonien wurde 150 ml LB-Amp-Medium mit 500 μ l der Flüssigkultur infiziert und über Nacht bei 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm geschüttelt. Das Plasmid wurde mit dem *Nucleo Bond Xtra Midi Kit* von Macherey-Nagel nach Handbuch aufgereinigt, in H₂O eluiert und die Konzentration mit dem Nanodrop bestimmt.

6.5.1.5. Validierung der Vektoren

Um die Funktionalität der produzierten pLenti6.3-KRAS-Konstrukte zu überprüfen, wurden diese mittels Lipofectamin2000 in HEK293FT-Zellen eingebracht. Dazu wurden die Zellen einen Tag zuvor zu je 6×10^5 Zellen/*well* in 6-*well*-Platten ausgesät. Bei einer Konfluenz von 90 % wurde das Medium durch 500 μ l Opti-MEM I ersetzt. 12 μ l Lipofectamin2000 wurden mit 150 μ l Opti-MEM I gut durchmischt, für 5 min bei RT inkubiert und danach mit einem Mix aus 2,5 μ g des pLenti6.3-KRAS-Konstruktes und 150 μ l Opti-MEM I vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. Das Gemisch wurde auf die HEK293FT-Zellen getropft und diese über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Transfektionsgemisch abgesaugt und durch DMEM Vollmedium ersetzt. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die HEK293FT-Zellen mit Trypsin von den Platten gelöst, in PBS gewaschen und mit FACS- und Western Blot-Analysen auf die Expression der Konstrukte und ihren Effekt auf den nachgeschalteten Signalweg untersucht. Es wurden eine Negativkontrolle sowie ein leerer pLenti6.3-Vektor als Mock-Kontrolle mitgeführt. Die AS-Sequenz und die daraus zu ermittelnde atomare Masse der generierten Fusionsproteine wurden zuvor mit ExPasy und Sciencegateway ermittelt.

6.5.2. Ermittlung geeigneter Zelllinien des Multiplen Myeloms

Die Untersuchung der funktionellen Bedeutung verschiedener ausgewählter *KRAS*-Mutationen im MM erforderte ein Testsystem, welches weder Mutationen in *KRAS* noch

Mutationen *upstream* und *downstream* vom *KRAS* betroffenen RTK-Signalweges aufweist. Dazu wurden Mutationsprofile für den RTK-Signalweg von sechs MM-ZL mit Hilfe der WES-Daten erstellt und kaum betroffene ZL für die funktionellen Untersuchungen ausgewählt.

6.5.3. Ermittlung geeigneter Polybrene®-Konzentration

Polybrene® wird zur Steigerung der Transduktionseffizienz eingesetzt und sollte vorher auf seine Toxizität für die zu transduzierenden Zellen getestet werden. Polybrene® wurde auf 6 mg/ml verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die ZL wurden mit einem Gesamtvolumen von 3 ml und einer Zelldichte von je $0,5 \times 10^6$ /ml in 6-*well*-Platten ausgesät. Jede ZL wurde mit einer Polybrene®-Konzentrationsreihe von 0; 2; 4; 6; 8; 10 µg/ml versetzt und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die auf unterschiedliche Polybrene®-Konzentrationen exponierten Zellen mit Propidiumiodid (PI) und Annexin V APC durch FACS-Analysen auf Nekrose und Apoptose untersucht.

6.5.4. Ermittlung geeigneter Blasticidin-Konzentration

Die mit pLenti6.3-V5-KRAS induzierten ZL wurden nach der Transduktion mit dem Antibiotikum Blasticidin selektiert. Dafür ist die Bestimmung der niedrigsten Blasticidin-Konzentration notwendig, welche nach einer Kultivierdauer von 14 Tagen bei allen nicht transduzierten Zellen den Zelltod auslöst. Blasticidin wurde mit einer Konzentration von 10 mg/ml bei -20 °C gelagert. Die ZL wurden mit einem Gesamtvolumen von 3 ml und einer Zelldichte von je $0,3 \times 10^6$ /ml in 6-*well*-Platten ausgesät. Jede ZL wurde mit einer Blasticidin-Konzentrationsreihe von 0; 2; 4; 6; 8; 10 µg/ml versetzt und es wurde je ZL eine Todkontrolle mit H₂O₂ (Verdünnung 1:1000) angesetzt. Das mit Blasticidin versetzte Medium wurde für 14 Tage alle drei Tage erneuert. Anschließend wurden von den verschiedenen Konzentrationsgruppen die Zellen mit Trypanblau ausgezählt und gleichzeitig ein MTT-Test nach Handbuch durchgeführt.

6.5.5. Lentivirus-Produktion durch Transfektion in HEK293FT

Einen Tag vor der Transfektion wurden die HEK293FT mit Trypsin von den Zellkulturflaschen gelöst und für 4 min, 800 rpm abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in antibiotikafreiem DMEM Vollmedium resuspendiert, mit einer Neubauer Zählkammer gezählt und zu je 6×10^5 Zellen/*well* in 6-*well*-Platten ausgesät. Am Tag der Transfektion, bei einer Konfluenz von 70 - 90 %, wurde das Medium durch je 500 µl Opti-MEM I mit 10 % FCS ausgewechselt. 3,6 µl Lipofectamin2000 wurden in 150 µl Opti-MEM I gut gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Ein Mix aus 0,3 µg Expressionsvektor, 0,9 µg des *Lentivirus packaging mixes* und 150 µl Opti-MEM I wurde zugegeben und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsmix auf die HEK293FT-Zellen getropft und diese über Nacht kultiviert. Jedes Expressionskonstrukt wurde in Triplikaten angesetzt. Für jedes Experiment wurde der Positivkontrollvektor pLenti6.2 mitgeführt. Nach 24 h wurde das Medium durch 1 ml DMEM

Vollmedium ersetzt und die mit EmGFP transfizierten HEK293FT-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf gleichmäßige EmGFP-Expression untersucht. Am Tag darauf wurde der Überstand abgenommen, gepoolt und bei 1500 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die Titerbestimmung und zur Transduktion verwendet. Für eine Doppel-Transduktion wurde auf die HEK293FT-Zellen nochmals 1 ml DMEM Vollmedium gegeben, diese über Nacht kultiviert und der Überstand erneut zur Transduktion verwendet.

6.5.6. Titerbestimmung

Für die Bestimmung des Virustiters der Transfektion wurden zuvor 2×10^4 HEK293-Zellen/100 μ l in 96-well-Platten ausgesät. Je Konstrukt wurden in Triplikaten 10 μ l des Überstandes in ein well gegeben. Danach wurden vier Verdünnungen einer 10er Verdünnungsreihe (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) pipettiert und die HEK293-Zellen für zwei Tage inkubiert. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes wurden die EmGFP-positiven Zellen in der Verdünnung ausgezählt, in welcher sie zählbar waren (<50 positive Zellen).

$$\text{positive Zellen} \cdot 100 \cdot \text{Verdünnung} = \frac{\text{Virus}}{\text{ml}} = \text{Titer}$$

Formel 3: Die Titerbestimmung

6.5.7. Transduktion und Selektion der Zelllinien

Die zu transduzierenden ZL wurden mit 1×10^6 Zellen in einem Gesamtvolumen von 3 ml pro well in 6-well-Platten ausgesät und in Duplikaten mit je 1 ml des Virusüberstandes versetzt, um einen *multiplicity of infection* (MOI) ≤ 1 zu erhalten. Am nächsten Tag erfolgte eine erneute Transduktion mit dem Lentivirus-Überstand. Zwei Tage nach der 1. Transduktion wurden die mit EmGFP transduzierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf EmGFP-Expression untersucht. Aus den mit EmGFP-Konstrukten transduzierten Zellen wurden durch FACS Sortierung Zellen mit niedriger EmGFP-Expression selektiert und die Duplikate gepoolt. Die Duplikate der mit V5-Konstrukten transduzierten Zellen wurden gepoolt und für 14 Tage mit der jeweiligen Blasticidin-Konzentration behandelt. Die Zellen wurden alle drei Tage bei 800 rpm für 5 min abzentrifugiert und in neuem Medium mit Antibiotika resuspendiert. Die jeweiligen Zellpoole wurden weiter kultiviert, in *master-* und *working stock* gesichert und auf Mykoplasmenkontamination überprüft.

6.5.8. Validierung der Zelllinien

Mit dem Aufbau der Zellbank wurden die modifizierten ZL gleichzeitig validiert, indem die Expression von den EmGFP- und V5-getaggten Konstrukten durch Western Blot-Analysen mit KRAS-AK und V5-AK sowie mit FACS-Analysen auf Größe und Spezifität untersucht wurden. Von den modifizierten ZL wurde DNA mit dem Qiagen *All Prep Kit* isoliert und diese mit PCR und Sanger-Sequenzierung auf die eingebrachten Mutationen mit den attB-Primern und bereits tragende Mutationen mit den folgenden Primern untersucht (Tabelle 30).

Tabelle 30: Primer für "Fingerabdruck" von ZL

ZL	Gen	Austausch	Position	forward Primer 5'-3'	reverse Primer 5'-3'	bp
OPM2	<i>DIS3</i>	A>C	chr13: 73355008	TCACAGGAACCCCTCTCCCGAATTT	TGATGTTCTTGAGGACCCTGCCAT	226
JJN3	<i>ITGA6</i>	C>T	chr2: 173355989	TGAATCTGGCACTGTTGGGAGGA	GGCAGCAGCAGTCACATCAATGAA	701

6.6. siRNA vermittelter *knockdown* von *KRAS* in der Zelllinie AMO1

Mittels Elektroporation wurde eine *KRAS*-spezifische siRNA in die *KRAS*-mutierte MM-ZL AMO1 (p.A146T) eingebracht und dadurch ein zeitlich begrenzter *knockdown* von *KRAS* in dieser ZL hervorgerufen. Es wurde immer eine *scrambled* siRNA als Mock-Kontrolle mitgeführt. Die ZL wurde einen Tag zuvor mit frischem RPMI-1640 Vollmedium versehen und am Tag der Elektroporation bei 800 rpm für 4 min abzentrifugiert, in Vollmedium aufgenommen und gezählt. Je Elektroporation wurden 6×10^6 Zellen abzentrifugiert, in PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Mit abgeschnittenen Spitzen wurden die Zellpellets in 200 μ l frisch geöffneten RPMI-1640 Medium, versetzt mit 1,5 - 4,5 μ M siRNA, resuspendiert und in 2 mm Küvetten pipettiert. Die Küvette wurde in die Elektroporationskammer des Gene Pulser II (Biorad) geklemmt und bei einer Kapazität von 960 μ F eine ZL-abhängige Spannung (AMO1: 180 V) angelegt. Unmittelbar danach wurden die Zellen in je 500 μ l reines RPMI-1640 Medium gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in eine 6-well-Platte mit 7 ml RPMI-1640 Vollmedium umgesetzt und über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden dann bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert und in einem Mix bestehend aus 2,5 ml RPMI-1640 Vollmedium und 0,75 ml OptiPrep aufgenommen, resuspendiert und in ein FACS Falcon pipettiert. Das Zellgemisch wurde mit 200 μ l PBS überschichtet und für 7 min bei 3500 rpm abzentrifugiert, um die toten von den lebenden Zellen über das OptiPrep Gradientensystem zu trennen. Der lebenden Zellen wurden abpipettiert und in 10 ml RPMI-1640 Vollmedium resuspendiert. Dieser wurde bei 1200 rpm für 4 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden erneut in Vollmedium aufgenommen, gezählt und für FACS- und Western Blot-Analysen verwendet.

6.7. Western Blot

6.7.1. Herstellung von Gesamtzelllysaten

Für die Herstellung von Gesamtzelllysaten wurden die Zellen bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert und das überschüssige Medium verworfen. Anschließend wurden die Zellen in eiskaltem PBS gewaschen, gezählt und erneut abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde 250 μ l 1x Lysispuffer auf 1×10^7 Zellen gegeben, gevortext und diese für 20 min auf Eis gelagert. Danach wurden die Proben für 15 min bei 13200 rpm, 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und bei -80 °C gelagert.

6.7.2. Proteinmengenbestimmung und Proteinvorbereitung

Die Bestimmung der Proteinmenge in den gewonnenen Zelllysaten erfolgte mit Hilfe des Bradford-Assays. Hierfür wurde eine Standardreihe mit sechs Konzentrationen (0,1; 0,25; 0,35; 0,5; 0,7; 1,0 mg/ml) aus in H₂O verdünntem BSA angesetzt. Die zu bestimmenden Lysate wurden 1:10 in H₂O vorverdünnt. Für die Standards, den Blank sowie die vorverdünnten Lysate wurden in Tripletts 290 µl Bradford-Reagenz in einer 96-*well*-Platte vorgelegt und mit je 10 µl der vorverdünnten Probe versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT im Dunkeln wurde die Absorption der Proben mit FLUOstar Omega bei einer Wellenlänge von 595 nm ausgemessen. Die lineare Funktion der Standardreihe wurde ermittelt und die Konzentration der Proben unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet. Die Proben wurden 1:1 mit 2X Lämmli-Blau-Puffer versetzt, für 5 min bei 96 °C denaturiert und bei -20 °C gelagert.

6.7.3. Protein-Elektrotransfer

Die Auftrennung der Proteinbanden nach ihrer Größe und Ladung erfolgte mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) durch das Mini-PROTEAN®Tetra System von Biorad. Je 30 µg der Proteinprobe und 2 µl des Proteinstandards wurden auf ein SDS-Page Gel, bestehend aus einem Trenngel überschichtet von einem Sammelgel, aufgetragen (Tabelle 31).

Tabelle 31: SDS-Page Gel

Trenngel			Sammelgel		
Komponente	Volumen	Konzentration	Komponente	Volumen	Konzentration
Acrylamid	2,0 - 5,0 ml	6 - 15 %	Acrylamid	0,5	5 %
Trenngel-Puffer	2,5 ml		Sammelgel-Puffer	0,38 ml	
SDS 10 %	0,1 ml	0,1 %	SDS 10 %	0,03 ml	0,1 %
APS 10 %	0,1 ml	0,1 %	APS 10 %	0,03 ml	0,1 %
TEMED	4 µl	0,0004 %	TEMED	3 µl	0,001 %
H ₂ O	<i>ad</i> 10,0		H ₂ O	<i>ad</i> 3,0	
Gesamtvolumen	10,0 ml		Gesamtvolumen	3,0 ml	

Die Proteine wurden nun durch Anlegung einer Spannung von 90 – 120 V für ca. 90 min elektrophoretisch aufgetrennt. Für den Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde das *wet western transfer system* von PeQLab verwendet. Gel, Membran und Blot Papier wurden in 1X Blotpuffer equilibriert und ein Gel ‚Sandwich‘, bestehend aus Anode – 1x Fasermatte – 2x Blot Papier – 1x Membran – 1x Gel – 2x Blot Papier – 1x Fasermatte – Kathode, zusammengesetzt. Das Sandwich wurde in einen mit 1X Blot Puffer befüllten Tank eingereicht. Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 90 V, 400 mA für 90 – 120 min je nach Größe des Proteins. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran mit Ponceau S reversibel angefärbt, um die Proteinmenge und den erfolgreichen Transfer zu überprüfen.

6.7.4. Immundetektion von KRAS und ausgewählter nachgestellter Proteine des Signalweges

Die Detektion der zu untersuchenden Proteine erfolgte mit proteinspezifischen Erstantikörpern und einem an diesen spezifisch bindenden Zweitantikörper. Die Membran wurde für 1 h bei RT in TBS/0,1 % Tween mit 5 % fettarmer Milch bzw. 5 % BSA inkubiert, um unspezifische Protein-Bindungsstellen zu blockieren. Die Erstantikörper wurden in TBS/0,1 % Tween mit 5 % fettarmer Milch bzw. 5 % BSA verdünnt (Tabelle 32), auf die Membran gegeben und bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation von ~16 h wurde die Membran dreimal für 5 min in TBS/0,1 % Tween gewaschen. Der passende Zweitantikörper wurde verdünnt (Tabelle 33), zu der Membran gegeben und für 1 h bei RT geschwenkt. Danach wurde die Membran dreimal für 5 min in TBS/0,1 % Tween gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Chemolumineszenz, ausgelöst durch die Zugabe einer ECL-Lösung auf die Membran. Die Proteinsignale wurden entweder mit dem Western Blot-Dokumentation System von Vilber oder durch die Verwendung von ECL-Hyperfilmen detektiert. Die Signale wurden dem System entsprechend mit der Fusion Software oder ImageJ ausgewertet.

Tabelle 32: Verdünnung der Erstantikörper

Erstantikörper	Verdünnung	Lösung
KRAS	1:200	5 %- Magermilch/ TBS 0,1% Tween
MEK1/2	1:2000	1 %- BSA/ TBS 0,1% Tween
Phospho-MEK1/2	1:2000	5 %- BSA/ TBS 0,1% Tween
ERK1/2	1:3000	1 %- BSA/ TBS 0,1% Tween
Phospho-ERK1/2	1:2000	1 %- BSA/ TBS 0,1% Tween
STAT3	1:500	1 %- BSA/ TBS 0,1% Tween
Phospho-STAT3	1:500	1 %- BSA/ TBS 0,1% Tween
AKT	1:1000	5 %- BSA/ TBS 0,1% Tween
Phospho-AKT	1:2000	5 %- BSA/ TBS 0,1% Tween
mTOR	1:1000	5 %- BSA/ TBS 0,1% Tween
Phospho-mTOR	1:1000	1 %- BSA/ TBS 0,1% Tween
Phospho-PI3K	1:5000	5 %- BSA/ TBS 0,1% Tween
p70 S6 Kinase	1:1000	5 %- BSA/ TBS 0,1% Tween
Phospho-p70 S6 Kinase	1:1000	5 %- BSA/ TBS 0,1% Tween
Tubulin α	1:5000	5 %- Magermilch/ TBS 0,1% Tween
Anti-V5	1:700	5 %- BSA/ TBS 0,1% Tween

Tabelle 33: Verdünnung Zweitantikörper

Zweitantikörper	Verdünnung	Lösung
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse (#P0260)	1:10000	TBS 0,1% Tween
Anti-Mouse (#7076)	1:3000	5 %- BSA/ TBS 0,1% Tween
Anti-Rabbit (#7074)	1:2000	5 %- BSA/ TBS 0,1% Tween

6.8. Durchflusszytometrie (FACS)

Zur Bestimmung der Transduktionseffizienz der lentiviralen Transduktion von mutierten *KRAS* in MM-Zellen und dem *knockdown* von *KRAS* in MM-Zellen wurde die Anzahl an EmGFP- bzw. Alexa-488-gelabelten, siRNA-positiven Zellen gemessen. Dazu wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer gewaschen, bei 1500 rpm für 5 min abzentrifugiert, in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und mit dem BD FACS Canto II bei Anregungswellenlänge von 488 nm im FITC Kanal gemessen.

Zur Bestimmung der Nekrose und Apoptose wurden die Zellen in 500 µl Annexin-Puffer bei 1500 rpm für 5 min abzentrifugiert, in 50 µl Annexin-Puffer mit 1 µl Propidiumiodid (PI) und 1 µl Annexin V APC aufgenommen und für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die positiven Zellen wurden dann im PE (PI) und APC (Annexin V) Kanal bei Anregungswellenlängen von 488 nm (PE) und 633 nm (APC) vermessen. Da das Emissionsspektrum von FITC und PE sich überlappt, wurden die Messwerte der Zellen kompensiert. Die Daten wurden in der Flowing Software 2 mit Dot Plots und Histogrammen visuell dargestellt und ausgewertet.

7. Ergebnisse

7.1. whole exome sequencing-Ansatz

7.1.1. Filterung und Validierung

Die WES-Daten von sechs MM-ZL sowie Tumor- und zugehörigen Normalproben von fünf Patienten ergaben 55363 Varianten. Durch die gewählte Filterstrategie wurde der Fokus auf 330 somatische, *non-synonymous* tumorrelevante SNVs in 193 Genen gelegt, welche nach allen drei bioinformatischen Prädiktoren eine funktionelle Relevanz aufwiesen (S_Tabelle 4 B). Diese Gene waren entweder in mindestens einem Patienten des vorliegenden Datensets (n = 5; 79 Gene) oder in einer MM-ZL (n = 6) in Kombination mit einem Patienten unseren Datensets oder des veröffentlichten Datensets von Chapman *et al.* [37] (n = 5 + 38; 114 Gene) mutiert. Die Validierung mit Sanger-Sequenzierung von zufällig ausgewählten Varianten innerhalb der unterschiedlichen Filterstrategien nach der SeattleSeq Annotation ergab eine Bestätigungsrate von 199 von 213 SNVs (94,3 %) (S_Tabelle 3). Sowohl die Anzahl an technisch verifizierten SNVs als auch die Bestätigungsrate entsprach den Richtlinien des *International Cancer Genome Consortium*. [83]

7.1.2. Häufig mutierte Gene im Multiplen Myelom

Die Integration der Daten von Chapman *et al.* [37] ermöglichte es, acht tumorrelevante Gene aus den MM-ZL zu extrahieren, welche zusätzlich in mindestens vier MM-Patienten betroffen waren und für deren SNVs in mindestens zwei der bioinformatischen Prädiktoren eine funktionelle Bedeutung vorhergesagt wurde (Tabelle 34). Jedoch bestätigte sich, dass im MM selten die gleichen Gene und auch die gleichen Positionen betroffen sind. [83]

Tabelle 34: Häufig betroffene Gene im MM [83]

Gen	Chr	Validierung	MM-Patienten	MM-ZL	MM-Patienten (einschließlich [37])	ZL + MM-Patienten (einschließlich [37])
<i>KRAS</i>	12	bestätigt	1	2 (AMO1, MM1.S)	11	13
<i>NRAS</i>	1	bestätigt	0	1 (L363)	9	10
<i>LRP1B</i>	2	bestätigt	0	2 (OPM2, AMO1)	6	8
<i>FAM46C</i>	1	bestätigt	0	1 (MM1.S)	5	6
<i>WHSC1</i>	4	bestätigt	0	1 (MM1.S)	5	6
<i>ALOX12B</i>	17	bestätigt	1	1 (AMO1)	4	6
<i>DIS3</i>	13	bestätigt	0	1 (OPM2)	4	5
<i>PKHD1</i>	6	bestätigt	0	1 (JN3)	4	5

7.1.3. Korrelation von häufig mutierten Genen mit *copy number*- und Genexpressionsdaten

Ein Abgleich des mutierten Gens mit den CN- und GE-Daten der betroffenen MM-ZL gab weiteren Aufschluss über die Relevanz der detektierten SNVs. Interessanterweise wurde für die heterozygot *KRAS*-mutierte MM-ZL AMO1 (p.A146T) (Abbildung 5 A) eine erhöhte CN von vier sowie eine ~2x höhere GE von *KRAS* im Vergleich zu den anderen MM-ZL festgestellt

(S_Tabelle 2). Für die MM-ZL OPM2 wurde eine homozygote SNV in *DIS3* (p.Y121S) (Abbildung 5 B) im Zusammenhang mit einer *copy neutral loss of heterozygosity* (CNLOH) festgestellt, welche zu keiner Veränderung der GE führte (S_Tabelle 2). [83]

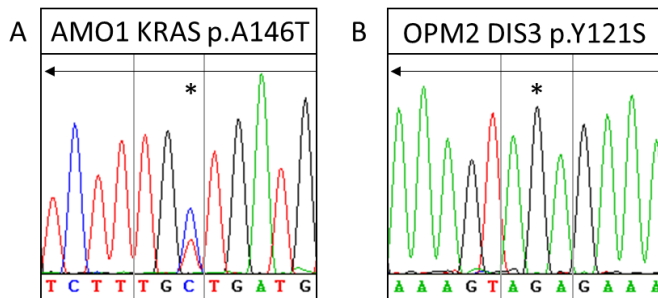


Abbildung 5: Sanger-Sequenzierung von SNV in *DIS3* und *KRAS*

Peak-Diagramme von Sanger-Sequenzierungen. Die Pfeilrichtungen geben die Richtung der Lesesequenz der DNA für das jeweilige Protein an. Die betroffenen SNVs sind mit einem Stern markiert und das betroffene Triplet für die AS ist grau umrandet. A: *KRAS*-SNV an Position Chr 12: 25378562 C>T. B: *DIS3*-SNV an Position Chr 13: 73355008 T>G.

7.1.4. Akkumulation von mutierten Genen in Signalwegen

Die GSEA Signalweg-Annotierung der 79 Gene (S_Tabelle 4 A), welche in mindestens einem Patienten des vorliegenden Datensets mutiert waren, offenbarte eine Anreicherung der Gene in neun Wachstumsfaktorrezeptor-Signalwegen und einem Adhäsions-Signalweg unter den ersten 20 Gensets (Tabelle 35). Außerdem wurde bei der Annotierung der 193 Gene (S_Tabelle 4 B), welche in mindestens einem Patienten des vorliegenden Datensets oder in einer MM-ZL in Kombination mit einem Patienten unseren Datensets oder des veröffentlichten Datensets von Chapman *et al.* [37] mutiert waren, eine Akkumulation in 14 tumorassoziierten Signalwegen und drei Adhäsions-Signalwegen unter den ersten 20 Gensets beobachtet (S_Tabelle 5). In den ersten 50 Gensets wurde ein weiterer Adhäsions-assoziiertes-Signalweg und vier weitere Wachstumsfaktorrezeptor-Signalwege identifiziert (S_Tabelle 5). [83]

Tabelle 35: GSEA Signalweg-Annotierung

Genset Name	Gene im Genset	Gen-Überlappung	p-Werte
REACTOME SIGNALING BY EGFR	48	4	1,59E-05
ST_MYOCYTE_AD_PATHWAY	23	3	5,09E-05
KEGG_LONG_TERM_DEPRESSION	70	4	7,12E-05
KEGG_LONG_TERM_POTENTIATION	70	4	7,12E-05
VERRECCHIA_DELAYED_RESPONSE_TO_TGFB1	36	3	1,99E-04
ST_B_CELL_ANTIGEN_RECEPTOR	39	3	2,53E-04
KEGG_BLADDER_CANCER	42	3	3,16E-04
BENPORATH_SUZ12_TARGETS	1037	11	3,82E-04
NAKAMURA_METASTASIS	47	3	4,42E-04
VERRECCHIA_RESPONSE_TO_TGFB1_C4	11	2	5,30E-04
KEGG_ENDOMETRIAL_CANCER	52	3	5,95E-04
REACTOME_SHC_MEDIATED_SIGNALING	12	2	6,34E-04
KEGG_NON_SMALL_CELL_LUNG_CANCER	54	3	6,65E-04
KEGG_NEUROTROPHIN_SIGNALING_PATHWAY	126	4	6,81E-04
KEGG_AXON_GUIDANCE	129	4	7,44E-04
REACTOME_GRB2_EVENTS_IN_EGFR_SIGNALING	13	2	7,48E-04
REACTOME_SOS_MEDIATED_SIGNALING	13	2	7,48E-04
KEGG_TIGHT_JUNCTION	134	4	8,57E-04
AMIT_EGF_RESPONSE_20_MCF10A	14	2	8,71E-04
REACTOME_SHC_RELATED_EVENTS	14	2	8,71E-04

7.1.5. Mutationen in Adhäsionsmolekülen, Rezeptortyrosinkinasen und *downstream*-Effektoren

Auf Grund der hohen Anreicherung von SNVs im Signalweg von Wachstumsfaktorrezeptoren, welche unter anderem die Rezeptortyrosinkinasen (RTK) umfassen und deren Bedeutung in der Pathogenese vom MM und anderen Tumorentitäten bekannt ist, wurde das Datenset auf 91 RTKs geprüft (S_Tabelle 6). Dies ergab, dass 14 der 91 RTKs in diesem Datenset mutiert waren, darunter bekannte RTKs, wie ERBB3, IGF1R und NTRK1/2. Des Weiteren wurden SNVs in mehreren *downstream*-Effektoren wie KRAS, BRAF, MAP2K2, AKAP1, IKBKE, STAM2 und GRK detektiert (Abbildung 6). Diese SNVs kamen alle in mindestens einem Patienten des vorliegenden Datensets oder des publizierten Datensets von Chapman *et al.* [37] vor und zeigten eine funktionelle Bedeutung durch alle drei bioinformatischen Prädiktoren. SNVs in NTRK1, NTRK2 AKAP1, IKBKE, STAM2, GRK2/ADRBK1 und MAP2K2 wurden im MM zuvor nicht erwähnt. [83]

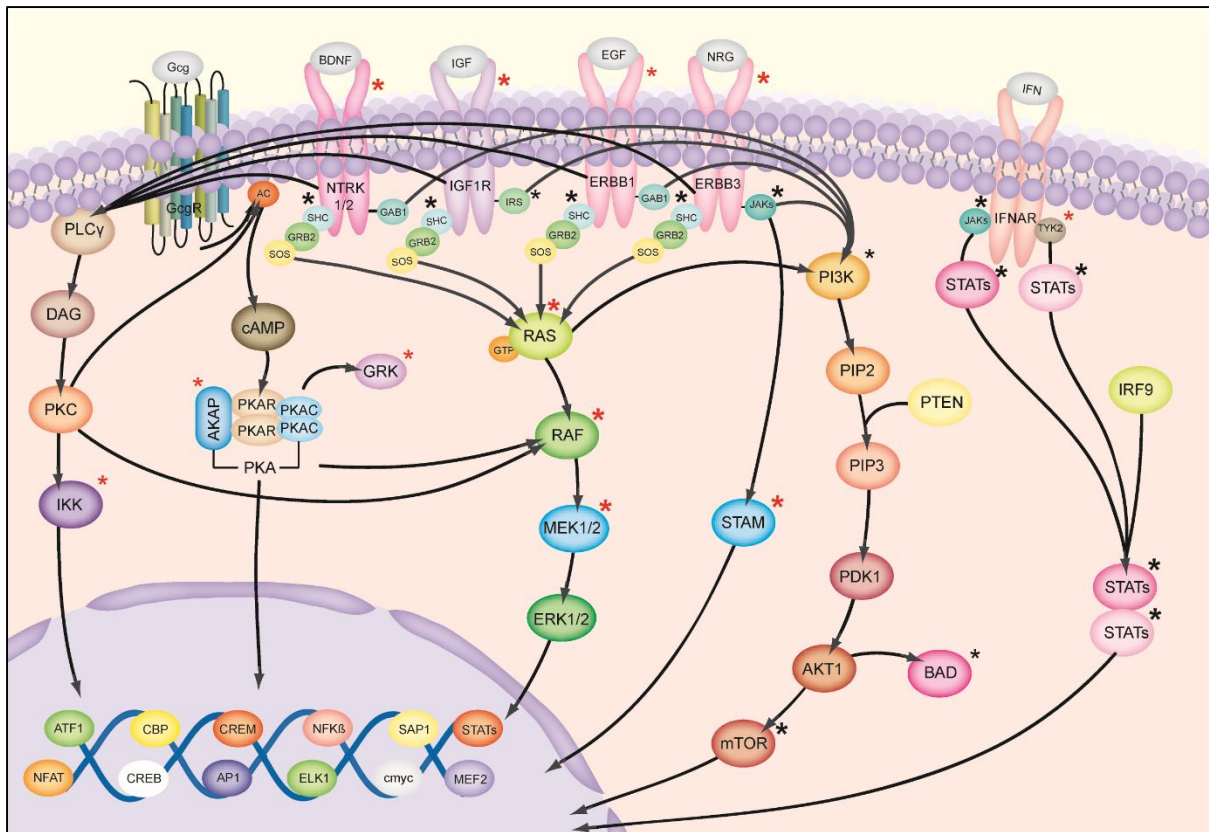


Abbildung 6: Betroffene Gene des RTK-Signalweges [83]

Schematische Darstellung des RTK-Signalweges, modifiziert nach Oda *et al.* [99]. Pfeile stellen die Verbindung zwischen RTK-assoziierten Proteinen dar. Sterne stehen für SNVs. Rote Sterne sind SNVs, welche in Patienten des vorliegenden Datensets und in dem publizierten Datenset von Chapman *et al.* [37] vorkamen. Schwarze Sterne kennzeichnen SNVs, welche in mindestens einer MM-ZL detektiert wurden. Fettgedruckte rote und schwarze Sterne weisen eine zusätzliche funktionelle Bedeutung nach allen drei Prädiktoren auf.

Die Tumorumgebung ist für die Pathogenese des MMs und anderen B-Zell-Erkrankung von essentieller Bedeutung [100, 101]. Durch die Beobachtung, dass neben den RTK-Signalwegen auch häufig Adhäsionsmoleküle betroffen sind, wurde das Datenset auf 653 bekannte Adhäsionsmoleküle gescreent (S_Tabelle 7), wobei 201 von diesen als mutiert in diesem Datenset identifiziert wurden. Es waren verschiedene Gruppen der Adhäsionsmoleküle, wie Integrine (ITGB1, ITGB5, ITGA7), Cadherine (CDH9, CDH11, CDH18), N-CAMs (N-CAM2) sowie verschiedene Ephrinrezeptor-Klassen (EPHB2, EPHA2) und *downstream*-Effektoren betroffen (Abbildung 7). [83]

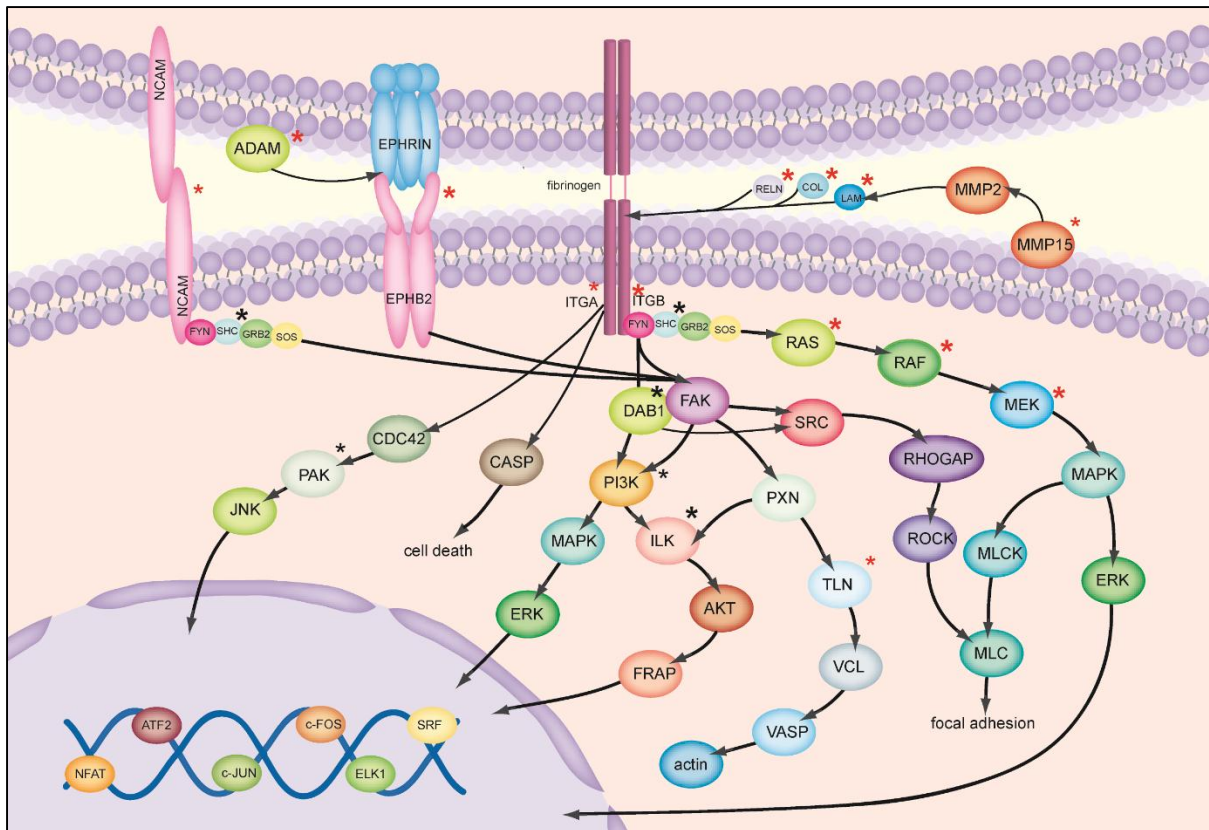


Abbildung 7: Betroffene Gene des Adhäsions-Signalweges [83]

Schematische Darstellung des Adhäsions-Signalweges, modifiziert nach Oda *et al.* [99]. Pfeile stellen die Verbindung zwischen Adhäsions-assoziierten Proteinen dar. Sterne stehen für SNVs. Rote Sterne sind SNVs, welche in Patienten des vorliegenden Datensets und in dem publizierten Datenset von Chapman *et al.* [37] vorkamen. Schwarze Sterne kennzeichnen SNVs, welche in mindestens einer MM-ZL detektiert wurden. Fettdruckte rote und schwarze Sterne weisen eine zusätzliche funktionelle Bedeutung nach allen drei Prädiktoren auf.

Die Überprüfung aller mutierten Gene des RTK- und Adhäsions-Signaltransduktionsnetzwerkes (S_Tabelle 8), welche in mindestens einem Patienten des vorliegenden Datensets oder des publizierten Datensets von Chapman *et al.* [37] und eine funktionelle Bedeutung für mindestens zwei bioinformatische Prädiktoren aufwiesen, zeigte eine starke Vernetzung zwischen den betroffenen Proteinen mit der String Software auf (Abbildung 8). Außerdem wurde beobachtet, dass alle MM-ZL und fast 100 % der MM-Patienten, einschließlich des veröffentlichten Datensets von Chapman *et al.* [37], mindestens von einer Mutation und ~50 % der MM-Patienten sowie alle MM-ZL von mehr als einer Mutation innerhalb dieses Signalnetzwerkes der Adhäsionsmoleküle, RTKs und *downstream*-Effektoren betroffen waren. Diese Beobachtung bezeichneten wir als inter- und intra-individuelle Signalweg-Redundanz. Interessanterweise wurde beispielsweise ein gemeinsames Auftreten von Mutationen in *KRAS* und *EGFR* in den MM-ZL AMO1 (*KRAS*: p.A146T; *EGFR*: p.K209N) und MM1.S (*KRAS*: p.G12A; *EGFR*: p.G917R), jedoch an unterschiedlichen Positionen, detektiert. [83]

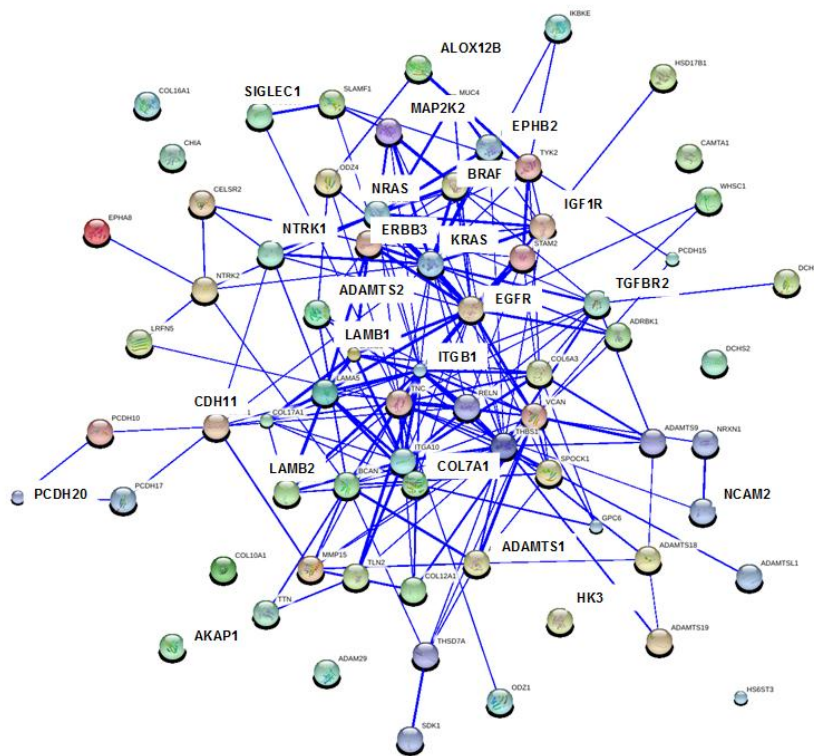


Abbildung 8: Analyse der betroffenen Proteine des RTK- und Adhäsions-Signalweges mit der String Software
Vernetzung der mutierten Proteine des RTK- und Adhäsion-Signalweges. Darstellung im *confidence* Modus mit einer *low confidence* von 0,150. Die Dicke der Linien zwischen den Proteinen entspricht der Stärke der Verbindung zwischen diesen.

7.2. Amplikon-Sequenzierungsansatz

7.2.1. Analyse, Filterung und Validierung der *DIS3*- und *KRAS*-Daten

Qualität

Für jeden 12-plex 454 Sequenzier-Lauf (1 – 8) wurden 177 072 – 254 564 Lesesequenzen mit Längen bis zu 500 bp generiert, welche einen gültigen Sequenzier-Key besitzen (Tabelle 36). In Abhängigkeit von den system- und chemikalienabhängigen Effekten waren 25,9 – 44,8 % dieser Lesesequenzen nach dem *Trimming/Rejecting Passed Filter* (nach Standardprotokoll) vorhanden. Alle Sequenzierläufe erreichten das Minimumkriterium von *Passed Filter Wells* >50 000. Über 99 % der getrimmten Lesesequenzen konnten der passenden Probe zugeordnet und mit der richtigen Zielsequenz gemappt werden. [85]

Tabelle 36: Qualitätswerte der Amplikon-Sequenzierläufe [85]

Qualitäts-Kriterien	12-plex								8-plex
	1	2	3	4	5	6	7	8	×
Raw Wells	187 501	222 877	259 193	227 893	214 613	199 950	223 916	244 396	264 939
<i>All Control DNA Wells</i>	6 586	4 324	2 518	7 960	5 420	6 743	6 446	5 383	4 371
<i>Key Pass Wells</i>	177 072	216 730	254 564	216 731	207 682	191 663	215 977	237 512	257 954
Key Pass Wells (%)	94,4	97,2	98,2	95,1	96,8	95,9	96,5	97,2	97,4
<i>Passed Filter Wells</i>	84 147	73 346	65 876	91 092	72 059	85 843	87 595	94 041	101 177
<i>Dot</i>	3 419	7 633	10 806	5 826	4 538	5 624	7 517	5 830	6 721
<i>Mixed</i>	7 042	14 801	20 078	9 526	16 553	9 468	11 886	9 895	8 144
<i>Short Quality</i>	82 086	120 418	157 332	110 060	114 312	90 475	108 583	127 547	141 522
<i>Short Primer</i>	1	126	10	10	2	58	114	24	17
Dot + Mixed (%)	5,91	10,35	12,13	7,08	10,16	7,87	8,98	6,62	5,76
<i>Short (%)</i>	46,36	55,62	61,81	50,79	55,04	47,24	50,33	53,71	54,87
Passed Filter (%)	47,52	33,84	25,88	42,03	34,7	44,79	40,56	39,59	39,22
<i>Trimmed Reads</i>	84 147	73 346	65 876	91 092	72 059	85 843	94 041	87 595	101 177
<i>Demultiplex Reads</i>	84 133	73 329	65 860	91 087	72 057	85 836	94 022	87 585	101 167
<i>Demultiplex Reads (%)</i>	99,98	99,98	99,98	99,99	100,00	99,99	99,98	99,99	99,99

Abdeckung

Die kodierende Sequenz von *DIS3* (Exon 1 – 22) wurde mit einer mittleren Anzahl von 57 – 178 Lesesequenzen pro Probe abgedeckt und erreichte eine durchschnittliche Abdeckung von 136 (Abbildung 9). Für Exon 1 wurde auf Grund eines hohen GC-Gehaltes in dieser Region und der damit verbundenen schlechteren Amplifikation in der *library*-Präparation eine niedrigere Abdeckung erreicht. Niedrig abgedeckte Bereiche in der enzymatisch aktiven RNB-Domäne (Exon 13 + 14) wurden für die betroffene Probe mit Sanger-Sequenzierung re-sequenziert. [85]

Für die *coding sequence* (CDS) von *KRAS* (Exon 2 – 6) wurde eine durchschnittliche Abdeckung von 121 mit 92 – 140 Lesesequenzen pro Probe erreicht (Abbildung 9). Proben, welche ein schwaches oder nicht abgedecktes Exon 3 aufwiesen, wurden für diese Region mit Sanger-

Sequenzierung resequenziert. Da die Lesesequenzen mit einer Länge von 500 bp das gesamte Amplikon abdecken, entspricht die Abdeckung pro Base der Abdeckung pro Amplikon.

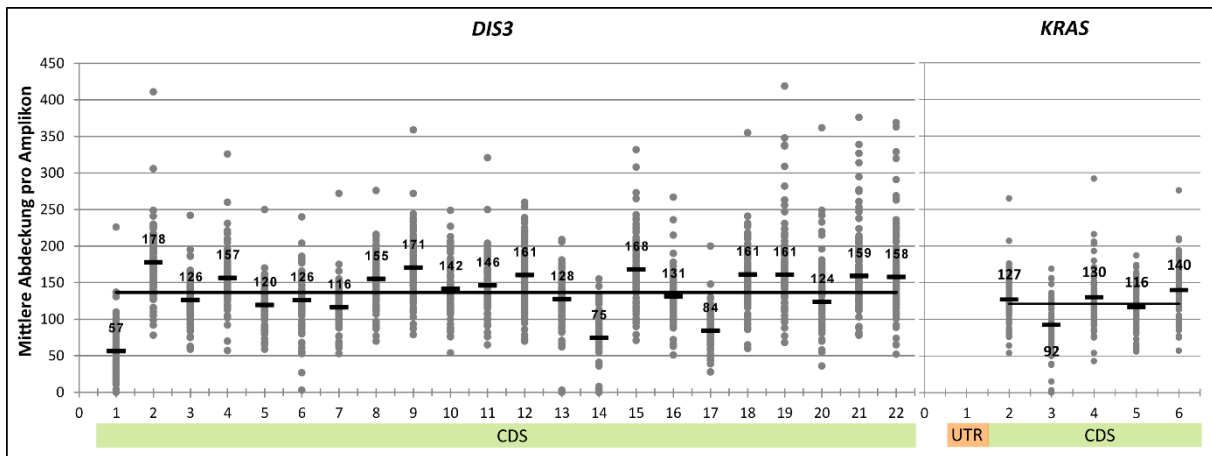


Abbildung 9: Abdeckung der CDS von *DIS3* und *KRAS*

Übersicht über die Abdeckung der CDS von *DIS3* (links) (leicht modifiziert nach Weißbach *et al.* [85]) und *KRAS* (rechts) in der Amplikon-Sequenzierung. Graue Punkte geben die Anzahl der Lesesequenz pro Probe pro Amplikon an. Daraus ergibt sich die mittlere Abdeckung (y-Achse) je Amplikon (x-Achse).

Um zu überprüfen, ob eine höhere Abdeckung von mindestens 200 der einzelnen Amplikons einen Vorteil in der Detektion von Varianten bringt, wurden die Daten für acht Proben aus einem 12-plex und einem 8-plex Lauf (✕) miteinander verglichen (Tabelle 36). Mit der AVA Software wurden die Varianten nach Standardprotokoll detektiert und der CDS zugeordnet. Es wurde sich auf die mit HRM überprüfbareren Varianten mit einer VAF >5 % fokussiert. Durch eine höhere Abdeckung der Amplikons der Patienten konnten in *DIS3* und *KRAS* mehr InDels an verschiedenen Positionen detektiert werden (Tabelle 37). Jedoch lagen die chromosomalen Positionen der InDels in Bereichen mit homopolymeren Sequenzen. Für die 454 Sequenziertechnik von Roche ist bekannt, dass in homopolymeren Bereichen falsch-positive InDels detektiert werden können [102]. Unter Bezugnahme dieser Aussage wurden diese InDels nicht berücksichtigt. Folgernd bringt eine höhere Abdeckung in dem gewählten Ansatz keinen Vorteil in der SNV Detektion.

Tabelle 37: Output höherer Abdeckungen

Patient	12-plex Ø Abdeckung pro Amplikon	8-plex Ø Abdeckung pro Amplikon	Gen	Chr	Position (hg19)	neue Variante (mutation rate >5 %)	Homopolymer
P62	144	164	<i>KRAS</i>	12	25368395	Insert	TTTTTTAA
P67	127	304	<i>KRAS</i>	12	25368395	Insert	TTTTTTAA
P72	169	393	<i>KRAS</i>	12	25368395	Insert	TTTTTTAA
P62	144	164	<i>KRAS</i>	12	25368480	Insert	TAAAAAGC
P67	127	304	<i>KRAS</i>	12	25368480	Insert	TAAAAAGC
P72	169	393	<i>KRAS</i>	12	25368480	Insert	TAAAAAGC
P57	77	329	<i>DIS3</i>	13	73335852	Insert	GATTTTAC
P67	127	304	<i>DIS3</i>	13	73335852	Insert	GATTTTAC
P62	144	164	<i>DIS3</i>	13	73337691	Insert	TTTTTTGC
P21	142	270	<i>DIS3</i>	13	73355947	Deletion	TCTTTTTAA

Filterung

Es wurden für *DIS3* 441 und für *KRAS* 104 Substitutionen und InDels mit der AVA-Software detektiert (Abbildung 10). 177 von diesen Varianten wurden der CDS von *DIS3* und 43 der CDS von *KRAS* durch SeattleSeq 137-Annotierung zugeordnet. Diese Varianten bestanden aus 154 Substitutionen und 23 InDels für *DIS3* sowie 34 Substitutionen und neun InDels für *KRAS*. Weitere Analysen ergaben, dass die InDels vorzugsweise in homopolymeren Sequenzen von *DIS3* oder *KRAS* auftraten und wurden somit als bekannte homopolymer-assoziierte InDel Fehler in der 454 Technik von der weiteren Analyse ausgeschlossen [102]. In den weiteren Schritten wurde auf *non-synonymous* SNVs fokussiert, welche eine VAF >5 % aufwiesen, um tumorassoziierte Varianten mit einem detektierbaren Level aus den Daten zu extrahieren. Da ab dbSNP Version 134 sowohl SNVs als auch SNPs in die Datenbank eingespeist wurden, wurde für die dbSNP-Kennung manuell in der dbSNP Datenbank überprüft, ob für diese Varianten eine klinische Assoziation vorlag. Im Falle einer klinischen Assoziation wurden diese in dem vorliegenden Filteransatz den tumorrelevanten SNVs zugeordnet. Dies ergab 34 *non-synonymous* SNVs in *DIS3* und 17 *non-synonymous* SNVs in *KRAS*. Mit Sanger-Sequenzierung konnten drei zufällig ausgewählten SNVs in *DIS3*, welche nur in *forward* oder *reverse* Lesesequenzen vorkamen, nicht bestätigt werden. Daher wurden alle SNVs, die nur in *forward* oder *reverse* Lesesequenzen vorkamen, als mögliche falsch-positive Varianten von den Daten ausgeschlossen. Die Filterung ergab 25 tumorassoziierte SNVs in *DIS3* [85] und 15 tumorassoziierte SNVs in *KRAS* (Abbildung 10).

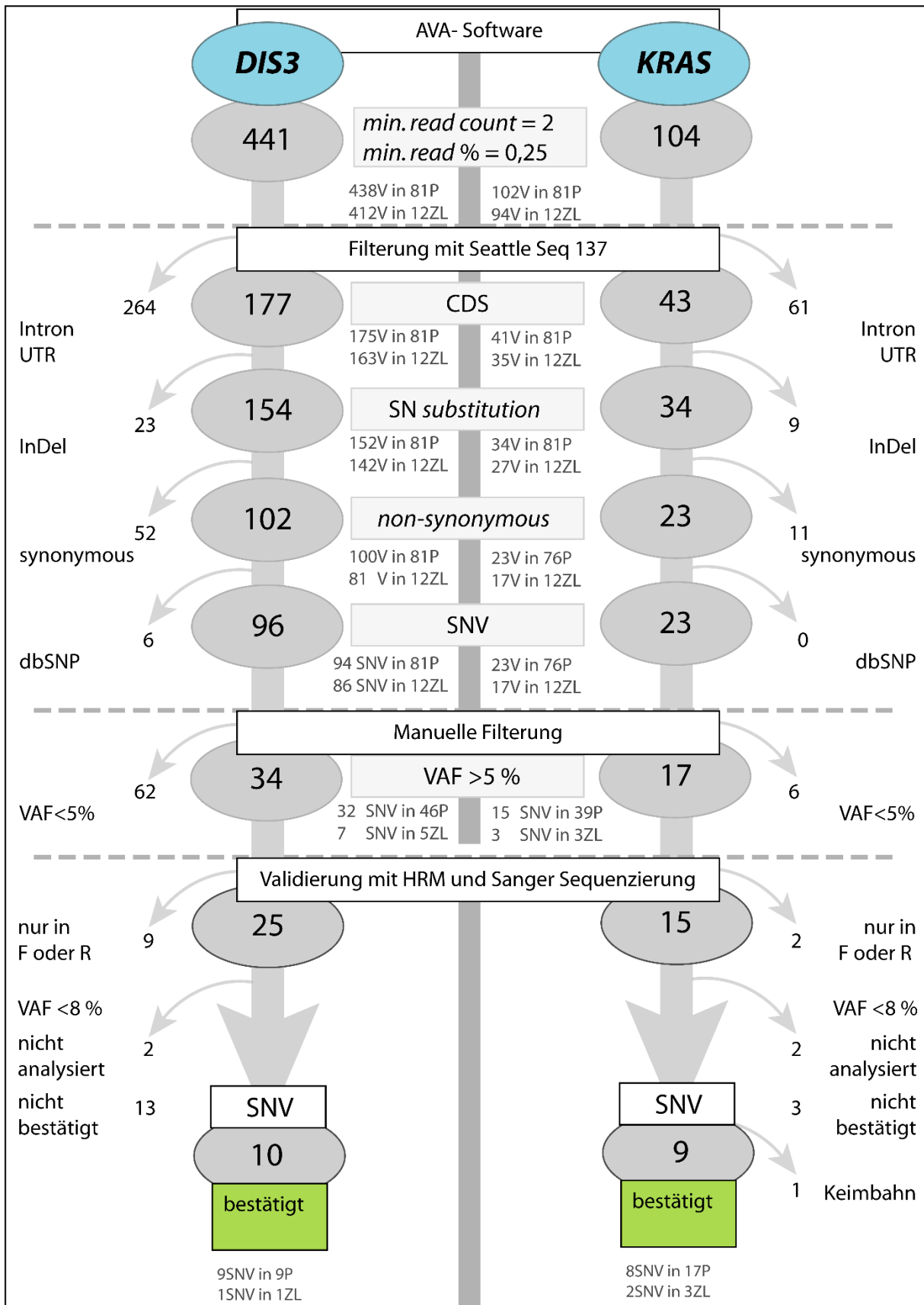


Abbildung 10: Analyse, Filterung und Validierung

Schematische Darstellung der einzelnen Analyse-, Filter- und Validierungsschritte für das *DIS3* (links) (leicht modifiziert nach Weißbach *et al.* [85]) und das *KRAS* (rechts) Amplicon-Datenset. Die Zahlen in den Ellipsen geben die Anzahl an Varianten an, welche den Filterkriterien entsprechen. Die Zahlen an den Pfeilen entsprechen den Varianten, welche von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden.

Validierung

Die generierten und gefilterten Amplikon-Daten für die MM-ZL AMO1, U266, MM1.S, JLN3, L363 und OPM2 wurden mit deren zuvor erstellten WES-Daten abgeglichen (Tabelle 38). Für beide NGS-Techniken, Roche 454 GS Junior (GS RJ) und Gallx Illumina (GAllx), konnten bei der verwendeten Analyse- und Filterstrategie für AMO1 und MM1.S die gleichen Mutationen in *KRAS* und für OPM2 die gleiche Mutation in *DIS3* [85] erkannt werden. Die beiden Techniken wiesen für diese sechs ZL und diese Gene keine Unterschiede im *variant-calling* auf und erwiesen sich somit als stabil.

Tabelle 38: Vergleich der Amplikon- und WES-Daten (leicht modifiziert nach Weißbach *et al.* [85])

ZL Technik	AMO1		U266		MM1.S		JLN3		L363		OPM2	
	GAllx	GS RJ	GAllx	GS RJ	GAllx	GS RJ	GAllx	GS RJ	GAllx	GS RJ	GAllx	GS RJ
<i>KRAS</i> hg19 chr12	25378562 (T)	-	-	-	25398284 (G)	-	-	-	-	-	-	-
<i>DIS3</i> hg19 chr13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	73355008 (G)

Durch den Filterungsansatz der Amplikon-Daten ergaben sich 25 tumorassoziierte SNVs in *DIS3* und 15 tumorassoziierte SNVs in *KRAS*, welche im nächsten Schritt mit HRM oder Sanger-Sequenzierung in den Tumor- und Normalproben der betroffenen Patienten überprüft wurden.

Zuvor wurde die Sensitivität von HRM und Sanger-Sequenzierung mit der Überprüfung der Mutation an Position chr13: 73355008 T>G in *DIS3* ermittelt und verglichen (Abbildung 11). Die ZL OPM2 besitzt an dieser Position eine homozygote SNV. Daher konnten durch ein OPM2/AMO1 DNA-Gemisch verschiedene VAF nachgestellt werden. Die Analyse der HRM-Daten zeigte, dass die reine OPM2 DNA der WT-Gruppe AMO1 zugeordnet wurde (blaue Linie), da zwischen homozygoten Varianten mit dieser Software schlecht zwischen dem WT und der Variante differenziert werden kann. Daher sollte die DNA mit einer homozygoten Variante immer mit WT-DNA vermischt werden, um eine heterozygote Variante zu erzeugen. Jedoch zeigte die Analyse, dass das Gemisch erst ab einem mutierten Anteil von 5 % der *variant*-Gruppe zugeordnet wurde, welches einer VAF von 5 % entspricht. Die farbigen Peak-Diagramme zur Auswertung der Sanger-Sequenzierung zeigten erst ein eindeutiges Signal über dem Hintergrundrauschen für die Mutation ab einem mutierten Anteil von 10 - 25 %, welches einer VAF von 10 - 25 % entspricht. [85]

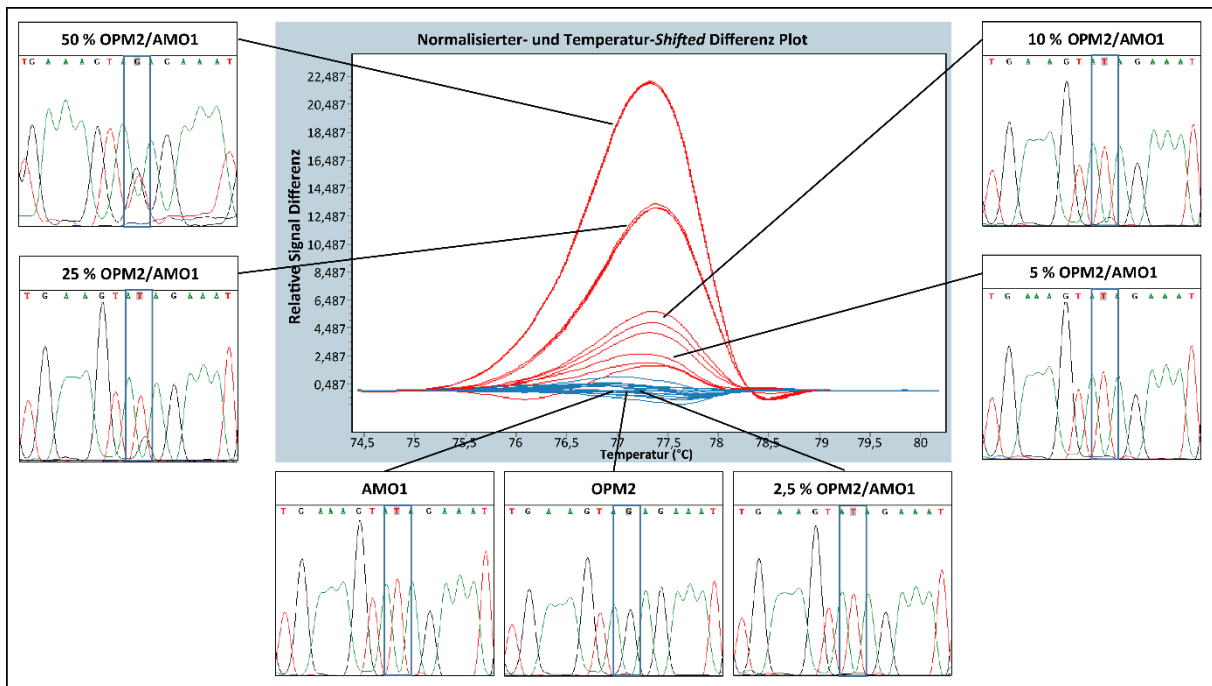


Abbildung 11: Sensitivität von HRM und Sanger-Sequenzierung (Weißbach et al. [85])

Bestimmung der Sensitivität von HRM und Sanger-Sequenzierung durch VAFs von 0 – 50 %. Die mittlere Abbildung stellt das Ergebnis der HRM bei einer Sensitivität von 0,6 dar. Rote Linie entspricht der Zuordnung zu *variant* und blaue Linie zu *common*. Die Peak-Diagramme der Sanger-Sequenzierung sind entsprechend zugeordnet. Die untersuchte SNV Chr 13: 73355008 G>T ist in den Peak-Diagrammen blau umrandet.

Daraus ableitend wurde zur Überprüfung der detektierten SNVs die Sanger-Sequenzierung für VAF >20 % und die HRM für VAF >5 % angewendet. Alle SNVs, die in mehr als 8 % der Lesesequenzen vorkamen, konnten über HRM und Sanger-Sequenzierung bestätigt werden, während SNVs mit VAF <8 % nicht bestätigt werden konnten. Durch den Abgleich zwischen Tumor- und Normalprobe wurden in diesem Ansatz nur somatische SNVs für weitere Charakterisierungen verwendet. Bezug nehmend auf die zuvor bestimmte 5 % Detektionsgrenze der HRM und der bekannten Frequenz von *DIS3*- und *KRAS*-Mutationen im MM [37-39, 42], wurde der Fokus auf die zehn bestätigten somatischen SNVs (neun in neun Patienten, eine in einer ZL) in *DIS3* [85] und neun bestätigten somatischen SNVs (acht in 17 Patienten, zwei in drei ZL) in *KRAS* gelegt (Abbildung 10) (Tabelle 39).

Tabelle 39: Bestätigte somatische *non-synonymous* SNVs in *DIS3* und *KRAS* (leicht modifiziert nach Weißbach et al. [85])

Probe	Gen	Chr	Exon	Position (hg19)	Abdeckung	VAF F %	VAF R %	SNV	AS	Transkript
P48	<i>KRAS</i>	12	2	25398285	64	9,1	29,0	C>A	p.G12C	NM_004985.3
P29	<i>KRAS</i>	12	2	25398284	155	37,5	30,1	A>C	p.G12V	NM_004985.3
P42	<i>KRAS</i>	12	2	25398284	113	31,6	48,2	A>C	p.G12V	NM_004985.3
P10	<i>KRAS</i>	12	2	25398284	168	16,3	18,4	C>G	p.G12A	NM_004985.3
RPMI8226	<i>KRAS</i>	12	2	25398284	95	70,8	61,7	C>G	p.G12A	NM_004985.3
MM1.S	<i>KRAS</i>	12	2	25398284	126	36,8	53,6	C>G	p.G12A	NM_004985.3
P59	<i>KRAS</i>	12	3	25380276	103	94,4	91,8	C>T	p.Q61R	NM_004985.3
P76	<i>KRAS</i>	12	3	25380275	79	51,9	22,2	T>A	p.Q61H	NM_004985.3
P81	<i>KRAS</i>	12	3	25380275	95	46,2	44,2	T>A	p.Q61H	NM_004985.3
P11	<i>KRAS</i>	12	3	25380275	93	21,4	24,3	T>G	p.Q61H	NM_004985.3

Probe	Gen	Chr	Exon	Position (hg19)	Abdeckung	VAF F %	VAF R %	SNV	AS	Transkript
P69	KRAS	12	3	25380275	119	19,1	25,5	T>G	p.Q61H	NM_004985.3
P68	KRAS	12	3	25380275	129	31,2	30,8	T>G	p.Q61H	NM_004985.3
P51	KRAS	12	3	25380275	103	54,0	59,3	T>G	p.Q61H	NM_004985.3
P13	KRAS	12	3	25380275	117	39,1	54,2	T>G	p.Q61H	NM_004985.3
P9	KRAS	12	3	25380275	103	15,4	18,4	T>G	p.Q61H	NM_004985.3
P32	KRAS	12	3	25380268	94	14,3	11,1	A>C	p.Y64D	NM_004985.3
P62	KRAS	12	3	25380268	119	4,2	8,3	A>C	p.Y64D	NM_004985.3
P79	KRAS	12	3	25380268	118	41,9	25,0	A>C	p.Y64D	NM_004985.3
AMO1	KRAS	12	4	25378562	239	47,0	44,9	C>T	p.A146T	NM_004985.3
P30	KRAS	12	4	25378561	104	50,0	46,0	G>A	p.A146V	NM_004985.3
OPM2	DIS3	13	3	73355008	158	100,0	100,0	T>G	p.Y121S	NM_014953.3
P1	DIS3	13	4	73352513	128	30,2	37,3	G>A	p.T131I	NM_014953.3
P1	DIS3	13	4	73352492	128	30,2	38,7	C>T	p.G138E	NM_014953.3
P2	DIS3	13	9	73347826	139	91,5	82,5	G>A	p.P412L	NM_014953.3
P3	DIS3	13	10	73346965	127	24,4	12,2	T>C	p.R418G	NM_014953.3
P4	DIS3	13	11	73346338	118	10,7	8,1	C>T	p.D488N	NM_014953.3
P5	DIS3	13	17	73337723	66	93,9	87,9	C>T	p.E665K	NM_014953.3
P6	DIS3	13	17	73337723	66	11,1	11,1	C>T	p.E665K	NM_014953.3
P7	DIS3	13	18	73336064	141	33,8	40,0	C>T	p.R780K	NM_014953.3
P8	DIS3	13	19	73335945	150	96,3	97,9	C>G	p.D784H	NM_014953.3
P9	DIS3	13	21	73334675	167	10,9	8,0	C>A	p.E929stop	NM_014953.3

7.2.2. Detektion neuer Mutationen und drei *hot spot*-Mutationen in *DIS3*

Der Amplikon-Sequenzierungsansatz der DSMM-XI-Studie ergab, dass neun von 81 MM-Patienten (~11 %) eine somatische, *non-synonymous* SNV in *DIS3* zum Zeitpunkt der Diagnose aufwiesen. Die Charakterisierung der SNVs mit den in SeattleSeq 137 implementierten, bioinformatischen Prädiktoren ergab, dass die Werte für GERP, PhastCons und PolyPhen für all diese SNVs >80 % waren und somit auf eine funktionelle Relevanz der SNVs in der Proteinfunktion deuteten (Abbildung 12). Durch einen Abgleich der als funktionell bedeutend eingestuften SNVs mit Informationen zu den funktionell verschiedenen Domänen konnte die Verteilung der SNVs über das Protein und deren funktionelle Wichtung durch die Domänen hergeleitet werden. Die enzymatisch aktive RNB- und PIN-Domäne sowie zwei der drei *oligo nucleotide binding* (OB)-Domänen von *DIS3*, CSD2 und S1 waren von SNVs betroffen [103, 104]. Die PIN-Domäne enthielt drei SNVs, eine publizierte homozygote SNV (p.Y121S) in der ZL OPM2 sowie zwei SNVs (p.T131I, p.G138N) in P1, welche auf derselben Lesesequenz detektiert wurden. Zwei SNVs (p.P412L, p.R418G) wurden in der CSD2 und eine SNV (p.E929stop) in S1 angehäuft. Der Großteil (~56 %) der tumorrelevanten SNVs (p.D488N, p.E665K, p.R780K, p.D784H) betraf fünf Patienten und befand sich in der RNB-Domäne, wobei zwei Patienten (P5, P6) von der gleichen SNV (p.E665K) betroffen waren. [85]

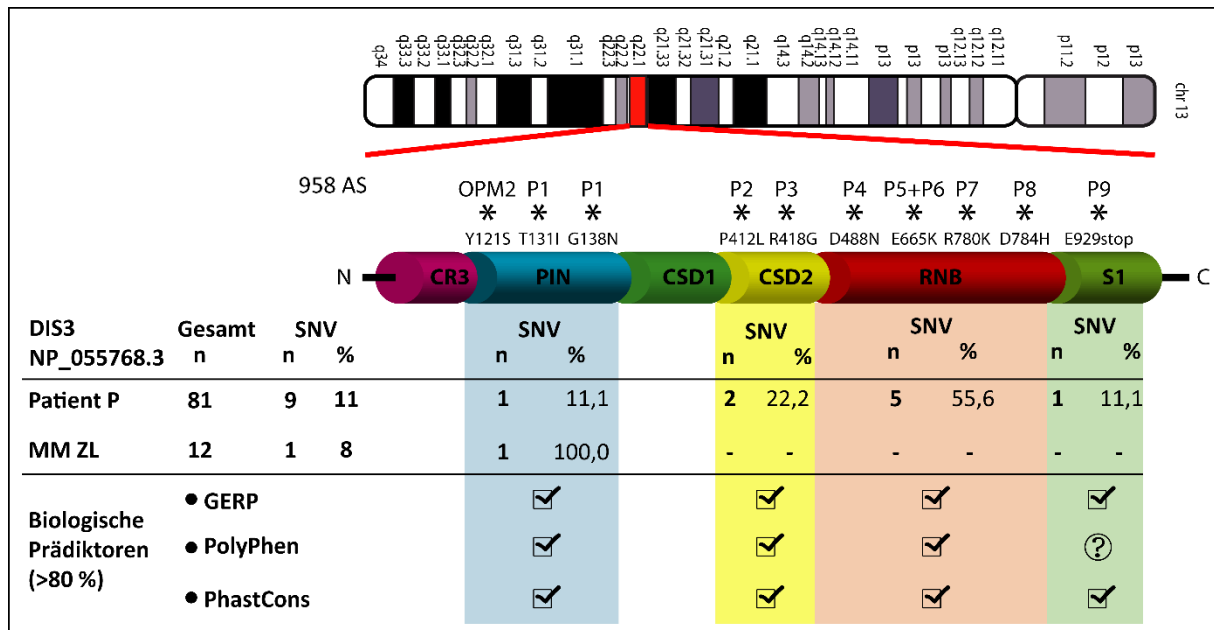


Abbildung 12: Verteilung der SNVs über die Domänen von DIS3 [85]

Verteilung und Häufigkeit der SNVs in DIS3. DIS3 liegt auf Chr 13q22.1 und besteht aus sechs bekannten Domänen CR3, PIN, CSD1, CSD2, S1, und RNB. Sterne entsprechen detektierten SNVs in den jeweiligen MM-Patienten oder MM-ZL. Die Häufigkeit der detektierten SNVs in MM-ZL und -Patienten ist angegeben sowie die funktionelle Bedeutung durch GERP (-12,3 – 6,17), PolyPhen (0 – 1) und PhastCons (0 – 1).

Der Abgleich der Amplikon-Daten für *DIS3* mit anderen veröffentlichten und re-analysierten NGS-Studien am MM ergab eine Übereinstimmung der Frequenz an *DIS3* mutierten MM-Patienten von ~11 % (Abbildung 13) [37, 38, 83]. Außerdem konnten durch den Abgleich nicht zuvor beschriebene Mutationen in der PIN-Domäne (p.T131I, p.G128N), in der CSD2-Domäne (p.P412L, p.R418G), in der S1-Domäne (p.E929stop) und in der RNB-Domäne (p.E665K, p.D784H) als neue SNVs identifiziert werden. Überdies wurden drei wiederkehrende *hot spot*-Mutationen an den Positionen p.D488, p.E665 und p.R780 in der mehrfach betroffenen RNB-Domäne von *DIS3* entdeckt, wobei Aminosäure (AS) p.R780 mit sechs MM-Patienten am häufigsten mutiert war. Ein Patient (P7) des Amplikon-Datensets war von der SNV R780K und fünf Patienten, publiziert von Walker *et al.* [39], Lohr *et al.* [38] und Chapman *et al.* [37], waren von den SNVs p.R780K, p.R780G und p.R780T betroffen [37-39]. Ein anderer Patient (P4) des Amplikon-Datensets war von der SNV p.D488N und zwei Patienten, publiziert von Lohr *et al.* [38], waren von p.D488H und p.D488N betroffen. Die meisten Patienten wiesen eine SNV in der RNB- und PIN-Domäne auf. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen bp-Längen der für die Domänen kodierenden Sequenzen sind 2,8 % der Positionen in den OB-Domänen (CSD1, CSD2, S1) und 2,5 % der Positionen in der enzymatisch aktiven RNB- und PIN-Domänen mutiert. [85]

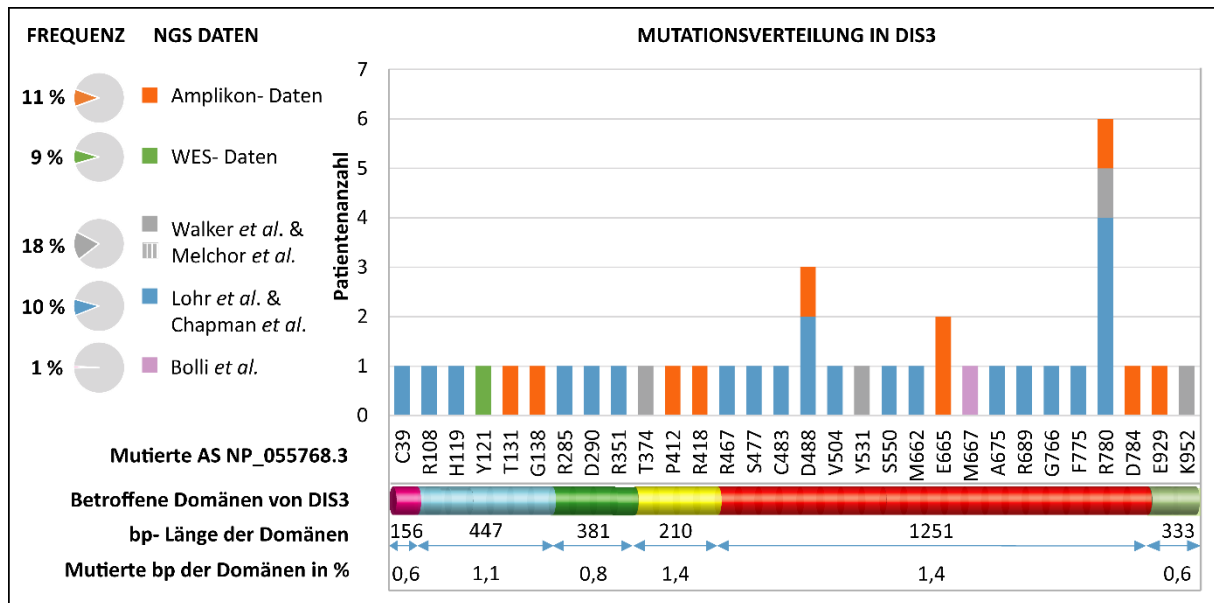


Abbildung 13: Abgleich der Amplikon-Daten von DIS3 mit anderen NGS-Studien [85]

Häufigkeit von SNVs in den Domänen von DIS3 durch Einbezug von Informationen aus der Literatur. Detektierte somatische *non-synonymous* SNVs in Patient und MM-ZL des vorliegenden Datensets (orange) (Weißbach *et al.* [85]) zusammen mit WES-Daten der sechs MM-ZL und fünf MM-Patienten (grün) (Leich *et al.* [83]) und anderen Gruppen (Melchor *et al.* [97], Walker *et al.* [39] (grau); Chapman *et al.* [37], Lohr *et al.* [38] (blau); Bolli *et al.* [42] (rosa)) wurden zusammengefasst und der zugehörigen Domäne zugeordnet. DIS3 besteht aus sechs bekannten Domänen. Die N-terminalen CR3 (pink)- und endonukleotiven PIN (blau)-Domänen, die OB-Domänen CSD1 (grün)-, CSD2 (gelb) und S1 (hellgrün) sowie die exonukleotiv RNB (rot)-Domäne.

Ein Abgleich von der *DIS3* Sequenz von *Homo sapiens* (Hs) mit den Organismen *Mus musculus* (Mm), *Danio rerio* (Dr), *Drosophila melanogaster* (Dm) und *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) durch ClustalX ergab, dass nicht die vollständige Sequenz von *DIS3* (Tabelle 40), sondern nur verschiedene Regionen, wie die PIN- und RNB-Domänen, über die verschiedenen Entitäten konserviert sind (S_Tabelle 9). Alle drei *hot spot*-Mutationen der Positionen p.D488, p.E665 und p.R780 sowie die SNVs an Position p.T131, p.P412 und p.D784 liegen in vollständig konservierten Regionen (S_Tabelle 9). [85]

Tabelle 40: Konservierung von DIS3 über verschiedene Organismen in %

DIS3	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Hs_NP_055768.3	100				
Mm_NP_082591.2	91	100			
Dr_XP_001336850.2	75	74	100		
Dm_NP_651246.2	57	56	57	100	
Sc_NP_014621.1	45	44	45	44	100

Darüber hinaus wurde durch PsiPred herausgefunden, dass die Proteinsequenz, welche alle detektierten SNVs des Amplikon-Sequenzierungsansatzes enthält, Veränderungen in der Sekundärstruktur, wie α -Helix und β -Faltblatt, in dem Protein aufweist (S_Tabelle 10). Zusammenfassend konnten neun tumorrelevante SNVs in *DIS3* detektiert werden, von welchen sieben zuvor nicht beschrieben wurden. Für alle SNVs wurde eine biologische Relevanz durch die biologischen Prädiktoren vorhergesagt, und drei Mutationen konnten als wiederkehrende *hot spot*-Mutationen bezeichnet werden. [85]

7.2.3. Bestätigung der Mutationsverteilung über KRAS

17 von 81 MM-Patienten (~21 %) der DSMM-XI-Studie wiesen eine somatische SNV in *KRAS* zum Zeitpunkt der Diagnose auf (Abbildung 14), welches den Angaben aus der Literatur entspricht (Abbildung 15) [37, 38, 42, 83]. Der Abgleich der SNVs mit Gen und Protein-Informationen von *KRAS* ergab, dass nur die Exons 2, 3 und 4 in dieser Studie von SNVs betroffen waren und keine unbekanntes Mutationen detektiert werden konnten [38]. Vor allem zeigte sich eine Anhäufung der SNVs an den AS-Positionen p.G12, p.Q61, p.Y64 und p.A146 mit unterschiedlichen AS-Austauschen. In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen waren die AS p.G12 (~24 %, vier Patienten und zwei MM-ZL) und die AS p.Q61 (~53 %, neun Patienten) am häufigsten betroffen [38, 42, 44]. Acht von neun Patienten enthielten einen p.Q61H Austausch. Jeder *KRAS*-mutierte Patient wies nur eine SNV in *KRAS* auf. Die SNVs betrafen wichtige Bindungsstellen bezüglich GDP/GTP-Austausch, GEF- und GDI-Interaktion in der *switch*-Region und G-Box, wobei am häufigsten die *switch*-Region durch die SNVs an Position p.Q61 und p.Y64 beeinflusst wurde. Die GTP-Bindungsstelle wurde durch die SNVs an Position p.G12 und p.A146 betroffen. Die Bedeutung der SNVs für die verschiedenen Bereiche und damit der Funktion von *KRAS* wurde durch die funktionelle Vorhersage mit den bioinformatischen Prädiktoren GERP, PhastCons und PolyPhen unterstützt. Alle SNVs an Position p.G12, p.Y64 und p.A146 wiesen für diese Prädiktoren *scores* >80 % auf. Die detektierten SNVs an Position p.Q61 besaßen nur für GERP und PhastCons *scores* >80 %. Die SNVs in *KRAS* der MM-ZL AMO1 und MM1.S sind durch den WES-Ansatz bekannt und die SNV in der MM-ZL RPMI8226 ist in COSMIC gelistet.

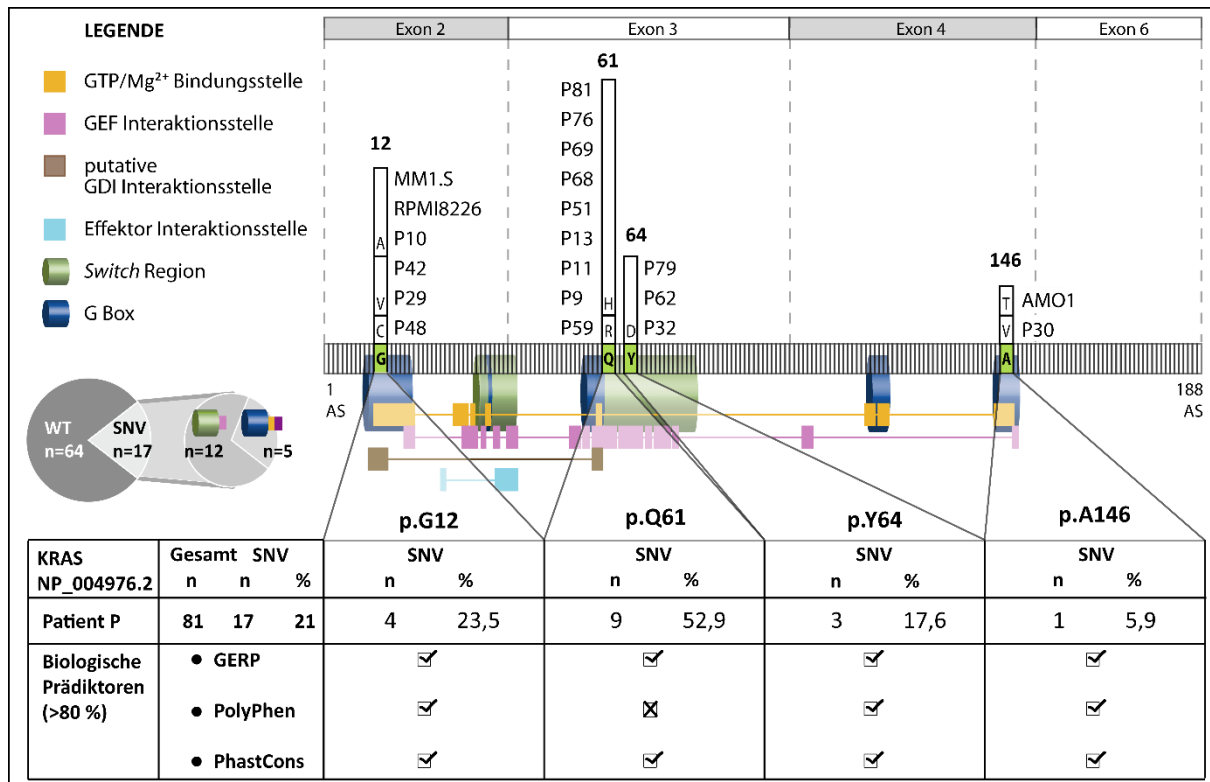


Abbildung 14: Verteilung und Häufigkeit der SNVs über die Domänen von KRAS

Über die AS-Sequenz (188 AS) von KRAS (NP_004976.2) sind die detektierten somatischen *non-synonymous* SNVs der Patienten der jeweiligen AS, dem AS-Austausch sowie dem Exon zugeordnet. Zusätzliche Informationen über die betroffene Domäne, die Häufigkeit der detektierten SNVs in MM-ZL und MM-Patienten sowie die funktionelle Bedeutung durch GERP (-12,3 – 6,17), PolyPhen (0 – 1) und PhastCons (0 – 1) ist angegeben.

Mit ClustalX konnte festgestellt werden, dass die komplette AS-Sequenz für KRAS über die Eukaryonten *Homo sapiens* (Hs), *Mus musculus* (Mm), *Danio rerio* (Dr), *Gallus gallus* (Gg) und *Rattus norvegicus* (Rn) stark konserviert ist (Tabelle 41). Alle detektierten SNVs lagen in einer konservierten Region und könnten somit essentiell für die Funktion von KRAS sein. Mit PsiPred konnten keine wesentlichen Veränderungen der Sekundärstruktur von KRAS durch die identifizierten SNVs festgestellt werden (Daten nicht dargestellt).

Tabelle 41: Konservierung von KRAS über verschieden Entitäten in %

KRAS	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Hs_NP_004976.2	100				
Mm_NP_067259.4	97	100			
Dr_NP_001003744.1	96	95	100		
Gg_NP_001243091.1	99	97	96	100	
Rn_NP_113703.1	97	99	95	97	100

Die Verteilung der SNVs über *KRAS* im MM wurde durch den Abgleich mit anderen publizierten MM-NGS-Studien überprüft (Abbildung 15).

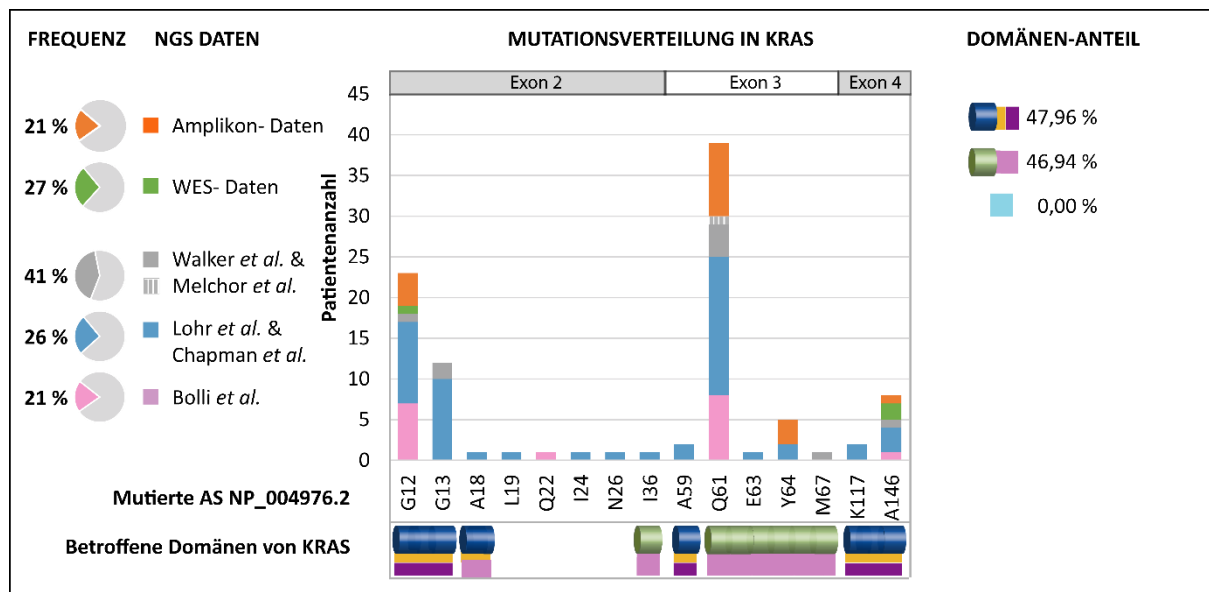


Abbildung 15: Abgleich der Amplikon-Daten von KRAS mit anderen NGS-Studien

Häufigkeit von SNVs in den Domänen von *KRAS* durch Einbezug von Informationen aus der Literatur. Detektierte somatische *non-synonymous* SNVs in Patient und MM-ZL des vorliegenden Datensets (orange) zusammen mit publizierten WES-Daten der sechs MM-ZL und fünf MM-Patienten (grün) und anderen Gruppen (Melchor *et al.* [97], Walker *et al.* [39] (grau); Chapman *et al.* [37], Lohr *et al.* [38] (blau); Bolli *et al.* [42] (rosa)) wurden zusammengefasst und der zugehörigen Domäne zugeordnet. *KRAS* besitzt eine GEF (pink)-, putative GDI (braun)- und Effektor (blau)-Interaktionsseite sowie eine GTP/Mg²⁺-Bindungsstelle (gelb) in den *switch*-Regionen (grün) und G-Boxen (dunkelblau).

7.2.4. Das Vorkommen von *DIS3*- und *KRAS*-Mutationen in Haupt- und Nebenklon

Um einen Überblick zu erhalten, ob sich die detektierten SNVs in *DIS3* und *KRAS* zum Zeitpunkt der Diagnose eventuell in dem Haupt- oder Nebenklon des Tumors des betroffenen Patienten befanden, wurde die Tumor-Populationsrate (TPR) für die einzelnen SNVs für das Amplikon-Datenset berechnet (Abbildung 16). Aufgrund der CD138+ Aufreinigung der Tumorzellen wurde eine Tumorzellreinheit von 100 % angenommen [82]. Außerdem wurde angenommen, dass eine VAF = 100 % erreicht wird, wenn eine heterozygote Deletion des *DIS3/ KRAS*-Lokus (CN = 1) oder eine homozygote SNV in *DIS3/ KRAS* (CN = 2) vorlag. Eine VAF = 50 % wurde erwartet, wenn eine heterozygote SNV in *DIS3/ KRAS* (CN = 2) vorhanden war. Für diese vereinfachten Annahmen lag die Ein-Klon-Theorie zu Grunde.

Für vier von neun Patienten mit *DIS3*-Mutationen, konnte die *DIS3*-SNV im Hauptklon mit einer TPR von ~100 % festgestellt werden. Die TPR des *DIS3*-mutierten Tumors der restlichen fünf *DIS3* mutierten Patienten lag bei 10 - 37 %. Wie bereits erwähnt, lagen die beiden SNVs, welche in der PIN-Domäne von *DIS3* in Patient P1 detektiert wurden, auf derselben Lesesequenz. Dadurch wurde davon ausgegangen, dass diese beiden Mutationen im selben Nebenklon von Patient P1 vorkommen. Patient P7 enthielt keine Deletion des *DIS3*- und

Chr 13q14-Lokus und besaß die *DIS3*-SNV im Hauptklon. Patient P4 enthielt keine Deletion im *DIS3*-Lokus, jedoch war die benachbarte Region Chr 13q14 betroffen. Dieser Patient besaß die *DIS3*-SNV im Nebeklon. [85]

Für keinen der *KRAS*-mutierten Patienten konnte ein chromosomaler Zugewinn oder Verlust von *KRAS* beobachtet werden. Somit wurde für die Berechnung der Tumor-Populationsrate eine CN von zwei angenommen. Neun von 17 Patienten besaßen eine heterozygote *KRAS*-SNV im Hauptklon mit einer TPR von 62 – 100 %. Nur Patient P52 des Patientensets wies eine homozygote *KRAS*-SNV im Hauptklon auf. Die restlichen sieben Patienten hatten die *KRAS*-SNV im Nebeklon. Patient P9 des Datensets war von SNVs in *DIS3* (p.E292stop) und *KRAS* (p.Q61H) betroffen, welche beide eine niedrige TPR von 10 % und 36 % aufwiesen und somit im Nebeklon vorkamen. Zusammenfassend war mehr als die Hälfte der MM-Patienten mit *DIS3*-Mutationen durch *DIS3*-SNVs im Nebeklon [85] und ebenso mehr als die Hälfte der Patienten mit *KRAS*-Mutationen durch *KRAS*-SNVs im Hauptklon betroffen.

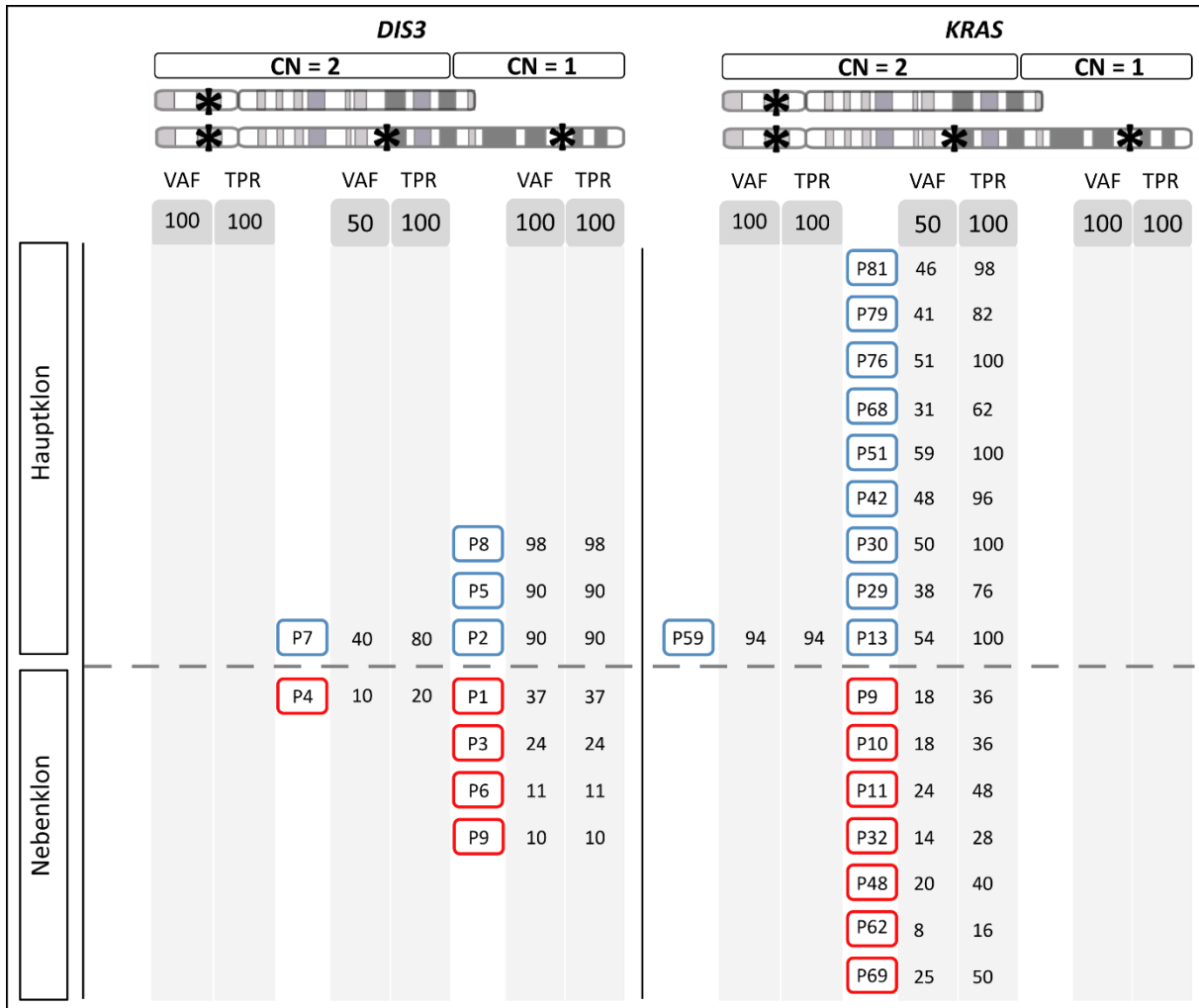


Abbildung 16: Vorkommen von DIS3- und KRAS-SNVs in Haupt- und Nebeklon des Tumors

Zuordnung der SNVs zu Haupt- und Nebeklon basierend auf den Informationen zu CN und VAF. SNP 6.0 Daten des Patientensets ergaben zwei möglichen CN Stadien (CN = 2; CN = 1) für DIS3 und KRAS. Schwarze Sterne geben mögliche SNVs an. Zugehörige VAF und TPR sind in % Angaben darunter angegeben. Eine VAF von ~100 % wird erwartet im Falle einer homozygoten SNV bei einem CN = 1 oder CN = 2. Im Falle einer heterozygoten SNV bei einem CN = 2 wird eine VAF von ~50 % erwartet. Ist die ermittelte TPR >50 %, wird die SNV dem Hauptklon des Tumors des Patienten (blauer Rahmen) zugeordnet. Die SNVs wurden dem Nebeklon des Tumors des Patienten (roter Rahmen) bei einer TPR <50 % zugeordnet. Leicht modifiziert nach Weißbach *et al.* [85].

7.2.5. Korrelation von *DIS3*- und *KRAS*-mutierten Fällen mit zytogenetischen Aberrationen

Das gesamte Patientenset der DSMM-XI-Studie wurde auf ausgewählte zytogenetische Alterationen durch FISH-Analysen untersucht (S_Tabelle 11). *IGH*-Translokationen kamen mit Häufigkeiten von 23 % t(11;14), 26 % t(4;14), 4 % t(14;16), 4 % t(8;14) und 0 % t(14;20) in dem Set vor. Es wurden weitere Veränderungen wie Deletionen von Chr 13q14 (53 %) und Chr 17p13 (20%) sowie auch Zugewinne von Chr 9q34 (46 %) und Chr 1q21 (34 %) identifiziert. Auf Grund des CN-Status von Chr 9q34 konnten ~54 % des Patientensets dem nicht-hyperdiploiden MM Sub-Typ (NHMM) zugeordnet werden.

Zunächst wurde der Fokus auf die Korrelation von *DIS3*-Mutationen mit den am häufigsten vorkommenden *IGH*-Translokationen t(11;14), t(4;14) und t(14;16) und der Deletion von Chr 13q14 gelegt, auf Grund des zuvor beschriebenen starken Zusammenhangs zwischen diesen Faktoren [37-39]. 58 Patienten wiesen eine oder mehrere dieser genetischen Alterationen, einschließlich *DIS3*-Mutationen, auf (Abbildung 17). 53 % (n = 43) der Patienten hatten eine der *IGH*-Translokationen und 53 % (n = 43) wiesen eine Chr 13q14-Deletion in ihrem Tumor auf. Von beiden Events zusammen waren 35 % der Patienten betroffen. Außerdem wurde eine starke Korrelation von *DIS3*-Mutationen mit den *IGH*-Translokationen t(11;14), t(4;14) und t(14;16) (7 von 9) sowie eine signifikante Assoziation von *DIS3*-Mutationen mit Chr 13q14-Deletionen (8 von 9) ($p = 0,032$, Fisher's-Exakt-Test) beobachtet (Tabelle 42). Diese Beobachtung stimmte mit anderen bereits publizierten Ergebnissen überein [37-39]. Das für die MM-ZL OPM2 beobachtete Auftreten von einer *copy neutral loss of heterozygosity* (CNLOH) in Kombination mit einer *DIS3*-Mutation konnte in der vorliegenden Patientenstudie nicht ermittelt werden [83]. Es konnte keine weitere Assoziation von *DIS3*-Mutationen mit den restlichen zytogenetischen Parametern gefunden werden. Des Weiteren wurde kein Zusammenhang zwischen Mutationen in *KRAS* und anderen zytogenetischen Alterationen entdeckt (Tabelle 42). Das von Lohr *et al.* [38] beobachtete gleichzeitige Vorkommen von *DIS3*- und *KRAS*-Mutationen in einem Klon, konnte in diesem Patientenset nur für einen Patienten beobachtet werden (Patient P9). Ansonsten traten *DIS3*- und *KRAS*-Mutationen einzeln in den Patienten auf und es konnte keine Assoziation zwischen diesen beiden Genen festgestellt werden ($p = 0,676$, Fisher's-Exakt-Test).

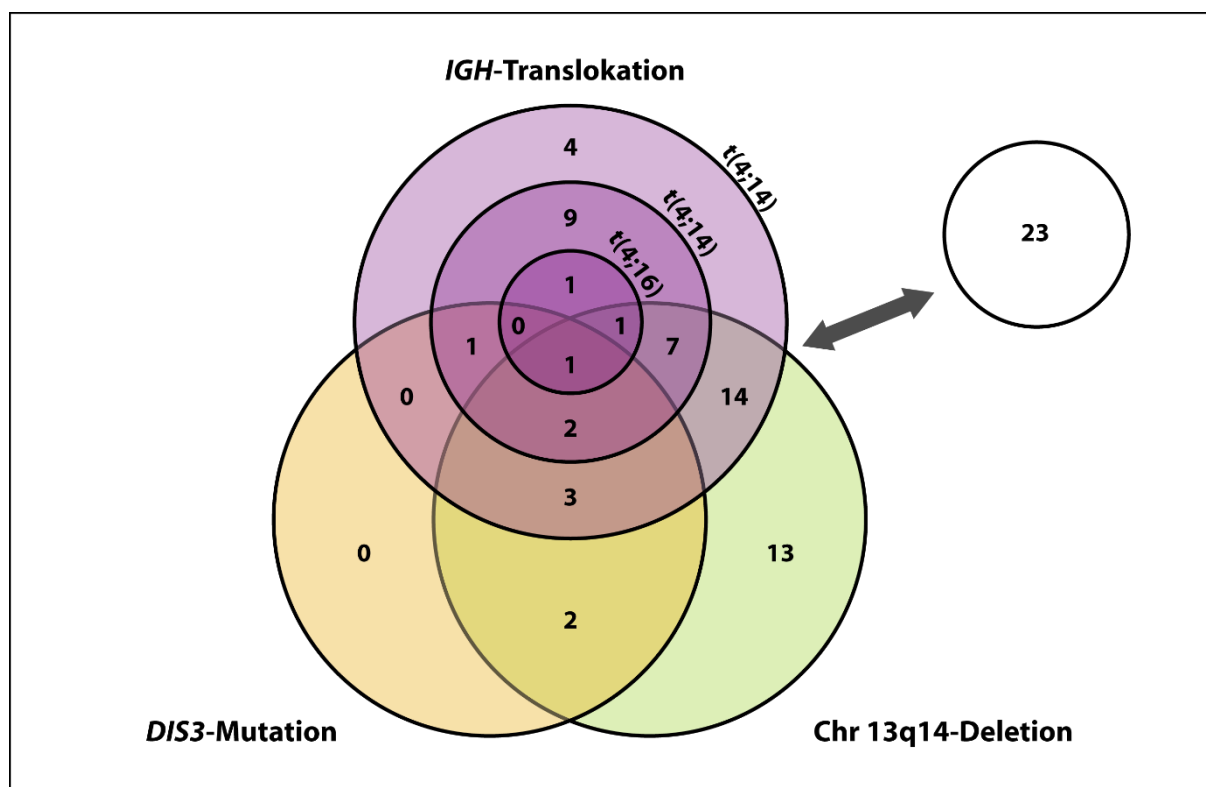


Abbildung 17: VENN-Diagramm (leicht modifiziert nach Weißbach *et al.* [85])

VENN – Diagramm über die Verteilung von häufig vorkommenden *IGH*-Translokationen t(4;14), t(11;14) und t(14;16) (lila), Chr 13q14-Deletionen (grün) und *DIS3*-Mutationen (gelb) in dem Patientenset. Nicht-betroffene Patienten sind in einem separaten Kreis (weiß) aufgelistet. Die Anzahl der betroffenen Patienten ist in den jeweiligen Feldern angegeben.

Tabelle 42: Zytogenetische Parameter bezügl. *DIS3*- und *KRAS*-Status (leicht modifiziert nach Weißbach *et al.* [85])

Zytogenetische Parameter	<i>DIS3</i> -SNV	<i>DIS3</i> -WT	p-Werte	<i>KRAS</i> -SNV	<i>KRAS</i> -WT	p-Werte
Chr 13q-Deletion; nein, ja	1; 8	37; 35	0,032	9; 8	29; 35	0,597
Chr 17p-Deletion; nein, ja	7; 2	58; 14	1,000	15; 2	50; 14	0,501
Chr 1q-Zugewinn; nein, ja	5; 4	48; 23	0,477	12; 5	41; 22	0,778
Chr 9q-Zugewinn; nein, ja	7; 2	37; 35	0,170	11; 6	33; 31	0,416
t(4;14); nein, ja	6; 3	54; 18	0,689	12; 5	48; 16	0,759
t(11;14); nein, ja	6; 3	56; 16	0,431	13; 4	49; 15	1,000
t(14;16); nein, ja	8; 1	69; 2	0,304	16; 1	61; 2	0,517
t(8;14); nein, ja	9; 0	67; 3	1,000	15; 2	61; 1	0,115
t(14;20); nein, ja	9; 0	70; 0	-	17; 0	62; 0	-

7.2.6. Einfluss zytogenetischer Alterationen auf den klinischen Verlauf

Um zu überprüfen, ob das Auftreten der SNVs oder das Vorkommen klassischer zytogenetischer Alterationen einen Einfluss auf das Überleben und die Therapieantwort in diesem Patientenset hatten, wurde der Einfluss von *DIS3*-Mutationen, *KRAS*-Mutationen, Deletionen von Chr 13q14 und Chr 17p13, Zugewinne von Chr 1q21 und Chr 9q34 sowie *IGH*-Translokationen auf das *overall survival* (OS), das *progression-free survival* (PFS), das *event-free survival* (EFS) und die Therapieantwort bestimmt (Tabelle 43, Tabelle 44, S_Tabelle 11).

Patienten mit einer *KRAS*-Mutation ($n = 17$) zeigten kein verringertes OS, EFS, PFS und keinen Unterschied hinsichtlich der Therapieantwort im Vergleich zu *KRAS*-WT Patienten. Im Gegensatz dazu zeigten Patienten mit einer *DIS3*-Mutation ($n = 9$) ein verringertes medianes OS (33 vs. 54 Monate; $p = 0,138$), aber keinen Effekt auf EFS, PFS und die Therapieantwort.

Die monovariaten Analysen zeigten, dass Patienten mit einer Chr 13q14-Deletion ($n = 43$) oder Chr 17p13-Deletion ($n = 16$) signifikant mit einem schlechteren OS ($p = 0,037$; $p = 0,015$) sowie mit einer schlechteren HD-Chemotherapieantwort ($p = 0,016$; $p = 0,040$) assoziiert waren. Ebenfalls waren Patienten mit einem Zugewinn von Chr 1q21 ($n = 27$) signifikant mit einem schlechteren OS und EFS assoziiert ($p = 0,050$; $p = 0,034$). Für t(4;14) ($n = 21$) und die anderen *IGH*-Translokationen sowie dem Zugewinn von Chr 9q34 ($n = 37$) wurde in dieser Studie kein Einfluss auf die klinischen Parameter festgestellt. Da in dem Patientenset jedoch ein Zusammenhang zwischen der Chr 13q14-Deletion und der Chr 17p13-Deletion ($p = 0,002$), dem Zugewinn von Chr 1q21 ($p = 0,010$) sowie der t(4;14) ($p = 0,005$) bestand, wurde in einem multivariaten Ansatz überprüft, ob der prognostische Wert der Chr 13q14-Deletion abhängig von den anderen Alterationen ist. Dabei stellte sich heraus, dass der Einfluss der Deletion von Chr 13q14 unabhängig vom gemeinsamen Auftreten mit dem Zugewinn von Chr 1q21 ($p = 0,050$) oder t(4;14) ($p = 0,045$), aber interessanterweise abhängig von dem gemeinsamen Auftreten mit einer Deletion von Chr 17p13 ($p = 0,149$) ist. [85]

Tabelle 43: OS, EFS, PFS hinsichtlich zytogenetischer Parameter (leicht modifiziert nach Weißbach *et al.* [85])

Zytogenetische Parameter	Gesamt (n)		Median OS (Monate)		P Log Rank Test	Median EFS (Monate)		P Log Rank Test	Median PFS (Monate)		P Log Rank Test
	Mut (%)	WT (%)	Mut (n)	WT (n)		Mut (n)	WT (n)		Mut (n)	WT (n)	
<i>KRAS</i>	17 (20,99)	64 (79,01)	49 (16)	54 (60)	0,839	35 (16)	32 (59)	0,609	33 (15)	34 (54)	0,795
<i>DIS3</i>	9 (11,11)	72 (88,88)	33 (9)	54 (67)	0,138	25 (9)	34 (66)	0,588	25 (8)	34 (61)	0,603
Chr 13q14-Deletion	43 (53,09)	38 (46,91)	49 (40)	61 (36)	0,037	32 (39)	35 (36)	0,862	32 (34)	36 (35)	0,586
Chr 17p13-Deletion	16 (19,75)	65 (80,25)	37 (16)	58 (60)	0,015	28 (16)	33 (59)	0,705	35 (14)	34 (55)	0,461
Chr 1q21-Zugewinn	27 (33,75)	53 (66,25)	53 (24)	54 (51)	0,050	23 (24)	37 (50)	0,062	25 (23)	40 (45)	0,034
Chr 9q34-Zugewinn	37 (45,68)	44 (54,32)	55 (34)	53 (42)	0,132	35 (34)	32 (41)	0,586	36 (32)	32 (37)	0,607
t(4;14)	21 (25,93)	60 (74,07)	55 (20)	51 (56)	0,564	33 (20)	33 (55)	0,965	33 (18)	34 (51)	0,912
t(11;14)	19 (23,46)	62 (76,54)	59 (18)	53 (58)	0,929	29 (18)	34 (57)	0,554	32 (16)	34 (53)	0,720
t(14;16)	3 (3,75)	77 (96,25)	32 (2)	54 (73)	0,014	21 (2)	34 (72)	0,064	21 (2)	35 (66)	0,030
t(8;14)	3 (3,80)	76 (96,20)	61 (3)	53 (71)	0,712	61 (3)	33 (70)	0,395	61 (3)	34 (65)	0,445
t(14;20)	0 (0,00)	79 (100,0)	0 (0)	54 (76)	-	0 (0)	33 (75)	-	0 (0)	34 (69)	-

Tabelle 44: Therapieantwort hinsichtlich zytogenetischer Parameter (leicht modifiziert nach Weißbach *et al.* [85])

Zytogenetische Parameter	Antwort auf Bortezomib						p chi	Antwort auf HD-Chemotherapie						p Fisher
	CR (n)		PR + VGPR (n)		SD + PD (n)			CR (n)		PR + VGPR (n)		SD + PD (n)		
	Mut	WT	Mut	WT	Mut	WT		Mut	WT	Mut	WT	Mut	WT	
<i>KRAS</i>	0	9	15	41	1	7	0,156	5	27	11	28	0	0	0,260
<i>DIS3</i>	0	9	8	48	1	7	0,481	5	27	4	35	0	0	0,722
Chr 13q14-Deletion	6	3	31	25	2	6	0,191	23	9	16	23	0	0	0,016
Chr 17p13-Deletion	1	8	12	44	2	6	0,735	3	29	12	27	0	0	0,040
Chr 1q21-Zugewinn	3	6	19	36	1	7	0,456	10	22	12	26	0	0	1,000
Chr 9q34-Zugewinn	3	6	26	30	4	4	0,733	12	20	19	20	0	0	0,471
t(4;14)	3	6	17	39	0	8	0,180	11	21	9	30	0	0	0,427
t(11;14)	3	6	10	46	3	5	0,307	7	25	8	31	0	0	1,000
t(14;16)	0	9	2	53	0	8	0,728	1	31	1	37	0	0	1,000
t(8;14)	0	9	2	52	0	8	0,723	1	31	1	36	0	0	1,000
t(14;20)	0	9	0	54	0	8	-	0	32	0	37	0	0	-

7.2.7. Einfluss von Haupt- und Nebenklonen auf den klinischen Verlauf

In Anbetracht der Erkenntnis, dass Nebenklone sich während des Krankheitsverlaufes zu Hauptklonen entwickeln können, welches unter dem Begriff ‚clonal tiding‘ zusammengefasst wird, wurden die Korrelationen zusätzlich auf dem Subklon-Level durchgeführt [105]. Dabei wurde der Hauptklon mit den Nebenklonen der Patienten mit *DIS3* (4 vs. 5)- bzw. *KRAS* (10 vs. 7)-Mutationen hinsichtlich zytogenetischer Alterationen, klinischem Verlauf und Therapieantwort verglichen (S_Tabelle 12).

In der Gruppe der Nebenklone von *DIS3* ($n = 5$) konnte eine leichte Akkumulation von Chr 17p13-Deletion sowie geringere mediane Überlebensdauern für OS, EFS und PFS festgestellt werden. Für die Hauptklone von *DIS3* ($n = 4$) wurde beobachtet, dass diese Patienten im Gegensatz zu der Gruppe mit den Nebenklonen sehr gut auf die HD-Chemotherapie ansprachen ($p = 0,048$, Fisher's-Exakt-Test). [85]

Patienten mit *KRAS*-SNVs in Haupt ($n = 10$)- oder Nebenklon ($n = 7$) wiesen keine Unterschiede in der Therapieantwort und zytogenetischen Events auf. Es wurde eine geringere mediane Überlebensdauer des OS in der Gruppe der Hauptklone beobachtet.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass eine SNV in *DIS3* im Nebenklon des Tumors eventuell mit einer schlechteren Therapieantwort sowie einer schlechteren Prognose assoziiert ist [85]. Außerdem scheint es für den Einfluss von *KRAS* auf den klinischen Verlauf und die Therapieantwort nicht essentiell von Bedeutung zu sein, ob die *KRAS*-SNV in Haupt- oder Nebenklon des Tumors ausgeprägt ist.

7.3. Funktionelle Untersuchung ausgewählter Mutationen in KRAS

In dem WES- und Amplikon-Sequenzierungsansatz wurden Mutationen in Exon 4 an AS-Position p.A146 in *KRAS* in der MM-ZL AMO1 (p.A146T) und auch in dem MM-Patienten P30 (p.A146V) detektiert und validiert. Im MM wurden Mutationen in Exon 4 von *KRAS* bisher nicht näher untersucht. Jedoch zeigten Untersuchungen im kolorektalen Karzinom, dass Mutationen in Exon 2 und Exon 4 von *KRAS* zu einer Aktivierung von KRAS führen und somit möglicherweise von funktioneller Bedeutung für die Tumorprogression sind [70]. Auf Grund dessen war es von großem Interesse, die funktionelle Bedeutung der *KRAS*-SNVs in Exon 4 (p.A146T und p.A146V) näher im MM durch *knockdown*- und Überexpressionsexperimente zu untersuchen. Als Kontrolle wurde die *KRAS*-SNV in Exon 2 mitgeführt.

7.3.1. Generierung von Entry- und Expressionsvektoren

Die cDNA der ZL AMO1 (p.A146T), MM1.S (p.G12A) sowie der Tumorproben der Patienten P30 (p.A146V) und P79 (p.Y64D) wurde mit Sanger-Sequenzierung überprüft und ergab, dass die in der genomischen DNA detektierten SNVs in den MM-ZL AMO1 (C>T) und MM1.S (C>G) sowie dem Patient P30 (G>A) auch in ihrer mRNA auftraten (Abbildung 18 A). In Patient P79 konnte die *KRAS*-SNV A>C (p.Y64D) nicht in der cDNA nachgewiesen werden und wurde somit als nicht tumorrelevant deklariert (Abbildung 18 B). Daher wurden die attB-KRAS-PCR-Produkte mit den SNVs p.A146T, p.A146V und p.G12A generiert. Es entstanden die attB-V5-KRAS (685 bp)- und attB-EmGFP-KRAS (1357 bp)-Konstrukte (Daten nicht dargestellt).

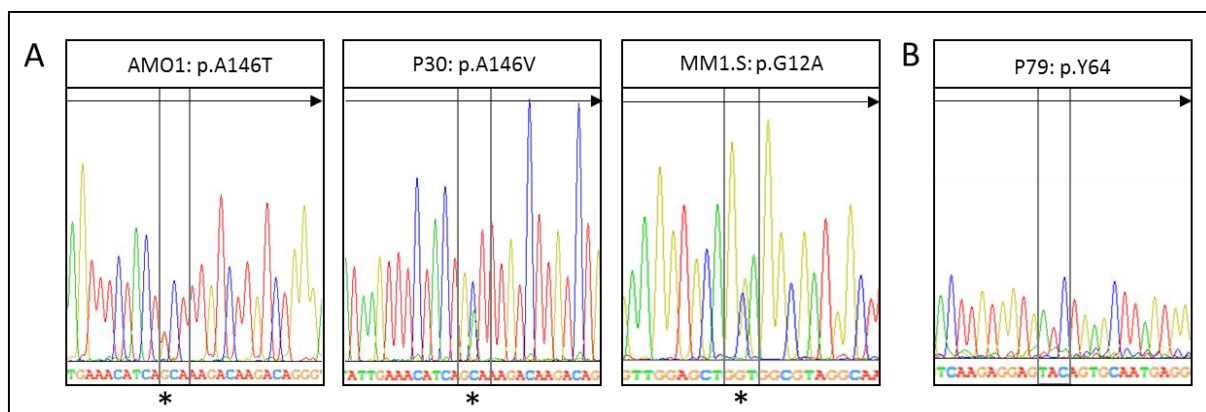


Abbildung 18: Sanger-Sequenzierung von *KRAS*-SNVs in cDNA

Peak-Diagramme von Sanger-Sequenzierungen. Die Pfeilrichtungen geben die Richtung der Lesesequenz der DNA für das jeweilige Protein an. Die betroffenen SNVs sind mit einem Stern markiert und das betroffene Triplet für die AS ist grau umrandet. A: AMO1 *KRAS*-SNV an Position Chr 12: 25378562 C>T; P30 *KRAS*-SNV an Position Chr 12: 25378561 G>A; MM1.S *KRAS*-SNV an Position Chr 12: 25398284 C>G. B: keine *KRAS*-SNV an Position Chr 13: 73355008 T>G.

Durch die BP-Rekombination des pDONR221-Vektors (4761 bp) mit den jeweiligen attB-Rekombinationsstellen der V5-KRAS-Konstrukte (685 bp) bzw. EmGFP-KRAS-Konstrukte (1357 bp) entstanden die Entry-Vektoren pDONR221-V5-KRAS (3170 bp) und pDONR221-EmGFP-KRAS (3842bp) (S_Abbildung 1). Die Überprüfung der Entry-Vektoren erfolgte über

den Restriktionsverdau mit PvuI-HF und EcoRI-HF, welcher zwei verschieden große Produkte erzeugte (Tabelle 45) (Daten nicht dargestellt).

Tabelle 45: Restriktionsverdau von pDONR221-KRAS-Konstrukten

Konstrukt	Position		Verdau
	PvuI-HF	EcoRI-HF	
pDONR221-V5-KRAS	1990	1140	850 bp + 2320 bp
pDONR221-EmGFP-KRAS	2662	1813	850 bp + 2992 bp

Durch die LR-Rekombination des pLenti6.3-Vektors (9387bp) mit dem jeweiligen pDONR221-V5-KRAS (3170bp)- bzw. pDONR221-EmGFP-KRAS (3842bp)-Vektor entstanden die Expressionsvektoren pLenti6.3-V5-KRAS (8358bp) und pLenti6.3-EmGFP-KRAS (9030bp) (S_Abbildung 2). Über einen Restriktionsverdau mit EcoRI-HF und MfeI-HF, mit der Entstehung von drei Produkten, wurden die Vektoren auf ihre Richtigkeit überprüft (Tabelle 46).

Tabelle 46: Restriktionsverdau der pLenti6.3-KRAS-Konstrukte

Konstrukt	Position		Verdau
	MfeI-HF	EcoRI-HF	
pLenti6.3-V5-KRAS	962	3063, 2552	6257 bp + 1590 bp + 511 bp
pLenti6.3-EmGFP-KRAS	962	3736, 2552	6257 bp + 1590 bp + 1183 bp

Die pLenti6.3-KRAS-Konstrukte, bestehend aus WT, p.G12A, p.A146T und p.A146V mit einem V5-Tag bzw. EmGFP-Tag, konnten erzeugt und über Restriktionsverdau (Abbildung 19) und Sanger-Sequenzierung validiert werden.

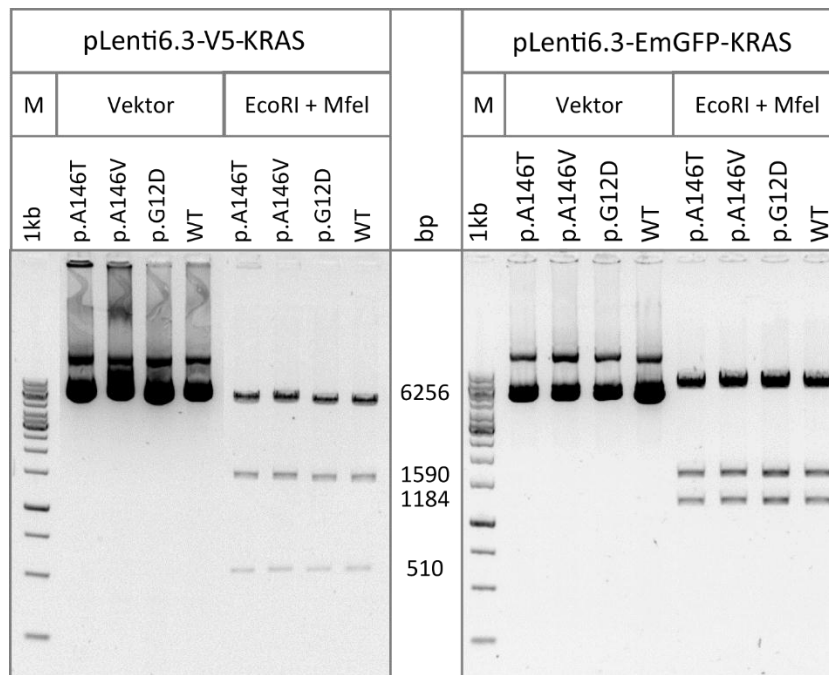


Abbildung 19: Restriktionsverdau der pLenti6.3-KRAS-Konstrukte

Die plenti6.3-V5-KRAS und -EmGFP-KRAS Plasmide wurden in OneShotStbl3 *E. coli* transformiert, aufgereinigt und mit EcoRI und MfeI verdaut. Die Produkte wurden auf einem 1,0 %-igen Agarosegel überprüft. Der Verdau ergab Banden mit den erwarteten Größen. Die Plasmide wurden für die weiteren Studien verwendet.

7.3.2. Funktionalität der pLenti6.3-KRAS-Konstrukte

Um die Funktionalität der generierten pLenti6.3-KRAS-Konstrukte zu überprüfen, wurden die Plasmide in HEK293FT transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurde für alle pLenti6.3-EmGFP-KRAS-Konstrukte sowie für die Positivkontrolle pLenti6.2 ein EmGFP-Signal in den HEK293FT-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert (Abbildung 20). Es wurde beobachtet, dass das EmGFP-Signal der Positivkontrolle gleichmäßig in der HEK293FT-Zelle verteilt war. Im Gegensatz dazu, fand für alle EmGFP-KRAS-Konstrukte unabhängig von der SNV eine Anreicherung des EmGFP-Signales an der Zellmembran statt.

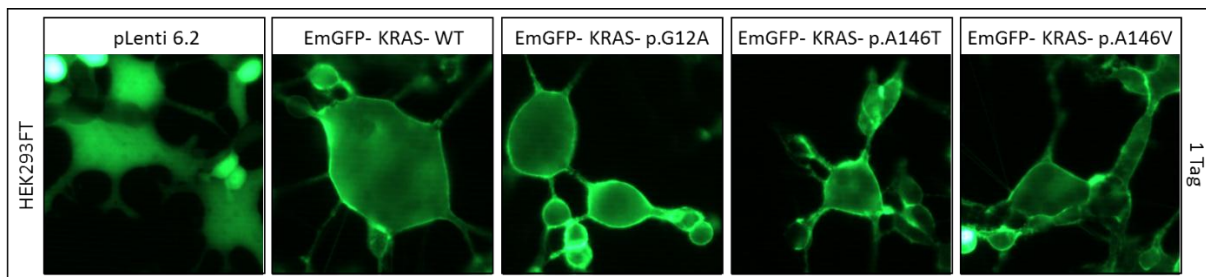


Abbildung 20: EmGFP-Signal in transfizierten HEK293FT-Zellen

HEK293FT-Zellen wurden über Lipofektion mit den angegebenen Vektoren transfiziert und nach einem Tag bei einer 40x Vergrößerung in einem Fluoreszenzmikroskop auf EmGFP-Expression hin untersucht.

Zwei Tage nach der Transfektion wurden die HEK293FT-Zellen geerntet und mit FACS- und Western Blot-Analysen überprüft. Für die HEK293FT-Zellen, welche mit pLenti6.3-EmGFP-KRAS transfiziert wurden, konnten über die FACS-Analyse gleichmäßige Transfektionseffizienzen von ~70 % für alle SNVs festgestellt werden (Abbildung 21). Die gemessenen FITC-Signale bewiesen die Funktionalität des angehängten EmGFP-Tags.

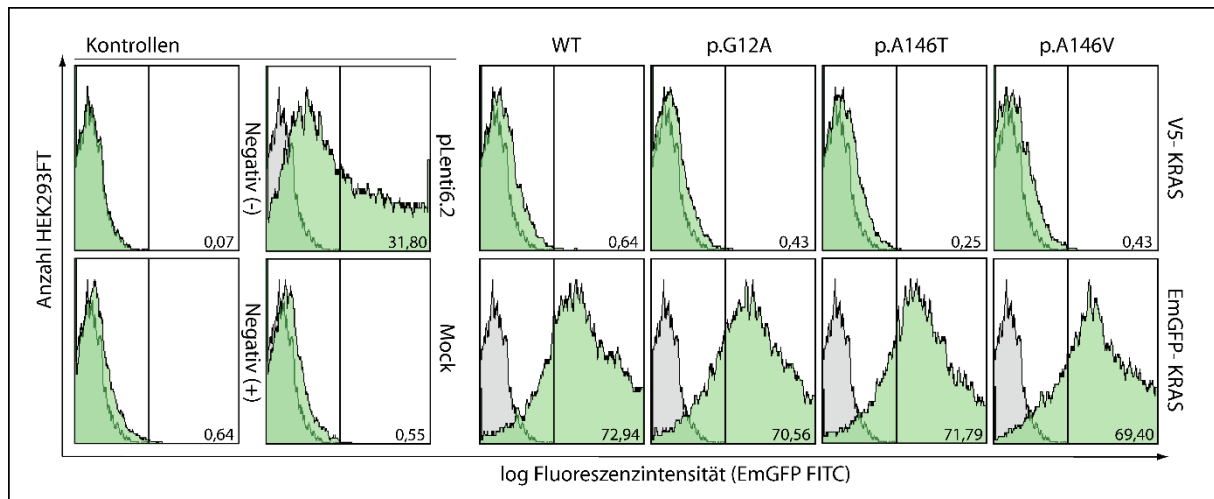


Abbildung 21: FACS-Analyse von transfizierten HEK293FT-Zellen

HEK293FT-Zellen wurden über Lipofektion mit den angegebenen pLenti6.3-V5-KRAS- und pLenti6.3-EmGFP-KRAS-Vektoren transfiziert und nach zwei Tagen auf EmGFP-Expression mit FACS untersucht. Es wurden die Kontrollen ohne Vektoren (Negativ (-)), aber mit Transfektionsreagenz (Negativ (+)) sowie der pLenti6.2 als EmGFP-Positivkontrolle und ein leerer pLenti6.3-Vektor als Mock-Kontrolle mitgeführt. Der Schwellenmarker (Schwarze Linie) wurde nah an der Negativkontroll-Population (-) gesetzt, so dass ein positiver Wert von 0,07 % als Background angezeigt wird. Alle Werte, die über diesen Schwellenwert hinausgehen, werden als EmGFP-Positiv betrachtet und in % angegeben.

Für die Fusionsproteine wurde eine atomare Masse von ~25 kDa für die V5-KRAS-Proteine und ~51 kDa für die EmGFP-KRAS-Proteine ermittelt, welche sich in den Western Blot-Analysen bestätigten (Abbildung 22). Die unterschiedlichen pLenti6.3-KRAS-Konstrukte zeigten eine gleichmäßige Expression der WT und mutierten Fusionsproteine auf. Interessanterweise konnte in der gesamten V5-Gruppe deutlich eine erhöhte Phosphorylierung von MEK1/2 und ERK1/2 gegenüber der Mock-Kontrolle festgestellt werden. Im Detail wiesen die KRAS-mutierten Fusionsproteine eine bis zu 8-fach und der KRAS-WT eine 4-fach höhere Phosphorylierung von MEK1/2 und ERK1/2 bei einer gleichmäßigen Proteinexpression auf. Jedoch wurden keine Veränderungen in der Phosphorylierung von PI3K, AKT, STAT, mTOR und dem Transkriptionsfaktor S6 festgestellt. Die EmGFP-Gruppe wies das gleiche Profil auf, jedoch mit geringeren Unterschieden in der Phosphorylierung von MEK1/2 und ERK1/2. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt und zeigten die gleichen Ergebnisse.

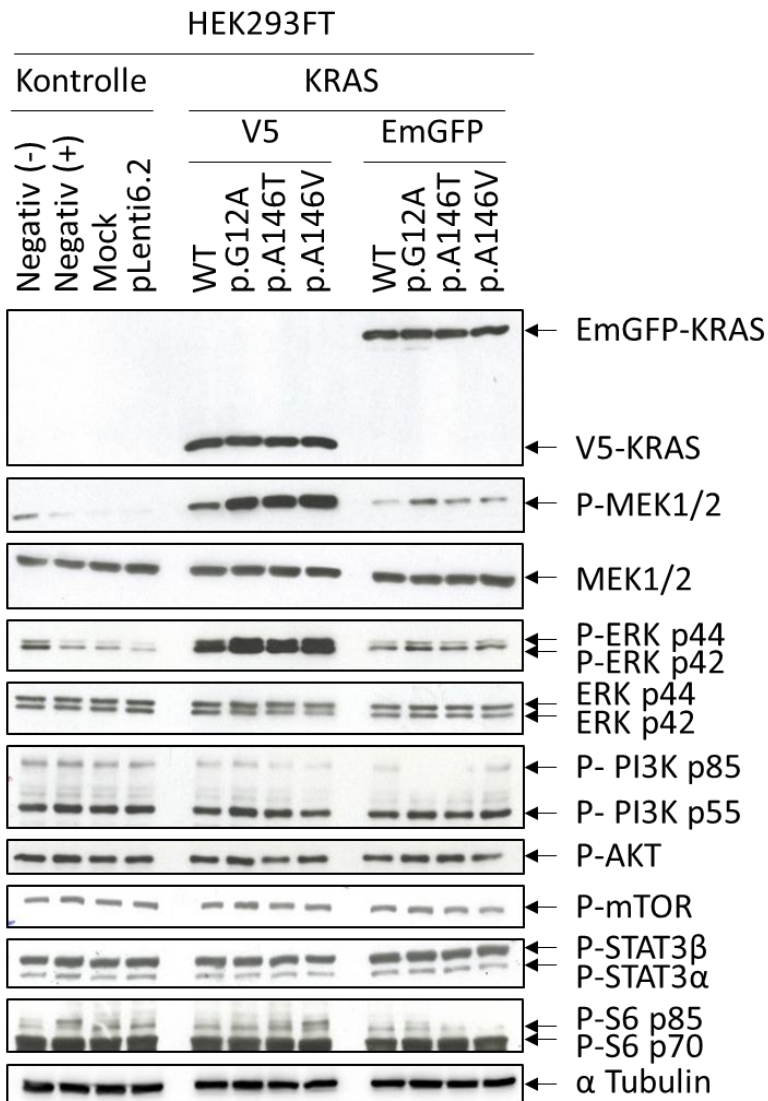


Abbildung 22: Western Blot-Analysen von transfizierten HEK293FT-Zellen

HEK293FT-Zellen wurden über Lipofektion mit den angegebenen pLenti6.3-V5-KRAS- und pLenti6.3-EmGFP-KRAS-Vektoren transfiziert und nach zwei Tagen mit Western Blot untersucht. Es wurden die Kontrollen ohne Vektoren (Negativ (-)), aber mit Transfektionsreagenz (Negativ (+)) sowie der pLenti6.2 als EmGFP-Positivkontrolle und ein leerer pLenti6.3-Vektor als Mock-Kontrolle mitgeführt. Gesamtzelllysate wurden angefertigt und auf einem SDS-PAGE mit Western Blot analysiert. Die angegebenen Erstantikörper wurden über Nacht bei 4 °C in der vorgegebenen Verdünnung angewendet. Die gleichmäßige Proteinladung wurde mit dem α Tubulin Antikörper kontrolliert.

7.3.3. Vorbereitung der Zelllinien für die lentivirale Transduktion

Die verschiedenen KRAS-Konstrukte wurden in MM-ZL eingebracht, welche keine oder wenige SNVs in den bekannten RTKs und *downstream*-Effektoren aufwiesen. Dafür wurden die WES-Daten der MM-ZL AMO1, U266, OPM2, MM1.S, JN3 und L363 auf *non-synonymous* SNVs überprüft (Tabelle 47). Der Screeningansatz ergab, dass in den MM-ZL AMO1 und L363 mehrere Gene des RTK-Signalweges mutiert waren. Die MM-ZL U266 und JN3 wiesen nur eine SNV und OPM2 keine SNV in den RTK assoziierten Genen auf. Die MM-ZL U266 enthielt eine SNV in *BRAF*, welches am Anfang der *downstream*-Signalkette steht. Daher wurden die

MM-ZL OPM2 und JN3 für die Analyse der funktionellen Bedeutung der verschiedenen *KRAS*-Mutationen auf die *downstream*-Effektoren ausgewählt. Außerdem wurde die DLBCL-ZL HLY-1 als Kontrolle mitgeführt.

Tabelle 47: Mutierte RTKs und *downstream*-Effektoren in MM-ZL

Gen	AMO1	U266	OPM2	MM1.S	JN3	L363
<i>EGFR</i>	×			×		
<i>IGF1R</i>						×
<i>ERBB3</i>	×					×
<i>NTRK1</i>				×		
<i>SHC4</i>	×					
<i>KRAS</i>	×			×		
<i>NRAS</i>						×
<i>ARAF</i>	×					
<i>BRAF</i>		×				
<i>RAF1</i>						×
<i>MAP2K2</i>	×					
<i>PIK3CA</i>						×
<i>STAT3</i>	×					
<i>MTOR</i>					×	

Laut Herstellerangaben sollte für jede dieser ausgewählten ZL die geringste Konzentration an Polybrene® ermittelt werden, welche keinen toxischen Effekt in der ZL zeigt, um eine Steigerung der Transduktionseffizienz herbeizuführen [106]. Die MM-ZL OPM2 wies jedoch in dem gesamten getesteten Konzentrationsbereich eine sichtbare Veränderung der Morphologie durch ein verstärktes Clustern der Zellen auf (Abbildung 23 A). Die FACS-Analysen deuteten auf eine Zunahme der nekrotischen und apoptotischen Zellen mit Zunahme der Polybrene®-Konzentration in allen ZL hin (Abbildung 23 B). Im Detail sank der prozentuale Anteil an lebenden Zellen insbesondere in den MM-ZL OPM2 und JN3 auf unter 60 % (Abbildung 23 C). Schon für die geringste Polybrene®-Konzentration mit 2 µg/ml wurde eine Abnahme der lebenden OPM2- und JN3-Zellen aufgezeichnet. Auf Grund der morphologischen Veränderung von OPM2 und der erhöhten Nekrose und Apoptose in OPM2 und JN3 bei geringen Polybrene®-Konzentrationen wurde während der Transduktion in allen ZL auf Polybrene® verzichtet.

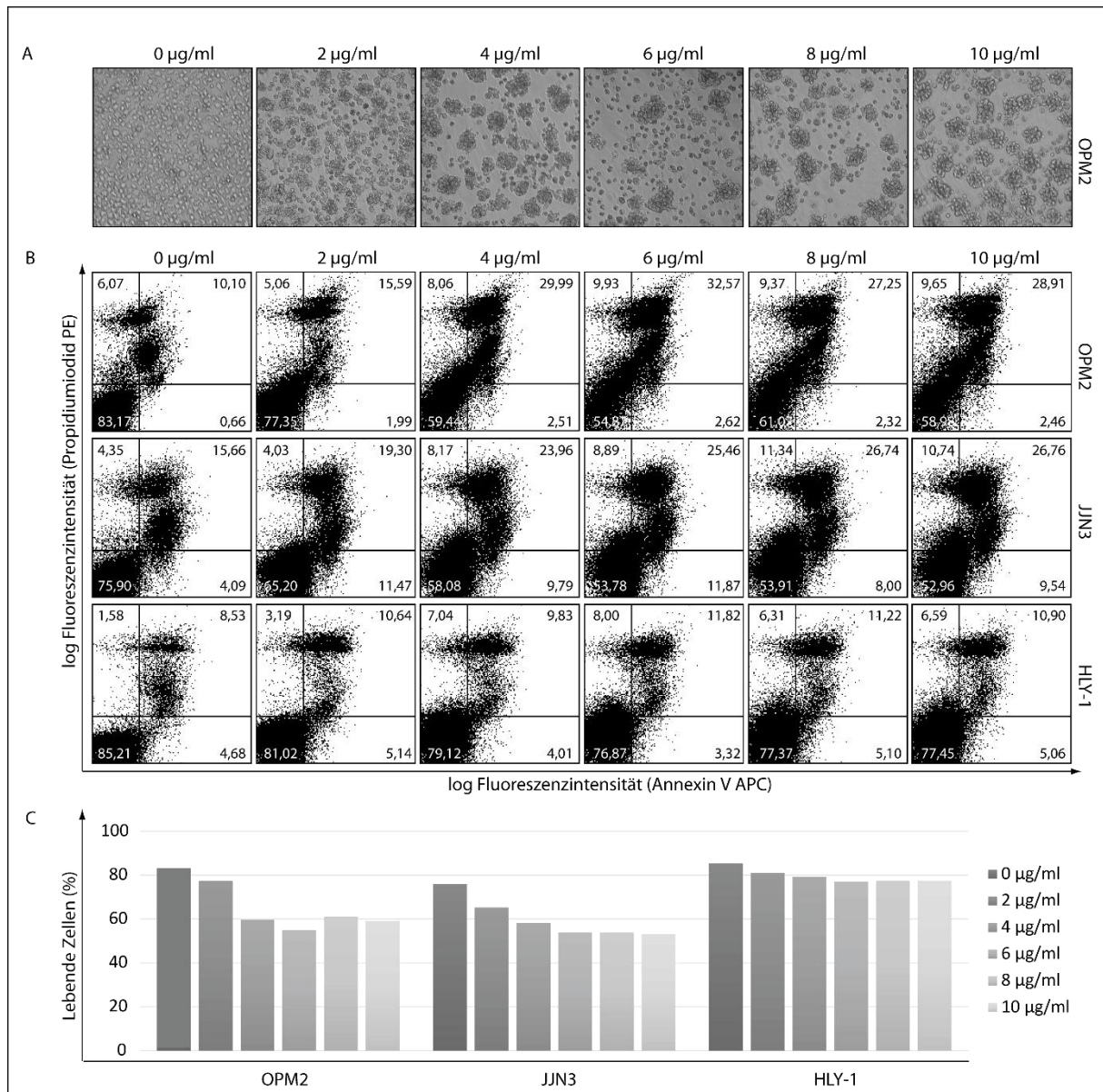


Abbildung 23: Konzentrationstest von Polybrene®

OPM2-, JIN3- und HLY-1-Zellen wurden mit den angegebenen Polybrene®-Konzentration für 24 h kultiviert. A: Morphologische Betrachtung von den OPM2-Zellen durch lichtmikroskopische Aufnahmen bei einer 10x Vergrößerung. B: Analyse der Apoptose und Nekrose durch FACS-Analysen (Dot Plot). Mit Hilfe von Quadranten wurden die PE und APC negativen Zellen als lebend markiert (links unten) und von den letalen Zellen abgegrenzt. Die prozentuale Verteilung wurde in den Quadranten aufgezeigt. C: Darstellung der mit FACS bestimmten lebenden Zellen im Balkendiagramm.

Zusätzlich wurde zur Selektion mittels Antibiotikaresistenz für jede ZL die niedrigste Blasticidinkonzentration ermittelt, welche innerhalb von 14 Tagen bei allen nicht transduzierten Zellen letal war. Die Ermittlung durch Auszählen der mit Trypanblau angefärbten toten Zellen ergab, dass in den MM-ZL OPM2 und JIN3 im Gegensatz zur DLBCL-ZL HLY-1 bereits die niedrigeren Blasticidinkonzentrationen den Zelltod in allen Zellen herbeiführten (Abbildung 24 A). Durch Auszählen wurde für OPM2 und JIN3 eine Blasticidinkonzentration von 4 µg/ml und für HLY-1 die höchste getestete

Blasticidinkonzentration mit 10 µg/ml für diesen Selektionsansatz bestimmt. Der parallel durchgeführte MTT-Test ergab ähnliche Ergebnisse mit 2 µg/ml für die MM-ZL OPM2 und JLN3 und 6 µg/ml für die DLBCL-ZL HLY-1 (Abbildung 24 B). Basierend auf den Ergebnissen der Auszählung und des sensiblen MTT-Tests, wurde eine Blasticidinkonzentration von 3 µg/ml für die ZL OPM2 und JLN3 und von 8 µg/ml für HLY-1 ausgewählt.

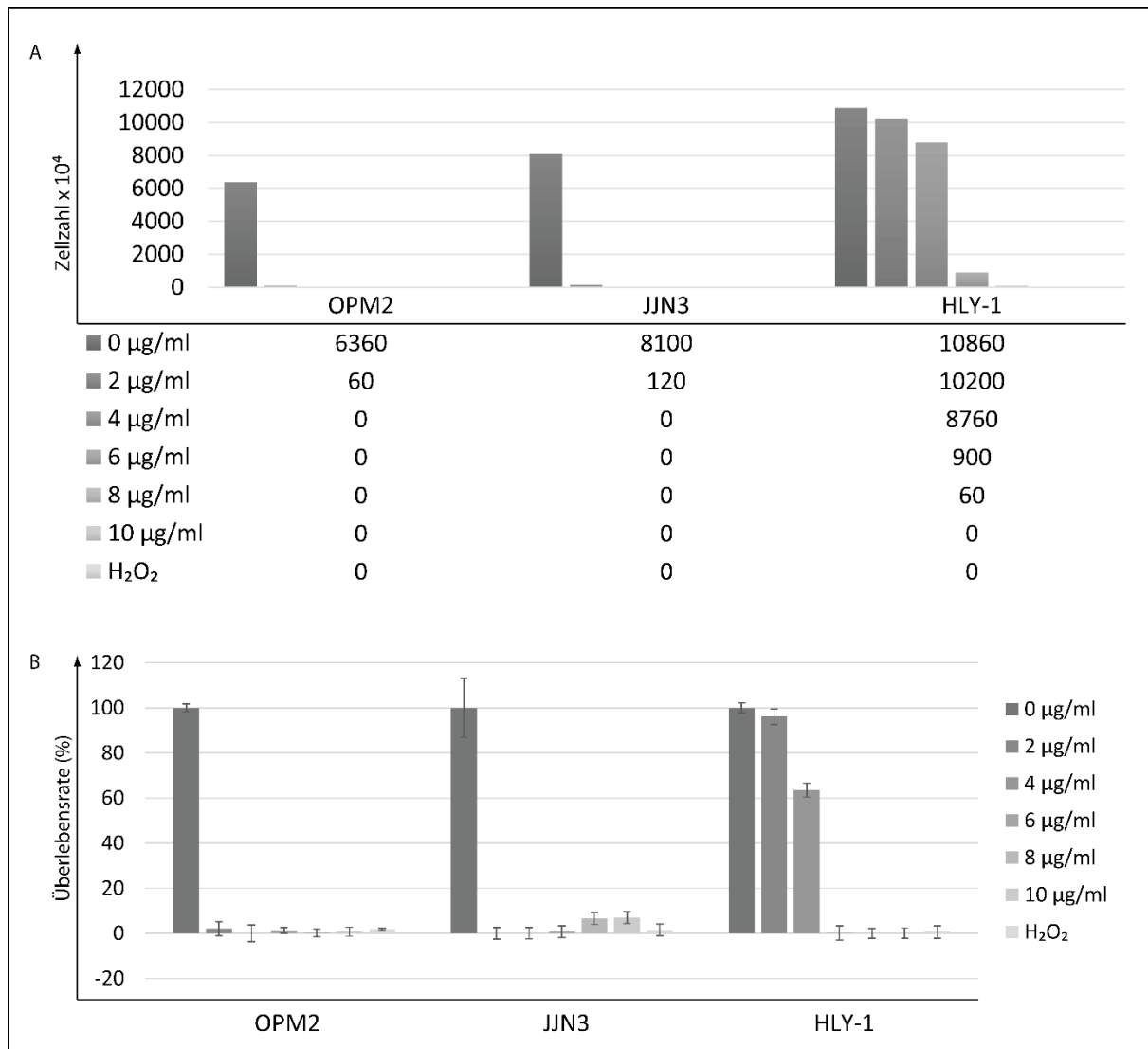


Abbildung 24: Konzentrationstest von Blasticidin

OPM2-, JLN3- und HLY-1-Zellen wurden mit den angegebenen Blasticidinkonzentrationen sowie H₂O₂ für 14 Tage kultiviert. A: Einfache Bestimmung der lebenden Zellen durch Trypanblau-Färbung. B: Bestimmungen der Überlebensraten in % bezogen auf H₂O₂ in Triplikaten mit der MTT-Messung.

7.3.4. Etablierung von stabilen Zelllinien mit *KRAS*-Varianten

Es wurden in die ZL OPM2, JLN3 und HLY-1 die pLenti6.3-V5-KRAS- und pLenti6.3-EmGFP-KRAS-Konstrukte (WT, p.G12A, p.A146T, p.A146V) sowie der Positivvektor pLenti6.2 über das lentivirale Expressionssystem transduziert. Stabile ZL wurden für alle, mit den V5-getaggten Konstrukten, transduzierten ZL erzeugt. Für die Zellen, welche mit pLenti6.3-EmGFP-KRAS-Konstrukten transduziert wurden, konnte keine stabile ZL für OPM2 EmGFP-KRAS-WT und für

JJN3 pLenti6.2 während der Dauer der Doktorarbeit angefertigt werden. Die Ursache hierfür waren Kontaminationen auf Grund eines unsterilen Arbeitsablaufs während des Sortierens von Zellen mittels FACS. Für die anderen EmGFP-KRAS-Konstrukte konnten stabile ZL erzeugt werden. Nach einer vierwöchigen Kultivierung der erfolgreich transduzierten ZL wurden diese mit Sanger-Sequenzierung positiv auf ihren *KRAS*-Mutationsstatus im Genom überprüft. Allerdings zeigten FACS-Analysen für die stabilen ZL HLY-1 mit integrierten mutierten EmGFP-KRAS-Konstrukten (p.G12A, p.A146T, p.A146V) im Gegensatz zu EmGFP-KRAS-WT und pLenti6.2 einen Rückgang des EmGFP-Signals und somit der Expression der EmGFP-KRAS-Fusionsproteine (Abbildung 25). Die stabile ZL HLY-1 mit EmGFP-KRAS-p.G12A wies dabei die niedrigste EmGFP-positive Population mit ~6 % auf. Ebenso wurden nur ~50 % EmGFP-positive Zellen in den pLenti6.3-EmGFP-KRAS-p.A146T und -p.A146V transduzierten HLY-1-Zellen gemessen. Andererseits zeigten die stabilen MM-ZL OPM2 und JJN3 eine stabile Expression mit >90 % für alle EmGFP-KRAS-Fusionsproteine und pLenti6.2 an. Aufgrund des abnehmenden EmGFP-Signales in den *KRAS*-mutierten HLY-1-Zellen wurde die ZL für weitere Untersuchungen an den SNVs in *KRAS* ausgeschlossen.

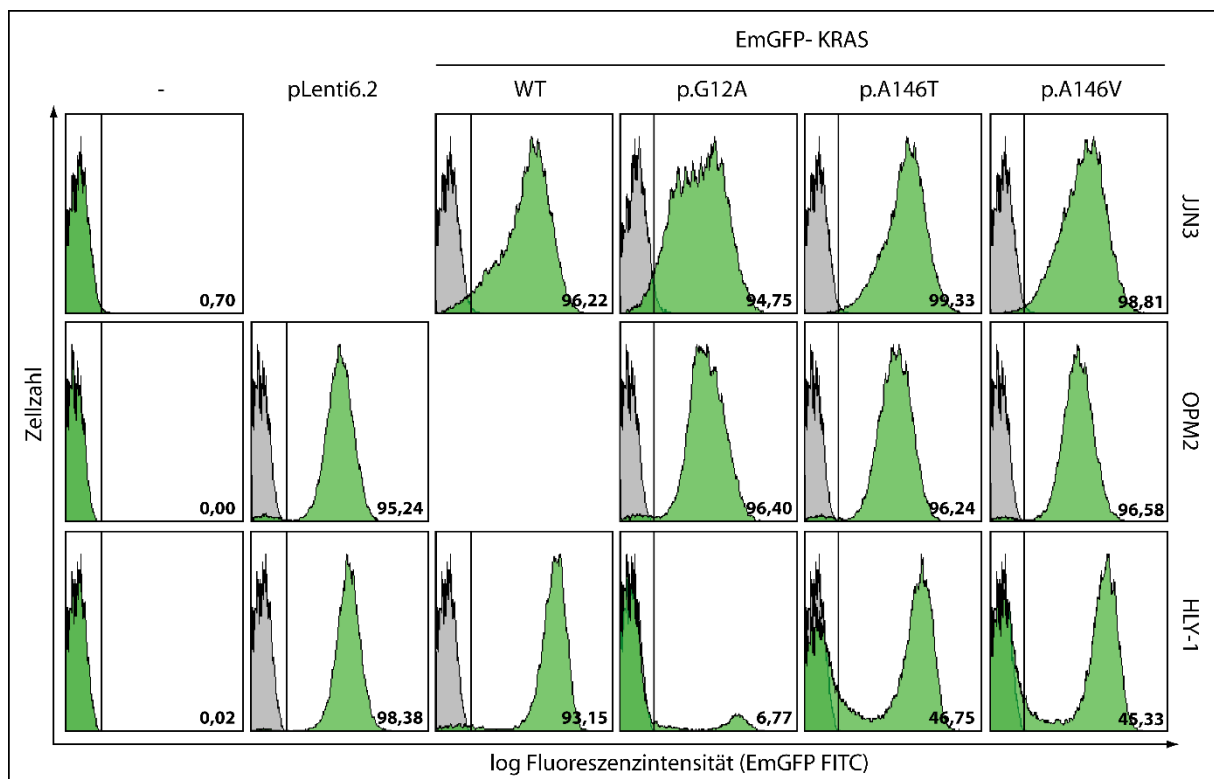


Abbildung 25: FACS-Analysen stabiler ZL

OPM2-, JJN3- und HLY-1-Zellen wurden über lentivirale Transduktion mit den angegebenen pLenti6.3-V5-KRAS- und pLenti6.3-EmGFP-KRAS-Vektoren infiziert und mit FACS Sortierung selektiert. Die EmGFP-Expression wurde nach vier Wochen erneut mit FACS in den Zellen untersucht. Es wurden die Negativ- sowie der pLenti6.2 als EmGFP-Positivkontrolle mitgeführt. Der Schwellenmarker (Schwarze Linie) wurde nah an der Negativkontroll-Population (-) gesetzt, so dass ein positiver Wert von 0,70 % als Background angezeigt wird. Alle Werte, die diesen Schwellenwert überschreiten, werden als EmGFP-Positiv betrachtet und in % angegeben.

Interessanterweise wurde eine ähnliche Verteilung des EmGFP-Signals in den MM-ZL wie zuvor in den HEK293FT-Zellen beobachtet (Abbildung 26). Das EmGFP der Positivkontrolle war über die Zellen gleichmäßig verteilt, während die EmGFP-KRAS-Fusionsproteine an der Membran angereichert waren.

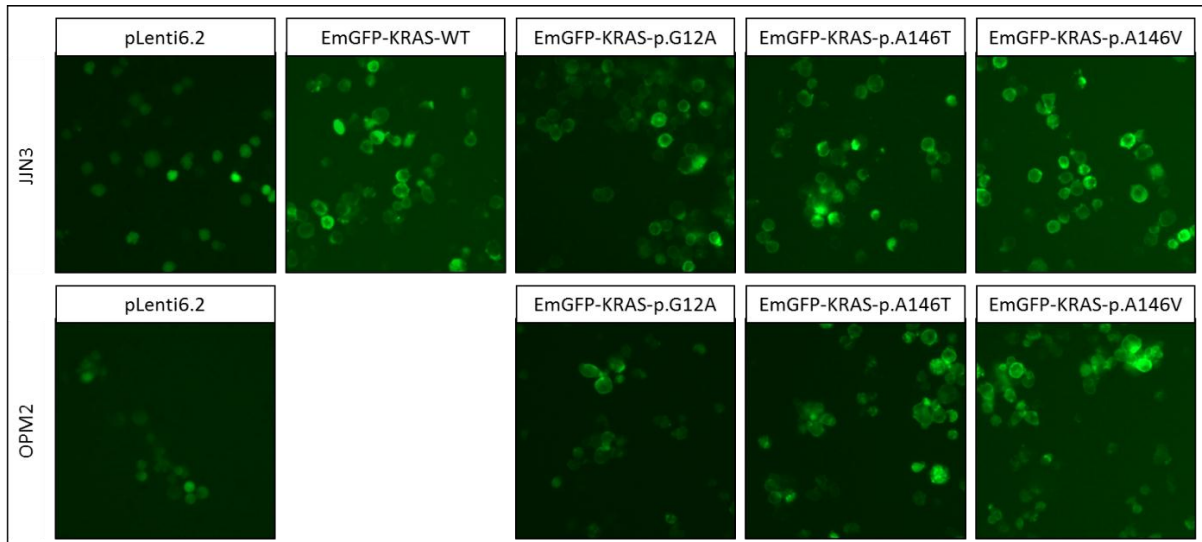


Abbildung 26: EmGFP-Expression in stabilen MM-Zellen

JJN3- und OPM2-Zellen wurden über lentivirale Transduktion mit den angegebenen Vektoren infiziert und deren EmGFP-Expression nach vier Wochen bei einer 20x Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Erste Western Blot-Analysen der transduzierten MM-ZL JJN3 und OPM2 zeigten eine erfolgreiche Produktion der verschiedenen V5-KRAS-Fusionsproteine (WT, p.G12A, p.A146T, p.A146V), welche bei der zuvor bestimmten atomaren Masse von ~25 kDa detektiert wurden (Abbildung 27). Dabei schwankte das Level der V5-KRAS-Fusionsproteine bei der MM-ZL JJN3 leicht und bei der ZL OPM2 stark. Wie bereits für die HEK293FT-Zellen unter 7.3.2. beschrieben, wiesen beide MM-ZL in Bezug auf die unterschiedlichen Fusionsproteinlevel eine höhere Phosphorylierung von MEK1/2 und ERK1/2 für die mutierten V5-KRAS-Fusionsproteine im Gegensatz zu V5-KRAS-WT auf. Ebenso konnte keine Veränderung in der Phosphorylierung von PI3K/AKT/mTOR und pS6 beobachtet werden. Die Phosphorylierung von STAT3 wies keine Unterschiede zwischen den V5-KRAS-Fusionsproteinen in der MM-ZL JJN3 auf, wohingegen eine höhere Phosphorylierung von STAT3 in V5-KRAS-WT und V5-KRAS-G12A in OPM2 vorlag.

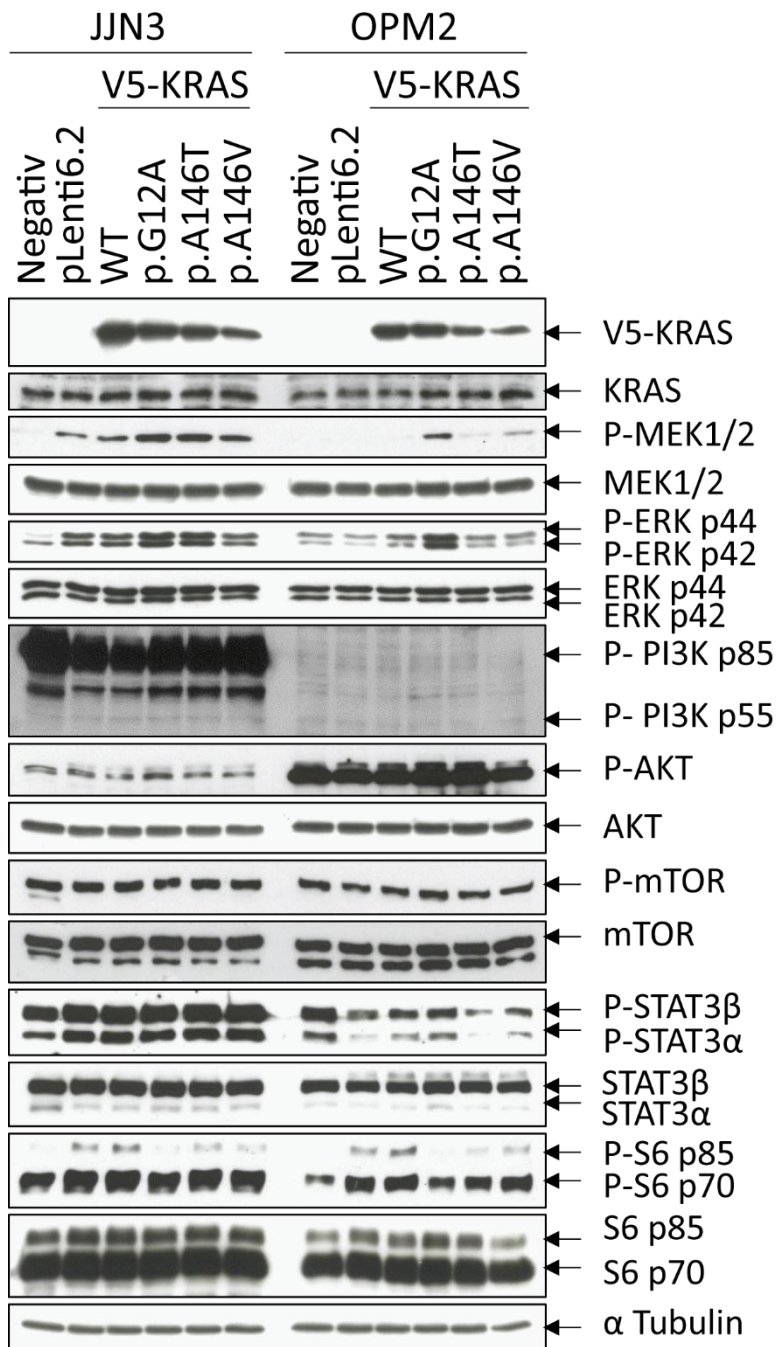


Abbildung 27: Western Blot-Analysen der stabilen V5-KRAS MM-ZL

JJN3- und OPM2-Zellen wurden über lentivirale Transduktion mit den angegebenen Vektoren transduziert und nach acht Wochen mit Western Blot-Analysen untersucht. Es wurden die Kontrollen ohne Vektoren (Negativ) sowie der pLenti6.2 als EmGFP-Positivkontrolle mitgeführt. Gesamtzelllysate wurden angefertigt und auf einem SDS-PAGE analysiert. Die angegebenen Erstantikörper wurden über Nacht bei 4 °C in der vorgegebenen Verdünnung angewendet. Die gleichmäßige Proteinladung wurde mit dem α Tubulin Antikörper kontrolliert.

7.3.5. *KRAS-knockdown* in der Zelllinie AMO1

Die mRNA von *KRAS* wurde in der *KRAS*-mutierten MM-ZL AMO1 (p.A146T) durch siRNA, welche mittels Elektroporation in die Zellen gebracht wurde, herunterreguliert. Die FACS-Analysen nach dem OptiPrep an Tag eins bis drei nach der Elektroporation zeigten für alle behandelten Zellen ein höheres Aufkommen an nekrotischen und apoptotischen Zellen im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen (Abbildung 28 A). Zwischen den behandelten Zellen und den unterschiedlichen siRNA-Konzentrationen traten keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil an lebenden Zellen auf. Die Transfektionseffizienz konnte auf Grund der Alexa-488-gelabelten *stealth* siRNA bestimmt werden und lag einen Tag nach der Elektroporation bei >70 % (Abbildung 28 B). Der prozentuale Anteil an Alexa-488-positiven Zellen sank bis Tag drei auf 14 - 30 %. Besonders markant war der Unterschied in der Gesamtzellzahl zwischen den siRNA-Konzentrationen 1,5 - 4,5 μ M. Die Zellzahl wurde auf die Mock-Kontrolle (*scrambled* siRNA) bezogen und daraus die prozentuale Überlebensrate nach der Elektroporation ermittelt (Abbildung 29). Die mit *stealth KRAS* siRNA behandelten Gruppen wiesen eine niedrigere Überlebensrate einen Tag nach der Transfektion auf, wobei die Überlebensrate der Behandlung mit 4,5 μ M siRNA ~25 %, mit 3 μ M siRNA ~50 % und in der niedrigsten Konzentration mit 1,5 μ M siRNA ~80 % betrug. Es wurde festgestellt, dass mit zunehmendem siRNA-Einsatz die Überlebensrate der behandelten AMO1-Zellen abnimmt. An Tag eins bis drei nach der Transfektion wurde innerhalb der einzelnen Konzentrationen nur eine geringe Abnahme an Zellen bemerkt. Erste Western Blot-Untersuchungen zeigten an Tag 3, dass die exprimierte Proteinmenge an *KRAS* mit zunehmender siRNA-Konzentration abnimmt und somit ein *knockdown* von ~85 % für 4,5 μ M siRNA, ~30 % für 3 μ M und 20 % für 1,5 μ M erreicht wurde (Abbildung 30). Des Weiteren wurde eine stetige Abnahme der Phosphorylierung von ERK1/2 mit Zunahme des *knockdowns* von *KRAS* beobachtet.

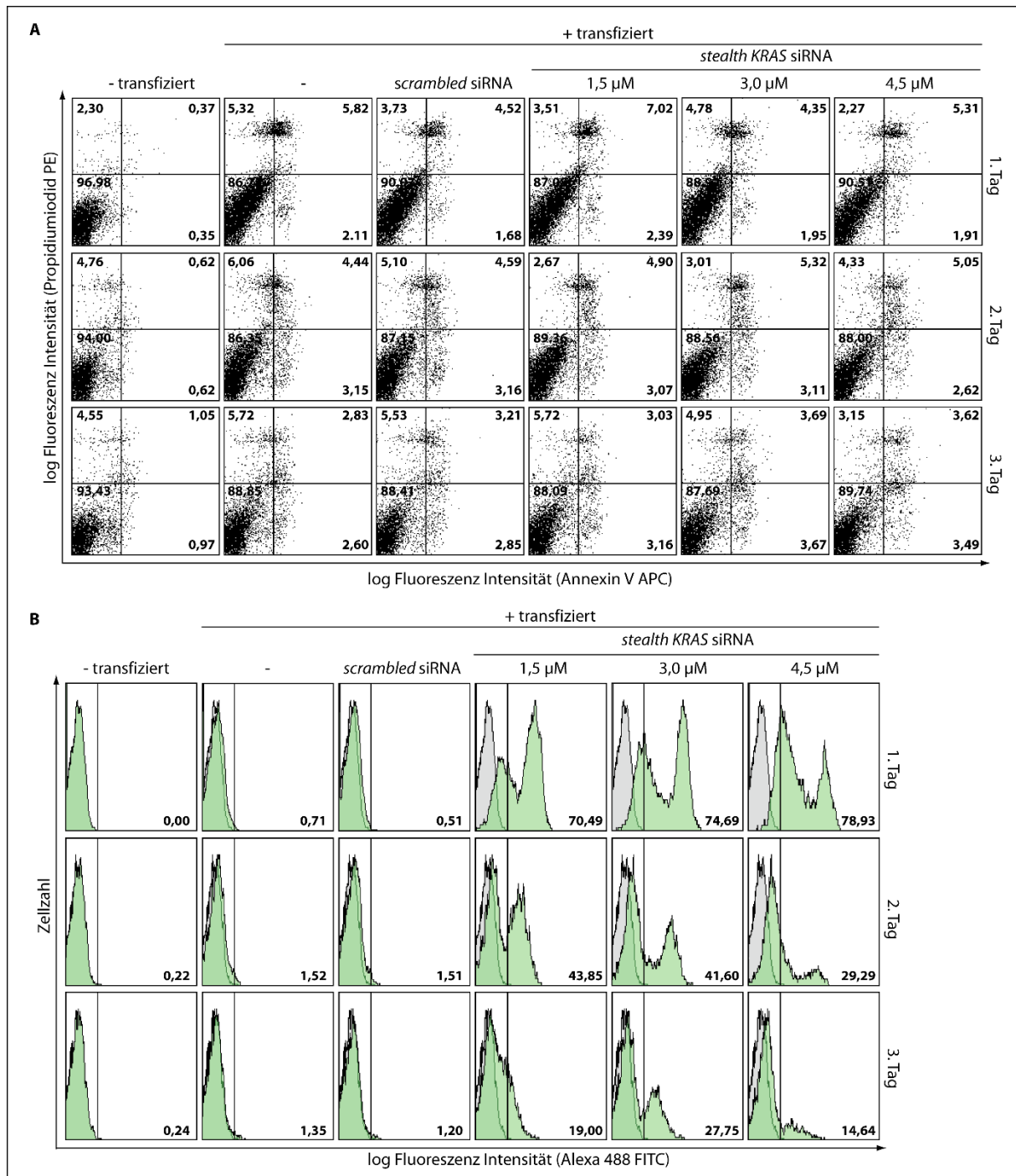


Abbildung 28: FACS-Analysen von *KRAS*-knockdown in AMO1

AMO1-Zellen wurden mit den angegebenen *stealth KRAS* siRNA-Konzentration über Elektroporation transfiziert. Zusätzlich sind die Kontrollen ohne siRNA (-- transfiziert), aber mit Elektroporation (+ transfiziert) sowie mit *scrambled siRNA* 1,5 μ M dargestellt. A: Analyse von Apoptose und Nekrose durch FACS-Analysen (Dot Plot). Mit Hilfe von Quadranten wurden die PE und APC negative Zellen als lebend markiert (links unten) und von den letalen Zellen abgegrenzt. Die prozentuale Verteilung wurde in den Quadranten aufgezeigt. B: Untersuchung der Zellen auf EmGFP-Expression mittels FACS. Der Schwellenmarker (schwarze Linie) wurde nah an der Negativkontroll-Population (-) vom 1. Tag gesetzt. Alle Werte, die diesen Schwellenwert überschreiten, wurden als EmGFP-Positiv betrachtet und sind in % angegeben.

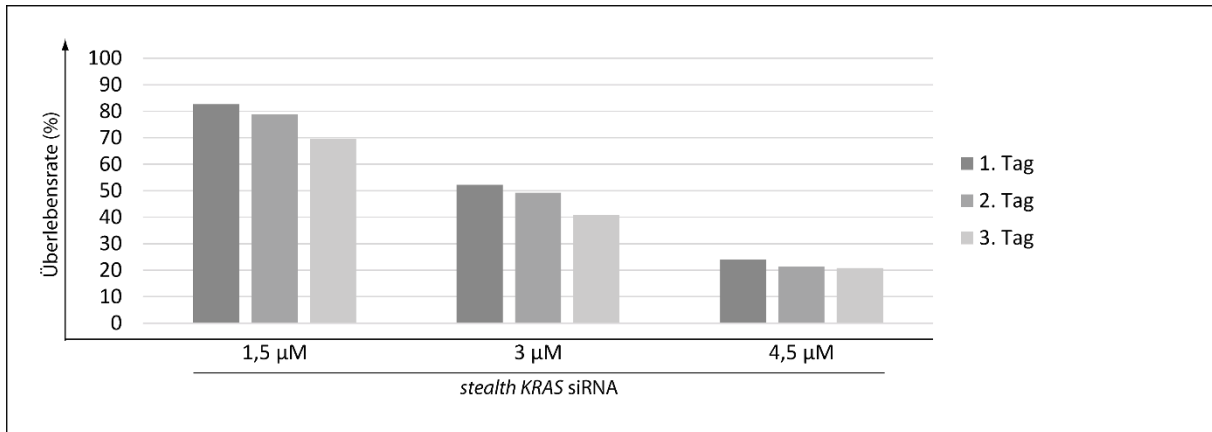


Abbildung 29: Überlebensrate der transfizierten AMO1-Zellen nach *KRAS*-knockdown

AMO1-Zellen wurden mit den angegebenen *stealth KRAS* siRNA-Konzentration über Elektroporation transfiziert. Zusätzlich sind die Kontrollen ohne siRNA (-- transfiziert), aber mit Elektroporation (+ transfiziert) sowie mit *scrambled* siRNA 1,5 µM dargestellt. Auszählen der Zellen mit Trypanblau. Bestimmung der prozentualen Überlebensrate der mit *stealth KRAS* siRNA-behandelten Zellen durch Bezug der Gesamtlebend-Zellzahl auf die lebenden Zellen der mit *scrambled* siRNA-behandelten Zellen.

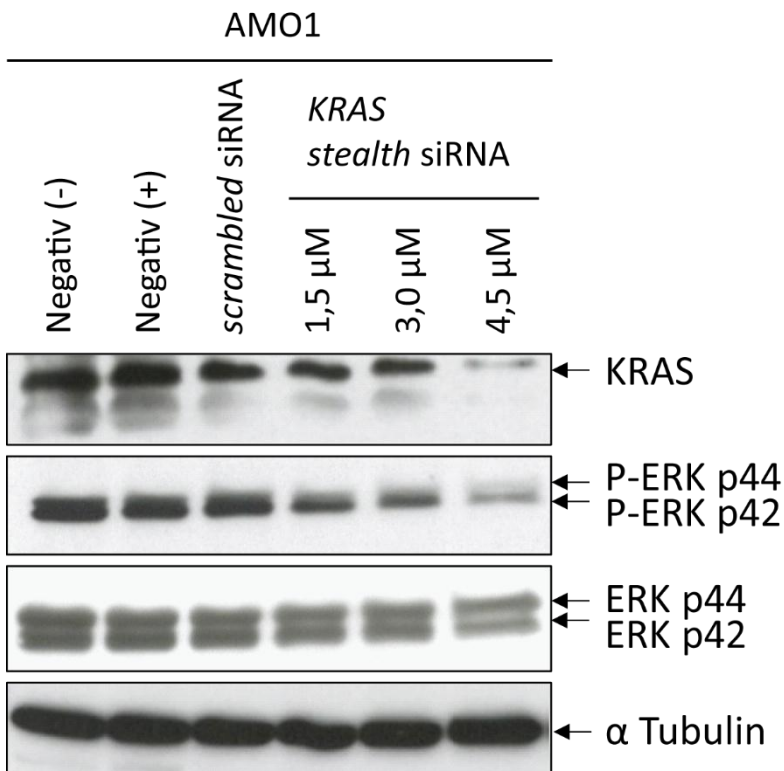


Abbildung 30: Western Blot-Analyse von *KRAS*-knockdown in AMO1

AMO1-Zellen wurden mit den angegebenen *stealth KRAS* siRNA-Konzentration über Elektroporation transfiziert. Es wurden die Kontrollen ohne siRNA (Negativ (-)), aber mit Elektroporation (Negativ (+)) sowie mit *scrambled* siRNA 1,5 µM mitgeführt. Gesamtzelllysate wurden angefertigt und auf einem SDS-PAGE mit Western Blot analysiert. Die angegebenen Erstantikörper wurden über Nacht bei 4 °C in der vorgegebenen Verdünnung angewendet. Die gleichmäßige Proteinladung wurde mit dem α Tubulin Antikörper kontrolliert.

8. Diskussion

Die Überlebenszeit mit einer Spanne von sechs Monaten bis 10 Jahren und der Erfolg der klinischen Therapieantwort auf das gleiche Medikament ist zwischen den MM-Patienten sehr unterschiedlich, welches vorwiegend auf einer großen Heterogenität an epigenetischen und genetischen Aberrationen basiert. Die epigenetischen Aberrationen umfassen aberrante DNA- und Histon-Methylierung oder auch abnormale microRNA Expressionen [107]. Numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen, welche Veränderungen in den Genexpressionsprofilen hervorrufen [108], sowie Punktmutationen gehören zu den genetischen Alterationen. Dabei treten primäre *IGH*-Translokationen in rund 40 % der MM-Patienten auf, und mehr als die Hälfte der Patienten weisen hyperdiploide Tumore auf [9]. Punktmutation in den gleichen Genen treten jedoch selten auf. Die Onkogene *KRAS* und *NRAS* sind zusammen in ~50 % der MM-Fälle am stärksten von Mutationen betroffen, wobei *KRAS* häufiger mutiert ist als *NRAS* [37, 38, 79]. Im Gegensatz dazu kommen *BRAF*-SNVs nur in ~4 % der MM-Fälle vor [37]. Jedoch wurde für einen MM-Patienten mit einer *BRAF* p.V600E SNV durch die Behandlung mit dem *BRAF*-Inhibitor Vermurafenib eine erfolgreiche Therapieantwort erzielt [109]. Dies zeigt, dass das gesamte genetische Profil der MM-Patienten für eine erfolgreiche Behandlung von Bedeutung ist. *Next generation sequencing* (NGS)-Ansätze erlauben die Identifizierung von somatisch mutierten Genen im gesamten Genom und mit Hilfe einer hohen Abdeckung auch die Detektion von Mutationen in Nebenklonen, die aufgrund der mangelnden Sensitivität mit einer Sanger-Sequenzierung nicht detektierbar sind.

8.1. *whole exome sequencing*-Daten offenbaren Gemeinsamkeiten des heterogenen Multiplen Myeloms in betroffenen Signalwegen

In einem ersten NGS-Projekt an 38 MM-Patienten, publiziert von Chapman *et al.* [37], wurden die häufig mutierten Gene *NRAS* (~24 %), *KRAS* (~26 %), *FAM46C* (~13 %), *DIS3* (~11 %), *TP53* (~8 %), *CCND1* (~5 %), *PNRC1* (~5 %), *ALOX12B* (~8 %), *HLA-A* (~5 %) und *MAGED1* (~5 %) identifiziert [37]. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit gewählte Analysestrategie, mit der die *whole exome sequencing* (WES)-Daten von fünf MM-Patienten und sechs MM-ZL ausgewertet wurden, und die auch die Integration der 38 publizierten MM-Patienten von Chapman *et al.* [37] umfasste, ergab eine ähnliches Spektrum an bedeutenden Genen [37], wobei *KRAS* (~27 %), *NRAS* (~21 %), *LRP1B* (16 %), *FAM46C* (~12 %), *WHSC1* (~12 %), *ALOX12B* (~12 %), *DIS3* (~10 %) und *PKHD1* (~10 %) als die am häufigsten mutierten Gene identifiziert wurden. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass in den Tumorproben der Patienten selten die gleichen Gene mutiert waren. Selbst wenn das gleiche Gen betroffen war, betrafen die Mutationen üblicherweise andere Codons. Interessanterweise wurde in der MM-ZL OPM2 die homozygote *DIS3*-SNV p.Y121S im Zusammenhang mit einer CNLOH beobachtet. Außerdem

wies die MM-ZL AMO1 neben einer heterozygoten *KRAS*-SNV p.A146T einen CN- und mRNA-Expressionszugewinn auf. Humane MM-ZL werden vorwiegend aus der vorangeschrittenen extramedullären Form der MM-Patienten gewonnen [9]. In NGS-Studien von verschiedenen Zeitpunkten der Transformation von MGUS über SMM zu MM und letztendlich PCL wurde gezeigt, dass die Anzahl an genetischen Events mit dem Krankheitsverlauf zunimmt [110]. Daher ist es möglich, dass diese mehrfache Veränderung bezüglich *DIS3* und *KRAS* in den MM-ZL auf einer Aufeinanderfolge von verschiedenen Events während der Krankheitsentwicklung beruht. *DIS3* ist auf Chr 13q lokalisiert und eine Deletion von Chr 13q (13q14) ist in nahezu ~50 % des MGUS und ~60 % des MMs beschrieben [9]. Daher könnte die Chr 13q-Deletion das erste Event und die SNV-Initiierung und die Verdopplung des mutierten Chromosomenabschnittes könnten die folgenden Events darstellen. SNVs in *KRAS* wurden als aktivierend beschrieben, wodurch die erhöhte *copy number* von vier sowie eine ~2x höhere Genexpression die ‚*gain of function*‘ Rolle von *KRAS* im MM unterstützt [111]. Diese mehrfache Veränderung über die Zeit weist auf eine essentielle Bedeutung der Gene für die Progression des MMs hin. Daher sollten die Gene auf Mutationen an einem größeren Patientenset detaillierter untersucht und deren klinische Relevanz sowie die biologische Bedeutung in der Zelle überprüft werden. [83]

Chapman *et al.* [37] stellte neben den häufig einzelmutierten Genen auch eine Akkumulation von Mutationen in ganzen Gensets fest. Die Hälfte der untersuchten Patienten wies Mutationen in Genen der RNA-Prozessierung, der Proteintranslation und der ungefalteten Proteinantwort auf. Außerdem wurden Mutationen identifiziert, welche einerseits in dem NF- κ B-Signalweg angereichert waren und andererseits Histon-modifizierende Enzyme beeinflussen. Jedoch wurden die Gensets zuvor nach bestehenden Erkenntnissen über einen Zusammenhang mit dem MM ausgewählt und dann auf die Mutationen untersucht. In dem hier gewählten Ansatz wurden alle Gene der fünf MM-Patienten mit und ohne den publizierten Daten der 38 MM-Patienten von Chapman *et al.* [37] sowie den sechs MM-ZL, welche Mutationen mit funktioneller Bedeutung aufwiesen, unabhängig von bereits bekannten betroffenen Signalwegen, im MM durch die GSEA Signalweg-Annotierung auf Anreicherungen in Signalwegen untersucht. Die Analysen zeigten, dass die MM-Zellen durch mehrere und verschiedene Mutationen in Genen der zellulär wichtigen Wachstumsfaktorrezeptor-Signalwege und Adhäsions-Signalwege betroffen waren, welches bis dahin nicht beschrieben war. Genetische Veränderungen von Adhäsionsmolekülen haben Einfluss auf die Interaktion der MM-Zelle mit der Tumorumgebung, wie Knochenmark-Stromazellen, und können dadurch Tumorstromawachstum, Überleben, Migration und Therapieresistenz steigern [112]. Die Anreicherung von somatischen Mutationen in RTKs ist von besonderem Interesse, da zum einen durch die t(4;14)-Translokation die RTK FGFR3 häufig überexprimiert wird [113]. Außerdem spielen die RTKs, durch die Beteiligung an der

fehlerhaften *downstream*-Regulierung des RAS- und PI3K-Signalweges, möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese des MMs [76, 114]. Dadurch stellen die RTKs geeignete *targets* im MM für neue Arzneistoffe zur Inhibierung der anti-apoptotischen Effekte oder zur Inhibierung der erhöhten Proliferation durch die RTK-Aktivierung dar [115-117]. Erste Studien bei der Behandlung von refraktärem/ rezidiviertem MM mit einer Kombination aus Cetuximab und Dexamethason zeigten moderate Wirksamkeiten in den MM-Patienten [117]. Jedoch ist noch wenig über die genaue Wirkungsweise von Cetuximab im MM bekannt, und es sollte das gesamte genetische Profil des Signalweges berücksichtigt werden, da im kolorektalen Karzinom für den Anti-EGFR-Inhibitor Panitumumab und Cetuximab eine Unwirksamkeit bei Vorhandensein von *KRAS*-Mutationen bekannt ist [118, 119]. Die WES-Daten der sechs MM-ZL zeigten, dass die *EGFR*-mutierten MM-ZL AMO1 und MM1.S ebenso eine SNV in *KRAS* aufwiesen. [83]

Die Erkenntnisse unserer Studie und die Ergebnisse von Chapman *et al.* [37] legen nahe, dass die Entstehung und Entwicklung des MMs mit der Anreicherung von somatischen Mutationen in Genen wichtiger zellulärer Signalwege (RNA-Prozessierung, Proteintranslation, ungefalteten Proteinantwort, NF- κ B-Signalweg, Histon-modifizierende Enzyme, RTK-Signalweg, Adhäsions-Signalweg) einhergehen. Alle sechs MM-ZL und 95 % der MM-Patienten, einschließlich der Daten von Chapman *et al.* [37], wiesen mindestens eine Mutation in Genen der Adhäsionsmoleküle, RTKs oder *downstream*-Effektoren auf, welches wir als inter-individuelle Signalweg-Redundanz bezeichneten [83]. Außerdem wiesen ~50 % der MM-Patienten mehr als eine Mutation in dem von uns definierten Netzwerk aus Adhäsionsmolekülen, RTKs und *downstream*-Effektoren auf, welches wir als intra-individuelle Signalweg-Redundanz bezeichneten [83]. Überdies wurde durch Tiefen-Sequenzierung und Einzelzell-Analyse durch andere Arbeitsgruppen zusätzlich eine intra-klonale Heterogenität im MM festgestellt [39, 97], welches einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf und die Therapieresistenz hat [12, 110, 120]. Melchor *et al.* stellten fest, dass in den MM-Patienten zwei bis sechs verschiedene Hauptklone vorliegen, wobei für zwei Patienten in unterschiedlichen Klonen verschiedene Mutationen in Genen des RAS-Signalweges beobachtet wurden [97]. Dies bestätigt unsere Beobachtung einer intra-klonalen Signalweg-Redundanz. Auf Grund dessen, dass der genetische Hintergrund der MM-Patienten und innerhalb deren Erkrankung so verschieden ist, sollte bei der Behandlung der Fokus nicht auf einzelne Zielgene, sondern auf möglichst ganze Signalwege gelegt werden. Dieser Ansatz wird unterstützt durch die Ergebnisse dieser Arbeit sowie anderer Gruppen, die zeigten, dass häufig die gleichen Signalwege betroffen sind. Erste Ansätze sind die Verwendung von epigenetischen Medikamenten wie HDAC, welche im Zusammenhang mit Bortezomib synergistische Effekte zeigen [107], oder eine Kombination von verschiedenen Inhibitoren gegen mehrere *targets* des gleichen Signalweges [121].

8.2. Biologische Bedeutung von *DIS3*-Mutationen für das Multiple Myelom

Auf Grund des häufigen Vorkommens von *DIS3*-SNVs im MM und dessen mehrfache Veränderung in der MM-ZL OPM2, wurden das molekulare Spektrum und die Auswirkung auf die Klinik und Therapieantwort der *DIS3*-SNVs, unter Berücksichtigung der Haupt- und Nebenklone, in 81 MM-Patienten der DSMM-XI-Studie überprüft. Dafür wurde eine Amplikon-Tiefen-Sequenzierung der gesamten kodierenden Sequenz von *DIS3* durchgeführt. Folglich konnten Aussagen zur Verteilung und Häufigkeit der *DIS3*-SNVs getroffen werden sowie neue Mutationen und *hot spot*-Mutationen definiert werden. Im Detail wurden neun tumorassoziierte *DIS3*-SNVs in neun der 81 MM-Patienten der DSMM-XI-Studie detektiert. Die Häufigkeit von ~11 % stimmt mit anderen Studien, welche keine Vorselektion nach *IGH*-Translokation trafen, überein [37, 38]. Unter Einbezug bereits veröffentlichter MM-NGS-Studien ([37, 38, 42, 97]) und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Domänengrößen ergab das SNV-Profil von *DIS3*, dass die SNVs nicht wie bereits beschrieben in der RNB- und PIN-Domäne akkumulieren [37], sondern gleichmäßig über die CR3-, CSD1-, CSD2-, PIN-, RNB- und S1-Domänen von *DIS3* verteilt sind. Interessanterweise lagen laut bioinformatischen Prädiktoren die *DIS3*-SNVs der neun MM-Patienten der DSMM-XI-Studie vorwiegend in hochkonservierten Bereichen der PIN-, CSD2-, RNB- und S1-Domäne vor und könnten zu Veränderungen der Proteinstruktur führen. Außerdem wurden sieben bisher nicht beschriebene *DIS3*-SNVs in den neun MM-Patienten der DSMM-XI-Studie identifiziert, wobei vier in den enzymatisch aktiven PIN-Domäne und RNB-Domäne und drei in der CSD2- und S1-Domäne lagen. Strukturanalysen von *DIS3* in *E. coli*, durch röntgenkristallographische Methoden, ergaben, dass die CSD1-, CSD2- und S1-Domäne möglicherweise als OB-Domänen für die RNA-Bindung wichtig sind [104]. Außerdem ergaben biochemische Analysen in *S. cerevisiae*, dass eine Punktmutation (p.G916E) in der S1-Domäne zu einer geringeren RNA-Bindung und geringeren Exonukleaseaktivität führt [26, 27, 29]. Daher ist es möglich, dass die drei neu entdeckten *DIS3*-SNVs (p.P412L, p.R418G, p.E929stop) aus der DSMM-XI-Studie in den OB-Domänen einen Einfluss auf die RNA-Bindung, die enzymatische Aktivität und dadurch einen veränderten RNA-Metabolismus hervorrufen können. Veränderungen des Sequenzmotivs CCCH von CR3 zeigten in *S. cerevisiae* eine verringerte Assoziation von *DIS3* zu dem Exosom und eine daraus folgende Reduzierung der Exonukleaseaktivität. Außerdem wurde eine geringe Änderung in der Endonukleaseaktivität der PIN-Domäne auf Grund der Verknüpfung der PIN-Domäne über p.H184 mit den p.C47, p.C52 und p.C55 der CR3-Domäne beschrieben [26]. Lohr *et al.* identifizierte in dem MM-Patienten MM-0544 eine *DIS3*-SNV in dem CR3-Motiv (p.C39F) [38], welches der p.C55 Position in *S. cerevisiae* entspricht (S_Tabelle 9) und somit möglicherweise ähnliche Auswirkungen auf den RNA-Metabolismus hat. Des Weiteren können auch Mutationen in der PIN-Domäne einen Effekt auf deren Endonukleaseaktivität sowie deren Assoziation mit dem Exosom haben [28, 29]. Jedoch

zeigten Mutationen in dieser Domäne nur geringe Auswirkungen auf das Zellwachstum [40]. Neben den beiden neuen SNVs (p.E665K, p.D784H) in der RNB-Domäne wurden durch den Abgleich mit den anderen NGS-Studien im MM drei *hot spot*-Mutationen in der RNB-Domäne an Position p.D488, p.E665 und p.R780 identifiziert, von denen zwei, drei bzw. sechs MM-Patienten betroffen waren [38, 39, 85]. Keine der drei AS wurde zuvor als positionsspezifischer *hot spot* im MM beschrieben. Dies ist eine interessante Beobachtung, da aus den WES-Daten hervorging, dass wiederaufkehrende, positionsspezifische somatische SNVs im MM eher selten sind. Funktionelle Studien in *S. cerevisiae* zeigten, dass Mutationen in der RNB-Domäne von DIS3 Einfluss auf das endgültige Degradationsprodukt und dadurch auf die RNA-Prozessierung und RNA-Degradation haben [41]. Zugleich untersuchte Tomecki *et al.* die Mutationen p.D487N und p.R780K, welche auch in dieser NGS-Studie detektiert wurde, in *S. cerevisiae* und beobachtete neben einer geringeren Proliferation auch negative Effekte auf die Exonukleaseaktivität und den RNA-Metabolismus [40]. Die AS p.R780, welche am häufigsten in *DIS3* im MM mutiert ist, ist an der Substratbindung beteiligt [16]. Möglicherweise haben Mutationen an der *hot spot*-Position p.D488 einen ähnlichen Effekt wie für p.D487 beschrieben wurde, da beide Asparaginsäuren an der enzymatischen Substratkatalyse mitwirken und bedeutend für die Mg²⁺-Koordination sind [16]. Eine Mutation an Position p.D488 wurde auch in einem von acht Patienten mit akuter myeloischer Leukämie detektiert [36]. [85]

Auf Grund der hohen Konservierung der Domänen, der gleichen Verteilung der SNVs über die Domänen und der wichtigen funktionellen Bedeutung der Domänen für den RNA-Metabolismus sollten die CR3- und die OB-Domänen neben der enzymatisch aktiven RNB- und PIN-Domäne in zukünftigen Screeningansätzen im MM nicht vernachlässigt werden. [85]

Über die funktionelle Bedeutung von *DIS3* als Tumorsuppressorgen oder Onkogen im MM oder anderen Tumorentitäten ist bisher nur wenig bekannt. Im kolorektalen Karzinom wurde *DIS3* im Zusammenhang mit einer Überexpression der mRNA als Onkogen bezeichnet [33]. Möglicherweise verliert *DIS3* im MM seine Funktion (*loss of function*), resultierend aus der starken Assoziation der enzymatisch inaktivierenden *DIS3*-SNVs mit einer zusätzlichen Deletion des *DIS3*-Lokus auf Chr 13q. Dadurch könnte es sein, dass *DIS3* als wichtiger Bestandteil der RNA-Qualitätskontrolle inaktiv wird und somit indirekt eine erhöhte Transkription und Translation von fehlerhafter RNA in der Zelle zulässt. Dies könnte einen Trigger für die Tumorentstehung und -entwicklung darstellen. Der Effekt, wodurch eine Mutation in einem Gen zu vielen weiteren Mutationen in anderen Genen führt, wurde bereits für sogenannte Mutatorgene wie AID oder Polymerase II beschrieben [13, 122]. AID initiiert die für die B-Zell-Reifung notwendige SHM und CSR in dem Ig-Lokus [123]. Jedoch können Aktionen des AID außerhalb des Ig-Lokus zu genomischer Instabilität, eine Hyperaktion des

AID zu chromosomalen Translokationen und ein Aktivitätsverlust zu Immundefizienzen führen [124]. Es ist bekannt, dass das Exosom in der B-Zelle an den AID-Komplex bindet und so den Zugang der AID zu beiden Seiten der transkribierenden DNA ermöglicht und dessen Aktivität stimuliert [122, 124-126]. Möglicherweise wird die Aktivität des AID-Komplexes durch das mutierte DIS3 verändert und dadurch evtl. mehr *IGH*-Translokationen initiiert, welches das starke gemeinsame Vorkommen von *DIS3*-SNVs und *IGH*-Translokationen erklären würde. Die Erkenntnisse aus der DSMM-XI-Patientenstudie sowie unserer WES-Studie und auch die NGS-Daten anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass *DIS3*-SNVs vorwiegend in MM-Patienten mit *IGH*-Translokationen gefunden werden und eine signifikante Assoziation mit einer Chr 13q14-Deletion vorliegt [37-39, 83, 85]. Weiterhin wäre es möglich, dass MM-Patienten mit *DIS3*-SNVs im weiteren Verlauf der Krankheit zusätzlich zu der Chr 13q-Deletion eine CNLOH dazugewinnen.

Jedoch sollte die Rolle von DIS3 in Abhängigkeit des Gewebes, dessen funktionelle Bedeutung in humanen MM-Zellen und unter Berücksichtigung der Tumorgenese näher untersucht werden.

8.3. Biologische Bedeutung von *KRAS*-Mutationen für das Multiple Myelom

Die WES- und CN- sowie GE-Daten der MM-ZL AMO1 offenbarten eine im MM bisher selten beschriebene *KRAS*-SNV (p.A146T) im Zusammenhang mit einem CN-Zugewinn des *KRAS*-Lokus und einer daraus resultierenden Überexpression von *KRAS*. Zusätzlich spielt *KRAS* eine zentrale Rolle im dem RTK-Signalweg, welcher durch die GSEA Signalweg-Annotierung als häufig betroffener Signalweg im MM detektiert wurde. Außerdem ist *KRAS* eines der am häufigsten mutierten Gene im MM [37] und unterliegt, wie im kolorektalen Karzinom beschrieben, selten einer Überexpression [127]. Des Weiteren ist eine Zunahme von Patienten mit *RAS*-SNVs über den Krankheitsverlauf von MGUS (7 %), über das MM (25 %) und rezidiviertem MM (45 %) beschrieben wurden, welches auf eine Bedeutung der *RAS*-SNVs für die Progression des MMs hindeutet [77]. Aus diesen Gründen wurde wie für *DIS3* unter 8.2. beschrieben, die kodierenden Regionen von *KRAS* in 81 MM-Patienten der DSMM-XI-Studie untersucht und der Mutationsstatus mit zytogenetischen und klinischen Parametern korreliert. Dabei konnten acht SNVs an vier unterschiedlichen AS-Positionen der Exons 2, 3 und 4 in 17 MM-Patienten und drei MM-ZL (MM1.S, RPMI8226: p.G12A; AMO1: p.A146T) identifiziert werden. Die Häufigkeit von ~21 % an Patienten mit einer *KRAS*-SNV stimmte dabei mit anderen publizierten NGS-Studien überein [37, 38, 42]. Jedoch wies die MM-NGS-Studie von Walker *et al.*, welcher das Patientenset nach *IGH*-Status vorselektierte, eine höhere Frequenz mit ~41 % an *KRAS*-mutierten Patienten auf. Dies könnte auf einen Zusammenhang zwischen *KRAS*-SNV und *IGH*-Status, wie es für *DIS3* beschrieben wurde [37, 39, 85], hinweisen. Eine signifikante Assoziation von *RAS* Mutationen mit einer t(11;14)-Translokation

und keinen weiteren zytogenetischen Merkmalen wurde von Chng *et al.* beobachtet, welcher jedoch das Patientenset nur auf spezifische SNVs überprüfte [77]. Diese Beobachtung konnte in dem vorliegenden Patientenset der DSMM-XI-Studie nicht bestätigt werden. Es konnten keine signifikanten Assoziationen mit anderen bekannten zytogenetischen Merkmalen detektiert und weiterhin kein CN-Zugewinn des *KRAS*-Lokus im Zusammenhang mit einer *KRAS*-SNV, wie für die ZL AMO1 bekannt ist, beobachtet werden. Möglicherweise tritt ein CN-Zugewinn und die daraus resultierende Überexpression erst im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit ein. Der Abgleich mit anderen NGS-Studien im MM ergab, dass die gleichen exonischen Regionen in *KRAS*, die gleichen AS-Positionen (vornehmlich p.G12 und p.Q61) sowie die gleichen Domänen betroffen waren [37-39, 42, 97]. Daraus schlussfolgernd unterstützen die Ergebnisse aus der DSMM-XI-Studie die bisherigen Erkenntnisse über die Verteilung der SNVs über *KRAS* im MM. Die Recherche in Cosmic und *My Cancer Genomics* ergab, dass mutierte Formen von *KRAS* auch in anderen Geweben, wie im Dickdarm, der Lunge und im Eierstock vorkommen. Diese können zu verschiedenen Tumoren führen z.B. dem kolorektalen Karzinom, welches zu 35 - 45 % von tumorassozierten *KRAS*-SNVs betroffen ist. Interessanterweise treten diese Mutationen an den gleichen AS-Positionen wie im MM auf [128, 129] und akkumulieren häufig an AS-Position 12 und 13 [129, 130]. Die AS p.A146 ist in diesem Datenset der DSMM-XI-Studie, wie auch bei Lohr *et al.* [38] und Bolli *et al.* [42], mit ~1 % im MM und mit ~4 % ebenso im kolorektalen Karzinom [131, 132] eher selten betroffen. Jedoch wurde auch für die *KRAS*-SNV in Codon 146 neben den SNVs in Codon 12, 13 und 61 eine Resistenz gegen den EGFR-Inhibitor Cetuximab im kolorektalen Karzinom festgestellt [133]. Außerdem konnte durch Überexpressionen der SNV p.A146T in NIH3T3- und HEK293FT-Zellen mittels eines *RAS Pull Down*-Assay bereits gezeigt werden, dass *KRAS* mit p.A146T in einer aktiven GTP-gebundenen Form vorliegt [70, 131, 134]. Smith *et al.* zeigte außerdem durch Genexpressionsanalysen, dass die NIH3T3-Zellen mit eingebrachten *KRAS*-SNVs an den verschiedenen AS-Positionen p.G12 und p.A146 Unterschiede in ihren individuellen Phänotypen aufweisen, welches für die Tumorprogression und Therapieantwort wichtig ist [134]. Es wurde ebenso in ZL des nicht-kleinzelligem Lungenkarzinoms beschrieben, dass die verschiedenen AS-Austausche p.G12D, p.G12C, p.G12V zu Unterschieden in der Assoziation mit *downstream*-Effektoren führen [135]. Untersuchungen dieser Art wurden im MM zu den *KRAS* Exon 4-Mutationen bisher nicht publiziert. Daher war es von großem Interesse, die Auswirkungen auf die *downstream*-Signalwege der p.G12A SNV aus MM1.S, der p.A146T aus AMO1 und der p.A146V eines MM-Patienten in den *KRAS*-WT MM-ZL JN3 und OPM2 zu untersuchen. Erste Ergebnisse der lentiviralen Transduktion mit V5-*KRAS*-Konstrukten in HEK293FT und in die MM-ZL JN3 und OPM2 konnten zeigen, dass die SNVs p.G12A, p.A146T und p.A146V den pMEK1/2 und pERK1/2-Signalweg, jedoch nicht den PI3K/AKT/MTOR/PS6-Signalweg, beeinflussen. Im Gegensatz zu HEK293FT und JN3 schienen die V5-*KRAS*-WT- und

V5-KRAS-G12A-Fusionsproteine in der MM-ZL OPM2 jedoch zusätzlich einen Einfluss auf die Phosphorylierung von STAT3 auszuüben. Eine mögliche Ursache könnte in dem unterschiedlichen genetischen Hintergrund der HEK293FT-, JLN3- und OPM2-Zellen oder auch in dem stark schwankenden V5-KRAS-Fusionsproteinlevel zwischen den Konstrukten innerhalb der MM-ZL OPM2 liegen. Das variierende Proteinlevel der V5-KRAS-Fusionsproteine in OPM2 beruht möglicherweise auf einer variablen inserierten CN-Anzahl der V5-KRAS-Konstrukte in dem Zielgenom. Daher können keine endgültigen Aussagen über den Zusammenhang zwischen den KRAS-Mutationen und der Aktivierung von möglichen KRAS-Effektoren im MM gemacht werden. In den HEK293FT-Zellen konnte außerdem eine erhöhte Aktivierung von pMEK1/2 und pERK1/2 durch eine erhöhte Expression des KRAS-WT im Gegensatz zu den Kontrollen erkannt werden. Die Aktivierung von pMEK1/2 und pERK1/2 konnte auch mit den EmGFP-KRAS-Konstrukten in den HEK293FT-Zellen beobachtet werden, jedoch waren hier die Phosphorylierungslevel sehr viel schwächer und die Ergebnisse daher weniger eindeutig. Ein Grund hierfür könnte die Modifizierung des N-Terminus durch EmGFP sein. Für die C-terminale Modifizierung von KRAS wurde z.B. eine Störung der Interaktion von KRAS mit dem Mikrotubuli beschrieben [136]. Der Einfluss einer N-terminalen Modifikation, wie sie hier angewendet wurde, wurde bisher jedoch noch nicht dokumentiert. Es wäre somit möglich, dass eine Modifizierung des N-terminalen Endes von KRAS durch EmGFP einen Einfluss auf die zelluläre posttranslationale Modifizierung von KRAS und somit dessen Funktionalität hat. Die Abnahme des EmGFP-Signales, sowie die Abnahme des Proteinlevels die selektiv für die mutierten EmGFP-KRAS-Fusionsproteine in der transduzierten DLBCL-ZL HLY-1 beobachtet wurde, könnte darauf hindeuten, dass die mutierten EmGFP-KRAS-Fusionsproteine keinen selektiven Vorteil für die Krebszellen darstellen und dadurch inaktiviert werden [137].

Der *knockdown* von Gesamt-KRAS in der MM-ZL AMO1 führte zu einer geringeren Phosphorylierung von ERK1/2 sowie einer Abnahme an lebenden Zellen innerhalb von 24 h nach dem *knockdown*. Dies würde die Ergebnisse von Steinbrunn *et al.* bestätigen, welcher einen *KRAS-knockdown* in der MM-ZL MM1.S (p.G12A) durchgeführt hat [76]. Die durchgeführten Überexpressions- und *knockdown*-Experimente zusammen mit den Daten von Steinbrunn *et al.* [76] lassen erkennen, dass die KRAS-SNVs p.G12A, p.A146T und p.A146V den ERK-Signalweg in der B-Zelle aktivieren, keinen Einfluss auf den PI3K/AKT-Signalweg haben, und dass KRAS essentiell für das Überleben der ZL AMO1 und MM1.S ist. Die EmGFP-KRAS-Konstrukte ließen erkennen, dass die verschiedenen KRAS-SNVs keinen Unterschied zu KRAS-WT in der Lokalisierung der Zelle aufwiesen, welches darauf hindeutet, dass die Bindung zu dem Chaperon PDE δ durch die Mutation nicht beeinflusst wird. Dadurch stellt diese Verbindung zwischen PDE δ und KRAS ein geeignetes *target* zur Inhibierung der Lokalisierung und Funktionalität von KRAS in der Zelle dar [138]. Zimmermann *et al.* entwarfen ein kleines

Molekül namens Deltarasin, welches die Farnesol-Bindungstasche von PDE δ bindet [139]. Dadurch wird die Verbindung von PDE δ mit der Farnesol-Gruppe von KRAS unterbunden und die Lokalisierung von KRAS an der Membran verhindert. KRAS-mutierte humane Zelllinien des Pankreaskarzinoms zeigten bei einer Inkubation mit Deltarasin eine verringerte Proliferation und ein schlechteres Überleben im Zusammenhang mit einer verringerten ERK-Phosphorylierung [139]. Ähnliche Ergebnisse, wie die Inhibierung der Lokalisierung von KRAS an die Zellmembran und die Blockierung der Proliferation und des KRAS-Signalweges konnten ebenfalls mit dem Kalzium-Kanal-Blocker Fendiline beobachtet werden [140]. Fendiline und Deltarasin bzw. PDE δ -Inhibitoren wurden im Zusammenhang mit MM bisher nicht beschrieben, stellen aber eine interessante Möglichkeit, unter dem Gesichtspunkt, dass KRAS ein häufig mutiertes Gen im MM ist, für einen neuen Therapieansatz dar [141].

Der ausführliche Mechanismus der *DIS3*- und *KRAS*-Mutationen und deren Einfluss auf die Pathogenese des MM sind noch nicht vollständig untersucht und erklärt. Eventuell kommen diese Mutationen parallel mit anderen Mutationen vor, wodurch möglicherweise negative Effekte der jeweils anderen ausgeglichen und dadurch ein synergistischer Effekt erzielt wird [13]. Melchor *et al.* beobachtete z.B. in 4 % der untersuchten Patienten ein gleichzeitiges Vorkommen von *RAS*-Mutationen und der *IRF4* p.K123R SNV [97]. Lohr *et al.* beschrieb ein gemeinsames Vorkommen von *DIS3*- und *KRAS*-SNVs [38], welches in dem untersuchten Patientenset jedoch nur für einen Patienten der DSMM-XI-Studie bestätigt werden konnte.

8.4. Prognostische Bedeutung von zytogenetischen Alterationen

Durch beständige klinische Studien an großen MM-Patientensets mit neuen Medikamenten, z.B. Proteasom-Inhibitoren, und innovativen Behandlungsstrategien mit autologer Stammzelltransplantation, konnte die Prognose über die Zeit, auch bei Vorhandensein von Risikofaktoren wie der *IGH*-Translokation t(4;14), erheblich verbessert werden [142]. Proteasom-Inhibitoren, z.B. Bortezomib, stimulieren verschiedene apoptotische Signalwege, wie das Anschalten der Stressantwort durch das endoplasmatische Retikulum, die Herunterregulierung von Zytokin-Signalwegen, Angiogenesefaktoren und Zelladhäsion an das Microenvironment durch die Inhibition des NF- κ B-Signalweges [112]. In dem untersuchten Studienset aus 81 MM-Patienten, welche mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib in Kombination mit dem Zytostatikum Cyclophosphamid und dem Glukokortikoid Dexamethason behandelt wurden, konnte keine geringere Überlebenszeit oder schlechtere Therapieantwort für Patienten mit einer t(4;14)-Translokationen festgestellt werden [85]. Diese Erkenntnis wird durch die Beobachtungen von Avet-Louiseau *et al.* unterstützt, welcher an einer MM-Patientenstudie ebenfalls Bortezomib und Dexamethason im Vergleich zu einer Behandlung mit Vincristin, Doxorubin und Dexamethason anwendete [143]. Es bestand eine signifikant erhebliche Verbesserung ($p < 0.001$) des EFS und OS für die MM-Patienten mit einer

t(4;14)-Translokation, welche im Gegensatz zu Vincristin und Doxorubin mit Bortezomib behandelten wurden. Jedoch verblieb die t(4;14)-Translokation in dieser Studie von Avet-Louiseau *et al.* immer noch als prognostischer Faktor, denn die MM-Patienten mit einer t(4;14)-Translokation innerhalb der Bortezomib-Behandlung wiesen eine signifikant schlechtere EFS ($p = 0,0178$) und OS ($p = 0,002$) als die MM-Patienten ohne t(4;14)-Translokation auf [143]. Außerdem bestätigen unsere Analysen, dass Deletionen von Chr 13q14, Chr 17p13 und Zugewinne von Chr 1q21 mit einem signifikant schlechterem OS assoziiert sind [142]. Insbesondere wurde für MM-Patienten mit einer Chr 13q14-Deletion in einer univariaten Analyse ein schlechterer Krankheitsverlauf beobachtet. Allerdings bestätigten multivariate Analysen, auf Grund der starken Assoziation der Chr 13q14-Deletion mit Chr 17p13-Deletion, Chr 1q21-Zugewinn und *IGH*-Translokation, dass die Chr 13q-Deletion allein keinen Hoch-Risikofaktor darstellt, wie auch bei der Behandlung von refraktärem/ rezidiviertem MM beobachtet wurde [142, 144, 145]. Jedoch beruht in dieser Studie der negative Einfluss auf den klinischen Verlauf nicht auf der Assoziation der Chr 13q14-Deletion mit der t(4;14)-Translokation und der Chr 17p13-Deletion, wie von Neben *et al.* beschrieben wurde, sondern nur auf dem gemeinsamen Vorkommen mit der Chr 17p13-Deletion [146]. Avet-Louiseau *et al.* beschrieb ebenfalls Chr 17p13-Deletion weiterhin als prognostischen Faktor, da Patienten mit einer Chr 17p13-Deletion keinen Vorteil durch die Bortezomib-Anwendung erhielten [143]. Die Gruppe Neben *et al.* hingegen beobachtete, dass der negative Einfluss der Chr 17p13-Deletion auf PFS und OS signifikant durch die Behandlung mit Bortezomib, Doxorubin und Dexamethason im Gegensatz zu Vincristin, Doxorubin und Dexamethason reduziert werden konnte [146]. Wie bereits erwähnt, wurde in dieser Studie auch der Zugewinn von Chr 1q21 signifikant mit einem schlechteren OS und PFS assoziiert. Chang *et al.* identifizierte den Zugewinn von Chr 1q21 in refraktärem/ rezidiviertem MM bei einer Behandlung mit Bortezomib als einzigen unabhängigen Risikofaktor [147]. Eine mögliche Ursache für den schlechteren Verlauf von MM-Patienten mit einem Zugewinn von Chr 1q21 könnte die damit verbundene Überexpression von *CKS1B* sein, welches eine Aktivierung des ERK- und STAT3-Signalweges und eine Arzneimittelresistenz fördert [148]. [85]

Auf Grund der Anwendung von unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen von Bortezomib mit anderen Komponenten, in verschiedenen Behandlungsstrategien unter unterschiedlichen Studiengrößen, Patientenkriterien und Krankheitsstadien in den unterschiedlichen MM-Studien, ist keine finale Aussage über die Prognose von verschiedenen zytogenetischen Merkmalen bei der Behandlung mit Bortezomib möglich. Die Ergebnisse geben lediglich Hinweise auf die Möglichkeit des Zusammenhanges von verschiedenen genetischen Alterationen mit dem klinischen Verlauf bei der Behandlung mit Bortezomib.

8.5. Klinische Bedeutung von *KRAS*- und *DIS3*-Mutationen im Multiplen Myelom

Ein negativer Einfluss von *KRAS*-Mutationen mit einer erhöhten Proliferation, spontaner Apoptose, geringerem Überleben und schlechterer Therapieantwort wurde in Patienten mit kolorektalem Karzinom und Pankreaskarzinom beobachtet [149, 150]. Im Gegensatz dazu konnte in der DSMM-XI-Studie, die ein Teil dieser Doktorarbeit war, gezeigt werden, dass die *KRAS*-Mutationen bei einer Behandlung mit Bortezomib und HD-Chemotherapie keinen Einfluss auf EFS, PFS, OS und die Therapieantwort in MM-Patienten haben. Diese Erkenntnis wird durch die veröffentlichte MM-Studie von Mulligan *et al.* unterstützt, welcher für MM-Patienten mit *NRAS*-Mutationen, aber nicht für MM-Patienten mit *KRAS*-Mutationen, ein schlechteres Ansprechen auf Bortezomib erkannte [151]. Möglicherweise hat die Behandlung mit Bortezomib einen positiven Einfluss auf MM-Patienten mit *KRAS*-Mutationen, wie es bereits für die t(4;14)-Translokationen beschrieben wurde. Steckle *et al.* beobachtete bereits für verschiedene *KRAS*-mutierte humane Tumorzelllinien eine Abhängigkeit der Zellen von der Proteasomfunktion [152]. Daher kann es sein, dass die *KRAS*-Mutationen die MM-Zellen evtl. gegenüber dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib sensitivieren. Für die MM-Patienten der DSMM-XI-Studie, welche eine *DIS3*-SNV im Tumor aufwiesen, konnte ein Trend hinsichtlich eines kürzeren medianen OS im Vergleich zu *DIS3*-WT MM-Patienten (33 vs. 54) beobachtet werden [85]. Eine Kaplan-Meier Statistik ergab jedoch keine Signifikanz, was möglicherweise an der kleinen Patientenkohorte mit *DIS3*-mutierten Fällen lag [85].

Verschiedene veröffentlichte NGS-Studien des MMs konnten demonstrieren, dass die Pathogenese vom MGUS über SMM zum MM sowie die Progression des MMs sehr unterschiedlich ist, welches auf einer heterogenen intraklonalen Zusammensetzung des Tumors beruht [42, 105, 110, 153], die sich in Abhängigkeit der klonalen Evolution und unter Therapiedruck stetig ändern kann (*'clonal tiding'*) [2, 105, 153]. Besonders interessant ist, dass alle zeitlich dominierenden Hauptklone zum Zeitpunkt der Diagnose bereits als Nebenkclone vorliegen und nach einer Therapie gegen den Hauptklon zu einem Rezidiv führen können [14, 105, 154]. In beiden Gruppen der *DIS3*- und *KRAS*-mutierten MM-Patienten der DSMM-XI-Studie konnten, mit Hilfe der vorhandenen CN-Daten, die SNVs den Haupt- als auch den Nebenklonen zugeordnet werden.

In dem DSMM-XI-Studienset zeigten die in Haupt- oder Nebenklon *KRAS*-mutierten Patienten keinen Unterschied in EFS, PFS, OS oder der Therapieantwort. Allerdings war interessanterweise das Auftreten von *DIS3*-SNVs in dem Nebenklon, neben einer geringeren medianen Überlebensdauer für OS, EFS und PFS, signifikant mit einer schlechteren HD-Chemotherapieantwort im Vergleich zu dem Auftreten von *DIS3*-SNVs im Hauptklon assoziiert. Jedoch wiesen zwei der fünf MM-Patienten, welche eine *DIS3*-SNV im Nebenklon enthielten, eine zusätzliche Chr 17p13-Deletion auf. Dabei traten die Chr 17p13-Deletion und

die *DIS3*-SNV wahrscheinlich nicht im selben Klon auf, da nur ~20 % der MM-Zellen eine *DIS3*-SNV aufwiesen und die Chr 17p13-Deletion hingegen in ~70 - 90 % der MM-Zellen detektiert werden konnte. Keiner der vier MM-Patienten mit einer *DIS3*-SNV im Hauptklon enthielt eine Chr 17p13-Deletion. Ob die Mutation von *DIS3* in einem Nebenklon oder die Chr 17p13-Deletion im Hauptklon für das schlechtere Überleben verantwortlich ist, bleibt somit ungeklärt. Die SNVs in *DIS3* wurden dabei im Gegensatz zu vorhergehenden Studien [38, 39] vorwiegend in Nebenklonen gefunden. Eine Ursache könnte, neben den unterschiedlichen Patientensets, der hier gewählte technische Ansatz mit einer höheren Abdeckung der CDS von *DIS3* sein, welches möglicherweise die Detektion von Nebenklonen fördert. Dies würde jedoch auch bedeuten, dass wir mit einer höheren Abdeckung auch insgesamt eine höhere Frequenz von *DIS3*-Mutationen beobachten. Da die von uns beobachtete Gesamtfrequenz an detektierten SNVs in *DIS3* jedoch der Frequenz aus anderen Studien entspricht [37, 38, 83], ist eine höhere Abdeckung wahrscheinlich nicht die Ursache für das verstärkte Auftreten von *DIS3*-Mutationen in Nebenklonen. [85]

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die MM-Zellen mit einer *DIS3*-SNV im Hauptklon eine geringe bis intermediäre Aggressivität im Spektrum der Krankheit vorzeigen. Das Auftreten von *DIS3*-Mutationen in einem Nebenklon könnte hingegen auf die Präsenz eines aggressiveren Klons hinweisen, wie z.B. einem Klon mit Chr 17p13-Deletion, der für ein schlechteres Überleben und eine schlechtere Therapieantwort verantwortlich ist. Um den klinischen Einfluss und die onkogene Funktion von *DIS3*-SNVs als auch *KRAS*-SNVs in Haupt- und Nebenklon im MM besser zu verstehen, ist eine größere Studienkohorte an *DIS3*- und *KRAS*-mutierten Patienten notwendig, da in der DSMM-XI-Studie nur neun MM-Patienten eine *DIS3*-SNV und nur 17 MM-Patienten eine *KRAS*-SNV aufwiesen.

9. Ausblick

Auf Grund des häufigen Vorkommens von *KRAS*-SNVs im MM und der zentralen Rolle von *KRAS* im RTK-Signaltransduktionsweg, sollte die Rolle von *KRAS* im MM, vor allem die Bedeutung der noch nicht näher charakterisierten Exon 4-Mutation, weiterhin durch funktionelle Experimente untersucht werden. Beispielsweise können die beschriebenen *KRAS*-SNVs hinsichtlich ihres Einflusses auf die Proliferation und die Bindung an andere Effektoren erforscht werden. Veränderungen in der Bindung von Effektoren in Abhängigkeit von den verschiedenen *KRAS*-SNVs können über Immunopräzipitation und anschließender Massenspektrometrie in der stabil transduzierten MM-ZL JN3 detektiert werden. Andererseits können die MM-ZL neben Mutationen in *KRAS* auf Veränderungen der GAPs, GDIs und GEFs überprüft werden.

Um einen detaillierteren Einblick in die Biologie und somit ein umfassenderes Verständnis für die Pathogenese und die Progression des MMs zu gewinnen, sind fortführende sequentielle *whole genome*-, *whole exome*- oder RNA-Sequenzierungsanalysen von einheitlich behandelten MM-Patientensets notwendig, um einerseits die verschiedenen Transformationsebenen der B-Zell-Erkrankung (MGUS, SMM, MM, PCL) sowie die klonale Entwicklung während der Therapiebehandlung (Erst-Diagnose, Erfolg, Rezidiv) und die klonale Verteilung innerhalb (intramedullär) und außerhalb (extramedullär) des Knochenmarks zu verstehen.

Unterstützend bei der Identifizierung von tumorrelevanten Ereignissen könnte die Detektion von potentiell synergistischen genetischen Ereignissen sein, welche sequentiell erworben werden. Beispielsweise könnte man in einem frühen Stadium der Krankheit eine Deletion beobachten, in einem späteren Stadium eine Mutation auf dem jeweils anderen Allel und in einem noch weiter fortgeschrittenen Stadium die Verdopplung des mutierten Allels, welches im zytogenetischen Profil als *copy neutral loss of heterozygosity* angezeigt wird. Jedoch müsste man sich für weitreichendere Aussagen über gleichzeitige Events innerhalb eines Klonen mehr auf das *single-cell-sequencing* fokussieren [155].

Nach der Identifizierung von geeigneten molekularen *targets* muss die Verfügbarkeit von Inhibitoren sowie die Möglichkeit, diese *in vitro* zu testen, geprüft werden. Aufgrund der molekularen Heterogenität des MMs wird es wahrscheinlich notwendig sein, auch zwei bis drei Inhibitoren parallel auf ihre Wirkung zu testen. Da wir bereits die RTKs und deren *downstream*-Effektoren als relevant identifiziert haben, könnte man in einem initialen Ansatz einen RTK-Inhibitor (z.B. Imatinib) allein und in Kombination mit dem indirekten *KRAS*-Inhibitor Deltarasin testen.

Für die Charakterisierung von weiteren tumorrelevanten Mutationen im MM sollte in Zukunft auf die TALEN oder Crisp-Cas9-basierten Systeme zugegriffen werden, welche direkt im Gen der Empfängerzelle die gewünschte genetische Veränderung einbringen. Diese Systeme erfolgen ohne die zusätzlichen Nebeneffekte der lentiviralen Transduktion, wie z.B. der konstitutiven Expression des Gens durch einen konstitutiven Promoter und die Veränderung des Genoms durch die zufällige und mehrfache Insertion des veränderten Gens in die DNA der Empfängerzelle.

10. Literaturverzeichnis

1. Steven H. Swerdlow, E.C., Nancy Lee Harris, Elaine S. Jaffe, Stefano A. Pileri, Harald Stein, Jürgen Thiele, James W. Varidman, ed. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4 ed. 2008: Lyon.
2. Prideaux, S.M., E. Conway O'Brien, and T.J. Chevassut, *The genetic architecture of multiple myeloma*. Adv Hematol, 2014. **2014**: p. 864058.
3. Greipp, P.R., et al., *International staging system for multiple myeloma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(15): p. 3412-20.
4. Vincent Rajkumar, S., *Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management*. Am J Hematol, 2014. **89**(10): p. 999-1009.
5. Raab, M.S., et al., *Multiple myeloma*. Lancet, 2009. **374**(9686): p. 324-39.
6. Morgan, G.J., B.A. Walker, and F.E. Davies, *The genetic architecture of multiple myeloma*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(5): p. 335-48.
7. Kupperts, R., *Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(4): p. 251-62.
8. Lenz, G. and L.M. Staudt, *Aggressive lymphomas*. N Engl J Med, 2010. **362**(15): p. 1417-29.
9. Bergsagel, P.L. and W.M. Kuehl, *Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(26): p. 6333-8.
10. de Mel, S., et al., *Implications of heterogeneity in multiple myeloma*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 232546.
11. Neri, P. and N.J. Bahlis, *Genomic instability in multiple myeloma: mechanisms and therapeutic implications*. Expert Opin Biol Ther, 2013. **13** Suppl 1: p. S69-82.
12. Brioli, A., et al., *The impact of intra-clonal heterogeneity on the treatment of multiple myeloma*. Br J Haematol, 2014. **165**(4): p. 441-54.
13. Yates, L.R. and P.J. Campbell, *Evolution of the cancer genome*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(11): p. 795-806.
14. Bahlis, N.J., *Darwinian evolution and tiding clones in multiple myeloma*. Blood, 2012. **120**(5): p. 927-8.
15. Paramore, A. and S. Frantz, *Bortezomib*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(8): p. 611-2.
16. Tomecki, R., et al., *The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L*. EMBO J, 2010. **29**(14): p. 2342-57.
17. Staals, R.H., et al., *Dis3-like 1: a novel exoribonuclease associated with the human exosome*. EMBO J, 2010. **29**(14): p. 2358-67.
18. Liu, Q., J.C. Greimann, and C.D. Lima, *Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome*. Cell, 2006. **127**(6): p. 1223-37.
19. Dziembowski, A., et al., *A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(1): p. 15-22.
20. Vanacova, S. and R. Stefl, *The exosome and RNA quality control in the nucleus*. EMBO Rep, 2007. **8**(7): p. 651-7.
21. Houseley, J., J. LaCava, and D. Tollervey, *RNA-quality control by the exosome*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(7): p. 529-39.
22. Tomecki, R., K. Drazkowska, and A. Dziembowski, *Mechanisms of RNA degradation by the eukaryotic exosome*. Chembiochem, 2010. **11**(7): p. 938-45.
23. Sloan, K.E., C. Schneider, and N.J. Watkins, *Comparison of the yeast and human nuclear exosome complexes*. Biochem Soc Trans, 2012. **40**(4): p. 850-5.
24. Lorentzen, E., J. Basquin, and E. Conti, *Structural organization of the RNA-degrading exosome*. Curr Opin Struct Biol, 2008. **18**(6): p. 709-13.
25. Lorentzen, E., et al., *Structure of the active subunit of the yeast exosome core, Rrp44: diverse modes of substrate recruitment in the RNase II nuclease family*. Mol Cell, 2008. **29**(6): p. 717-28.

26. Schaeffer, D., et al., *The CR3 motif of Rrp44p is important for interaction with the core exosome and exosome function*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(18): p. 9298-307.
27. Schneider, C., J.T. Anderson, and D. Tollervey, *The exosome subunit Rrp44 plays a direct role in RNA substrate recognition*. Mol Cell, 2007. **27**(2): p. 324-31.
28. Schaeffer, D., et al., *The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(1): p. 56-62.
29. Schneider, C., et al., *The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(4): p. 1127-40.
30. Lebreton, A., et al., *Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome*. Nature, 2008. **456**(7224): p. 993-6.
31. Reis, F.P., et al., *The RNase II/RNB family of exoribonucleases: putting the 'Dis' in disease*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2013. **4**(5): p. 607-15.
32. Camps, J., et al., *Genetic amplification of the NOTCH modulator LNX2 upregulates the WNT/beta-catenin pathway in colorectal cancer*. Cancer Res, 2013. **73**(6): p. 2003-13.
33. de Groen, F.L., et al., *Gene-dosage dependent overexpression at the 13q amplicon identifies DIS3 as candidate oncogene in colorectal cancer progression*. Genes Chromosomes Cancer, 2014. **53**(4): p. 339-48.
34. Lim, J., et al., *Isolation of murine and human homologues of the fission-yeast dis3+ gene encoding a mitotic-control protein and its overexpression in cancer cells with progressive phenotype*. Cancer Res, 1997. **57**(5): p. 921-5.
35. Parsons, D.W., et al., *The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma*. Science, 2011. **331**(6016): p. 435-9.
36. Ding, L., et al., *Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing*. Nature, 2012. **481**(7382): p. 506-10.
37. Chapman, M.A., et al., *Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma*. Nature, 2011. **471**(7339): p. 467-72.
38. Lohr, J.G., et al., *Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy*. Cancer Cell, 2014. **25**(1): p. 91-101.
39. Walker, B.A., et al., *Intraclonal heterogeneity and distinct molecular mechanisms characterize the development of t(4;14) and t(11;14) myeloma*. Blood, 2012. **120**(5): p. 1077-86.
40. Tomecki, R., et al., *Multiple myeloma-associated hDIS3 mutations cause perturbations in cellular RNA metabolism and suggest hDIS3 PIN domain as a potential drug target*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(2): p. 1270-90.
41. Reis, F.P., et al., *Modulating the RNA processing and decay by the exosome: altering Rrp44/Dis3 activity and end-product*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e76504.
42. Bolli, N., et al., *Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 2997.
43. Popescu, N.C., et al., *Chromosomal localization of three human ras genes by in situ molecular hybridization*. Somat Cell Mol Genet, 1985. **11**(2): p. 149-55.
44. Jancik, S., et al., *Clinical relevance of KRAS in human cancers*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 150960.
45. Friday, B.B. and A.A. Adjei, *K-ras as a target for cancer therapy*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1756**(2): p. 127-44.
46. Wennerberg, K., K.L. Rossman, and C.J. Der, *The Ras superfamily at a glance*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): p. 843-6.
47. Colicelli, J., *Human RAS superfamily proteins and related GTPases*. Sci STKE, 2004. **2004**(250): p. RE13.
48. Bourne, H.R., D.A. Sanders, and F. McCormick, *The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism*. Nature, 1991. **349**(6305): p. 117-27.

49. Dever, T.E., M.J. Glynias, and W.C. Merrick, *GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(7): p. 1814-8.
50. Zhang, B., et al., *The role of Mg²⁺ cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25299-307.
51. Vetter, I.R. and A. Wittinghofer, *The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions*. Science, 2001. **294**(5545): p. 1299-304.
52. Milburn, M.V., et al., *Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins*. Science, 1990. **247**(4945): p. 939-45.
53. Vakiani, E. and D.B. Solit, *KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers*. J Pathol, 2011. **223**(2): p. 219-29.
54. Cox, A.D. and C.J. Der, *Ras history: The saga continues*. Small GTPases, 2010. **1**(1): p. 2-27.
55. Repasky, G.A., E.J. Chenette, and C.J. Der, *Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis?* Trends Cell Biol, 2004. **14**(11): p. 639-47.
56. Boguski, M.S. and F. McCormick, *Proteins regulating Ras and its relatives*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 643-54.
57. Cherfils, J. and M. Zeghouf, *Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs*. Physiol Rev, 2013. **93**(1): p. 269-309.
58. Margolis, B. and E.Y. Skolnik, *Activation of Ras by receptor tyrosine kinases*. J Am Soc Nephrol, 1994. **5**(6): p. 1288-99.
59. Waters, S.B., et al., *Insulin and epidermal growth factor receptors regulate distinct pools of Grb2-SOS in the control of Ras activation*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 18224-30.
60. Quilliam, L.A., J.F. Rebhun, and A.F. Castro, *A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2002. **71**: p. 391-444.
61. Bos, J.L., H. Rehmann, and A. Wittinghofer, *GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins*. Cell, 2007. **129**(5): p. 865-77.
62. Peter, F., et al., *Guanine nucleotide dissociation inhibitor is essential for Rab1 function in budding from the endoplasmic reticulum and transport through the Golgi stack*. J Cell Biol, 1994. **126**(6): p. 1393-406.
63. Dovas, A. and J.R. Couchman, *RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities*. Biochem J, 2005. **390**(Pt 1): p. 1-9.
64. Sivars, U., D. Aivazian, and S.R. Pfeffer, *Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 856-9.
65. Prior, I.A. and J.F. Hancock, *Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling*. Semin Cell Dev Biol, 2012. **23**(2): p. 145-53.
66. Spiegel, J., et al., *Small-molecule modulation of Ras signaling*. Nat Chem Biol, 2014. **10**(8): p. 613-22.
67. Ahearn, I.M., et al., *Regulating the regulator: post-translational modification of RAS*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(1): p. 39-51.
68. Ismail, S.A., et al., *Arl2-GTP and Arl3-GTP regulate a GDI-like transport system for farnesylated cargo*. Nat Chem Biol, 2011. **7**(12): p. 942-9.
69. Schubbert, S., K. Shannon, and G. Bollag, *Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(4): p. 295-308.
70. Janakiraman, M., et al., *Genomic and biological characterization of exon 4 KRAS mutations in human cancer*. Cancer Res, 2010. **70**(14): p. 5901-11.
71. Eser, S., et al., *Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer*. Br J Cancer, 2014. **111**(5): p. 817-22.
72. Arrington, A.K., et al., *Prognostic and predictive roles of KRAS mutation in colorectal cancer*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(10): p. 12153-68.
73. Mascaux, C., et al., *The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis*. Br J Cancer, 2005. **92**(1): p. 131-9.

74. Chen, J., X.F. Huang, and A. Katsifis, *Activation of signal pathways and the resistance to anti-EGFR treatment in colorectal cancer*. J Cell Biochem, 2010. **111**(5): p. 1082-6.
75. Perkins, G., et al., *Additional value of EGFR downstream signaling phosphoprotein expression to KRAS status for response to anti-EGFR antibodies in colorectal cancer*. Int J Cancer, 2010. **127**(6): p. 1321-31.
76. Steinbrunn, T., et al., *Mutated RAS and constitutively activated Akt delineate distinct oncogenic pathways, which independently contribute to multiple myeloma cell survival*. Blood, 2011. **117**(6): p. 1998-2004.
77. Chng, W.J., et al., *Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma*. Leukemia, 2008. **22**(12): p. 2280-4.
78. Liu, P., et al., *Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Trial*. Blood, 1996. **88**(7): p. 2699-706.
79. Bezieau, S., et al., *High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis*. Hum Mutat, 2001. **18**(3): p. 212-24.
80. Intini, D., et al., *Relevance of Ras gene mutations in the context of the molecular heterogeneity of multiple myeloma*. Hematol Oncol, 2007. **25**(1): p. 6-10.
81. Huchtagowder, V., et al., *Resequencing analysis of the candidate tyrosine kinase and RAS pathway gene families in multiple myeloma*. Cancer Genet, 2012. **205**(9): p. 474-8.
82. Stuhmer, T., et al., *Preclinical anti-myeloma activity of the novel HDAC-inhibitor JNJ-26481585*. Br J Haematol, 2010. **149**(4): p. 529-36.
83. Leich, E., et al., *Multiple myeloma is affected by multiple and heterogeneous somatic mutations in adhesion- and receptor tyrosine kinase signaling molecules*. Blood Cancer J, 2013. **3**: p. e102.
84. Kropff, M., et al., *DSMM XI study: dose definition for intravenous cyclophosphamide in combination with bortezomib/dexamethasone for remission induction in patients with newly diagnosed myeloma*. Ann Hematol, 2009. **88**(11): p. 1125-30.
85. Weissbach, S., et al., *The molecular spectrum and clinical impact of DIS3 mutations in multiple myeloma*. Br J Haematol, 2014.
86. Affymetrix. *Probe Set Summary*. 2014; Available from: http://www.affymetrix.com/support/help/IVT_glossary/index.affx.
87. Cooper, G.M., et al., *Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence*. Genome Res, 2005. **15**(7): p. 901-13.
88. Subramanian, A., et al., *GSEA-P: a desktop application for Gene Set Enrichment Analysis*. Bioinformatics, 2007. **23**(23): p. 3251-3.
89. Szklarczyk, D., et al., *The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D561-8.
90. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
91. Ng, S.B., et al., *Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes*. Nature, 2009. **461**(7261): p. 272-6.
92. Abecasis, G.R., et al., *An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes*. Nature, 2012. **491**(7422): p. 56-65.
93. Sherry, S.T., et al., *dbSNP: the NCBI database of genetic variation*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(1): p. 308-11.
94. Larkin, M.A., et al., *Clustal W and Clustal X version 2.0*. Bioinformatics, 2007. **23**(21): p. 2947-8.
95. Buchan, D.W., et al., *Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Web Server issue): p. W349-57.
96. Jones, D.T., *Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices*. J Mol Biol, 1999. **292**(2): p. 195-202.
97. Melchor, L., et al., *Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma*. Leukemia, 2014.

98. Hinrichs, A.S., et al., *The UCSC Genome Browser Database: update 2006*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D590-8.
99. Oda, K., et al., *A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling*. Mol Syst Biol, 2005. **1**: p. 2005 0010.
100. Shain, K.H., W.S. Dalton, and J. Tao, *The tumor microenvironment shapes hallmarks of mature B-cell malignancies*. Oncogene, 2015.
101. van Driel, M. and J.P. van Leeuwen, *Cancer and bone: a complex complex*. Arch Biochem Biophys, 2014. **561**: p. 159-66.
102. Loman, N.J., et al., *Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms*. Nat Biotechnol, 2012. **30**(5): p. 434-9.
103. Cannistraro, V.J. and D. Kennell, *The processive reaction mechanism of ribonuclease II*. J Mol Biol, 1994. **243**(5): p. 930-43.
104. Frazao, C., et al., *Unravelling the dynamics of RNA degradation by ribonuclease II and its RNA-bound complex*. Nature, 2006. **443**(7107): p. 110-4.
105. Egan, J.B., et al., *Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides*. Blood, 2012. **120**(5): p. 1060-6.
106. Scientific, T.F. *ViraPower™ Lentiviral Expression Systems—for high-level expression in dividing and non-dividing mammalian cells*. Using Polybrene® During Transduction 2015; Available from: <https://www.lifetechnologies.com/de/de/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/protein-expression-protocol/lentiviral-expression-systems.html>.
107. Dimopoulos, K., P. Gimsing, and K. Gronbaek, *The role of epigenetics in the biology of multiple myeloma*. Blood Cancer J, 2014. **4**: p. e207.
108. Agnelli, L., P. Tassone, and A. Neri, *Molecular profiling of multiple myeloma: from gene expression analysis to next-generation sequencing*. Expert Opin Biol Ther, 2013. **13 Suppl 1**: p. S55-68.
109. Andrulis, M., et al., *Targeting the BRAF V600E mutation in multiple myeloma*. Cancer Discov, 2013. **3**(8): p. 862-9.
110. Walker, B.A., et al., *Intraclonal heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms*. Leukemia, 2014. **28**(2): p. 384-90.
111. Fernandez-Medarde, A. and E. Santos, *Ras in cancer and developmental diseases*. Genes Cancer, 2011. **2**(3): p. 344-58.
112. Palumbo, A. and K. Anderson, *Multiple myeloma*. N Engl J Med, 2011. **364**(11): p. 1046-60.
113. Munshi, N.C. and H. Avet-Loiseau, *Genomics in multiple myeloma*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(6): p. 1234-42.
114. Lentzsch, S., et al., *PI3-K/AKT/FKHR and MAPK signaling cascades are redundantly stimulated by a variety of cytokines and contribute independently to proliferation and survival of multiple myeloma cells*. Leukemia, 2004. **18**(11): p. 1883-90.
115. de Brito, L.R., et al., *Comparative pre-clinical evaluation of receptor tyrosine kinase inhibitors for the treatment of multiple myeloma*. Leuk Res, 2011. **35**(9): p. 1233-40.
116. Stellrecht, C.M., et al., *Multiple myeloma cell killing by depletion of the MET receptor tyrosine kinase*. Cancer Res, 2007. **67**(20): p. 9913-20.
117. von Tresckow, B., et al., *Anti-epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in refractory or relapsed multiple myeloma: a phase II prospective clinical trial*. Leuk Lymphoma, 2014. **55**(3): p. 695-7.
118. Amado, R.G., et al., *Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(10): p. 1626-34.
119. Karapetis, C.S., et al., *K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(17): p. 1757-65.

120. Paino, T., et al., *Phenotypic identification of subclones in multiple myeloma with different chemoresistant, cytogenetic and clonogenic potential*. Leukemia, 2014.
121. Steinbrunn, T., et al., *Combined targeting of MEK/MAPK and PI3K/Akt signalling in multiple myeloma*. Br J Haematol, 2012. **159**(4): p. 430-40.
122. Nagaoka, H., et al., *Preventing AID, a physiological mutator, from deleterious activation: regulation of the genomic instability that is associated with antibody diversity*. Int Immunol, 2010. **22**(4): p. 227-35.
123. Ruiz, J.F., B. Gomez-Gonzalez, and A. Aguilera, *AID induces double-strand breaks at immunoglobulin switch regions and c-MYC causing chromosomal translocations in yeast THO mutants*. PLoS Genet, 2011. **7**(2): p. e1002009.
124. Keim, C., et al., *Regulation of AID, the B-cell genome mutator*. Genes Dev, 2013. **27**(1): p. 1-17.
125. Basu, U., et al., *The RNA exosome targets the AID cytidine deaminase to both strands of transcribed duplex DNA substrates*. Cell, 2011. **144**(3): p. 353-63.
126. Pefanis, E., et al., *Noncoding RNA transcription targets AID to divergently transcribed loci in B cells*. Nature, 2014. **514**(7522): p. 389-93.
127. Valtorta, E., et al., *KRAS gene amplification in colorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy*. Int J Cancer, 2013. **133**(5): p. 1259-65.
128. Tan, C. and X. Du, *KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(37): p. 5171-80.
129. Vaughn, C.P., et al., *Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 2011. **50**(5): p. 307-12.
130. Neumann, J., et al., *Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer*. Pathol Res Pract, 2009. **205**(12): p. 858-62.
131. Tyner, J.W., et al., *High-throughput sequencing screen reveals novel, transforming RAS mutations in myeloid leukemia patients*. Blood, 2009. **113**(8): p. 1749-55.
132. Edkins, S., et al., *Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer*. Cancer Biol Ther, 2006. **5**(8): p. 928-32.
133. Loupakis, F., et al., *KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer*. Br J Cancer, 2009. **101**(4): p. 715-21.
134. Smith, G., et al., *Activating K-Ras mutations outwith 'hotspot' codons in sporadic colorectal tumours - implications for personalised cancer medicine*. Br J Cancer, 2010. **102**(4): p. 693-703.
135. Ihle, N.T., et al., *Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome*. J Natl Cancer Inst, 2012. **104**(3): p. 228-39.
136. Chen, Z., et al., *The C-terminal polylysine region and methylation of K-Ras are critical for the interaction between K-Ras and microtubules*. J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 41251-7.
137. Baylin, S.B., *DNA methylation and gene silencing in cancer*. Nat Clin Pract Oncol, 2005. **2 Suppl 1**: p. S4-11.
138. Chandra, A., et al., *The GDI-like solubilizing factor PDEdelta sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(2): p. 148-58.
139. Zimmermann, G., et al., *Small molecule inhibition of the KRAS-PDEdelta interaction impairs oncogenic KRAS signalling*. Nature, 2013. **497**(7451): p. 638-42.
140. van der Hoeven, D., et al., *Fendiline inhibits K-Ras plasma membrane localization and blocks K-Ras signal transmission*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(2): p. 237-51.
141. Fedorenko, I.V., et al., *Beyond BRAF: where next for melanoma therapy?* Br J Cancer, 2015. **112**(2): p. 217-26.
142. Munshi, N.C., et al., *Consensus recommendations for risk stratification in multiple myeloma: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 2*. Blood, 2011. **117**(18): p. 4696-700.
143. Avet-Loiseau, H., et al., *Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p)*. J Clin Oncol, 2010. **28**(30): p. 4630-4.

144. Jagannath, S., et al., *Bortezomib appears to overcome the poor prognosis conferred by chromosome 13 deletion in phase 2 and 3 trials*. *Leukemia*, 2007. **21**(1): p. 151-7.
145. Sagaster, V., et al., *Bortezomib in relapsed multiple myeloma: response rates and duration of response are independent of a chromosome 13q-deletion*. *Leukemia*, 2007. **21**(1): p. 164-8.
146. Neben, K., et al., *Administration of bortezomib before and after autologous stem cell transplantation improves outcome in multiple myeloma patients with deletion 17p*. *Blood*, 2012. **119**(4): p. 940-8.
147. Chang, H., et al., *Impact of cytogenetics in patients with relapsed or refractory multiple myeloma treated with bortezomib: Adverse effect of 1q21 gains*. *Leuk Res*, 2011. **35**(1): p. 95-8.
148. Shi, L., et al., *Over-expression of CKS1B activates both MEK/ERK and JAK/STAT3 signaling pathways and promotes myeloma cell drug-resistance*. *Oncotarget*, 2010. **1**(1): p. 22-33.
149. Liu, X., M. Jakubowski, and J.L. Hunt, *KRAS gene mutation in colorectal cancer is correlated with increased proliferation and spontaneous apoptosis*. *Am J Clin Pathol*, 2011. **135**(2): p. 245-52.
150. Kim, S.T., et al., *Impact of KRAS mutations on clinical outcomes in pancreatic cancer patients treated with first-line gemcitabine-based chemotherapy*. *Mol Cancer Ther*, 2011. **10**(10): p. 1993-9.
151. Mulligan, G., et al., *Mutation of NRAS but not KRAS significantly reduces myeloma sensitivity to single-agent bortezomib therapy*. *Blood*, 2014. **123**(5): p. 632-9.
152. Steckel, M., et al., *Determination of synthetic lethal interactions in KRAS oncogene-dependent cancer cells reveals novel therapeutic targeting strategies*. *Cell Res*, 2012. **22**(8): p. 1227-45.
153. Keats, J.J., et al., *Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma*. *Blood*, 2012. **120**(5): p. 1067-76.
154. Magrangeas, F., et al., *Minor clone provides a reservoir for relapse in multiple myeloma*. *Leukemia*, 2013. **27**(2): p. 473-81.
155. Van Loo, P. and T. Voet, *Single cell analysis of cancer genomes*. *Curr Opin Genet Dev*, 2014. **24C**: p. 82-91.

11. Anhang

Klinische Parameter	DIS3-SNV	DIS3-WT	KRAS-SNV	KRAS-WT
Sex; M/F	2/7	41/30	7, 10	33, 30
Alter zur Diagnose (Jahre)	54 (42-68)	53 (32-70)	54 (34-65)	53 (32-70)
HC; IgA, IgG, IgD, n.a.	3, 5, 0, 1	14, 42, 1, 15	3, 11, 0, 3	14, 36, 1, 13
LC; Lambda, Kappa	5, 4	28, 44	8, 9	25, 39
Stage; IA, IIA, IIIA, IB, IIB, IIIB, n.a.	1, 2, 6, 0, 0, 0	4, 4, 44, 0, 2, 10	2, 1, 11, 0, 0, 2, 1	3, 5, 39, 0, 2, 8, 7
Antwort auf Bortezomib: SD, PD, PR, VGPR, CR	1, 0, 4, 4, 0	5, 2, 21, 27, 9	1, 0, 4, 11, 0	5, 2, 21, 20, 9
Antwort auf HD-Chemotherapie: SD, PD, PR, VGPR, CR	0, 0, 2, 2, 5	0, 0, 10, 25, 27	0, 0, 2, 9, 5	0, 0, 10, 18, 27
Event; nein, ja	2, 7	20, 50	5, 12	17, 45
EFS \geq 12 Monate; nein, ja	1, 8	8, 58	1, 15	8, 51
PFS \geq 12 Monate; nein, ja	1, 7	6, 55	1, 14	6, 48
OS \geq 36 Monate; nein, ja	5, 4	18, 49	5, 11	18, 42

S_Tabelle 1: Klinische Parameter hinsichtlich DIS3- und KRAS-Status (leicht modifiziert nach Weißbach *et al.* [85])

Gen		AMO1	U266	MM1S	OPM2	JJN3	L363	INA6	KMS11	KMS12BM	MOLP8	NCI929	RPMI8226	Median
KRAS	CN	4	1	2	3	2	2	2	2	2	2	1	2	
	LOH		×					×				×		
	GE	2,30	0,00	0,00	1,10	-0,50	-0,60	0,30	0,80	0,00	-0,10	-1,10	0,70	8,48
DIS3	CN	2	2	1	2	1/2	2	2	1	1	2	1	1	
	LOH		×	×	×	×	×		×	×		×	×	
	GE	0,70	0,20	-0,40	0,90	0,00	0,40	0,00	-0,60	-0,20	0,30	-0,30	-0,40	9,15

S_Tabelle 2: CN-, LOH- und GE-Daten zu KRAS und DIS3 (leicht modifiziert nach Leich *et al.* [83])

Gen	Chr	Position (hg 19)	SNV	forward Primer 5' - 3'	reverse Primer 5' - 3'	Probe	Validierung	Validierung
ABL2	1	179078046	A/G	TGTGGCTCTCTGGGCAATAACTT	TCACAGGCTTCTTTACACCACGCT	L363	bestätigt	heterozygot
ACTN3	11	66326713	A/C	TTCTGTAGTGAACAAAGGAGGCCG	CCTGTAGCAAAGCCGAATCGTAGT	L363	bestätigt	heterozygot
ACTN3	11	66321572	C/T	GATTGAGACCATCTGGCTGACAT	TTGAACTCCTGGGCGATCCTCAA	MM1S	bestätigt	heterozygot
ACTN3	11	66314530	C/A	AGATGATGATGGTTATGCAGCCCG	CTAGGTTAAAGACAAGCTCTGCC	L363	bestätigt	heterozygot
ADAMTS19	5	128956417	C/T	ACCATGACAATGACCACCCATCGT	TAGACGTGCTGGGTGATGAACAGT	U266	bestätigt	heterozygot
ADAMTS19	5	128864279	G/A	ATGCCTTGATGAGCTCTGTTCT	AGGGATTAATGGGATCAACAGTGCAG	U266	bestätigt	heterozygot
ADAMTS2	5	178540970	G/T	TCCGAGCATCTCTTTCTCCGCAT	ACATTGACGTGTTTCATGCCTACCC	AMO1	bestätigt	heterozygot
ADAMTS2	5	178581144	G/A	GGCACATGGGCAGTACTCACT	TCAGAGTGGGCCAAGGTCAGGA	OPM2	bestätigt	heterozygot
AKAP1	17	55183432		GCAAATCAGCTGAGGTGTGTAAGC	TTCCAAGACATGCTCCCGAGACAA	Patient 1_Tu	bestätigt	heterozygot
AKAP11	13	42876412	G/C	GCCAAAGAGTTTGACCTGCTACA	ACTGAACCTTCTCCCTGAGTGCT	L363	bestätigt	homozygot
AKAP8	19	15483906	C/T	ATCCGTAGGGCATGGTGTGTCATA	AGGTTATACTGAGGGAGTGGCA	U266	bestätigt	heterozygot
AKAP9	7	91690697	A/G	TGACACAGACAGAGTTGATGCGTG	TTGGATTGACGGCTTCAAACCTG	AMO1	bestätigt	heterozygot
AKT1	14	105239288	G/A	TTCTTGAGCAGCCCTGAAAGCAAG	GGACAAGGACGGGCACATTAAGAT	Patient 5_Tu	bestätigt	heterozygot
ALOX12B	17	7982850	T/C	ATGCAGGTCACACGCTCACATAA	CACGGGATCCCAGACAAGTT	Patient 1_Tu	bestätigt	heterozygot
ALOX12B	17	7976624	A/C	CTTTGGTTTTCAGTGGCCTCTCACT	TTCCAGCTTCAACTCCAGTCCCAA	AMO1	bestätigt	heterozygot
ARAF	X	47430355	T/C	ATCTTTATGGTGGGCCGTGGCTAT	TCACATCTGCCTCCATCTCAGTCT	AMO1	bestätigt	homozygot
ASPSR1	17	79968712	C/T	GTCAAAGCCAGGCCCTGATT	GGAAGGAAGGAGCCGGGAGA	AMO1	bestätigt	heterozygot
ATM	11	108115724	A/G	GACTTTGGCTGTCAACTTTTCG	TCCTAGAGGGAAACAATGTCTCAG	AMO1	bestätigt	heterozygot
BAD	11	64037735	G/T	AAACTCCGATGGGACCAAGCCT	TCCTGGGAGTTGTGGCCTTCATTA	OPM2	bestätigt	heterozygot
BCAN	1	156626789	C/T	ACTCCTGGCATTTAATCGGTGGTC	CATGGGTTAATGAGGAAGGCGGTT	AMO1, OPM2	bestätigt	heterozygot
BLM	15	91328204	G/A	ACGTGTGTGGTCTTCCAGCAGTAT	TTCTGCTGCACTTCATCTCTGGCA	U266	bestätigt	heterozygot
BRAF	7	140453132	T/A	TCTAGTAACTCAGCAGCATCTCAGGG	CACCTCATCTAACACATTTCAAGCCC	U266	bestätigt	heterozygot
BRD7	16	50354643	G/A	TTCCTGGAGTCCCTGAGCAATCT	TGGCTTAGCAAGCGCCAGTAATTG	U266	bestätigt	homozygot
BTBD7	14	93761215	C/T	ATCTTTCTGCAATGTCCGGGCTTC	AATCCCTTGAGCCCAGGAGTTTGA	MM1S	bestätigt	homozygot
CAMTA1	1	7731097	G/T	TTGGGCTCTCCTCTTGCTGATG	TTCTGCCCTAAATCGTCTCTCA	OPM2	bestätigt	heterozygot
CD68	17	7483386	G/A	AACAACCAGCCACAGGACTACCAA	TGTTGGATGAACCGTGGCATTTC	U266	bestätigt	homozygot
CDH11	16	65032507	G/A	TGATTTGGGAGAACGGGCTTCA	TCAGGGAACATTCATGCCACCA	L363	bestätigt	heterozygot
CDH9	5	26988400	T/C	AGAACTGATTCCACATCCAGCCAC	CACGTTGTGGGAAAGTGAACTCAAGC	JJN3	bestätigt	heterozygot
CDHR1	10	85955312	G/A	GGGTGTCGGTCTGTTCTGTGTTCTT	AATTCGGAGAGCAAACAAGGAGCC	U266	bestätigt	homozygot
CELSR2	1	109806783	T/G	AACAGTGATTAAGGCCGTCTGCTG	TGCTGCCATAATCGAAGGACAGA	JJN3	bestätigt	heterozygot
CENPF	1	214818656	G/C	AATGTGGCCAAGGTGAATGACAGC	TCTCCACGAAGCTGGTTTCTCTCA	JJN3	bestätigt	homozygot
CMTM4	16	66657309	C/T	TTGAGAACCACAGCAGTAAGGGA	ACTGAAATATGGAGCCACCAGGGA	OPM2, MM1S	bestätigt	heterozygot
COL6A3	2	238234247	T/C	CATGGGTTGATTTTGAACGTCTTCC	TTGCCGAAAGACGAAGGAACTTGC	Patient 2_Tu	bestätigt	heterozygot
COL10A1	6	116442881	C/T	CCCTTTCTGTCCATTCATACCAGGGA	AAACCAGGAGAGAGAGGACCAT	Patient 1_Tu	bestätigt	heterozygot
COL12A1	6	75823017	G/A	GTTTGCACCTCGCTCTGTATCC	CCACAAGTTGGAGTGATTGCAGATCGT	L363	bestätigt	heterozygot
CRLF2	X	1321349	C/T	TGATGAAACAGCGAATCCACAGC	AGGGACGTGCTTCCGTTATTTCT	JJN3	bestätigt	homozygot
CTNNB1	3	41277329	G/T	TCCTAGCTCGGGATGTTTAC	GAGTGCAAGAGGCATTACA	JJN3	bestätigt	heterozygot
CTNND2	5	11565089	A/G	AACTCGGAGACTGTGACTTGGCAT	ACAGTTTGAAGGCTGACCCGAGA	U266	bestätigt	heterozygot
CYBB	X	37665684	A/G	ACCCTGTGAAATGTCCAGAGCCTT	TTTCAGAGTGCTGGTGGGAGAAT	AMO1	bestätigt	homozygot

Gen	Chr	Position (hg 19)	SNV	forward Primer 5' - 3'	reverse Primer 5' - 3'	Probe	Validierung	Validierung
CYP3A43	7	99447254	T/C	TTAGTGTCTCCATCACTCCCAGCA	TGGAGGTTTCAGTGAGCCCAGAT	OPM2	bestätigt	homozygot
DAB1	1	57480944	C/A	TAAGTGGAGAAGGCCCTCTGAGGTACA	ATGCATCCTTCTTTCCCAGGACAC	JJN3	bestätigt	heterozygot
DCHS2	4	155155969	G/C	ATGGGAGAGCGTGGGTGTTT	TCAGGAAGTAAGGTGTGCAGCTCT	MM1S	bestätigt	heterozygot
DCHS2	4	155243515	G/A	CCTGCAAATTTACCAGAGCCTTGAC	TCATTGCCACTGACCAGGGAGT	OPM2	bestätigt	heterozygot
DDX10	11	108536057	C/G	GCAACTGAAGAAACCCGAATGGCA	AGGAACAGTGTGGCAAGCAGAAGA	U266	bestätigt	heterozygot
DDX20	1	112309145	C/G	AGAGTCCCTGTGTGGCAAGTAGT	TCTTCTGGGCTTCAGTCTGCAAT	OPM2	bestätigt	homozygot
DDX53	X	23019191	A/G	CAACGCCAATTCAGTACAGGCAT	TCGGTCTGGGCGCACATCTAATAA	JJN3	bestätigt	homozygot
DIS3	13	73355008	T/G	TCACAGGAACCCTCTCCCGAATTT	TGATGTTCTTGAGGACCCTGCCAT	OPM2	bestätigt	homozygot
EGFR	7	55219054	A/C	AGTGATTCTACAAACCAGCCAGCC	TGCAAGACTGTCCTTCACTACTGG	AMO1	bestätigt	heterozygot
EGFR	7	55266457	G/C	CTTGCTGGGCATTGCACTAAGCAT	TGTTTCTGGATTTGTGTGCCTGCC	MM1S	bestätigt	heterozygot
EML4	2	42522290	T/G	TCTCAAATCTTGCCCTATCG	TAGTGAATTGCCGCTCCAG	MM1S, U266	nicht bestätigt	
EPHA2	1	16458645	C/T	AGGTGAACCTCCGGTAGGAAATGGC	CTTCGGTAAGGATGTGGGTTGTA	MM1S	bestätigt	heterozygot
EPHA2	1	16462256	T/C	ACAAATCTCTGCTGTGCTGCCTTG	AAAGCTGTAGTGGGCCGAGATCAT	L363	bestätigt	heterozygot
EPHA8	1	22927565	A/C	TACTGGAACATGACCAACCGGAT	TCCTAGTGTGAGGGCCAACTGT	U266, MM1S, Patient 1_Tu	nicht bestätigt	
EPHB2	1	23111000	G/A	ATGTGTGCCTTTCCACCTGATTG	TGCAATGGTATCCACCTTACCACA	Patient 1_Tu	bestätigt	heterozygot
ERBB3	12	56487289	G/A	AATGTCACATCTCTGGGCTTCCGA	TTCTACCACCTAGCAGACCCTTT	L363	bestätigt	heterozygot
ERBB3	12	56487560	A/T	TAATGAAGAGAGGGCTTGCTGGGA	TCATGCTCCGATCTCACAACCACA	AMO1	bestätigt	heterozygot
ETV5	3	185775016	G/C	ATCCAGTGCATACCTCTCCGGTT	TTGTGTTGTGCCTGAGAGACTGGA	OPM2	bestätigt	heterozygot
EXT2	11	44129528	C/T	CCAAGAATGAAGACCAAGCACCGA	TGGTTAAGCACATCGATGGAGGGA	OPM2	bestätigt	heterozygot
EZH2	7	148523651	T/C	TATCAGCAATGTTGCTCTGGCTACC	AGGCGCACTTCTCCTGAATGTA	JJN3	bestätigt	heterozygot
EZH2	7	148524314	A/C	AACAAAGTGTAGTGGCTCATCCGC	TCAGTTAGTAGCAGAGCTGGGAGT	JJN3	bestätigt	heterozygot
FAM46C	1	118166298	A/G	AGAACAGACTGATCGCCACCAAGA	TGCGAAGGATCATGAGGTAGTCGT	MM1S	bestätigt	homozygot
FANCA	16	89831335	C/T	CTGCACATGAGGCCACAACGATTT	TTCAGATTGTTCTCAGAGGCCCGA	JJN3	bestätigt	heterozygot
FANCF	11	22646800	G/A	GACTCAGTTCCAACCAATGCCT	AACCCAAATCTCCAGGAGGACTCT	U266	bestätigt	heterozygot
FGFR1	8	38287238	G/A	GAGCAATGTTAGTGGGCAGCAGTT	GCCAGCGTAATCCCTTTGTCTCT	OPM2	bestätigt	heterozygot
FGR	1	27939850	G/A	CACCTGTTCCAACACTTCCCGTTT	AAGCCTCCCAGGTTCAAGCAATTC	U266	bestätigt	heterozygot
FIP1L1	4	54257205	G/A	TAGACCTTGATGCACCTGGAAGCA	GGACGGTAGACAAGCCAAGGGTATT	U266, MM1S	nicht bestätigt	
FLT4	5	180030301	C/A	TTCAACCAGATGAGTTCCAGCCT	TGTAAGGACCTGGCCAGAATGTG	U266	bestätigt	heterozygot
GATA2	3	128204758	G/A	AGATCTGGGAAACCAACTGCCA	ACTGACGGAGAGCATGAAGATGGA	U266	bestätigt	heterozygot
GPHN	14	66975262	T/C	TTCTCTGGCTCCCTAGCTGTGCG	TAAGGCAATGCAGGGACAGCA	U266	bestätigt	homozygot
GPR124	8	37693202	A/C	TCTGTGCTCCTTCCACATCAAGGT	ACCCAACATCCTGTGTCAGTTCCA	U266, MM1S	nicht bestätigt	
GPR124	8	37689051	C/T	GTGGCTCCTATCTATGGCACCAGATT	TTCCAAAGTGCTGGGATTGTAGGC	Patient 5_Tu	bestätigt	heterozygot
HEPACAM2	7	92826850	C/A	GCTTTCCTGTATTCTGTTCTGGCCT	GCACCACGTTTCCAATCAGGTA	U266, JJN3	bestätigt	heterozygot
HOXA13	7	27238827	G/C	ACCAGGAAGAGAACGAAACGCAC	CTTACCACCACCATCAGCCCAT	OPM2	bestätigt	homozygot
HSD17B1	17	40706724	T/G	ACACCTTCCACCCTTCTACCAAT	AGCGGCTGAGGAAGCCTTACT	Patient 2_Tu	bestätigt	homozygot
IGF1R	15	99482568	G/A	ACCTCCAAGCCTGAGCAAGATGAT	TGCCCAGTATCTGAACCACCATGT	L363	bestätigt	heterozygot
IKBKE	1	206650130	G/A	TCCATGGCCTCATTCTGGTTCTCT	CCCACCGTACATGATCTCCTTGT	Patient 1_Tu	bestätigt	heterozygot
ILK	11	6630132	G/A	TCATGGTTGGTTCACTGACTGCCA	TGCCAGAGTGTGTTTCAGGGTTC	JJN3	bestätigt	homozygot
INSRR	1	156815045	C/T	TTGGGATTATGGGAACTGAGAGGG	AAGGTGACGTCCATCAACAAGAGC	Patient 5_Tu	bestätigt	heterozygot

Gen	Chr	Position (hg 19)	SNV	forward Primer 5' - 3'	reverse Primer 5' - 3'	Probe	Validierung	Validierung
INSRR	1	156821942	C/T	AGGACTCATACTGGTAGGTGCCTG	AGTCGGCAACCAGTGTCTATCTGAA	MM1S	bestätigt	heterozygot
IQGAP3	1	156524153	A/C	ACAGAAGAGTGCTGAGTCTTGCT	TTTAGACCTTCACTGCCACTT	U266, MM1S	nicht bestätigt	
IRF4	6	405075	G/A	TGGTGTGTTCCGGTGATGAGGGTTT	GACCATGCTTCTCCTCACTAGTTT	JJN3	bestätigt	heterozygot
IRS4	X	107977386	T/G	AGGCTTTGAAGCTGCATCTTTGGG	TGAGGATGACCCATACGTGCCAAT	L363	bestätigt	homozygot
IRS4	X	107977403	A/T	AGGCTTTGAAGCTGCATCTTTGGG	TGAGGATGACCCATACGTGCCAAT	L363	bestätigt	homozygot
ITGA6	2	173355989	C/T	TGAATCTGGCACTGTTGGGAGGA	GGCAGCAGCAGTCACATCAATGAA	JJN3	bestätigt	heterozygot
ITGA7	12	56090739	C/T	AAATGACAGGAGAGGGCAGCAGAT	TAACCTGGAAGAACCCAAGCACCA	U266	bestätigt	heterozygot
ITGB1	10	33224484	C/G	GCTTCCAGAAGGAGCAGCATGATT	TTTCGCAAGTGTAGGTGCAAGGTGA	U266	bestätigt	homozygot
JAKMIP1	4	6081975	A/G	TTGGTGAGTCCCAAAGTCAGCACT	TCTGAAGCGGCATACCTCCTTGAA	AMO1	bestätigt	homozygot
KRAS	12	25398284	C/G	TCATGGACCCTGACATACTCCCAA	AAGCGTCGATGGAGGAGTTTGT	MM1S	bestätigt	heterozygot
KRAS	12	25378562	C/T	GTG TTA CTA ATG ACT GTG CTA T	ATG CCC TCT CAA GAG ACA AAA	AMO1, Patient 4_Tu	bestätigt	heterozygot
LAMA5	20	60903450	C/T	TTACTCTCTCACAGCCGACCA	TGGTCCACAGTCTCTGACGATGAT	OPM2	bestätigt	heterozygot
LAMA5	20	60911398	G/A	TCAGGGCACACTCATGGGTACAAT	TCAGGGCTCTATGGCTCTATGGTT	MM1S	bestätigt	heterozygot
LAMB2	3	49160317	G/A	TTGAAGTTCCTGTTGGCCTGTTC	ACACCCTGAGCCTGACAGACATAA	MM1S	bestätigt	heterozygot
LAMC2	1	183201329	C/A	TGGATGATCCCTTGGGTACATGGT	TTCTGTCTGAAGGGAAGTTGGCCT	AMO1	bestätigt	homozygot
LHX5	12	113906140	G/A	AGCTGCTTGGCCTTGATGGT	TGTCGCAGGTTTGGGAGGGAAAT	U266, L363	bestätigt	heterozygot
LPP	3	188327019	C/T	GTTCAACAGCCTCTCCTCCAGTTTC	GGCTGACTTCACCTGCACATTAAGG	U266	bestätigt	heterozygot
LRFN5	14	42355892	A/G	TGTGTCTTCCGTTACAGGCTCT	ATTCCTGGATAGAGTCAGGTCCAC	Patient 1_Tu	bestätigt	heterozygot
LRFN5	14	42360559	A/C	AGTGCAGATGCTGACAAGGACT	TGAGACTGCATGAAATGGCAACGC	U266, MM1S	nicht bestätigt	
LRP1	2	57573303	A/G	AACAGACGGATCCAGAAGAAGGCA	AGTAGGGAGTCAGTTGTTGGGTGT	U266	bestätigt	heterozygot
LRP11	6	150157416	T/C	ACCGTGAATCCTTACCTGGCATCA	TGATTGCCTACTTCTGCCTCCCAA	L363	bestätigt	homozygot
LRP1B1	2	141113924	G/T	AGCTTTGTAGCCTCTGTCGTGGTT	CCCAGCTCCTACTGAATATACTGTG	OPM2	bestätigt	heterozygot
LRP1B1	2	141113930	C/T	AGCTTTGTAGCCTCTGTCGTGGTT	CCCAGCTCCTACTGAATATACTGTG	OPM2	bestätigt	heterozygot
LRP1B1	2	141115674	A/G	AGACTTGTGTATCCCGGTGCTTTG	TGGCCTTGAGAGCTTCAGATAAAGG	OPM2	bestätigt	heterozygot
LRP2	2	170033078	T/G	AAGTTGGAGGCTGAGAGTCTTGCT	AGTGGGTATAGCTCACTTCTGGTAGC	JJN3	bestätigt	heterozygot
LRP8	1	53727820	C/G	GTGCAGGCAGCTCACAGATTGTTT	AAATGTGGGCAGGGAGAGGTACAA	L363	bestätigt	heterozygot
MAF	16	79632985	C/T	TGCACCTCGACGACCGCTTCT	GCCTGGAGATCTCCTGCTTGA	MM1S	bestätigt	homozygot
MAML1	5	179193270	C/T	ACAATCCCAGTCCAAACCTGATGC	TTCAAGTTACTCGGTGGCTGGTGA	L363	nicht bestätigt	
MAP2K2	19	4117541	G/T	AGCTAATCAGAATGCAGAGACCCG	ATAGCAAACGGCCAGATGGAGTCT	AMO1	bestätigt	heterozygot
MAP2K2	19	4117551	A/G	GCCTGGAGCTAATCAGAATGCAGAGA	TTGTTGAGACAGGATCAAGGCAGC	Patient 1_Tu	bestätigt	heterozygot
MAP3K11	11	65365947	G/A	TGAAGGCTTCTGTGCAGTGTAGT	CGGTGGAAGTTGAGTCAAGTAGGT	JJN3	bestätigt	heterozygot
MED1	3	37564266	C/G	AGCCTGACTCACTTCTACTGTCCA	GGTGAGCACAAATCTCCAGCCA	AMO1	bestätigt	heterozygot
MITF	3	70001015	G/T	TGACTTCATTACGTGCACAGC	ACAGCTGTAGGAATCAACTCTCCTC	MM1S	bestätigt	heterozygot
MKL1	22	40807753	A/G	ACAAAGTGCAATCCGAGGTGTCC	TTTCAGCAGATTTCAAGGAGCCGC	AMO1	bestätigt	heterozygot
MLL	11	118376934	G/A	GCAATAACAGCGCATCTAGCATCTG	AAGCAGAATCAAGATCACGCTGGG	MMS1	bestätigt	heterozygot
MLL2	12	49445392	G/T	AGAGTTGCGGCTCCTCAGGTAGT	GCATCTCGTCTGTTCCACCATT	L363	bestätigt	heterozygot
MLLT10	10	22015264	A/G	TTCTCTCAGTCAGGCACCATCTCA	CTGCTTGCTGATGGCTCTGTTGAA	OPM2	bestätigt	heterozygot
MLLT10	10	22016809	A/G	GCAAACCACGCTTCTGTGCTGTAA	CGAACTGATTGAAACCAAGGAAAGGG	AMO1	bestätigt	heterozygot
MLLT3	9	20414231	C/A	CCTGGAAGTCTTTGAAGGCACT	GTATTCATACCAGCAGCAGCAGCA	U266	bestätigt	heterozygot

Gen	Chr	Position (hg 19)	SNV	forward Primer 5' - 3'	reverse Primer 5' - 3'	Probe	Validierung	Validierung
MMP15	16	58075547	A/C	GGGTCTGCTGTAGATGGACAGGATTT	GCCAGACCTTGAACACGAACATCT	U266, MM15, Patient 3_Tu	nicht bestätigt	
MSH6	2	48018227	G/A	ATTTGGTTTGGGCCAAGATGGAGG	CCCATGCCAGAACTTTTCACAACT	U266	bestätigt	heterozygot
MTOR	1	11190698	G/A	ATTTCTCAGAGAGCCTGGCACCTT	TCCAGTGTCTGCTTGCCTTTCT	JJN3	bestätigt	heterozygot
MUC16	19	8993411	C/A	AGAATCTCCAACCACATCACAGCC	TGCCTGGAAGTTGGTGCATTGAGA	L363	bestätigt	heterozygot
MUSK	9	113459684	G/A	GAATTCACGTCCTATCTCTGGCA	TATCTGGAACAACTGAGGGAAGTGGG	L363	bestätigt	heterozygot
MYH11	16	15876295	G/C	GGAGCCCTTGCAAGATTGTGAGAT	ACCTGTGGGTTAAGGGCAGAGTTT	L363	bestätigt	heterozygot
MYH13	17	10265714	T/C	CCAGTCAGCATGAACTGATAGGCA	ACACCAGTAAAGTGCAATGTGGGC	OPM2	bestätigt	heterozygot
MYH2	17	10447433	A/G	TCACAGTCTTCCCTGCACCAGATT	TAAAGCCTGCCAAGCCCTAAAGGT	AMO1	bestätigt	heterozygot
MYH4	17	10348375	T/G	ATGTTTGCGAAGACCCCTTGACAGC	AGCTGAAGAAGGAACAGGACACCA	MM15	bestätigt	heterozygot
MYH8	17	10296261	G/C	TTAGCCCAAGACCTACTGAAGGCA	CACGCAATGCAGAAGAGAAAGCCA	JJN3	bestätigt	heterozygot
MYH8	17	10312678	A/T	TTTCTTCGCGTCTATCTGAGGT	TAAGGCAACGGACACCTCCTTCAA	OPM2	bestätigt	heterozygot
MYH9	22	36710303	T/C	AGACACCTCCACAACCAACACAGA	CTGGCTCCAAAGAGTAAATGTTGCC	MMS1	bestätigt	heterozygot
MYH9	22	36685292	G/A	TCACACTCTTGCACATCATCCT	AGGAGAAGACCATCTGCCAAGT	Patient 5_Tu	bestätigt	heterozygot
NACA	12	57113464	G/A	TCTGAAGCTGTAGGAACCAAGGGT	TCCTGAAGCCACCCTAGCAAAGAA	JJN3	bestätigt	heterozygot
NCAM2	21	22664441	G/T	AGCTTGATAGTGTGACAGAGTGC	TGGCTCCACTCTTCTTACATC	Patient 1_Tu	bestätigt	heterozygot
NCOA2	8	71036260	G/T	TGGGAGTTGGTGGCTAAAAGTCAGA	TAAACGCCTGAGAAACAAGTGCC	JJN3	bestätigt	heterozygot
NCOA2	8	71036930	C/T	TAGAAATTGCTGTGGAAGGCGGTG	TGGCACAACACAGAGTCCCATGA	JJN3	bestätigt	heterozygot
NDOR1	9	140100317	C/G	TTTAGTCTCAGACCAGACCACCG	AACCTCCTCCCTAAATCCGCCAT	L363, Patient 3_Tu, Patient 5_Tu	bestätigt	heterozygot
NRAS	1	115256528	C/T	AGCCTTCGCCTGTCTCATGTATT	AAATTGAACTTCCCTCCCTCCCTGC	L363	bestätigt	heterozygot
NSD1	5	176696634	G/T	GTGTGGGAATGTGGGCAGATGTTT	TCTTATCCTTGCTGCTCAGCTCAC	L363	bestätigt	heterozygot
NTRK2	9	87636308	A/G	ATAGAGTGATCACTCAGGGCCGA	TGTCAGAGTGAAGGAGAGCAGCTT	Patient 5_Tu	bestätigt	heterozygot
NTRK2	9	87338515	C/A	CTCGATTCTGAAACACTCTTGTCTCTC	AGATCTATGAAGCTGATCAAAGTAGCAC	L363	bestätigt	heterozygot
NUP155	5	37351423	T/C	AAACAGCCATCCTTCCAGCCAAG	ACCATCCTGGCTAACACGGTGAAA	OPM2	bestätigt	heterozygot
NUP160	11	47806597	C/T	AATGTGCGGGCATGACAGGTATGA	AGGAAGCTGAAATGGGAGAATCTGGG	OPM2	bestätigt	heterozygot
NUP188	9	131730983	G/A	TTGTACAGACAGAGCGCCAAGTGT	TCCAGTCTTACTCCCTGCATGA	JJN3	bestätigt	heterozygot
NUP98	11	3723971	G/C	CAACACGAAATGAGCGTCCCATGA	AATGTGCTACTCCAGAGCAGCAT	OPM2	bestätigt	heterozygot
PAK6	15	40558460	C/A	GCTGCTCAACGACATCCAGAAGTT	TCCTGACTTACCTTGCTCTGTGGT	MM15	bestätigt	heterozygot
PARP1	1	226568836	C/T	TGAGGCAATTTGTTGGGCTTCGG	TGTCCCGGAACAAGGATGAAGTGA	JJN3	nicht bestätigt	
PARP15	3	122334591	A/G	AACAGCCAAAGATGCCAAGGAACG	TTGGGTATCTCCTGCCATGGGAAT	U266	bestätigt	heterozygot
PARP4	13	25067738	T/C	ATGGACTGCGGTTAAGGCATCTGA	TCTGAGCCAAGAGGTGAGCGATTT	L363	bestätigt	homozygot
PAX3	2	223066678	C/T	GTGGCAATCAGGTTTACGTCTCA	TGGACAGTCTGCCAACATCTCAGT	JJN3	bestätigt	heterozygot
PAX7	1	19062204	G/A	ACCCTCTTCAAGAGAAACACCGA	TGACACCACCTTGAGCTCTCCAT	OPM2	bestätigt	heterozygot
PBRM1	3	52588770	C/T	AACCTTTGGATTCTCAGGGAGGGAAG	GTGTCCTTCAAGGCATGATGGGTG	MM15	bestätigt	heterozygot
PBX1	1	164815893	G/C	AAACAGCCACCCAATCTCAGAGGA	TGATTGCTTCGACCTCCAGTCTGA	MMS1	bestätigt	heterozygot
PCDH10	4	134072888	A/C	TCCAGGTACAAGTGTGCGATGTGA	AGGATGTTGACAGTGGCGTTACCA	AMO1	bestätigt	heterozygot
PCDH15	10	55582708	T/G	AGAAGTGAGGCCTGGGAAAGCAAA	ATTCAGAGGCTGTGGAGTCAGTCA	JJN3	bestätigt	homozygot
PCDH17	13	58240961	G/A	AGCTCCACGTTTAAAGACCAGAA	GGTCCATTCCACTGTGATAAAGTGC	JJN3	bestätigt	heterozygot
PCDH20	13	61987149	A/C	AGCTTGTGGGACTCCAGAACACTT	AAACCCAGGACCAGTATGTGAGCA	AMO1	bestätigt	heterozygot
PCDHGC3	20	140870782	A/C	TTCCTCGTGTCTACACACTGGT	TCGCTGACAGAAAGGTGAAGGTGA	U266, MM15	nicht bestätigt	

Gen	Chr	Position (hg 19)	SNV	forward Primer 5' - 3'	reverse Primer 5' - 3'	Probe	Validierung	Validierung
PCDHGC3	20	140869330	A/C	TGCAATTGGGCTCTGAGGAGAATG	ACTGAGGATTGGAAGGTTGGAGCA	MM1S	nicht bestätigt	
PCDHGC3	20	140870727	C/A	CCCATTGCATGCCAACACATCTCT	TCGCTGACAGAAAGGTGAAGGTGA	JJN3	bestätigt	heterozygot
PDE4DIP	1	144886244	C/T	TCAGTTCCTCCTCAGCTTTCCTCT	TAGCTTGCAAGGTGGCTTTGGAG	AMO1	bestätigt	heterozygot
PDE4DIP	1	144930805	G/C	CCGGAGCGGCAAATAATCTTCACA	AGCCCTCCACAACAGAAAGATGAG	MMS1	bestätigt	heterozygot
PIK3CA	3	178936091	G/A	TCCTAATCTGGTCTTGTGTGGCT	AGCACTTACCTGTGACTCCATAGAA	L363	bestätigt	heterozygot
PKHD1	6	51887680	C/T	CAGATGTCTTCAGCAACCTCACCTCA	GTGCATGTGTTGGAGCGGGATTT	JJN3	bestätigt	heterozygot
PKHD1L1	8	110472023	T/C	ATTGCATCTGTCTGTCTGATGGC	GGCATGATTATACCAACCACGAGAGC	L363	bestätigt	heterozygot
PLEKHG2	19	39914638	G/T	ATGGCCAGGGTCTACATGTTTCCA	ATATTGGTTGGGCTCTCGCTGTCT	AMO1, OPM2	bestätigt	heterozygot
PRDM10	11	129784708	T/C	ACACGGCATTATAAGGCAAAGGG	ACACCATACACACCACTGACGA	AMO1	bestätigt	homozygot
PRDM16	1	3328907	C/A	TCTATCCCAGCACTATTCTTCCCG	TTGGGCTTGGTGGTGGAGATCAAAG	JJN3	bestätigt	heterozygot
PRDM2	1	14108656	A/T	AGTGACAAGAAGAGGTACACGCCT	CTGCGGTGGTTGCTGTTACTGTTT	L363	bestätigt	heterozygot
PRDM2	1	14149672	A/G	ATTCTTCATCTGGGTGCCAGCTCT	TATCATCCCAAAGGACAGCGTGGA	JJN3	bestätigt	heterozygot
PRDM7	16	90128442	C/T	TGGCTGCCTCTCGTCTTCTGTAA	TAATCCCTGCTTCCCTCACTTCCA	L363	bestätigt	heterozygot
PRKCI	3	169981188	G/A	AGGGTCAGGTTGAAATCTGGGTCA	ACAAGGTCTCACTTTGTTGCCAG	MM1S	bestätigt	heterozygot
PRKD3	2	37513440	C/A	ACCTTTACACTGCATTCTTGGCG	TCTTGTGGTTAAGCTCTGCTCCA	U266	bestätigt	heterozygot
RAF1	3	12650334	T/G	TGGAGTATGAATGCCACCAA	TGGAGGCCAAGAAATGAAGT	L363	bestätigt	heterozygot
RB1	13	48934228	A/G	CAGGGGAAGTATTACAAATGGAAGATG	TGGTTCTAAGGCTGACAGGATG	U266	bestätigt	homozygot
RB1	13	48951156	G/T	CCTCCTAAAGAACTGCACAGTGAATCC	AATAGCAGCATACACAGGCAGCAG	U266	bestätigt	homozygot
RELN	7	103252138	T/A	AGGCAGAAGGTTACCTGTTACAAGGTTT	GCCTCAAGTATGCGCTATGTGGAA	U266	bestätigt	heterozygot
RELN	7	103191602	C/T	CACAAAGGTGCAGTCTCCAAAGT	AACGTTGGCTGTTGACTGATAGC	U266	bestätigt	heterozygot
RIF1	9	152293353	C/T	AGCCCAGGAGTTGAGGTTGTAGT	TCAAGGCTTCTGGACCCAACAAGA	L363	bestätigt	heterozygot
RIF1	9	152285316	A/G	TGTTCTGTGTTGATATTGTCTGCTTC	GCAAGAGCGACCCTGTCTCAAA	OPM2	bestätigt	heterozygot
RIMS2	8	104898191	G/A	AGAGGCTCAGGGACCAAGTTCTTA	TTATGAGGCTTTGGTGGTGGAGGT	Patient 1_Tu	bestätigt	heterozygot
RNF213	17	78350110	G/A	GTGGAGGAACACATAACCAAGCTGT	TTCCAGTGAAGGCCGATGGAATTG	OPM2, JJN3	bestätigt	heterozygot
RPN1	3	128369597	G/C	GTCCTCATTGATCAGCGGCGGT	CCATCTTGTGTACCAGCCCTTGC	MM1S	bestätigt	heterozygot
RUNX1T1	8	92999151	G/C	CACAATAGAACAGTAGCCACCGA	GAGTTTGCCACATAGTCTTGTCT	OPM2	bestätigt	homozygot
SDK1	7	4277369	C/T	CGGCTGGACATTGGTTTCATCTCA	TCCAGAGAGAACGAACGCTATGT	MM1S	bestätigt	heterozygot
SDK1	7	4119176	A/G	AGTTTCTCATCAGGGAGGCCATGT	AAATGCCAGCTCCCAGTCTAACGA	Patient 1_Tu	bestätigt	heterozygot
SDK1	7	4285328	C/A	TCAGGGTGTGTTTGTACGTGAGT	ATGCATCTGCCGACTTCTCCTTGA	JJN3	bestätigt	heterozygot
SHC4	15	49118251	C/T	CCTGGTCCATGATGGTCTTGAAA	TGTCGGCCACCTTATCAGATACCA	AMO1	bestätigt	heterozygot
SIGLEC1	20	3672050	G/A	ACAACCTGCAGGATGAGGCGAATG	GCAACTCCACCTTTCATGGTTCT	MM1S	bestätigt	heterozygot
SIGLEC1	20	3674990	A/C	ACCATCGTTAGGAAGGGTGGGAAT	ATCAGCCTCCAGTGTCTGTAA	U266, MM1S	nicht bestätigt	
SLC45A3	1	205633769	A/C	ATGTAGTGACTCACCCAGCACCAT	AGAGCCGAGACGAAGCAGTTCT	MM1S, U266	nicht bestätigt	
SLITRK2	X	144904104	G/T	ACTCCGCTCCTTGTCTTACCATT	TCCGATCTCCTGTAACCCGTTGTT	AMO1	bestätigt	homozygot
SLITRK2	X	144904697	A/T	CAGCAATGTGTTCCGCTTGTCTCT	TGGTTGGGTTGAGAGCAGGATTCA	U266	bestätigt	homozygot
SRGAP3	3	9057302	G/A	TGCGAAACCAAGTCTTCTCTGGT	TTCCCATCTGCCTTCTCTGTGGT	OPM2	bestätigt	heterozygot
STAM2	2	153000426	C/T	GGGCATTACACTTAAACCTTCCCA	AAATGTCATGGTTCCCTGCCCTG	Patient 1_Tu	bestätigt	heterozygot
STAT3	17	40469209	C/T	GGGCTTCCAACCTTGGCAGATTA	TCCAGCTCTGCTTACTGAATCGGA	AMO1	bestätigt	heterozygot
TAF15	17	34171886	G/T	TATGGAGGAGATCGAGGTGGCTAT	CCCAATCTAGGTGCAGTGAGGTAA	AMO1	bestätigt	heterozygot

Gen	Chr	Position (hg 19)	SNV	forward Primer 5' - 3'	reverse Primer 5' - 3'	Probe	Validierung	Validierung
TAF9	5	68651605	T/C	ACCAGCGTTCAGGGAAGAAATCAC	GGCTATGATGAAGAGTATGACTGTCCC	U266	bestätigt	heterozygot
TEP1	10	20849117	G/A	AGTAAGTCTCAAAGTGTGGCCCTCTG	TCCTGCCCTTCTTCTCAAGTCCT	MM1S	bestätigt	homozygot
TET2	4	106157485	A/G	ACAGGCAGCACAAACACAACCATC	GCTCCTGTTCTTGAAGCACCTGT	AMO1	bestätigt	heterozygot
THBS1	15	39884967	A/G	TCAGACCGCATTGGAGATACCTGT	ATGACTCACCGTCAGAGTCCTTCT	AMO1	bestätigt	heterozygot
THBS1	15	39874477	G/A	CGGAGACAACAGCGTGTGACAT	TTGGAACCTGTCATCAGGCACAGG	Patient 1_Tu	bestätigt	heterozygot
TLN2	15	63111778	G/A	AGTGTGCTTCTTCCGTGCCAGT	TCCTCACTGTATTCCTGGCTGCAT	L363	bestätigt	heterozygot
TNC	9	117792613	A/C	TGTCAGAGTGCATCAGGAGGAGAT	TCCTGCACTGAGAGCATCACCAT	AMO1	bestätigt	heterozygot
TNFRSF10A	8	23059430	C/T	TAGGGTTCCTTGCTTCTGTGGTT	TGTGCCTCCTTGTACTGACCAT	JJN3	bestätigt	homozygot
TNFRSF17	16	12059238	T/G	CACGAAGCAGGCGAAGTTCATTGT	ACGCTGACATGTTAGAGGAGGAGT	JJN3	nicht bestätigt	
TRIM24	7	138239499	G/A	GGGCTCATGAGATCAGAGAATTTCTTGGC	AGCTAGGCTGATCTGTGTTGGGAA	MM1S	bestätigt	homozygot
TYK2	19	10476435	C/A	TCCTCCTTGTTACCTCCTCCTCTA	TCAAAGAGGTTAAGCCACTTGCCC	MM1S	bestätigt	heterozygot
UGT2A3	4	69795626	T/C	TGTGGCTGGAATTAACAGGATTACCC	CACCATGATCAACCTGTAAAGCCC	AMO1,U266,MM1S,OPM2,JJN3,L363	bestätigt	heterozygot
USP7	16	8994457	G/A	ACCCAGAGAAAGCCTCTCAACAGT	TGTTAGGTCTACCAGCTAACTCAGGG	L363	bestätigt	heterozygot
VCAN	5	82833674	A/G	GTCTTCAGGAGAGATTGCCATTGACC	TCTTCTTCTGCTTCTCCAGAGCCT	Patient 1_Tu	bestätigt	heterozygot
WHSC1	4	1962801	G/A	TGTGTGGTGCCCGTCTAAGTGAT	AGCTCACAGTGGAGTCCGCATTA	MMS1	bestätigt	heterozygot
WNT5B	12	1755086	G/A	CTGAGCACTGAGCATCTTGAAA	CTGCACGCTCTTGAAGTGGTTGTA	MM1S	bestätigt	heterozygot
WRAP53	17	7592285	G/C	AATGCGGACTCTGAACTGATGCCA	ACTGCCATCACCACTTACGTGTCT	JJN3	bestätigt	homozygot
XPA	9	100456006	C/G	CTGGTGCCTCATTTACGCTATCAAG	TGCTCTGTAGACTAGCTGGGACCTT	MM1S	bestätigt	heterozygot

S_Tabelle 3: WES-Validierung (leicht modifiziert nach Leich *et al.* [83])

A: 79 Gene		B: 193 Gene				
UBA3	CEP110	CD1B	RBMS3	PCDHGs	IGF1R	WNT10A
NDOR1	NTRK2	COG5	SCN5A	RBKS	IL6ST	HHATL
KRAS	TMEM8C	DCHS2	SEMA3F	ADAMTS19	IRF4	NMD3
EPHA8	PDZD7	FHDC1	GRIA2	CAMTA1	ITGB1	FAM5C
RIF1	FADS2	GPR112	HOPX	ADAMTS2	KIAA0100	POLR1C
HK3	LUZP2	KRAS	RAD50	AMT	KIAA0922	TNNI3K
KLHL32	OR51V1	LYST	RNF44	AUTS2	KLHL6	HAS2
SDK1	PAMR1	SIGLEC1	VCAN	COL12A1	LRP8	HCLS1
GPR124	RIC3	SLC12A2	RNF8	FMN1	MECOM	HPSE2
SPATC1	GLI1	SPRED1	ZBTB22	GPRIN2	MYH11	KCTD3
KRT6A	FARP1	TNKS1BP1	CLIP2	JAG2	MYH8	PTGFR
SYT10	AKT1	WHSC1	ETV1	KIAA1109	MYO9A	RAB7L1
LRFN5	SHF	ZZEF1	TRPV5	LAMA5	NCOR1	RHBG
THBS1	MT1M	LAMB2	PAG1	NAV3	NEBL	BCS1L
PRSS27	SPNS1	BTBD7	RIMS2	PCDH10	PCDH20	TMEFF2
HMHA1	STX4	FAM46C	XKR6	PKHD1L1	PDE11A	TTYH1
MAP2K2	AKAP1	UBA3	CEP110	PKP1	PKHD1	ZNF578
MYH9	GRIN2C	NDOR1	NTRK2	RFX1	PLEKHG2	LPIN3
HEATR3	HSD17B1	EPHA8	TMEM8C	SORCS2	PON3	ANK2
STAM2	TMEM49	RIF1	PDZD7	SPEF2	RAD54L2	AP1M1
AVPR1B	KCNJ14	HK3	FADS2	TJP3	RALGAPB	BCAN
BCL9	RYR1	KLHL32	LUZP2	UBN1	RB1	DIS3
EPHB2	SMARCA4	SDK1	OR51V1	ZBTB45	RELN	DNAH5
HDGF	STRN4	GPR124	PAMR1	AGAP2	SEC13	FGFR1
KCTD3	TTYH1	SPATC1	RIC3	ARPP21	SETX	FRMPD1
PTGFR	ZNF578	ACTN3	GLI1	ASH1L	SKP2	GNPAT
RAB7L1	LPIN3	KRT6A	FARP1	ATG2A	SLC4A5	GPRC6A
RHBG	NASP	SYT10	AKT1	ATP9A	SLCO1B3	ZNF148
BCS1L	SPG11	LRFN5	SHF	BRAF	SLITRK2	ZNF569
TMEFF2	SPG12	THBS1	MT1M	C6orf146	SPATS2	ZNF630
WNT10A	ACTN3	PRSS27	SPNS1	C7orf50	ST13	NASP
HHATL	PAG1	HMHA1	STX4	C9orf93	TBC1D1	SPG11
NMD3	RIMS2	MAP2K2	AKAP1	CDC42BPB	TNC	SPG12
RBMS3	XKR6	MYH9	GRIN2C	CDH11	TP53	
SCN5A	VCAN	HEATR3	HSD17B1	CELSR2	TRAPPC10	
SEMA3F	RNF8	STAM2	TMEM49	CHL1	TRIO	
GRIA2	ZBTB22	AVPR1B	KCNJ14	CSMD3	TSHZ3	
HOPX	CLIP2	BCL9	RYR1	CSNK1G3	USH2A	
RAD50	ETV1	EPHB2	SMARCA4	CUBN	VWA2	
RNF44	TRPV5	HDGF	STRN4	DIAPH2	ZMYM4	

S_Tabelle 4: Mutierte Gene nach Filterstrategie (leicht modifiziert nach Leich *et al.* [83])

Genset Name TOP 20	Gene im Genset	Gen-Überlappung	p-Werte
ACEVEDO_LIVER_CANCER_WITH_H3K27ME3_DN	226	18	1,10E-12
KEGG_MELANOMA	71	8	1,69E-07
BIOCARTA_TEL_PATHWAY	18	5	3,44E-07
KEGG_PROSTATE_CANCER	89	8	9,86E-07
KEGG_PATHWAYS_IN_CANCER	328	14	9,99E-07
KEGG_GLIOMA	65	7	1,40E-06
KEGG_BLADDER_CANCER	42	6	1,49E-06
NIKOLSKY_MUTATED_AND_AMPLIFIED_IN_BREAST_CANCER	94	8	1,50E-06
KEGG_TIGHT_JUNCTION	134	9	2,41E-06
GRESHOCK_CANCER_COPY_NUMBER_UP	322	13	4,52E-06
KEGG_NON_SMALL_CELL_LUNG_CANCER	54	6	6,75E-06
KEGG_SMALL_CELL_LUNG_CANCER	84	7	7,93E-06
KEGG_FOCAL_ADHESION	201	10	9,76E-06
GRESHOCK_CANCER_COPY_NUMBER_DN	347	13	1,01E-05
LIN_MELANOMA_COPY_NUMBER_UP	67	6	2,38E-05
KEGG_LONG_TERM_DEPRESSION	70	6	3,06E-05
KEGG_CHRONIC_MYELOID_LEUKEMIA	73	6	3,89E-05
NAKAMURA_METASTASIS	47	5	5,04E-05
KEGG_ENDOMETRIAL_CANCER	52	5	8,25E-05
KEGG_ECM_RECEPTOR_INTERACTION	84	6	8,58E-05
Genset Name in TOP 50	Gene im Genset	Gen-Überlappung	p-Werte
VERRECCHIA_RESPONSE_TO_TGFB1_C4	11	3	9,59E-05
VERRECCHIA_DELAYED_RESPONSE_TO_TGFB1	36	4	2,44E-04
REACTOME_INTEGRIN_CELL_SURFACE_INTERACTIONS	81	5	6,50E-04
REACTOME_SIGNALING_BY_EGFR	48	4	7,45E-04
KEGG_NEUROTROPHIN_SIGNALING_PATHWAY	126	6	7,52E-04

S_Tabelle 5: GSEA Signalweg-Annotierung von 193 Genen (leicht modifiziert nach Leich *et al.* [83])

RTKs		
BDNF/NT-3 growth factors receptor	FMS	ROR2/NTRKR2
PDGFRA/CD140a	MET	VDR/NR1L1
PDGFRB/CD140b	RET	FGFR2
CD115 antigen/CSF1R	SRC	FGFR3
FLT4/VEGFR4	DDR1	MED1
Srcasm/TOM1L1	DFGF-R1	FGR
CD221 antigen/IGF1R	DTK	MuSK
Derailed protein	EGFR2	NTRK2
Doughnut protein	RTK6/PTK3	EPHB2
Anaplastic lymphoma kinase	ErbB-2	EPHB1
angiopoietin 1 receptor/TEK	FGFR1K	NTRK3
Brain-specific kinase	FGFR4	NTF3
Breathless protein	GHR	FYN
Cadherin 96Ca	HER-1	NTRK1
CD117 antigen	HTK/EPHB4	HER3/ERRB3
CD136 antigen/MST1R	JAK1	FGFR1
CD167a antigen	KGFR	EPHA8
CD202b antigen	KIT	EGFR1
CD220 antigen	LTK	EPHA2
Cell adhesion kinase	Mer	EmRK2
discoidin domain receptor 1	Met RTK	ALK/CD246
discoidin domain receptor 2	MST1R/RON	AXL/UFO
embryonic receptor kinase	TNK2	CD117
ephrin type-A receptor 1	NGFR	
ephrin type-A receptor 3/CEK4	ROS	
ephrin type-A receptor 4	Pyk-2/PTK2B	
ephrin type-A receptor 5	ROR2	
ephrin type-A receptor 7	RTK	
Flk-1/VEGFR2/KDR	STK-1	
FLT3/FLK2/CD135	Tie1	
HEK2/EPHB3/ETK2	Tie2	
Rse/TYRO3/SKY/TIF	RYK	
ErbB-4 receptor	RET	

S_Tabelle 6: Bekannte Rezeptortyrosinkinasen (leicht modifiziert nach Leich *et al.* [83])

Adhäsionsmoleküle				
Contactin-6	NrCAM	CRTAC1	TGM4	CD18
Contactin-AP2	OBCAM/OPCML	CTGF/CCN2	TGM7	CD61
ALCAM/CD166	OCAM/NCAM2	CTHRC1	TGM6	CD104
AMICA/JAML	PEAR1	Cyr61/CCN1	Vitronectin/VTN	Integrin beta 5
ASAM	SALM2/LRFN1	DPT	vWF-A2	Integrin beta 6
BCAM	SALM3/LRFN4	DMP-1	WARP	Integrin beta 7
BOC	SALM4/LRFN3	ECM-1	WISP-1/CCN4	Integrin beta 8
CD31/PECAM-1	SALM5	COL18A1	CD49a	MIG2
CDO	CD172a	SPON1	Integrin alpha 1 beta 1	CASL
CEACAM-1	SIRP beta	FMOD	Integrin alpha 11 beta 1	NID1
CEACAM-3	TCAM-1	FN1	CD49b	NID2
CEACAM-4	THBS1	FBLN1	Integrin alpha 2 beta 1	NIF
CEACAM-5	THBS4	Fibulin 5	CD41	OPN
CEACAM-6	THSD1	FLRT1	CD49c	PXN
CEACAM-7	TROP-2	FLRT2	VLA-3	PINCH1
CEACAM-8	UBE2S	FLRT3	CD49d	RAGE
L1CAM-2	VCAM-1/CD106	IL-32	Integrin alpha 4 beta 1	RIAM/APBB1IP
CLP24	VSIG3	IL-32 alpha	LPAM-1	TLN
CLP1	Agrin/AGRN	IL-32 beta	CD49e	Talin2

Adhäsionsmoleküle

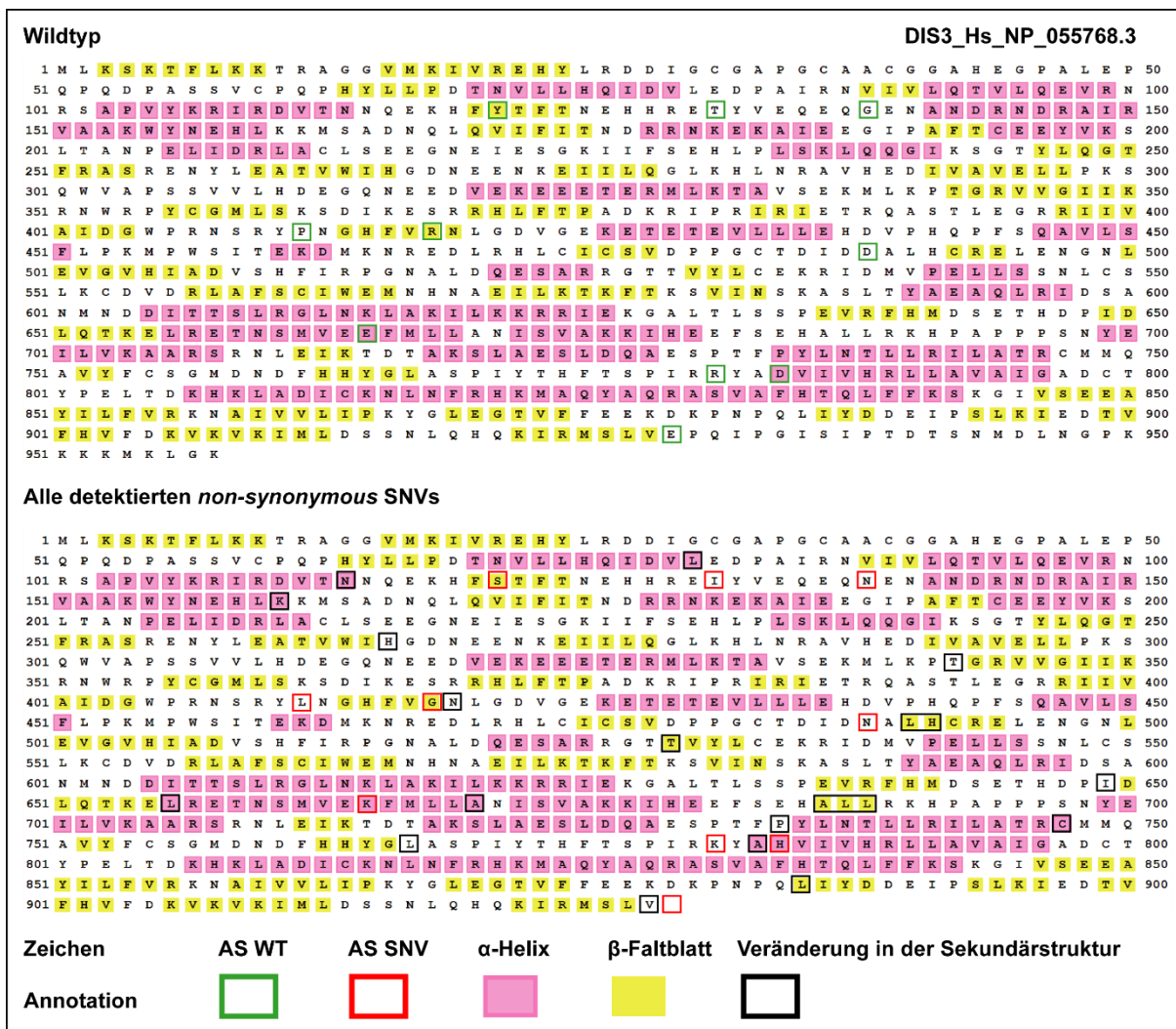
DSCAM	beta IG-H3	IL-32 gamma	Integrin alpha 5 beta 1	TNXB
DSCAM-L1	C4.4A/LYPD3	Laminin alpha 1	CD49f	TIN-Ag
EpCAM/TROP1	CHI3L1	Laminin-5	Integrin alpha 6 beta 4	TSPAN8
ESAM	CHI3L2	Laminin alpha 4	Integrin alpha 7	TSPAN9
HepaCAM	ECF-L	Laminin gamma 1	Integrin alpha 8	TSPAN1
HepaCAM2	CHIA	Laminin 5	Integrin alpha 9	TSPAN7
ICAM-1/CD54	CILP-1	Laminin-1	Integrin alpha 9 beta 1	ASGPR1
ICAM-2/CD102	Cochlin	Lamin alpha 2	CD103	CD93
ICAM-3/CD50	COL1	Lamin beta 2	Integrin alpha E beta 7	FCER2
ICAM-4	COL1A1	Lamin beta 3	CD11a	CD72
ICAM-5	COL2	Lamin alpha 5	PARVA	KLRD1
IGSF4A	COL4	Lamin gamma 2	TGBB1	CLEC13A
IGSF4B	COL4A1	Lamin beta 1	TGB2	Chondrolectin
IGSF4C	COL3A1	MAGP-1/MFAP2	TGFBR3	COLEC11
IGSF4D	COL13A1	MAGP-2/MFAP5	TGFBR2	COLEC12
IGSF2	COL23A1	Matrilin-2/MATN2	CD47	COLEC10
IGSF11	COL25A1	Matrilin-3	CD63/LAMP3	CLEC-1
IGSF3	COL22A1	Matrilin-4	CD151	CLEC-2
IGSF22	COL7A1	MIA	CYTH1	CLEC3B
IGSF8	COL17A1	Mindin/SPON2	DMP-1	CLEC4D
IGSF1	COL6A3	NPNT	EDIL3	CLEC4F
ISLR-2	COL10A1	NID-1	EGF-L6	CLEC9a
JAM-A	COL22A1	NID-2	IBSP/Sialoprotein II	CLEC-2A
JAM-B/VE-JAM	COLEC10	CCN3	ICAP-1	CLEC10A
JAM-C	COLEC12	OPTC	ILK	CLEC14A
JAM-4/IGSF5	COL6A2	PRELP	ITGB1BP2	CLEC4L
Kilon/NEGR1	COL24A1	FREM1	MEPE/OF45	DC-SIGN
Kirrel1/NEPH1	COL9A2	R-Spondin 2	MFG-E8	DC-SIGNR
Kirrel2/NEPH3	COL9A1	RELN	Integrin alpha L beta 2	CLEC4B
Kirrel3/NEPH2	COL8A1	SMOC-1	Integrin alpha M/CD11b	CLEC4A
LAMP	COL4A5	SMOC-2	Integrin alpha M beta 2	DEC-205
MAdCAM-1	COL4A1	SOD3/EC-SOD	Integrin alpha V/CD51	CLEC7A
MCAM/CD146	COL19A1	SPARC	Integrin alpha V beta 1	CLEC6A
MDGA1	COL14A1	SPARCL1	Integrin alpha V beta 3	CLEC6A
MDGA2	COL6A6	EGFL7	Integrin alpha V beta 5	CLEC12B
MFG-E8	COL5A1	TNC	Integrin alpha V beta 6	FCN1
NCAM-1	COL11A1	TNR	Integrin alpha V beta 8	Ficolin-2
L1CAM	COL4A4	THBS1	Integrin alpha X/CD11c	Ficolin-3
NCAM2	COL18A1	THBS2	Integrin alpha X beta 2	Klre-1
NPHS1	COL16A1	THBS4	Integrin alpha 10	CD207
NFASC	COL12A1	TIN-Ag	Integrin alpha 10 beta 1	LAYN
NINJ1	THBS5	TGM2	Integrin alpha 11	LOX-1
Ninjurin-2	CRISP-3	TGM3	Integrin beta 1/CD29	CLEC4G
CLEC2i	NCAN	AMIGO3	NRXN3b	CPB2
PLA2R1	SPAM1	CA125	NRXN1	CPE
FREM1	Stabilin-1	MUC21	ODZ1	CPXM1
Reg1	Stabilin-2	MUC4	ODZ2	PRCP
Reg1A	TSG-6	MUC20	ODZ3	CPGL
Reg1B	ACAN	MUC6	ODZ4	MMP-12
Reg2	AGRN	MUC17	VCL	MMP-13
Reg3A	BGN	MUC13	ADAM8	MMP-14
Reg3B	BCAN	MUC12	ADAM9	MMP-15
Reg3D	DCN	MUC2	ADAM10	MMP-16
Reg4	DSPG3	MUC5AC	ADAM12	MMP-19
CLEC11a	DAG1	MUC7	ADAM19	MMP-24
SIGNR1/CD209b	ESM-1	CD2	ADAMTS1	MMP-25
SIGNR3/CD209d	PODLX2	CD6	ADAMTS3	SPOCK1
SIGNR4/CD209e	HSPG2	CD9	ADAMTS4	SPOCK2
SIGNR7/CD209g	FMOD	CD34	ADAMTS5	SPOCK3
SP-D	GPC1	CD36	ADAMTS8	TIMP
LGALS1	Glypican 2	CD43	ENPEP	TIMP-1
Galectin-2	Glypican 3	CD44	ERAP2	TIMP-2
Galectin-3	Glypican 5	CD58	ANPEP	TIMP-3

Adhäsionsmoleküle				
Galectin-3BP	Glypican 6	CD63	ONPEP	TIMP-4
Galectin-4	LUM	CD84	XPNPEP1	TRA-1-85
Galectin-7	OGN	CD90	XPNPEP2	
Galectin-8	ARSA	CD96	ARTS1	
Galectin-9	ARSB	CD98	DPEP3	
Galectin-10	ARSG	CD99	DPEP1	
Galectin-14	ARSD	CD99-L2	ANPEP	
CD83	ARSE	CD164	FNPEP	
MAG/Siglec-4a	GUSB	CD229	RNPEPL1	
Siglec-1	CHST15	DOCK3	BoNT-A Light Chain	
Siglec-2	EXTL1	DOCK1	BoNT-B Light Chain	
Siglec-3	EXTL2	DOCK7	BoNT-C1 Heavy Chain	
CD170	EXTL3	GPR56	BoNT-D Heavy Chain	
Siglec-14	GNS	GPR101	CPA1	
CD327	NCAN	GPR112	CPA2	
CD328	CSPG5	GPRASP1	CPA4	
Siglec-9	NG2	GPR124	CPB1	
Siglec-10	OPTC	GPR155	MMP-1	
Siglec-11	OSAD	GPR142	MMP-2	
Siglec-14	PODN	GPR199	MMP-3	
Siglec-16	PRELP	GPR64	MMP-7	
Siglec-E	SGCD	GPR111	MMP-8	
Siglec-F	SDC1	GPR45	MMP-9	
SELE	Syndecan-2	GPR123	MMP-10	
CD44	Syndecan-3	GPR116	MMP-11	
SELP	Syndecan-4	GPR125	ADAM22	

S_Tabelle 7: Bekannte Adhäsionsmoleküle (leicht modifiziert nach Leich *et al.* [83])

RTK, Adhäsion, <i>downstream</i> -Effektoren							
MMP15	CELSR2	ODZ1	TYK2	ADAMTS18	ALOX12B	ITGA10	EPHB2
MUC4	GPC6	SIGLEC1	KRAS	CDH11	HSD17B1	NTRK2	
COL10A1	ITGB1	WHSC1	NRAS	STAM2	NCAM2	EGFR	
SDK1	LAMB1	LAMB2	BRAF	IKBKE	ADAM29	ERBB3	
LRFN5	PCDH15	PCDHGA7	MAP2K2	ADRBK1	ADAMTS1	IGF1R	
THBS1	PCDH17	ADAMTS19	BCAN	AKAP1	ADAMTSL1	TTN	
SLAMF1	PCDH20	ADAMTS9	COL17A1	HK3	TNC	NRXN1	
COL6A3	RELN	CAMTA1	COL7A1	COL16A1	TGFBR2	ODZ4	
VCAN	SPOCK1	ADAMTS2	DCHS1	HS6ST3	CHIA	PCDH10	
THSD7A	TLN2	COL12A1	DCHS2	LAMA5	NTRK1	EPHA8	

S_Tabelle 8: Mutierte Gene des RTK- und Adhäsions-Signalweges (leicht modifiziert nach Leich *et al.* [83])



S_Tabelle 10: Veränderungen der Sekundärstruktur von DIS3 durch SNVs (leicht modifiziert nach Weißbach et al. [85])

Probe	Sex	HC	LC	Stage	Alter bei Diagnose	OS (Monate)	EFS (Monate)	PFS (Monate)	Therapieantwort nach Bortezomib	Therapieantwort nach HD-Chemo	Chr 1q21-Zugewinn	Chr 9q34-Zugewinn	Chr 13q14-Deletion	Chr 17p13-Deletion	t(4;14)	t(11;14)	t(14;16)	t(8;14)	t(14;20)	DIS3-SNV	KRAS-SNV	
P1	1	IgA	K	IIIA	68	27	27	NA	PR	VGPR	-	-	✗	-	✗	-	-	-	-	-	✗	-
P2	1	IgG	L	IIIA	56	59	59	59	VGPR	CR	✗	-	✗	-	✗	-	-	-	-	-	✗	-
P3	2	IgG	K	IIIA	57	7	7	7	SD	PR	-	-	✗	✗	-	-	-	-	-	-	✗	-
P4	2	IgG	L	IA	60	23	21	21	PR	VGPR	✗	-	✗	✗	-	-	-	-	-	-	✗	-
P5	1	IgG	L	IIIA	43	80	25	25	PR	CR	✗	-	✗	-	-	✗	-	-	-	-	✗	-
P6	1	IgG	L	IIA	60	110	59	59	VGPR	CR	✗	✗	✗	-	✗	-	-	-	-	-	✗	-
P7	1	IgA	K	IIA	44	81	57	57	VGPR	CR	-	✗	-	-	-	✗	-	-	-	-	✗	-
P8	1	NA	K	IIIA	57	33	21	21	VGPR	CR	-	-	✗	-	-	-	✗	-	-	-	✗	-
P9	1	IgA	L	IIIA	42	32	25	25	PR	PR	-	-	✗	-	-	✗	-	-	-	-	✗	✗
P10	1	IgG	K	IIIA	52	82	36	36	PR	VGPR	-	✗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✗
P11	1	IgG	K	IIIA	55	113	71	71	VGPR	VGPR	✗	✗	-	-	-	-	-	✗	-	-	-	✗
P12	1	IgG	K	IIIA	56	60	15	15	PR	VGPR	-	✗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P13	1	IgG	K	IIIA	34	30	19	19	SD	VGPR	-	-	-	-	-	✗	-	-	-	-	-	✗
P14	1	IgG	K	IIIA	60	42	19	19	VGPR	VGPR	✗	✗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P15	2	IgG	L	IIIB	58	11	11	11	VGPR	VGPR	✗	-	✗	✗	✗	-	-	-	-	-	-	-
P17	2	IgD	L	IA	58	20	12	12	CR	CR	✗	-	✗	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P18	2	IgG	K	IIIB	32	67	67	67	PR	CR	✗	-	✗	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P19	1	NA	K	IIIA	59	63	56	56	CR	CR	-	-	✗	-	-	✗	-	-	-	-	-	-
P20	1	IgG	K	IIIA	60	53	53	53	PR	CR	-	✗	✗	✗	-	-	-	-	-	-	-	-
P21	1	IgG	K	indol	59	61	31	31	NA	NA	✗	✗	✗	-	-	✗	-	✗	-	-	-	-
P22	2	IgA	K	IIIA	52	79	34	34	VGPR	VGPR	-	✗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P23	2	IgG	L	IIIA	47	53	53	53	PR	PR	-	-	✗	✗	✗	-	-	-	-	-	-	-
P24	1	IgG	L	IIA	56	15	15	NA	SD	PR	-	-	✗	✗	-	✗	-	-	-	-	-	-
P25	2	IgG	L	IIIA	60	42	42	42	VGPR	VGPR	-	-	✗	✗	-	-	-	-	-	-	-	-
P26	2	IgG	K	IIIA	57	63	57	57	PR	VGPR	-	✗	-	✗	-	-	-	-	-	-	-	-
P27	2	NA	K	IIIA	44	43	43	43	CR	CR	-	-	✗	✗	-	-	-	-	-	-	-	-
P28	1	NA	K	IIIB	42	9	9	NA	NA	NA	-	-	✗	✗	-	✗	-	-	-	-	-	-
P29	2	IgG	L	IIIA	52	42	32	32	VGPR	CR	-	-	✗	✗	✗	-	-	-	-	-	-	✗
P30	2	IgG	L	IA	57	31	20	20	VGPR	VGPR	✗	-	✗	✗	-	-	✗	-	-	-	-	✗
P31	2	IgG	K	IIIA	48	62	27	27	PR	PR	✗	✗	-	-	-	✗	-	-	-	-	-	-
P32	2	IgG	L	IIIA	51	38	38	NA	VGPR	CR	-	-	✗	-	✗	-	-	-	-	-	-	✗
P33	1	NA	L	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	✗	✗	✗	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P34	1	IgA	K	IIIA	50	88	29	29	VGPR	CR	-	-	✗	-	✗	-	-	-	-	-	-	-
P35	2	IgG	L	IIIB	42	86	69	69	PR	PR	-	-	-	-	-	✗	-	-	-	-	-	-
P36	2	IgG	K	IIIA	58	107	107	107	VGPR	VGPR	-	✗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P37	2	IgG	L	IIIA	59	75	75	75	SD	PR	-	✗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P38	2	IgA	L	IIIA	50	43	28	28	VGPR	VGPR	-	✗	-	-	✗	-	-	-	-	-	-	-
P39	1	NA	K	IIIA	58	75	75	75	PR	CR	-	-	-	-	-	✗	-	-	-	-	-	-
P40	2	IgG	K	IIIA	53	5	5	NA	NA	NA	-	✗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P41	2	IgG	K	IIIA	58	73	36	36	PR	CR	-	✗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P42	1	IgA	K	IIIA	56	73	32	32	VGPR	VGPR	✗	-	✗	-	✗	-	-	-	-	-	-	✗
P43	1	NA	L	IIIA	50	74	42	42	CR	CR	-	-	-	-	-	✗	-	-	-	-	-	-
P44	1	IgA	K	IIIA	57	73	32	32	VGPR	VGPR	✗	-	✗	-	✗	-	-	-	-	-	-	-
P45	1	IgG	L	IIIA	58	68	40	40	NA	CR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P46	1	NA	L	IIIA	57	67	67	67	CR	CR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P47	2	IgA	L	IIIA	46	61	41	41	PR	VGPR	-	✗	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P48	2	NA	L	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	✗	-	✗	-	✗	-	-	-	-	-	-	✗
P49	2	IgA	K	NA	42	0	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-	-	✗	-	-	-	-	-	-
P50	2	IgG	L	IIIB	45	20	16	16	PR	PR	✗	-	✗	✗	-	-	-	-	-	-	-	-
P51	2	NA	L	IIIA	57	61	41	41	VGPR	VGPR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✗

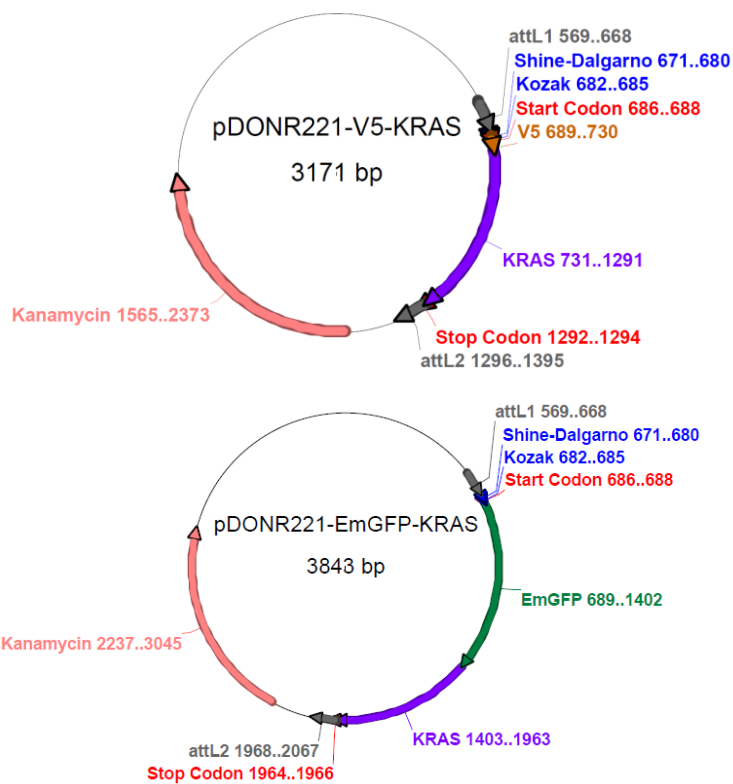
Probe	Sex	HC	LC	Stage	Alter bei Diagnose	OS (Monate)	EFS (Monate)	PFS (Monate)	Therapieantwort nach Bortezomib	Therapieantwort nach HD-Chemo	Chr 1q21-Zugewinn	Chr 9q34-Zugewinn	Chr 13q14-Deletion	Chr 17p13-Deletion	t(4;14)	t(11;14)	t(14;16)	t(8;14)	t(14;20)	DIS3-SNV	KRAS-SNV
P53	1	IgG	L	IIA	49	73	73	73	VGPR	VGPR	×	-	×	×	×	-	-	-	-	-	-
P54	1	NA	K	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	×	×	-	-	-	-	×	-	-	-	-
P55	1	IgG	K	IIIA	49	65	36	36	PR	PR	-	×	-	-	×	-	-	-	-	-	-
P56	NA	IgG	K	IIB	37	6	NA	NA	VGPR	CR	-	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-
P57	2	IgG	K	IA	50	88	NA	NA	VGPR	CR	-	-	×	-	-	-	-	-	-	-	-
P58	2	IgA	K	IIIA	45	47	19	19	CR	CR	×	×	-	-	×	-	-	-	-	-	-
P59	1	NA	K	IIIB	60	63	63	63	VGPR	CR	×	-	×	-	×	-	-	-	-	-	×
P60	2	IgG	K	IIA	55	54	16	16	CR	CR	×	×	×	-	×	-	-	-	-	-	-
P61	2	IgG	K	IIIA	48	49	49	49	PR	VGPR	-	×	×	-	-	×	-	-	-	-	-
P62	1	IgG	L	IA	62	94	33	33	VGPR	VGPR	-	-	-	-	-	×	-	-	-	-	×
P63	2	NA	K	NA	40	24	24	24	PR	PR	-	×	-	×	-	×	-	-	-	-	-
P64	2	IgG	K	IIIA	48	56	30	30	PR	CR	-	×	-	-	×	-	-	-	-	-	-
P65	2	IgG	L	IIIB	44	35	1	1	PD	NA	-	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P66	1	IgA	K	IIIA	55	81	38	38	PR	VGPR	-	-	×	×	×	-	-	-	-	-	-
P67	1	NA	L	IIB	58	56	23	23	CR	CR	-	-	×	-	-	×	-	-	-	-	-
P68	2	IgG	K	IIIA	57	61	61	61	VGPR	CR	-	×	-	-	-	-	-	×	-	-	×
P69	2	IgG	L	IIIA	42	54	54	54	VGPR	CR	-	-	×	-	-	×	-	-	-	-	×
P70	1	IgG	K	IIIA	65	55	49	49	SD	VGPR	-	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P71	2	IgA	K	IIIA	49	24	24	24	VGPR	CR	-	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-
P72	2	IgG	K	NA	57	49	49	49	VGPR	CR	-	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-
P73	1	NA	K	IIIA	64	32	32	32	VGPR	VGPR	NA	-	-	-	-	-	NA	NA	NA	-	-
P74	1	IgA	L	IIIA	44	52	34	34	PR	CR	×	-	×	-	×	-	-	-	-	-	-
P75	2	NA	L	IIIB	66	45	11	11	PR	PR	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P76	2	IgA	K	IIIA	65	44	44	44	VGPR	VGPR	-	×	-	-	-	-	-	-	-	-	×
P77	1	IgA	K	IIIB	37	41	41	41	CR	CR	-	×	×	-	×	-	-	-	-	-	-
P79	2	IgG	K	IIIB	55	33	33	33	PR	PR	-	×	-	-	-	-	-	-	-	-	×
P81	2	IgG	K	IIA	62	10	10	10	PR	VGPR	-	×	-	-	-	-	-	-	-	-	×
P82	1	IgG	K	NA	67	28	4	4	PD	NA	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P83	2	IgG	L	IIIA	61	14	14	NA	VGPR	VGPR	×	×	×	-	-	-	-	NA	NA	-	-
P84	2	IgG	L	IIIA	70	31	1	1	SD	NA	-	-	-	-	-	×	-	-	-	-	-
P85	2	IgA	K	IIIA	70	20	16	16	VGPR	CR	×	-	×	-	-	-	-	-	-	-	-

S_Tabelle 11: Klinische, zytogenetische Daten und SNV-Status zu DIS3 und KRAS des DSMM-XI-Studiensets (leicht modifiziert nach Weißbach *et al.* [85])

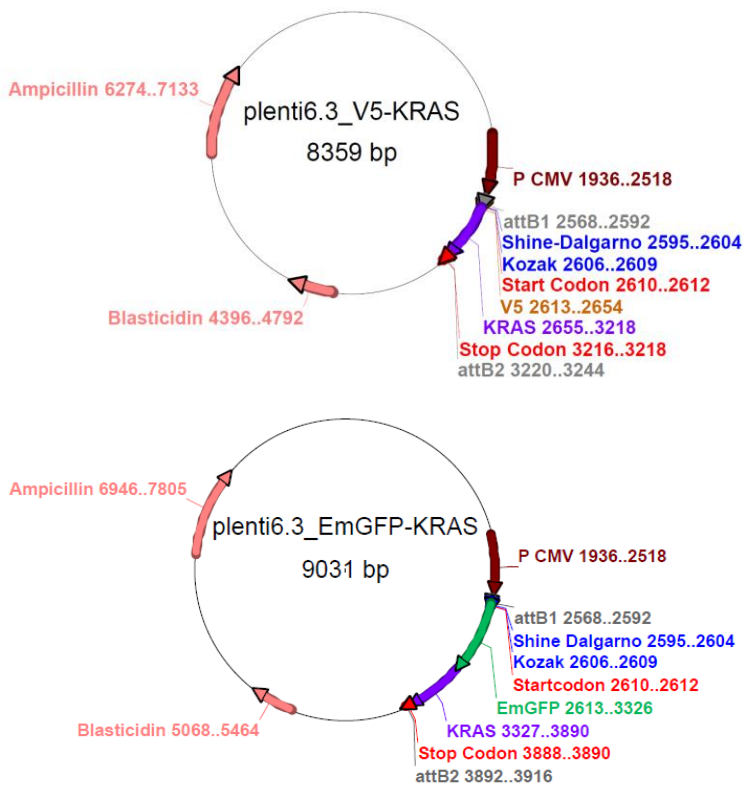
Patient	DIS3-SNV				Zytogenetische Events						Bortezomib		HD-Chemo		Klinischer Status			Mediane Überlebensdauer		
	AS-Austausch	VAF F %	VAF R %	CN	Subklone	t(4;14)	t(11;14)	t(14;16)	13q14 del	17p13 del	1. Response	2. Response	Event	Progress	Verstorben	Event	Progress	Overall		
P2	p.P412L	91,5	82,5	1	Hauptklon	✘	NA	NA	✘	-	VGPR	CR	-	-	-	59	59	59		
P5	p.E665K	93,9	87,9	1		-	✘	NA	✘	-	PR	CR	✘	✘	-	25	25	80		
P7	p.R780K	33,8	40	2		-	✘	-	-	-	VGPR	CR	✘	✘	✘	57	57	81		
P8	p.D784H	96,3	97,9	1		-	NA	✘	✘	-	VGPR	CR	✘	✘	✘	21	21	33		
						25%	50%	25%	75%	0%	100% PR	100% CR	75%	75%	50%	41	41	70		
P1	p.T131I	30,2	37,3	1	Nebenklon	✘	NA	NA	✘	-	PR	VGPR	✘	NA	✘	27	NA	27		
	p.G138E	30,2	38,7	1																
P3	p.R418G	24,4	12,2	1		-	-	NA	✘	✘	SD	PR	-	-	-	7	7	7		
P4	p.D488N	10,7	8,1	2		-	-	NA	✘	✘	PR	VGPR	✘	✘	✘	21	21	23		
P6	p.E665K	11,1	11,11	1		✘	NA	-	✘	-	VGPR	CR	✘	✘	-	59	59	110		
P9	p.E929stop	10,9	8	1		-	✘	-	✘	-	PR	PR	✘	✘	✘	25	25	32		
						40%	20%	0%	100%	40%	80% PR	20% CR	80%	60%	60%	25	23	27		

Patient	KRAS-SNV				Zytogenetische Events						Bortezomib		HD-Chemo		Klinischer Status			Median Überlebensdauer		
	AS-Austausch	VAF F %	VAF R %	CN	Subklone	t(4;14)	t(11;14)	t(14;16)	13q14 del	17p13 del	1. Response	2. Response	Event	Progress	Verstorben	Event	Progress	Overall		
P13	p.Q61H	39,1	54,2	2	Hauptklon	-	✘	-	-	-	SD	VGPR	✘	✘	✘	19	19	30		
P29	p.G12V	37,5	30,1	2		✘	-	-	✘	✘	VGPR	CR	✘	✘	✘	32	32	42		
P30	p.A146V	50,0	46,0	2		-	-	✘	✘	✘	VGPR	VGPR	✘	✘	✘	20	20	31		
P42	p.G12V	31,6	48,2	2		✘	-	-	✘	-	VGPR	VGPR	✘	✘	-	32	32	73		
P51	p.Q61H	54,0	59,3	2		-	-	-	-	-	VGPR	VGPR	✘	✘	✘	41	41	61		
P59	p.Q61R	94,4	91,8	2		✘	-	-	✘	-	VGPR	CR	-	-	-	63	63	63		
P68	p.Q61H	31,2	30,8	2		-	-	-	-	-	VGPR	CR	-	-	-	61	61	61		
P76	p.Q61H	51,9	22,2	2		-	-	-	-	-	VGPR	VGPR	-	-	-	44	44	44		
P79	p.Y64D	41,9	25,0	2		-	-	-	-	-	PR	PR	✘	✘	-	33	33	33		
P81	p.Q61H	46,2	44,2	2		-	-	-	-	-	PR	VGPR	-	-	-	10	10	10		
						30%	10%	10%	40%	20%	90% PR	30% CR	60%	60%	40%	33	33	43		
P9	p.Q61H	15,4	18,4	2	Nebenklon	-	✘	-	✘	-	PR	PR	✘	✘	✘	25	25	32		
P10	p.G12A	16,3	18,4	2		-	-	-	-	-	PR	VGPR	✘	✘	-	36	36	82		
P11	p.Q61H	21,4	24,3	2		-	-	-	-	-	VGPR	VGPR	✘	✘	-	71	71	113		
P32	p.Y64D	14,3	11,1	2		✘	-	-	✘	-	VGPR	CR	✘	NA	✘	38	NA	38		
P48	p.G12C	9,1	29,0	2		✘	-	-	✘	-	NA	NA	✘	NA	✘	NA	NA	NA		
P62	p.Y64D	4,2	8,3	2		-	✘	-	-	-	VGPR	VGPR	✘	✘	-	33	33	94		
P69	p.Q61H	19,1	25,5	2		-	✘	-	✘	-	VGPR	CR	-	-	-	54	54	54		
						29%	43%	0%	57%	0%	100% PR	33% CR	86%	80%	43%	37	36	68		

S_Tabelle 12: Zytogenetische Events und klinischer Status in Abhängigkeit von Haupt- und Nebenklon (leicht modifiziert nach Weißbach *et al.* [85])



S_Abbildung 1: Vektorkarten der pDONR221-KRAS-Konstrukte



S_Abbildung 2: Vektorkarten der pLenti6.3-KRAS-Konstrukte

12. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AS	Aminosäure
Amp	Ampicillin
AVA	<i>Amplicon Variant Analysis</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BZR	B-Zell-Rezeptor
C	Cytosin
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CDS	<i>Coding Sequence</i>
CD138	Syndecan-1
Chr	Chromosom
CMV	Cytomegalievirus
CN	<i>Copy Number</i>
CNLOH	<i>Copy Neutral Loss Of Heterozygosity</i>
COSMIC	<i>Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer</i>
C _p	<i>Crossing Point</i>
CSR	<i>Class Switch Recombination</i>
CR	<i>Complete Response</i>
CRC	Kolorektales Karzinom
Dest	Destilliert
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	<i>Deoxynucleotide</i>
Dr	<i>Danio rerio</i>
DSMM	Deutsche Studiengruppe Multiples Myelom
EB	<i>Elution Buffer</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	<i>Event Free Survival</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EmGFP	<i>Emerald Green Fluorescent Protein</i>
EmPCR	<i>Emulsion Polymerase Chain Reaction</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisation
G	Guanin
GAP	<i>GTPase activating proteins</i>
GDI	<i>Guanine nucleotide dissociation inhibitores</i>
GDF	<i>GDI displacement factors</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factors</i>
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HC	Schwere Kette
HD	Hochdosis
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRM	<i>High Resolution Melting Assay</i>
Hs	<i>Homo sapiens</i>
InDel	<i>Insertion and Deletion</i>

Kan	Kanamycin
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog</i>
LC	Leichte Kette
Len	<i>Length</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MID	<i>Manufacturer Identification Code</i>
min	Minuten
Mm	<i>Mus musculus</i>
MM	Multiplres Myelom
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NA	nicht verfügbar
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
OB	<i>Oligonucleotide Binding</i>
OS	<i>Overall Survival</i>
P	Patient
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD	<i>Progressive Disease</i>
PDAC	Pankreas-Adenokarzinoms
PFS	<i>Progression Free Survival</i>
PIN	<i>PilT N-terminal</i>
PR	<i>Partial Response</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNB	RNase II/R
rpm	<i>rotations per minute</i>
RRP44	<i>Ribosomal RNA-Processing Protein 44</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	Sekunde
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	<i>Stable Disease</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide</i>
Sex 1	Weiblich
Sex 2	Männlich
SHM	Somatische Hypermutation
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNV	<i>Single Nucleotide Variant</i>
SOS1	<i>Son of Sevenless 1</i>
SSPE	<i>Saline-Sodium Phosphate EDTA</i>
t()	Translokation
T	Thymin
Taq	<i>Thermus Aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TCP	Tumorzellreinheit
TPR	Tumor-Populationsrate
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UCSC	University of California, Santa Cruz
VAF	<i>Variant Allele Frequency</i>

VGPR	<i>Very Good Partial Response</i>
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i>
WT	Wildtyp
ZL	Zelllinie

13. Publikationen/ Poster

Publikationen

Shuji Momose, Susann Weißbach, Jordan Pischmarov, Theodora Nedeva, Elisa Bach, Martina Rudelius, Eva Geissinger, Annette Staiger, German Ott, and Andreas Rosenwald.

The diagnostic gray zone between Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma is also a gray zone of the mutational spectrum.

Leukemia. 2015 Feb 12. doi: 10.1038/leu.2015.34.

Susann Weißbach, Christian Langer, Bernhard Puppe, Theodora Nedeva, Elisa Bach, Miriam Kull, Ralf Bargou, Hermann Einsele, Andreas Rosenwald, Stefan Knop and Ellen Leich.

The Molecular Spectrum und Clinical Impact of DIS3 Mutations in Multiple Myeloma.

Br J Haematol. 2015 Apr;169(1):57-70. doi: 10.1111/bjh.13256. Epub 2014 Dec 17.

Leich E*, Weißbach S*, Klein HU, Grieb T, Pischmarov J, Stühmer T, Chatterjee M, Steinbrunn T, Langer C, Eilers M, Knop S, Einsele H, Bargou R, Rosenwald A.

Multiple myeloma is affected by multiple and heterogeneous somatic mutations in adhesion- and receptor tyrosine kinase signaling molecules.

Blood Cancer J. 2013 Feb 8;3:e102. doi: 10.1038/bcj.2012.47.

* gleichberechtigte Erstautorenschaft

Bommert KS, Effenberger M, Leich E, Küspert M, Murphy D, Langer C, Moll R, Janz S, Mottok A, Weissbach S, Rosenwald A, Bargou R, Bommert K.

The feed-forward loop between YB-1 and MYC is essential for multiple myeloma cell survival.

Leukemia. 2013 Feb;27(2):441-50. doi: 10.1038/leu.2012.185. Epub 2012 Jul 9.

Navarro A, Weißbach S, Faria M, Barata C, Piña B, Luckenbach T.

Abcb and Abcc transporter homologs are expressed and active in larvae and adults of zebra mussel and induced by chemical stress.

Aquat Toxicol. 2012 Oct 15;122-123:144-52.

Poster

Susann Weißbach, Ellen Leich, Christian Langer, Hermann Einsele, Stefan Knop, Andreas Rosenwald.

Targeted resequencing of DIS3 in multiple myeloma.

EMBL Heidelberg. Cancer Genomics 2013 2th – 3th November