

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II, Lehrstuhl für translationale  
Onkologie der Universität Würzburg**

**Direktor: Prof. Dr. med. Ralf C. Bargou**

**Funktionelle Validierung von seltenen KRas-Mutationen in Zelllinien des  
Multiplen Myeloms**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg vorgelegt von**

Lukas Friedrich Großhans  
**aus** Kaiserslautern

**Würzburg, März 2022**



# Referentenblatt

**Referent:** Prof. Dr. med. Ralf C. Bargou

**Korreferentin:** PD Dr. rer. nat. Ellen Leich-Zbat

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**Der Promovend ist Arzt.**



*Für Pia*



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><i>Einleitung</i></b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Klinik des Multiplen Myeloms</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Definition.....	1
1.1.2	Epidemiologie .....	1
1.1.3	Vorläuferstadien des Multiplen Myeloms .....	2
1.1.4	Klinik und Symptome.....	4
1.1.5	Diagnostik.....	5
1.1.6	Stadieneinteilung und Prognose .....	7
1.1.7	Therapie .....	8
<b>1.2</b>	<b>Pathogenese des Multiplen Myeloms</b> .....	<b>11</b>
1.2.1	Physiologische B-Zell-Entwicklung .....	11
1.2.2	Onkogene Transformation.....	13
<b>1.3</b>	<b>Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweg</b> .....	<b>15</b>
1.3.1	Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweg im Detail .....	15
1.3.2	KRas im Multiplen Myelom.....	17
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b><i>Material und Methoden</i></b> .....	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Listen der Materialien</b> .....	<b>20</b>
2.1.1	Technische Ausrüstung und Zubehör .....	20
2.1.2	Software .....	21
2.1.3	Chemikalien und Zellkulturmedien .....	22
2.1.4	Enzyme und zugehörige Puffer .....	24
2.1.5	Restriktionsenzyme .....	25
2.1.6	Längenstandards.....	25
2.1.7	Antikörper .....	25
2.1.8	Reaktionssets (Kits) .....	26
2.1.9	Zelllinien .....	27
2.1.10	Primer und Oligonukleotide.....	27
2.1.11	Lösungen und Puffer.....	28
<b>2.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>29</b>
2.2.1	Humane Myelom Zelllinien .....	29
2.2.2	Kulturbedingungen .....	30
2.2.3	Bestimmung der Zelldichte.....	31
2.2.4	Kryokonservierung der Myelomzellen .....	31

2.2.5	Mykoplasmen-PCR .....	31
2.2.6	Transfektion mittels Elektroporation .....	33
2.2.7	Herstellung transienter oder stabiler Zellklone .....	34
2.2.8	Durchflusszytometrie .....	35
2.2.9	Aufreinigung mittels CD4-MicroBeads .....	37
2.2.10	Dichtegradientenzentrifugation .....	38
2.2.11	Einzelzellentnahme .....	38
<b>2.3</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>39</b>
2.3.1	Western-Blotting .....	39
2.3.2	Vorbereiten der Myelomzellen .....	40
2.3.3	SDS-PAGE .....	40
2.3.4	Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran .....	41
2.3.5	Immunchemische Färbung .....	41
2.3.6	Analyse mittels Röntgenfilm .....	42
<b>2.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>42</b>
2.4.1	Das <i>Sleeping Beauty</i> Transposon System .....	43
2.4.2	Annealing von DNA-Oligonukleotiden .....	45
2.4.3	Phosphorylierung der Doppelstrang-Oligonukleotide .....	46
2.4.4	DNA-Restriktionsverdau .....	46
2.4.5	Vektorpräparation: Dephosphorylierung und DNA-Fällung .....	47
2.4.6	Insertpräparation: Gelextraktion .....	48
2.4.7	Ligation .....	48
2.4.8	Transformation in kompetente <i>E. coli</i> Bakterien .....	48
2.4.9	Selektion ausgewählter Klone mittels PCR .....	49
2.4.10	DNA-Gelelektrophorese .....	49
2.4.11	Plasmidextraktion mittels Reaktionsset .....	50
2.4.12	DNA-Sequenzierung .....	50
2.4.13	RNA-Isolierung .....	51
2.4.14	Cycloheximid-Assay .....	51
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>52</b>
<b>3.1</b>	<b>Herstellung und Transfektion von zur KRas-Expression geeigneten Plasmiden .....</b>	<b>53</b>
3.1.1	Auswahl eines passenden Promotors .....	53
3.1.2	Klonierung der Proteinexpressionsplasmide .....	55
3.1.3	Auswahl der Zelllinie und erste Transfektionsversuche .....	58
<b>3.2</b>	<b>Proteinexpressionsanalysen .....</b>	<b>62</b>



3.2.1	Transiente Proteinexpressionsversuche .....	62
3.2.2	Stabile Proteinexpressionsversuche .....	67
3.2.3	Einfluss von FBS auf die Aktivität des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs im Kontext von KRas Mutationen .....	70
<b>3.3</b>	<b>Weiterführende Experimente zur Analyse der möglichen Ursachen der Uneinheitlichkeit bei der Expression von KRas-Konstrukten .....</b>	<b>72</b>
3.3.1	Cycloheximidassay .....	73
3.3.2	Semiquantitative Analyse der cDNA-Spiegel .....	74
3.3.3	Einzelzellklone .....	75
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i>.....</b>	<b>78</b>
<b>5</b>	<b><i>Zusammenfassung</i>.....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i> .....</b>	<b>88</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Klinik des Multiplen Myeloms

### 1.1.1 Definition

Das Multiple Myelom (MM) ist eine seltene, maligne Störung der Plasmazellreihe. Es wird der Gruppe der indolenten B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome zugeordnet und manifestiert sich klinisch mit einem sehr heterogenen Symptomenspektrum. Dieses reicht von asymptomatisch, langsam progredienten bis hin zu hochakuten, letalen Verläufen mit hämatopoetischer Insuffizienz, renalen Funktionseinschränkungen und ausgeprägter Osteodestruktion. Beim Multiplen Myelom kommt es zu einer multilokulären Infiltration des Knochenmarks mit monoklonalen, antikörpersezernierenden Plasmazellen. Obwohl in den letzten 20 Jahren bedeutende Fortschritte in der Therapie des Multiplen Myeloms gemacht und eine Lebenszeitverlängerung sowie Prognoseverbesserung erreicht wurden, muss trotz allem in der überwiegenden Mehrheit der Fälle weiterhin von einer unheilbaren Erkrankung gesprochen werden<sup>1,2</sup>. Erst das Auftreten von Endorganschäden, welche durch die von den Myelomzellen sezernierten, funktionslosen Antikörper (sog. Paraproteine) verursacht werden, erlaubt die Diagnosestellung Multiples Myelom. Durch die herausfordernden diagnostischen Kriterien ist der Krankheitsprozess der Patientinnen und Patienten bei Therapiebeginn meist bereits fortgeschritten, weshalb die Therapieoptionen, der Behandlungserfolg, sowie das Gesamtüberleben häufig limitiert sind. Die diagnostischen und therapeutischen Fortschritte führen zunehmend zu einer Anpassung der Diagnosekriterien, sodass eine frühere Identifikation von Patientinnen und Patienten mit malignen Vorstadien des Multiplen Myeloms, welche mit einer hohen Progressionswahrscheinlichkeit vergesellschaftet sind, möglich wird und deren Therapie frühzeitig in die Wege geleitet werden kann<sup>3</sup>. Um weiteres Verständnis für die onkogen veränderten Signalwege in Myelomzellen zu erhalten und mögliche therapeutische Targets zu finden, kommt der präklinischen Myelomforschung eine besondere Bedeutung zu.

### 1.1.2 Epidemiologie

Jährlich erhalten in Deutschland knapp 7000 Patientinnen und Patienten die Diagnose Multiples Myelom. Es hat damit einen Anteil von etwa 1,4% an den neudiagnostizierten Malignomen und von 16,5% an den hämatologischen Neoplasien in Deutschland. Dabei tritt die Erkrankung bei Männern etwas häufiger auf (Inzidenz ca. 6 Neuerkrankungen/100000 Einwohner) als bei Frauen (Inzidenz ca. 4 Neuerkrankungen/100000 Einwohner)<sup>4</sup>. Zeitgleich ist eine erhöhte Inzidenz bei

Menschen mit schwarzer Hautfarbe gegenüber Hellhäutigen zu beobachten<sup>5</sup>. Das Multiple Myelom ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters, so liegt das mediane Erkrankungsalter in Deutschland für Frauen bei 74 und für Männer bei 72 Jahren<sup>2,4</sup>. Ein weiteres altersspezifisches Merkmal des MM ist, dass die Erkrankung bei unter 40-Jährigen beinahe nicht vorkommt (nur 2% der Patientinnen und Patienten sind jünger als 40 Jahre)<sup>6</sup>. Durch den demographischen Wandel war in den letzten Jahren eine leichte Zunahme der Myelomfälle zu beobachten. Darüberhinausgehend wird bis zum Jahr 2040 eine Zunahme von etwa 30% der Myelomfälle prognostiziert<sup>2</sup>. Die geschlechtsspezifische 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit in Deutschland liegt für Männer aktuell bei ca. 72% und für Frauen bei 76%<sup>4</sup>.

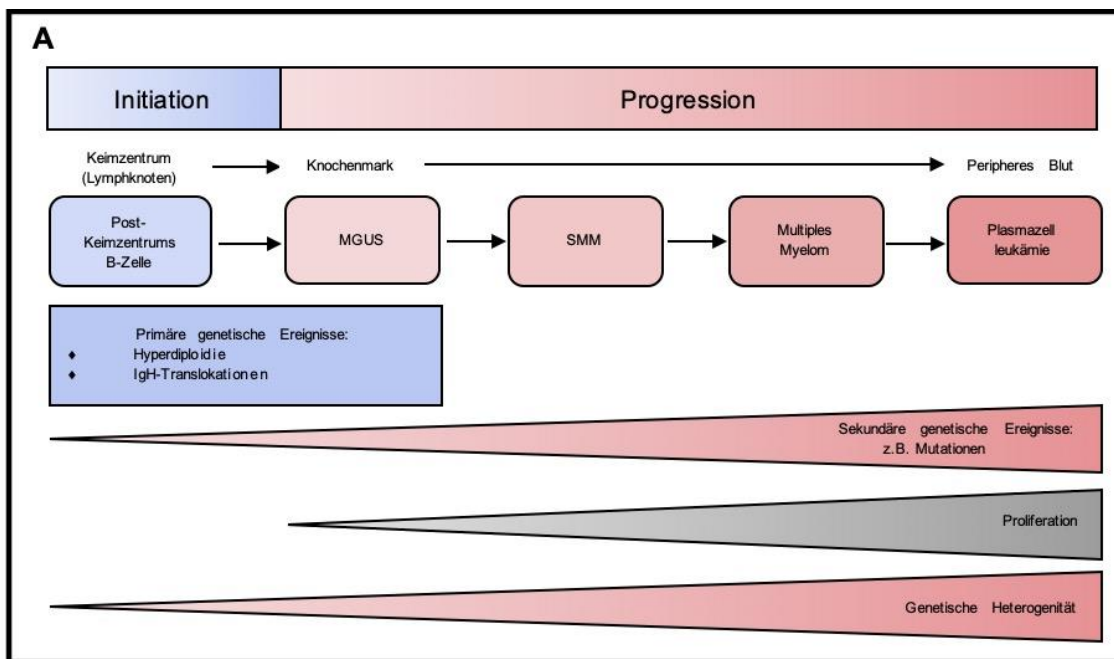
### 1.1.3 Vorläuferstadien des Multiplen Myeloms

Die klinisch und genetisch sehr heterogene Erkrankung des Multiplen Myeloms gehört zu den monoklonalen Gammopathien. Die Gruppe dieser Erkrankungen vereint die Sekretion funktionsloser Immunglobuline (Ig), der sogenannten Paraproteine, durch einen Klon maligner Plasmazellen. Das übermäßige Wachstum dieses Plasmazellklons, sowie die funktionslosen Paraproteine bedingen letztlich die Symptomatik des MM.

In den meisten Fällen geht der Erkrankung eine prä-maligne Vorstufe voraus, die sogenannte MGUS (monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz)<sup>7</sup>. Dabei zeigen Patientinnen und Patienten mit MGUS per definitionem keine Symptomatik ihrer Erkrankung. Die einzigen Auffälligkeiten zeigen sich laborchemisch durch das Auftreten monoklonaler Immunglobuline im Serum (<30g/L) und einen festgelegten Anteil monoklonaler Zellen im Knochenmark (<10%). Abhängig von der Klasse der sezernierten Immunglobuline (IgG, IgA, IgD, IgM, Bence-Jones-Leichtketten) kann die MGUS in verschiedene Erkrankungen übergehen. Dazu gehört beispielsweise der Morbus Waldenström. Hier werden lediglich Antikörper der Klasse IgM sezerniert. Das Multiple Myelom wiederum und damit auch sein MGUS-Vorläufer, zeichnet sich durch die Sekretion von Nicht-IgM-Paraproteinen aus. Die MGUS zeigt wie das Multiple Myelom eine altersabhängig steigende Prävalenz<sup>8</sup>. Obwohl die Diagnose einer MGUS selbst keinen pathologischen Wert hat, so kommt es pro Jahr bei ca. 1% der Patientinnen und Patienten zu einer Progression hin zu einem Multiple Myelom<sup>9</sup>. Dabei unterliegt die Progressionswahrscheinlichkeit jedoch großen interindividuellen Unterschieden, wofür mehrere Risikofaktoren ausfindig gemacht werden konnten. Als wichtigster Risikofaktor für die Progression eines MGUS in ein Multiples Myelom konnte die absolute Höhe des monoklonalen Proteins (M-Proteins) identifiziert werden. So kommt es beispielsweise

bei Patientinnen und Patienten mit einem M-Protein im Serum von  $>25\text{g/L}$  in den nächsten 20 Jahren bei etwa 50% zu einer Progression hin zu einem MM, im Gegensatz zu solchen mit einem M-Protein von  $<5\text{g/L}$  mit nur 15% Progression im gleichen Zeitraum. Außerdem werden monoklonale Gammopathien unklarer Signifikanz, die abnorm erhöhte Quotienten an freien  $\kappa$ - und  $\lambda$ -Leichtketten im Serum zeigen, genauso wie nicht-IgG-MGUS als Varianten mit besonders hohem Progressionsrisiko klassifiziert<sup>10</sup>. Aufgrund der unterschiedlichen Progressionsraten und fehlender zuverlässiger Risikoprognoseparameter unterbleibt bis heute eine präventive Therapie der MGUS<sup>11</sup>.

Die Zwischenstufe, die die MGUS mit dem MM verbindet, heißt schwelendes Multiples Myelom (Smouldering Multiple Myeloma [SMM]). Das SMM vereint durch sein Diagnosekriterium fehlender Endorganschäden eine sehr heterogene Gruppe von Patientinnen und Patienten. Als Übergangsstufe beinhaltet das SMM beispielsweise Patientinnen und Patienten mit nur leicht erhöhten Referenzwerten ( $>10\%$  Zellklone im Knochenmark,  $>30\text{g/L}$  M-Protein im Serum), deren Krankheit sich möglicherweise niemals zum MM entwickelt. Gleichzeitig werden dem schwelenden Multiplen Myelom aber auch Patientinnen und Patienten mit weit fortgeschrittener Erkrankung, ohne die für die Diagnostik des Myeloms notwendigen Endorganschäden, zugeordnet<sup>12,13</sup>. Daher ist es wichtig diese beiden Gruppen aufgrund laborchemischer oder molekularer Marker zu trennen und die Patientinnen und Patienten regelmäßigen Kontrolluntersuchungen zu unterziehen, um so bei Progression der Erkrankung rechtzeitig mittels Therapie intervenieren zu können<sup>14</sup>. Bisher gelingt eine solche Identifizierung und vorzeitige Therapie von Hochrisikopatientinnen und -patienten leider aufgrund fehlender Marker noch nicht regelhaft. Trotz allem konnten erste Fortschritte in dieser Richtung gemacht werden, so wurde ein erhöhtes Verhältnis der sogenannten „involvierten Kette“ gegenüber der „uninvolvierten Kette“  $>100$  mit einer 80% Krankheitsprogression innerhalb der nächsten 2 Jahre assoziiert<sup>15</sup> und in den aktuellen Diagnosekriterien für das MM verankert<sup>3</sup>. Als die Freie Leichtketten (free light chain [FLC])-Ratio involviert/uninvolviert wird das gemessene Verhältnis der freien  $\kappa$ - und  $\lambda$ -Leichtketten zueinander (physiologisch 0,26-1,65) bezeichnet. Bei den monoklonalen Gammopathien überwiegt im Rahmen der Paraproteinsekretion eine der beiden Leichtketten (involvierte Kette) gegenüber der anderen (uninvolvierte Kette). So kann bei einer FLC-Ratio  $>100$ , aufgrund damit korrelierender sicherer Krankheitsprogression, trotz fehlender Endorganschäden frühzeitig die Diagnose MM gestellt werden.



**Abbildung 1: A:** Initiation und Progression des Multiplen übernommen aus Morgan et al. (2012)<sup>16</sup> und modifiziert mit der Erlaubnis von Springer Nature BV, Lizenz-ID: 1225531-1. Abkürzungen: MGUS = monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz, SMM = Smouldering Multiple Myeloma (schwelendes Multiples Myelom), IgH = Immunglobulin-Heavy Chain (Schwere Kette). Ein Primäres genetisches Ereignis führt zu einer Immortalisierung einer prä-malignen Zellpopulation (MGUS). Durch weitere genetische Mutation dieses Zellklons entwickelt sich über die Vorstufen MGUS und SMM nach und nach ein Multiples Myelom.

### 1.1.4 Klinik und Symptome

Hervorgerufen durch die Sekretion der Paraproteine und das myelosuppressive Wachstum der Plasmazellklone ergibt sich die klinische Symptomatik des Multiplen Myeloms. Neben der Anhäufung der Paraproteine besitzen die Myelomzellen selbst auch eine Osteoklasten-aktivierende Wirkung, welche zu einem Überwiegen ihrer osteodestruktiven Aktivität und damit zu Osteolysen des Knochens führt<sup>17</sup>. Durch diesen Abbau von Knochensubstanz des Schädels und Stammskeletts kommt es bei ca. 60% der Patientinnen und Patienten zu Knochenschmerzen und teilweise pathologischen Frakturen. Darüber hinaus führt die osteoklastische Aktivität zu einem Anstieg der Serumkalziumkonzentration (10-20% der Fälle), was in einer kumulativen Schädigung der Niere und im Extremfall in eine hyperkalzämische Krise mit neurologischer Symptomatik mündet. Durch das infiltrative, monoklonale Wachstum der Plasmazellen kommt es im Verlauf der Erkrankung häufig zur Verdrängung der Hämatopoese. Die daraus resultierende Anämie, Leukopenie und Thrombozytopenie führen dabei zu Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Blässe (40%), erhöhter Infektanfälligkeit (10-20%) und verstärkter Blutungsneigung mit petechialen Einblutungen. Als weiteres unspezifisches Symptom kommt es im Zuge der Erkrankung bei einigen Patientinnen und Patienten zu

einem Gewichtsverlust (25% der Fälle). Die renal vermehrt anfallenden Immunglobulin-Leichtketten können außerdem zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion und zur sogenannten Cast-Nephropathie mit nephrotischem Syndrom bis hin zur Niereninsuffizienz mit Dialysepflichtigkeit führen. Verstärkt gebildete freie Leichtketten können im Rahmen von Mikrozirkulationsstörungen auch weitere Organsysteme betreffen (z.B. Augen, Gehirn, Herz). Des Weiteren manifestiert sich die Fehlagerung der Paraproteine bei 10% der Patientinnen und Patienten als Myelom-assoziierte AL-Amyloidose mit zusätzlichen Funktionseinschränkungen. Nichtsdestotrotz gibt es aber auch Patientinnen und Patienten (25%), welche bei Diagnosestellung völlig symptomlos sind<sup>18</sup>.

Die beim Multiplen Myelom führenden Endorganschäden sind in den sogenannten CRAB-Kriterien zusammengefasst. CRAB steht dabei als Akronym für Hyperkalzämie (increased **C**alcium), Niereninsuffizienz (**R**enal insufficiency), Anämie (**A**nemia) und Osteolysen (**B**one lesions)<sup>19</sup>.

### 1.1.5 Diagnostik

Die Diagnostik des Multiplen Myeloms basiert im Wesentlichen auf der laborchemischen Untersuchung des Serums und Urins, der radiologischen Bildgebung und der histopathologischen Begutachtung gewonnener Proben. Selbstverständlich steht vor der apparativen Diagnostik die Anamneseerhebung der Patientinnen und Patienten, sowie deren körperliche Untersuchung. Dabei wird von den Patientinnen und Patienten beispielsweise über eine B-Symptomatik (Müdigkeit, Nachtschweiß, Gewichtsverlust) oder weitere beim MM auftretende, unspezifische Symptome berichtet. Auch Knochenschmerzen, Infektneigung, petechiale Einblutungen, schäumender Urin oder neurologische Auffälligkeiten werden von einigen Patientinnen und Patienten beobachtet oder in der klinischen Ganzkörperuntersuchung als Befunde erhoben (siehe 1.1.4). Bei Verdacht auf ein MM wird im Anschluss die laborchemische Untersuchung des Serums und eine Immunfixationselektrophorese durchgeführt. Im Serum kann sich dabei neben der im Verlauf entstehenden Panzytopenie, auch eine Erhöhung der Entzündungsparameter mit Sturzsenkung und eine Hyperkalzämie (siehe 1.1.4) zeigen. Die sich, im Rahmen der Verdrängung der Hämatopoese, entwickelnde Anämie der Patientinnen und Patienten ist dabei genauso Bestandteil der CRAB-Kriterien wie auch die, durch Osteolysen bedingte, Hyperkalzämie. Die Untersuchung des Serums hinsichtlich der Nierenretentionsparameter und die Analyse der Urin-Eiweißausscheidung gehören als Basisdiagnostik zur Detektion einer

Nierenfunktionsstörung (Bestandteil der CRAB-Kriterien). Bei der außerdem durchgeführten Serumelektrophorese weist der Nachweis des sogenannten M-Gradienten auf das Vorliegen eines MM oder einer Amyloidose hin. Bei dem beschriebenen M-Gradienten handelt es sich um eine, in der Elektrophorese auftretende, scharf begrenzte Bande, welche durch die übermäßige Produktion funktionsloser, monoklonaler Antikörper hervorgerufen wird. In der Mehrzahl der Fälle kommt es durch die Antikörper zu einer Überhöhung des von der  $\gamma$ -Globulin-Fraktion gebildeten Peaks, sodass das Befundbild der Serumelektrophorese die namensgebende M-Konfiguration annimmt. Es ist aber auch möglich, dass sich der Peak der gebildeten Paraproteine in der  $\beta$ -Fraktion (beim IgA-Myelom) findet oder gänzlich fehlt (beim Leichtketten-Myelom oder der asekretorischen Form). Zur weiteren qualitativen und quantitativen Analyse kann im nächsten Schritt eine Immunfixation durchgeführt werden. Dabei werden die elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen genauer hinsichtlich der Menge und der Klasse der monoklonalen Antikörper untersucht. Da damit selbst der Nachweis geringster Mengen an Paraprotein gelingt, erlaubt die Immunfixation die Zuordnung des Myeloms anhand der sekretierten Antikörper oder Leichtketten zu einem spezifischen (Myelom-) Typ. Dieser immunfixatorische Nachweis monoklonalen Proteins im Urin und/oder Serum findet sich in den Diagnosekriterien der Myeloma Working Group von 2014 wieder. Wie unter 1.1.3 bereits erwähnt, hat mittlerweile auch die, in der weiteren Diagnostik durchgeführte, FLC-Ratio seinen Eingang in die Diagnosekriterien des Multiplen Myeloms gefunden<sup>3</sup>.

Die ehemals nach dem Pariser Schema durchgeführte Röntgendiagnostik wurde heute durch die deutlich sensitivere und spezifischere native Low-Dose-Ganzkörper-Computertomographie abgelöst<sup>20</sup>. Der bildmorphologische Beleg von Knochendestruktionen erlaubt dabei die Bestätigung einer Knochenbeteiligung im Sinne von CRAB. Nachfolgend kann die radiologische Diagnostik in einem weiteren Schritt optional durch eine Magnetresonanztomographie (MRT) ergänzt werden<sup>21</sup>. Der in der MRT zu erbringende Nachweis diffuser Knochenmarkinfiltration, fokaler Knochenherde oder extramedullärer Manifestationen wurde als Myelom-definierendes Ereignis in die aktualisierten Diagnosekriterien übernommen<sup>3</sup>.

Die Diagnostik des Multiplen Myeloms beinhaltet auch eine Knochenmarkspunktion der Patientinnen und Patienten. Das entnommene Aspirat und die gewonnenen Biopsien werden anschließend zytologisch und zytogenetisch bzw. histologisch untersucht. Für die Diagnose eines Multiplen Myeloms wird der Nachweis von >10% klonaler Plasmazellen im Knochenmark als obligates Kriterium zusätzlich zur Erfüllung der



CRAB-Kriterien gefordert. Alternativ erlaubt ein Nachweis von >60% klonaler Plasmazellen die Diagnose Multiples Myelom auch ohne die Erfüllung der CRAB-Kriterien<sup>3</sup>.

**Diagnostische Kriterien des Multiplen Myeloms nach aktualisierter Definition der International Myeloma Working Group, 2014**

- Anteil klonaler Plasmazellen im Knochenmark >10% oder durch Biopsie gesichertes knöchernes oder extramedulläres Plasmozytom und eines oder mehr der folgenden Kriterien:
  - CRAB-Kriterien:
    - Hyperkalzämie: Serum-Kalzium >0,25mmol/L (>1mg/dL) oberhalb des oberen Normbereichs oder >2,75mmol/L (>11mg/dL)
    - Niereninsuffizienz: Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) <40mL/min oder Serum-Kreatinin >117µmol/L (2mg/dL)
    - Anämie: Hämoglobin >2g/dL unterhalb des unteren Normbereichs oder <10g/dL
    - Knochenläsionen: ≥1 Läsion mittels Röntgenaufnahme, Computertomographie oder Positronenemissionstomographie
  - Biomarker:
    - Anteil klonaler Plasmazellen im Knochenmark ≥60%
    - Verhältnis involvierter/uninvolvierter freier Leichtketten ≥100
    - >1 Läsion >5mm im MRT

**Abbildung 2:** Überarbeitete Diagnosekriterien der International Myeloma Working Group nach Rajkumar et al. (2014)<sup>3</sup>.

Abkürzungen: CRAB = increased Calcium (erhöhtes Calcium), Renal insufficiency (Niereninsuffizienz), Anemia (Anämie), Bone lesions (Knochenläsionen), MRT = Magnetresonanztomographie, % = Prozent, mg = Milligramm, mmol = Millimol, L = Liter, dL = Deziliter, GFR = glomeruläre Filtrationsrate, µmol = Mikromol, g = Gramm, mm = Millimeter.

### 1.1.6 Stadieneinteilung und Prognose

Patientinnen und Patienten mit Multiplem Myelom haben eine durchschnittliche Überlebenszeit von ca. 7 bis 8 Jahren nach Diagnosestellung<sup>22,23</sup>. Dabei beschreibt das MM eine sehr heterogene Gruppe von Patientinnen und Patienten mit unterschiedlichen Überlebenszeiten (von unter 6 Monaten bis zu über 10 Jahren<sup>24</sup>) abhängig von der Schwere der Erkrankung, aber auch von anderen patientinnen- und patientenassoziierten Faktoren. Um eine individuell adaptierte Therapie zu ermöglichen, welche sich nicht nur pauschal an der Erkrankung, sondern auch an deren Schwere und anderen Risikofaktoren orientiert und eine genauere Risikoeinschätzung zu ermöglichen, ist man bei nahezu allen Krankheiten bestrebt die Patientinnen und Patienten in verschiedene Stadien ihrer Erkrankung einzuteilen. Dies gelang beim Multiplen Myelom erstmals 1975 Durie und Salmon<sup>25</sup>. Das nachfolgend 2005 von Greipp

et al. veröffentlichte Internationale Stagingssystem (International Staging System [ISS]) ermöglichte es erstmals MM-Patientinnen und Patienten anhand eines Stadiums auch einer Überlebensprognose zuzuordnen<sup>24</sup>. Dabei konnte beobachtet werden, dass es möglich ist anhand der Konzentration an  $\beta_2$ -Mikroglobulin eine Aussage über das Überleben der Patientinnen und Patienten zu treffen. Ein hoher  $\beta_2$ -Mikroglobulinwert korrelierte in den Untersuchungen mit einer großen Tumormasse und einer starken Nierenfunktionseinschränkung. Deshalb fand die Konzentration an  $\beta_2$ -Mikroglobulin, ebenso wie die Albuminserumkonzentration Berücksichtigung in der neuen Stadieneinteilung. Die von den Myelomzellen freigesetzten Zytokine sind dazu in der Lage das Serumalbumin zu senken, weshalb sie ebenfalls für die Prognoseabschätzung zu Rate gezogen werden können<sup>24,26</sup>. Das zuletzt veröffentlichte Stagingssystem von 2015 (Revised International Staging System, Palumbo et al.<sup>27</sup>) orientiert sich an dem vorherigen von 2005, erweitert dieses jedoch um 2 Punkte. Zum einen definiert es drei Hochrisikomutationen, anhand welcher Patientinnen und Patienten eingeordnet werden können und zum anderen berücksichtigt es die Laktatdehydrogenase (LDH) als wichtigen Biomarker. Dabei korreliert eine erhöhte LDH mit einer größeren Tumormasse und auch einem aggressiveren Verlauf<sup>27</sup>.

**Tabelle 1:** Revised Staging System nach Palumbo et al. (2015)<sup>27</sup>.

Abkürzungen: LDH = Laktatdehydrogenase, mg = Milligramm, L = Liter, 5J-ÜL = 5-Jahres-Überlebensrate, Ø-ÜL = durchschnittliches Überleben.

Stadium	Kriterien	5J-ÜL	Ø-ÜL
I	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Serum <math>\beta_2</math>-Mikroglobulin &lt;3,5mg/L</li> <li>• Serum Albumin <math>\geq</math>3,5g/dL</li> <li>• Normwertige LDH</li> <li>• Abwesenheit von Hochrisikomutationen</li> </ul>	82%	-
II	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Weder Stadium I noch Stadium III</li> </ul>	62%	83 Mo.
III	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Serum <math>\beta_2</math>-Mikroglobulin &gt;5mg/L</li> <li>• Erhöhte LDH</li> <li>• Vorhandensein von <math>\geq</math>1 Hochrisikomutation:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ del(17p)</li> <li>○ t(4;14)</li> <li>○ t(14;16)</li> </ul> </li> </ul>	40%	43 Mo.

### 1.1.7 Therapie

Die Behandlungsindikation beim Multiplen Myelom wird aktuell anhand der CRAB-Kriterien gestellt<sup>3</sup>. Zusätzlich zu diesen Kriterien sollte eine Therapie auch bei diagnostiziertem MM (ohne Erfüllung der CRAB-Kriterien) und klinischer Symptomatik (z.B. Myelom-bedingte Knochenschmerzen, Hyperviskositätssyndrom, B-Symptomatik)

der Patientinnen und Patienten begonnen werden. Asymptomatische Erkrankte mit Multiplem Myelom werden dagegen unter dem Konzept des „Watch and Wait“ nicht therapiert und stattdessen regelmäßigen, engmaschigen Kontrolluntersuchungen unterzogen.

Beim Multiplen Myelom handelt es sich weiterhin um eine primär nicht kurativ behandelbare Erkrankung, weshalb es das Ziel einer jeden Therapie sein muss ein langfristiges Überleben der Patientinnen und Patienten mit optimaler, individueller Lebensqualität zu ermöglichen. Eine ideale Therapie des MM erwirkt daher das rasche Erreichen einer kompletten Remission über viele Jahre hinweg. Da das Gelingen einer jeden Therapie aber von verschiedenen Faktoren der Erkrankung (z.B. Erkrankungsstadium, Endorganschäden), der Therapie (z.B. Toxizität) und individuellen Faktoren (z.B. Alter, Vorerkrankungen) abhängt, gelingt eine langjährige, komplette Remission in nur 3-20% der Fälle<sup>28,29</sup>. Auch wenn die andauernde Krankheitsfreiheit aktuell noch nicht die Regel ist, so konnten in den letzten beiden Jahrzehnten bereits große Fortschritte in der Verlängerung und Verbesserung des Gesamtüberlebens der Patientinnen und Patienten gemacht werden und immer neue Medikamente in die Myelomtherapie integriert werden<sup>27</sup>. Die Etablierung neuer Medikamente ist dabei besonders für die Rezidivtherapie von großer Bedeutung. Häufig führen Resistenzen der Myelomzellen gegen die Erstlinientherapie zu einem Wiederaufflammen der Erkrankung, weshalb es wichtig ist wirkungsvolle Medikamente in der Hinterhand zu haben, um im Rezidivfall adäquat reagieren zu können. Einen ausführlichen chronologischen Überblick über die verschiedenen Medikamente gibt Kyle et al. (2008)<sup>1</sup>.

Das aktuell gebräuchliche Therapieschema koppelt eine Hochdosistherapie an eine autologe Stammzelltransplantation, da dafür in Studien gegenüber einer alleinigen medikamentösen Therapie eine höhere Rate an kompletten Remissionen und weiteren Therapieerfolgen nachgewiesen werden konnte<sup>30-34</sup>. Abhängig von ihrer Eignung für eine Hochdosistherapie erhalten Patientinnen und Patienten entweder eine Induktionstherapie, optional gefolgt von 1-2 Zyklen Hochdosistherapie, einer autologen Stammzelltransplantation und einer sich anschließenden Erhaltungstherapie. Ein konkretes Alter als harte Grenze für die Eignung zur Hochdosistherapie ist dabei schwer zu definieren<sup>35,36</sup>, vielmehr spielen auch die erhaltenen Organfunktionen und das Fehlen weiterer Komorbiditäten eine wichtige Rolle bei der Entscheidung über die Therapie<sup>37,38</sup>.

In der voranstehenden Induktionstherapie zur Hochdosistherapie konnte der Erfolg verschiedener Medikamentenkombinationen in klinischen Studien nachgewiesen werden. Zum Einsatz kommende Therapieregime sind dabei beispielsweise das VTD-Schema, bestehend aus Bortezomib, Thalidomid und Dexamethason<sup>39</sup>. Einen ausführlichen Überblick über die verschiedenen Therapieschemata geben Moreau et al. (2017)<sup>40</sup>, siehe Abbildung 3.

Während oder nach Abschluss der, aus 4-6 Zyklen bestehenden, Induktionstherapie werden bei den Patientinnen und Patienten Stammzellen gesammelt. Diese werden nach der sich anschließenden Hochdosistherapie mit 200mg/m<sup>2</sup> Melphalan (Standarddosis<sup>41</sup>, die nach Bedarf auch angepasst werden kann<sup>42-44</sup>) autolog transplantiert. Die Wirksamkeit einer, vor der abschließenden Erhaltungstherapie eingeschobenen, Konsolidierungsphase konnte nicht abschließend geklärt werden<sup>45,46</sup>.

In der zuletzt erfolgenden Phase der Erhaltungstherapie wird zwischen der Therapie bei Hochrisikopatientinnen und -patienten und solchen mit Standardrisiko unterschieden. Während bei der Standardrisikotherapie aktuell ausschließlich der Immunmodulator Lenalidomid zum Einsatz kommt<sup>47</sup>, wird bei Patientinnen und Patienten mit Hochrisiko zwischen einer Therapie mit Lenalidomid oder Bortezomib unterschieden<sup>48,49</sup>.

Patientinnen und Patienten, welche sich nicht für die Behandlung mit einer Hochdosistherapie eignen, können im Rahmen einer Induktionstherapie verschiedenen anderen Therapieschemata unterzogen werden<sup>50-52</sup>.

Zusätzlich zur Myelom-spezifischen Therapie kommen auch supportive Arzneimittelgaben zur Osteoprotektion, eine Strahlentherapie zur Schmerzbehandlung der Knochenmarksinfiltration oder eine operative Therapie zur Stabilisierung von beispielsweise Wirbelkörperfrakturen zum Einsatz.

Auch für die Zweit- und Dritttherapie nach Rezidiv gibt es verschiedene etablierte Therapieregime, welche jedoch nicht Bestandteil dieser Zusammenfassung sein sollen<sup>40</sup>.

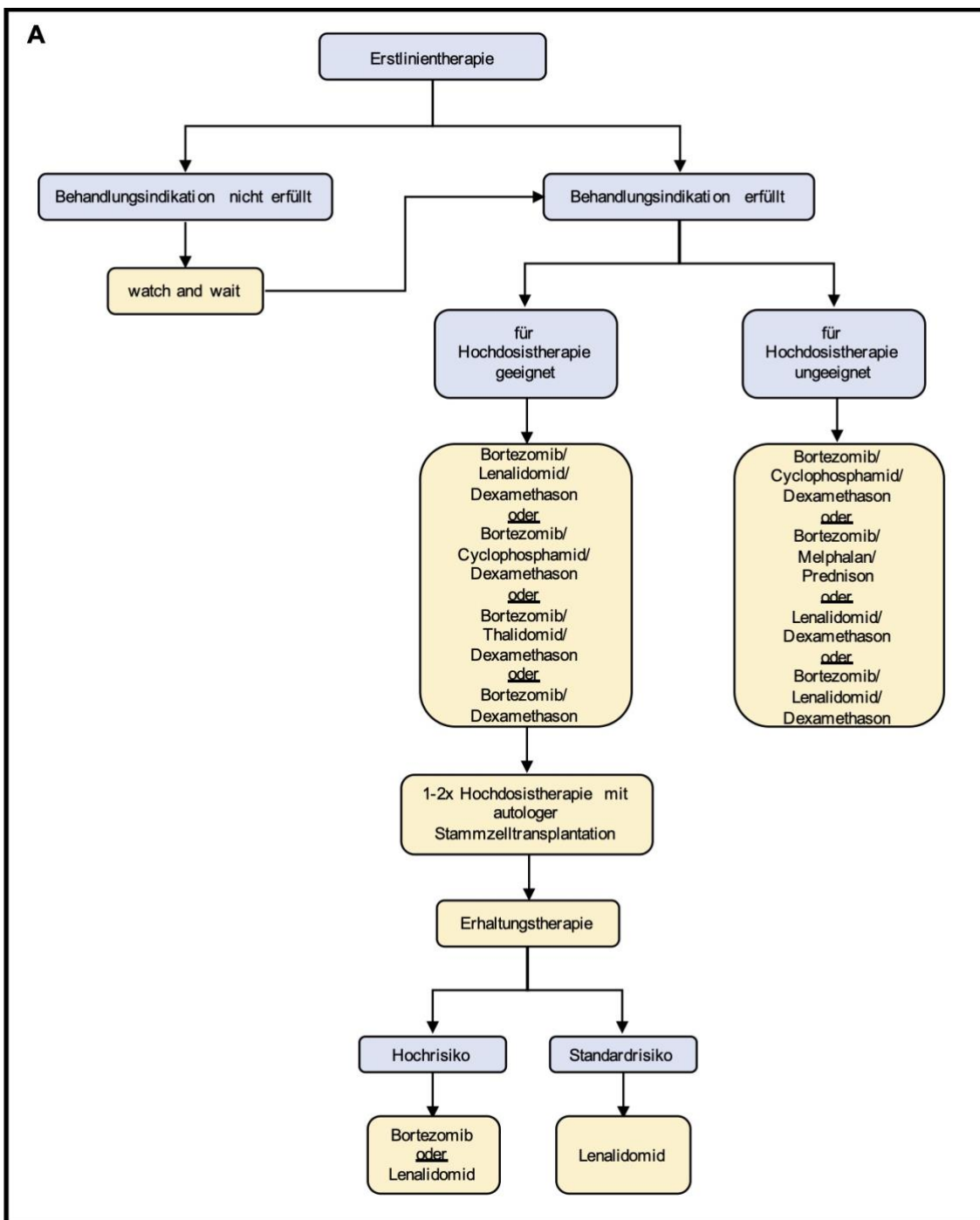


Abbildung 3: A: Therapie-Algorithmus bei Erstdiagnose Multiples Myelom nach Moreau et al. (2017)<sup>40</sup>.

## 1.2 Pathogenese des Multiplen Myeloms

### 1.2.1 Physiologische B-Zell-Entwicklung

Die Entwicklung und Reifung der B-Zelle von einer hämatopoetischen Stammzelle über eine B-Vorläuferzelle hin zur differenzierten B-Zelle ist ein sensibler Prozess, der das Ineinandergreifen vielfältiger, genetisch angelegter und umgebungsassoziierter

Faktoren beinhaltet. Um die beim Multiplen Myelom zugrundeliegenden pathogenen Prozesse zu verstehen, die diesen komplexen Differenzierungsprozess aus dem Gleichgewicht bringen können, ist es wichtig sich zunächst einen Überblick über die physiologische Entwicklung zu verschaffen.

Nach Bildung einer Vorläufer-B-Zelle im Knochenmark findet dort der nächste Entwicklungsschritt statt, wobei es zur Herstellung des membranständigen IgM-Antikörpers kommt. Antikörper bestehen in ihrem Aufbau aus je zwei identischen langen H-Ketten (**heavy**) und zwei identischen kurzen L-Ketten (**light**), welche jeweils einen variablen und einen konstanten Anteil besitzen. Dieser variable Anteil der beiden Ketten bestimmt die Spezifität eines jeden Antikörpers. Da durch die limitierte Länge des menschlichen Genoms nur eine geringe Anzahl an möglichen Antikörpervarianten codiert werden können, behilft sich der Körper mit dem Prozess der sogenannten VDJ-Rekombination. Bei dieser wird aus einer Auswahl möglicher Varianten je ein variables (variable [V-]), diversifizierendes (diversifying [D-]) und verbindendes (joining [J-]) Segment (im Falle der H-Kette; bei der L-Kette nur V- und J-Segment) zufällig ausgewählt. Die zufällige Kombination der einzelnen Segmente erlaubt es somit aus einer primär limitierten Auswahl eine große Vielfalt an Proteinvarianten zu erzeugen. Durch somatische Rekombination und Splicing kommt es dann zur Aneinanderlagerung der ausgewählten V-, (D-) und J-Segmente und durch Expression des entstandenen Gens zur Ausbildung eines einzigartigen Antikörpers auf der Membranaußenseite<sup>53</sup>.

Nach Arrangement und Bildung des Antikörpers wandert die nun unreife B-Zelle aus dem Knochenmark aus<sup>54</sup>. Nachfolgend zirkulieren die naiven B-Zellen zwischen dem Blutstrom und den sekundären lymphatischen Organen in der Erwartung ihrer Aktivierung durch Binden des für sie passenden, spezifischen Antigens an ihrem membranständigen IgM-Antikörper. Nach Antigenkontakt erfolgt die Opsonierung, Prozessierung und Präsentation des Antigens auf ihrem Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex [MHC])-II-Rezeptor an folliculäre T-Helferzellen. Die anschließende T-Zell-abhängige Aktivierung führt dann zur Proliferation der B-Zellen, wobei sich die entstehende B-Zell-Population in zwei Subpopulationen aufteilt. Ein Teil der aktivierten B-Zellen entwickelt sich zu niedrig-affinen, IgM-produzierenden, kurzlebigen Plasmazellen, welche für eine erste humorale Immunantwort verantwortlich sind. Der zweite Teil der B-Zellen wandert ins Keimzentrum des Lymphknotens und unterzieht sich der Affinitätsreifung. Dabei kommt es durch somatische Hypermutationen (häufig Punktmutationen) zu neuen

Generationen von B-Zellen mit leicht veränderter Affinität zum ursprünglichen Antigen<sup>55,56</sup>. Durch die wiederholte Präsentation des Antigens auf Antigen-präsentierenden Zellen gegenüber den B-Zellen kommt es zu einer Selektion auf B-Zellen mit besonders hoher Antigen-spezifischer Affinität. Die aus dieser Affinitätsreifung hervorgegangenen B-Zellklone bekommen nun Signale für eine starke Proliferation, bevor sich die Zellen entweder zu B-Gedächtnis- oder aber zu antikörperproduzierenden Plasmazellen differenzieren. Letztere durchlaufen während ihrer Differenzierung als weiteren Schritt den sogenannten Klassenwechsel. Dabei kommt es durch die IgH-Switch-Rekombination zu einem Wechsel der zukünftig sezernierten Antikörperklasse<sup>57</sup>. Die ausdifferenzierten Plasmazellen wandern ins Knochenmark und verbleiben dort, um bei einem erneuten Antigenkontakt schnellstmöglich für die Bildung von Antikörper zur Verfügung zu stehen.

### 1.2.2 Onkogene Transformation

Die stufenweise Entwicklung des Multiplen Myeloms über die Vorläuferstadien der MGUS sowie des SMM und letztlich über das Myelom hinaus zur Plasmazelleukämie, lassen die Vermutung zu, dass auch in der Pathogenese der betreffenden B-Zelle verschiedene Stadien durchlaufen werden. So wird zunächst ein initiales Ereignis benötigt aus dem eine immortalisierte Myelom vermehrende Zelle (Myeloma Propagating Cell [MPC]) hervorgeht. Dieser Klon erwirbt im weiteren Verlauf fortwährend zusätzliche Mutationen, welche ein ursprünglich physiologisches Verhalten nach und nach weiter verändern. Die sukzessive Deregulation der MPC führt letztlich zu den charakteristischen klinischen Eigenschaften des MM und dem, von extrazellulären Signalen unabhängigen, Wachstum auch außerhalb des Knochenmarks<sup>58</sup>. Bei dieser Entwicklung von einer normalen B-Zelle hin zur mutierten Myelomzelle handelt es sich jedoch nicht um eine lineare Entwicklung. Es gibt vielmehr auf jeder Entwicklungsstufe eine heterogene Mischung von Subklonen, welche aus einer gemeinsamen MPC hervorgehen. Durch die große Anzahl unterschiedlicher Subklone kommt es fortwährend zu einer Selektion der am besten angepassten Klone, weshalb über die Krankheitsentwicklung hinweg zu verschiedenen Zeitpunkten durchaus verschiedene Subklone das Krankheitsbild dominieren<sup>59</sup>. Bei der Myelomtherapie der Patientinnen und Patienten kann es durch den exogen verursachten, zusätzlich erzeugten Selektionsdruck zur Auswahl von besonders malignen Klonen kommen, die Resistenzen gegen die verwendeten Wirkstoffe besitzen. Kommt es zu einem Rezidiv der Erkrankung, so handelt es sich bei den Ausgangszellen der zurückkehrenden Krankheit

häufig um diese medikamentös vorselektionierten Subklone. Diese Myelomzellen proliferieren in der Regel deutlich schneller und bieten aufgrund der erworbenen Resistenzen weniger therapeutische Angriffspunkte. Dies erschwert die Therapie von Rezidiven des Multiplen Myeloms erheblich und aggraviert die Prognose der Erkrankten<sup>16</sup>.

### 1.2.2.1 Primäre genetische Ereignisse – Immortalisierung

Da sich die Immunglobulinklasse im Verlauf der Pathogenese des MM nicht mehr verändert ist davon auszugehen, dass das immortalisierende Primäreignis in der B-Zell-Entwicklung zeitlich nach der physiologischen IgH-Switch-Rekombination stattfindet<sup>60</sup>. Dabei finden sich im Patientenkollektiv zwei unterschiedliche Primäreignisse, welche jedoch nicht gemeinsam auftreten. Diese, durch das Primäreignis ausgelöste Veränderung, ist des Weiteren in allen Subklonen der Myelompatientinnen und -patienten zu finden. So finden sich zum einen etwa 50% MPCs (und deren Subklone) mit einem hyperdiploiden Genom (zwischen 48 und 75 Chromosomen)<sup>61</sup>. Der direkte Pathogenitätsmechanismus und die molekularbiologischen Konsequenzen dieser Hyperdiploidie sind bisher unbekannt<sup>16</sup>. Es ist jedoch davon auszugehen, dass es zu einer überschießenden Expression von *Cyclin D*-Isoformen und damit verbunden zu einer Fehlregulation des Übergangs von der G- in die S-Phase des Zellzyklus kommt<sup>62</sup>. Dieser fehlregulierte Übergang des Zellzyklus konnte ebenso beim zweiten Kollektiv an MPCs beobachtet werden, bei welchem eine fehlerhafte IgH-Switch-Rekombination zur Immortalisierung der MPC führt. Bei dieser misslungenen Rekombination kommt es zu einem DNA-Doppelstrangbruch im Bereich des Allels, welches für die schwere Kette codiert. Dieser, bei physiologischem Ablauf lokal reparierte Doppelstrangbruch, wird in der Entwicklung zur MPC hin durch eine reziproke Translokation ausgebessert. Dabei gelangt ein Protoonkogen unter die Kontrolle eines starken Immunglobulin-Enhancers<sup>60</sup>.

### 1.2.2.2 Sekundäre genetische Ereignisse

In Rahmen der folgenden Pathogenese finden weitere, zusätzliche Mutationen in den Zellklonen statt. Dabei kommt es zu einer Kumulation von Mutationen wie z.B. Genamplifikationen, -deletionen, sekundäre Translokationen, Verlust der Heterozygotie und epigenetischer Phänomene, die den Subklonen Progressions- und Standortvorteile ermöglichen. Es kommt im Myelom jedoch nicht zu einzelnen spezifischen Mutationen, wie z.B. bei der Chronisch Myeloischen Leukämie mit der Bildung des BCR-ABL-



Fusionsgens. Beim MM kommt es vielmehr zu einer kumulativen Deregulation einzelner Signalwege durch das Ansammeln verschiedener, diesen Signalweg modulierender, Mutationen<sup>16</sup>.

Ein in genomweiten Analysen häufig mutierter Signalweg im Multiplen Myelom ist der Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweg mit Mutationen der Ras Isoformen, NRas (Neuroblastoma Rat sarcoma) und KRas (Kirsten Rat sarcoma 2 viral oncogene homolog), in je etwa 20% der Myelompatientinnen und -patienten<sup>61,63,64</sup>. Auffällig ist dabei, dass Mutationen dieser Onkogene im MGUS selten sind (7%)<sup>61,65</sup>. Daher ist anzunehmen, dass dieser Signalweg eine Schlüsselrolle in der Entwicklung des MGUS zum Multiplen Myelom einnimmt. Durch diese Schlüsselposition stellt er ein mögliches therapeutisches Target dar, welches durch seine vielfältige Vernetzung mit anderen Signalwegen bisher nicht adäquat adressiert werden kann<sup>16,61</sup>.

Einen vollständigen Überblick über die molekulare Pathogenese und weitere häufig auftretende Genommutationen bei Myelompatientinnen und -patienten bieten die Artikel von Morgan et al. (2012)<sup>16</sup> und Chesi et al. (2015)<sup>61</sup>.

### 1.3 Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweg

#### 1.3.1 Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweg im Detail

In allen Eukaryonten existieren Signalwege, welche von der Natur angelegt wurden, um grundlegende zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Überleben und Apoptose zu steuern. Eines dieser ursprünglichen Signalsysteme, das in verschiedenen Permutationen existiert, und eine Vielfalt von Aufgaben erfüllt ist der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg. Dabei umfasst der Begriff des MAPK-Signalwegs eine Gruppe ähnlicher Signalwege. All diese MAPK-Signalwege besitzen einen äquivalenten Aufbau, bei welchem einer Phosphorylierungskaskade ein G-Protein vorgeschaltet ist. Dieses G-Protein aktiviert in einem ersten Schritt eine MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK), welche durch Phosphorylierung die nachgeschaltete MAPK-Kinase (MAPKK) stimuliert. Diese wiederum aktiviert die MAPK, welche mittels Phosphorylierung zahlreiche zelluläre Prozesse steuern kann<sup>66,67</sup>. Einer dieser MAPK-Signalwege ist der Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweg, auf welchen in dieser Arbeit genauer eingegangen werden soll.

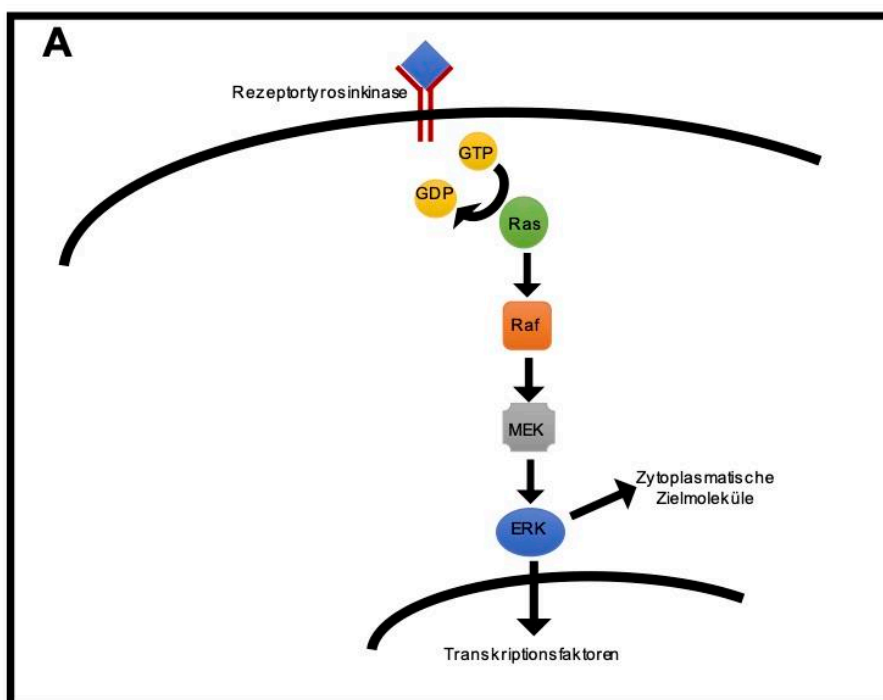
Das erste Molekül dieses Signalwegs ist das membrangebundene Protoonkogen Ras (Rat sarcoma). Dieses Protein umfasst eine Gruppe verschiedener Isoformen (KRas 4A

und 4B, HRas und NRas) und verwandter Proteine, die als G-Proteine den Startpunkt der Kaskade bilden. In ihrem inaktiven Zustand liegen die G-Proteine gebunden an Guanosindiphosphat (GDP) vor. Durch extrazelluläre Bindung eines Signalmoleküls an eine Rezeptortyrosinkinase kommt es zu deren Autophosphorylierung und der Assemblierung von GDP/GTP-Austauschfaktoren (Guanosintriphosphat [GTP]), wie z.B. Sos (son of sevenless)<sup>68</sup>. Mit Hilfe des Austauschfaktors Sos wird das Ras-gebundene GDP gegen GTP ausgetauscht und Ras somit aktiviert. Die Bindung von GTP verursacht dabei eine Konformationsänderung des Ras-Moleküls, welches nun in der Lage ist Raf (Rattenfibrosarkom)-Kinasen zu binden und an die Zellmembran zu dirigieren, wo Ras nachfolgend für eine Phosphorylierung von Raf sorgt<sup>69</sup>. Raf, das in diesem Signalweg die Rolle der MAPKKK einnimmt, phosphoryliert nachfolgend Mek1/2 (Mitogen-aktivierte Erk Kinase) an zwei der multiplen Serin-Reste. Mek1/2 wiederum haben bisher nur ein bekanntes Substrat, Erk1/2 (Extrazellulär Signal-regulierte Kinase), welche sie an spezifischen Threonin- und Tyrosin-Resten des Aktivierungs-Loops phosphorylieren. Die Phosphorylierung von Erk1/2 korreliert dabei mit ihrer Aktivierung, weshalb ihr Phosphorylierungslevel auch als Maß für die Aktivität von Erk zu Rate gezogen werden kann<sup>70</sup>. Die beiden Protein-Isoformen Erk1 und Erk2 sind Serin/Threonin-Kinasen, welche in aktivem Zustand mehr als 80 Substrate im Zytoplasma und Nukleus phosphorylieren können<sup>67,71</sup>. So regulieren sie beispielweise direkt die Genexpression von Transkriptionsfaktoren wie Ets (Erythroblasten transformationsspezifisch), Elk (Ets like) und Myc durch Phosphorylierung. Auch indirekt nimmt Erk1/2 Einfluss auf die Genexpression, indem es Substrate wie z.B. die p90-RSK (Ribosomale S6 Kinase) Kinase-Familie adressiert, welche wiederum ihrerseits Transkriptionsfaktoren oder Histone modifizieren<sup>72</sup>. Zusätzlich zu seinem Einfluss auf die Genexpression hat Erk auch Effekte auf die vorangeschalteten Proteine des Signalwegs. So kommt es durch die Aktivierung von Erk zur Inhibierung von Sos, Mek1 und Raf im Sinne einer negativen Rückkopplung<sup>67,73</sup>.

Trotz all dem dürfen Signalwege jedoch nicht als lineare Abfolge hintereinandergeschalteter Signalmoleküle angesehen werden. Vielmehr müssen sie als Netzwerk verschiedener Signalwege, welche in einem regelhaften Austausch miteinander stehen und sich auf jeder Stufe gegenseitig beeinflussen, verstanden werden. Beispielweise aktiviert Ras nicht nur Raf, sondern nimmt im aktiven Zustand auch Einfluss auf viele andere Moleküle. So ergeben sich Wechselwirkungen des aktiven Ras mit der Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K)<sup>74</sup>, welche nach Aktivierung Phosphoinositol (4,5)-biphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphoinositol (3,4,5)-triphosphat (PIP<sub>3</sub>)

phosphoryliert. PIP<sub>3</sub> bindet in einem nächsten Schritt an Akt und rekrutiert dieses zur Zellmembran, wobei Akt wiederum durch dort lokalisierte Kinasen aktiviert wird. Das aktivierte Akt ist dann in der Lage dazu auf verschiedene zelluläre Prozesse wie z.B. Zellwachstum, Zellzykluseintritt und Zellüberleben Einfluss zu nehmen<sup>75</sup>.

In den vergangenen Jahren konnten immer mehr solcher Effektormoleküle entdeckt werden, die mit Ras interagieren<sup>76</sup>. Auch wenn bis heute nicht alle Wechselwirkungen und deren physiologische Bedeutung verstanden sind, so scheint Ras zusammen mit seinen Unterformen eine entscheidende Rolle in der Steuerung eukaryotischer Zellen zuzukommen<sup>75</sup>.



**Abbildung 4: A:** Skizze des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs übernommen aus Kolch (2000)<sup>66</sup> und modifiziert mit Erlaubnis von Portland Press, Ltd, Lizenz-ID: 1222752-1. GTP = Guanosin-5'-triphosphat, GDP = Guanosin-5'-diphosphat, Ras = Rat sarcoma (Rattensarkom), Raf = Rattenfibrosarkom, Mek = Mitogen-aktivierte Erk Kinase, Erk = Extrazellulär Signal-regulierte Kinase.

### 1.3.2 KRas im Multiplen Myelom

Punktmutationen des Protoonkogens Ras wurden im Myelom in etwa 40% der Fälle gefunden (KRas und NRas je 20%)<sup>63</sup>. Das G-Protein Ras bildet den Ausgangspunkt des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs, sowie vieler weiterer Signalwege, die für die Proliferation und das Zellüberleben wichtig sind<sup>77-80</sup>. Wie in Zelllinien bereits gezeigt werden konnte, hängt das Zellüberleben dabei in entscheidendem Maße von aktivierenden Mutationen dieses Proteins ab<sup>63,81,82</sup>. Daher könnte es einen wichtigen Angriffspunkt in der Therapie des Multiplen Myeloms darstellen, welcher aufgrund der sehr starken Bindung des

aktivierenden GTPs an onkogene Ras Varianten bisher jedoch nicht adressiert werden kann<sup>83</sup>. Aus diesen Gründen konnte bisher noch keine KRas- oder NRas-spezifische Krebstherapie etabliert werden<sup>83,84</sup>.

Onkogene Mutationen von Ras sind zumeist in Codon 12 und 13 von Exon 2 und in Codon 61 von Exon 3 zu finden<sup>63,85-88</sup>. Mutationen in diesem Bereich des Ras-Gens beeinträchtigen die intrinsische GTPase-Aktivität und somit die Deaktivierung des Proteins<sup>77</sup>. Das somit konstitutiv aktive Ras-Molekül ermöglicht den Tumorzellen das Überleben und fördert deren Wachstum<sup>89</sup>. Zusätzlich können spärlich auch KRas-Mutationen in Exon 4 von Patientinnen und Patienten mit MM gefunden werden<sup>63</sup>. Die dort zu findende Mutation von Alanin an Stelle 146 betrifft eine evolutionär hoch konservierte Region, für welche vorhergesagt wird, dass sie für die Interaktion mit der Guaninbase von GDP relevant ist. Sie beeinflusst, anders als die Exon 2- und 3-Mutationen, nicht die intrinsische GTPase-Aktivität<sup>90,91</sup>, sondern führt zu einer erhöhten Austauschrate der Guaninnukleotide und dadurch im Durchschnitt zu einer häufigeren Aktivierung. Trotz der vermehrten Nettoaktivierung erhöht diese Exon 4-Mutation von Alanin an Stelle 146 bei Versuchen im NIH/3T3-Zelllinienmodell die KRas-Aktivität in einem geringeren Maße als solche Mutationen, die die GTPase-Aktivität betreffen<sup>92</sup>.

### 1.4 Zielsetzung

Um funktionelle Aussagen über diese Ras-Mutationen treffen zu können, wurden die in Patientinnen und Patienten gefundene Exon 2-Mutation in Codon 12 von Glycin zu Alanin und die Exon 4-Mutation an Stelle 146 von Alanin zu Valin im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht. Zusätzlich wurde die, in der Myelomzelllinie AMO1 vorhandene, Exon 4-Mutation in Codon 146 von Alanin zu Threonin in die Experimente eingeschlossen.

Damit schließt sich meine Arbeit thematisch an die, in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Ellen Leich-Zbat durchgeführten, lentiviralen Expressionsversuche bezüglich der seltenen KRas-Mutationen KRas<sup>p.G12A</sup>, KRas<sup>p.A146T</sup> und KRas<sup>p.A146V</sup> an<sup>93</sup>.

Im Gegensatz zu den dort zum Einsatz gekommenen lentiviralen Expressionsvektoren, wurde für die hier durchgeführten Überexpressionsversuche das *Sleeping Beauty* Transposon System verwendet.

Es wurde mittels *Sleeping Beauty* versucht eine funktionelle Analyse der verschiedenen KRas-Varianten, vergleichend in stabilen und transient transfizierten Zellpopulationen, zu erstellen. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung der Expression der KRas

nachgeschalteten Moleküle des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs, sowie dem PI3K/Akt-Signalweg. Für dieses übergeordnete Ziel galt es verschiedene Schritte zu absolvieren:

- I. Design und Klonierung eines nutzbaren Vektors für die Expressionsversuche. Dafür musste zunächst ein passender Promotor ausgewählt werden und nachfolgend die Herstellung von vier Expressionsvektoren für KRas-Wildtyp sowie die drei KRas-Mutationen erfolgen.
- II. Vergleichende Experimente transienter und stabiler Transfektion der Vektoren in verschiedenen Myelomzelllinien. Für die Visualisierung der Expression von KRas und der Aktivierungsspiegel von nachgeschalteten Signalmolekülen kamen Western Blot Analysen zum Einsatz. Darüberhinausgehend wurden verschiedene weitere Methoden verwendet, um die beobachtete problematische Heterogenität der Vektor-basierten Expression von KRas besser zu verstehen und gegebenenfalls auszugleichen.
- III. Untersuchung des Einflusses des im Nährmedium enthaltenen fötalen bovinen Serums (FBS) auf die Aktivierung verschiedener KRas-abhängiger Moleküle wie z.B. Akt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Listen der Materialien

#### 2.1.1 Technische Ausrüstung und Zubehör

**Tabelle 2:** Liste der verwendeten technischen Ausrüstung aufgelistet alphabetisch nach Geräteart, Produktname und Hersteller.

<b>Geräteart</b>	<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
Beheizbares Mischgerät	Thermomixer compact	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Blotting System	Mini TransBlot® Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules; USA
Brutschrank	INseries	Memmert GmbH + Co. KG; Schwabach; Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heracell™ 150	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA
Durchflusszytometer	FACSCalibur™	Becton, Dickinson and Company; Franklin Lakes; USA
Einstellungskonsole für Mikroskop	T-Cube™ LED-Driver LEDD1B	Thorlabs, Inc.; Newton; USA
Elektroporator	Gene Pulser Electroporation System	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules; USA
Magnetrührer	L-81 Hotplate Magnetic Stirrer	Labinco B.V.; Breda; Niederlande
Magnetrührer	MR Hei-Mix S	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG; Schwabach; Deutschland
Membran (Western Blot)	Amersham Protran	GE Healthcare; Chalfont St. Giles; Großbritannien
Mikroskop	CKX53	Olympus K.K.; Shinjuku; Japan
Mischgerät	Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG; Schwabach; Deutschland
Mischgerät	MACSmix™ Tube Rotator	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG; Bergisch Gladbach; Deutschland
Mischgerät	Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG; Schwabach; Deutschland
Mischgerät	Rocking Shaker DRS-12	neoLab Migge GmbH; Heidelberg; Deutschland
Monochrom Drucker	P91D	Mitsubishi; Chiyoda; Japan
Netzteil	Elektrophorese Power Supply E844	Consort bvba; Turnhout; Belgien

## 2 Material und Methoden

Netzteil	GPS 200/400	Pharmacia; Stockholm; Schweden
Netzteil	PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules; USA
Netzteil	PowerPac™ HC	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules; USA
pH- und Temperatur-Messgerät	HI 991001 pH/Temperature meter	Hanna Instruments; Woonsocket; USA
Sicherheitswerkbank	Laminar Flow-Sicherheitswerkbank Klasse II	BDK Luft und Reinraumtechnik GmbH; Sonnenbühl-Genkingen; Deutschland
Spektralphotometer	NanoDrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA
Transformator	AT-400 NV Vorschalt-Transformator	VOLTCRAFT; Wollerau; Schweiz
Trockenschrank	Ufseries	Memmert GmbH + Co. KG; Schwabach; Deutschland
Vortexmischer	Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, Inc.; Bohemia; USA
Vortexmischer	Vortex-Genie™ 1 Touch mixer	Scientific Industries, Inc.; Bohemia; USA
Waage	Scout® Pro	Ohaus Corporation; Parsippany; USA
Wasserbad	Inkubations-/Inaktivierungsbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH; Burgwedel; Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5810	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Zentrifuge	Mini centrifuge ROTILABO®	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R	Heraeus Holding GmbH; Hanau; Deutschland

### 2.1.2 Software

*Table 3: Liste der verwendeten Software aufgelistet alphabetisch nach Produktname und Hersteller.*

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
Adobe Photoshop	Adobe Inc.; San José; USA
BD CellQuest Pro™	Becton, Dickinson and Company; Franklin Lakes; USA
Endnote	Clarivate Analytics; Philadelphia; USA
FlowJo	FlowJo LLC; Ashland; USA

## 2 Material und Methoden

Microsoft Office	Microsoft Corporation; Redmond; USA
SnapGene	GSL Biotech LLC; San Diego; USA

### 2.1.3 Chemikalien und Zellkulturmedien

**Tabelle 4:** Auflistung der eingesetzten Chemikalien, Zellkulturmedien und Zusätze alphabetisch sortiert nach Produktname, CAS-Nummer (CAS = Chemical Abstracts Service) und Hersteller.

Produktname	CAS Nummer	Hersteller
2-Propanol	67-63-0	VWR International; Radnor; USA
Adenosintriphosphat (ATP)	34369-07-8	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Agar Agar	9002-18-0	Otto Nordwald GmbH; Hamburg; Deutschland
Agarose	9012-36-6	Biozym Scientific GmbH; Hessisch Oldendorf; Deutschland
Albumin Fraktion V, proteasefrei	90604-29-8	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	7727-54-0	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Ampicillin	69-53-4	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
Annexin V-Fluoresceinisothiocyanat (FITC)		Sigma Aldrich; St. Louis; USA
Bromphenolblau	115-39-9	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
CD4 MicroBeads		Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG; Bergisch Gladbach; Deutschland
cOmplete		Hoffmann-La Roche; Basel; Schweiz
Cycloheximid	66-81-9	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	67-68-5	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Desoxy Nukleosidtriphosphat (dNTP)-Mix		Fermentas International; Vilnius; Litauen
Ethanol 70%	64-17-5	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Ethanol 96%	64-17-5	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	60-00-4	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Fötales Bovines Serum (FBS)	9014-81-4	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
Glycerin	56-81-5	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Glycin	56-40-6	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
HDGreen	7732-18-5 7647-01-0	Intas Science Imaging Instruments GmbH; Göttingen; Deutschland



## 2 Material und Methoden

---

HEPES	7365-45-9	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
Kaliumacetat	127-08-2	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Kalziumchlorid	10043-52-4	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
L-Glutamin	56-85-9	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA
LB-Medium (Luria/Miller)		Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Luminol	521-31-3	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Magermilchpulver	68514-61-4	TSI GmbH & Co. KG; Zeven; Deutschland
Magnesiumacetat	142-72-3	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	7768-30-3	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Methanol	67-56-1	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
Natriumacetat	127-09-3	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Natriumazid	26628-22-8	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
Natriumchlorid	7647-14-5	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Natriumpyruvat	113-24-6	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
OptiPrep		Fresenius Kabi Norge AS; Oslo; Norwegen
p-Coumarsäure	501-98-4	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
Penicillin G	113-98-4	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Deutschland
Ponceau S	6226-79-5	AppliChem GmbH; Darmstadt; Deutschland
Propidiumiodid (PI)	25535-16-4	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
Proteaseinhibitorcocktail II		Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Proteaseinhibitorcocktail III		Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Puromycin	58-58-2	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	79-06-1 110-26-9	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
RPMI-1640 Medium		Sigma Aldrich; St. Louis; USA
Salzsäure 20%	7647-01-0	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	151-21-3	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland

## 2 Material und Methoden

Streptomycin	57-92-1	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Deutschland
TEMED	110-18-9	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
TRIS	77-86-1	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Triton X-100	9002-93-1	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
Trypanblau	72-57-1	Sigma Aldrich; St. Louis; USA
Tween® 20 Biochemica	9005-64-5	AppliChem GmbH; Darmstadt; Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	7722-84-1	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
β-Mercaptoethanol	60-24-2	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland

### 2.1.4 Enzyme und zugehörige Puffer

*Table 5: Alphabetische Nennung der eingesetzten Enzyme und zugehörigen Puffer, nach Produktname und Hersteller sortiert.*

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
10x DreamTaq Puffer	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA
10x Fast Digest Puffer	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA
10x Puffer Tango	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA
10x T4 DNA-Ligase Puffer	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA
5x Reaktionspuffer	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA
DreamTaq Hot Start DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA
Q5 High GC Enhancer	New England Biolabs; Ipswich; USA
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs; Ipswich; USA
Q5 Reaktion Puffer	New England Biolabs; Ipswich; USA
RevertAid Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA
Shrimp alkalische Phosphatase (SAP)	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA

## 2 Material und Methoden

T4 Polynukleotidkinase

Thermo Fisher Scientific;  
Waltham; USA

### 2.1.5 Restriktionsenzyme

**Tabelle 6:** Eingesetzte Restriktionsenzyme in alphabetischer Reihenfolge sortiert nach Restriktionsenzymname, Erkennungssequenz mit Schnittstelle und Hersteller.

Restriktionsenzymname	Erkennungssequenz	Hersteller
BstXI	5' CCAN NNNN↓ NTGG 3' 3' GGTN↑ NNNN NACC 5'	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA
NheI	5' G↓ CTAG C 3' 3' C GATC↑ G 5'	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA
NotI	5' GC↓ GGCC GC 3' 3' CG CCGG↑ CG 5'	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA
SacI	5' G AGCT↓ C 3' 3' C↑ TCGA G 5'	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA
SpeI	5' A↓ CTAG T 3' 3' T GATC↑ A 5'	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA
XbaI	5' T↓ CTAG A 3' 3' A GATC↑ T 5'	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA

### 2.1.6 Längenstandards

**Tabelle 7:** Liste der verwendeten Längenstandards mit Verwendungszweck, Produktname und Hersteller (in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet).

Verwendung	Produktname	Hersteller
DNA-Marker	GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA
Protein-Marker	PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific; Waltham; USA

### 2.1.7 Antikörper

#### 2.1.7.1 Primärantikörper

**Tabelle 8:** Im Rahmen meiner Arbeiten zum Einsatz gekommene Primärantikörper alphabetisch aufgelistet mit Namen, Ursprungsspezies, Verdünnung für Western Blotting und Hersteller.

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Akt (#9272)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology; Danvers; USA

## 2 Material und Methoden

Erk1/2 (#9102)	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling Technology; Danvers; USA
HA Tag (ab9110)	Kaninchen	1:4000	Abcam; Cambridge; Großbritannien
KRas-2B (sc-521)	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz Biotechnology; Dallas; USA
Phospho-Akt (Ser473) (#4058)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology; Danvers; USA
Phospho-Akt (Thr308) (#2965)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology; Danvers; USA
Phospho-Erk1/2 (#9101)	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling Technology; Danvers; USA
Phospho-Stat3 (#9138)	Maus	1:1000	Cell Signaling Technology; Danvers; USA
Raf-1 (sc-133)	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz Biotechnology; Dallas; USA
$\alpha$ -Tubulin (MCA78G)	Ratte	1:1000	Bio-Rad Laboratories, Inc; Hercules; USA

### 2.1.7.2 Sekundärantikörper

**Tabelle 9:** In den Experimenten verwendete Sekundärantikörper alphabetisch aufgelistet mit Namen, Ursprungsspezies, Verdünnung für Western Blotting und Hersteller.

Sekundärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen, HRP-konjugiert (111-036-045)	Ziege	1:20000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; West Grove; USA
Maus, HRP-konjugiert (115-036-003)	Ziege	1:20000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; West Grove; USA
Ratte, HRP-konjugiert (112-036-062)	Ziege	1:20000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.; West Grove; USA

### 2.1.8 Reaktionssets (Kits)

**Tabelle 10:** Für meine Arbeiten eingesetzte Reaktionssets mit Namen und Hersteller in alphabetischer Reihenfolge.

Produktname	Hersteller
NucleoBond® Xtra Midi	MACHEREY-NAGEL; Düren; Deutschland
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL; Düren; Deutschland
RNeasy® Mini Kit (250)	QIAGEN N.V.; Venlo; Niederlande

## 2 Material und Methoden

### 2.1.9 Zelllinien

**Tabelle 11:** Verwendete Myelomzelllinien mit Namen und Angabe des Vertreibers.

Zelllinie	Vertrieb
JJN-3	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ); Braunschweig; Deutschland
L-363	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ); Braunschweig; Deutschland
OPM-2	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ); Braunschweig; Deutschland

### 2.1.10 Primer und Oligonukleotide

#### 2.1.10.1 Primer

**Tabelle 12:** Für PCRs und Sequenzierungen eingesetzte Primer mit Angabe des Namens und der Basensequenz.

Primer	Basenfolge (5' nach 3')
230-3'-Primer	TTATGATCTAGAGTCGCGGC
230-5'-Primer	AACCGTCAGATCGCCTGGAG
5'-Primer-KRas-Amplifikat	AGACACAAAACAGGCTCAGG
CAG-3'-Primer	TCAGATGCTCAAGGGGCTTCA
CAG-5'-Primer	TTCGGCTTCTGGCGTGTGA
CMV-5'-Primer	GCAAATGGGCGGTAGGCGT
KRas-3'-Primer	GATCGCGGCCGCTTACATAATTACACACTTTGTCT
KRas-5'-Primer	GATCGCTAGCATGACTGAATATAAACTTGTGGT
pT2-3'-Primer	CTTCCACACCTGGTTGC
pT2-MCS-3'-Primer	CAACAACAATTGCATTCA
T3-Promotor-Primer	AATTAACCCTCACTAAAGG
T7-Promotor-Primer	TAATACGACTCACTATAGG

#### 2.1.10.2 Oligonukleotide

**Tabelle 13:** Verwendete Oligonukleotide zur Generierung eines dsDNA-Klonierungselements, das eine 1x HA-Tag Sequenz kodiert (Startcodon unterstrichen) mit Angabe der Nukleotidsequenz.

Name	Basenfolge (5' nach 3')
HA-Forward	CTAGGACTAGT <u>TATGT</u> ACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCT
HA-Reverse	CTAGAGCTAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATACTAGTC

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1.11 Lösungen und Puffer

**Table 14:** Auflistung aller selbst hergestellten Puffer und Lösungen mit Angabe ihrer Zusammensetzung.

<b>Name</b>	<b>Menge</b>
1% Agarosegel	0,5g Agarose 50mL TAE-Puffer 4µL HDGreen
10x TBS-Waschpuffer (pH 7,6)	20mM TRIS 136mM Natriumchlorid
10x TGS Laufpuffer (2L)	60g TRIS 284g Glycin 20g SDS
12% Trenngel	4,7mL Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) 2,9mL Trenngelpuffer 4,1mL ddH <sub>2</sub> O 16,1µL TEMED 195µL 10% Ammoniumperoxodisulfat
1x TBS-Tween-Puffer	100mL 10x TBS-Waschpuffer 900mL ddH <sub>2</sub> O 1mL Tween® 20 Biochemica
2x Laemmli-Puffer (50mL)	5mL 20% SDS-Lösung 5mL Glycerin 3mL TRIS pH 6,8/1M 5mL β-Mercaptoethanol 1 Spatelspitze Bromphenolblau 32mL ddH <sub>2</sub> O
Agarplatten (á 30mL)	500mL LB-Medium 7,5g Agar Agar (evtl. Antibiotikum z.B. 500µL Ampicillin)
Annexin V-Bindepuffer	10mM HEPES/NaOH pH 7,4 140mM Natriumchlorid 2,5mM Kalziumchlorid
Antikörperlösung	Blockingpuffer Antikörper in entsprechender Verdünnung (bei Primärantikörper 0,01% Natriumazid)
Blockingpuffer	1x TBS-Tween-Puffer 5% Magermilchpulver
Blottingpuffer (2L)	400mL Methanol 28,8g Glycin 6g TRIS
ECL-Reaktionslösung	2,5mM Luminol in DMSO 0,2mM p-Coumarsäure 100mM TRIS pH 8,8 3mM 30% Wasserstoffperoxid

## 2 Material und Methoden

---

IP-Lysepuffer (Stammlösung)	30mM TRIS pH 7,0 120mM Natriumchlorid 10% Glycerin 1% Triton X-100
IP-Lysepuffer (zum Einsatz, 540µL)	500µL IP-Lysepuffer (Stammlösung) 20µL cOmplete 10µL Proteaseinhibitorcocktail II 10µL Proteaseinhibitorcocktail III
Kryomedium	90% FBS 10% Dimethylsulfoxid
MACS-Puffer	0,5L PBS 2,5mL FBS 2,5mL EDTA (0,5M)
Nährmedium mit Zusätzen	500mL RPMI-1640 Medium 5mL Natriumpyruvat 5mL L-Glutamin 5mL Penicillin-Streptomycin 50mL FBS
Oligonukleotid Annäherungs-Puffer (OAB)	100mM Kaliumacetat 20mM HEPES pH 7,4 2mM Magnesiumacetat
Ponceau S-Lösung	0,1% Ponceau S 5% Essigsäure
Sammelgel	1mL Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) 1,3mL Sammelgelpuffer 2,9mL H <sub>2</sub> O 5,25µL TEMED 63µL 10% Ammoniumperoxodisulfat
Sammelgelpuffer	0,5M TRIS 0,015M SDS
Trenngelpuffer	1,5M TRIS 0,015M SDS pH 8,8

---

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Humane Myelom Zelllinien

Die drei Zelllinien, die für die Experimente in dieser Arbeit verwendet wurden, sind etablierte Myelom-Zelllinien. Diese bieten im Gegensatz zu Primärzellen, welche an Patientinnen und Patienten durch Knochenmarksaspiration gewonnen werden, verschiedene Vorteile.

So können die etablierten Zelllinien käuflich erworben werden, weshalb man nicht auf die Akquirierung von Patientinnen und Patienten für (prä-) klinische Studien mit der damit verbundenen ethischen Problematik angewiesen ist. Die Möglichkeit des kommerziellen Vertriebs bietet des Weiteren den theoretischen Vorteil des Zurückgreifens auf

sogenannte kryokonservierte Zellbanken, die den Austausch des verwendeten Zellmaterials bei Kontamination bzw. in regelmäßigen Abständen (üblicherweise nach etwa 3-4 Monaten) gewährleisten.

In der Praxis wird dabei das Zellmaterial jedoch aus wirtschaftlichen Gründen nicht regelhaft von kommerziellen Zellbanken bezogen, sondern aus der ersten Anzucht einer erworbenen Zelllinie eine eigene kryokonservierte Zellbank erstellt. Für die regelmäßige Erneuerung der Versuchszellkultur wird dann auf diese hauseigene Zellbank zurückgegriffen. Durch das regelmäßige Verwerfen der Versuchszellkulturen wird das langfristige Kontaminationsrisiko durch andere Zelllinien minimiert. Außerdem werden potenziell neu aufgetretene genetische Mutationen des Versuchsmaterials frühzeitig eliminiert und es kann eine Gleichwertigkeit bei der Interpretation der Versuchsergebnisse garantiert werden. Die Verwendung von immortalisierten Zelllinien bietet außerdem die Möglichkeit große Mengen an Versuchsmaterial in kurzer Zeit zu generieren und somit verschiedene Versuche in engen zeitlichen Abständen durchzuführen. Der für meine Arbeit entscheidende Vorteil von etablierten Myelomzelllinien gegenüber Primärzellen ist jedoch, dass lediglich etablierte Zelllinien unter *in vitro* Bedingungen proliferieren und die Durchführung meines darauf basierenden Versuchsansatzes ermöglichen.

Die, in den Experimenten verwendeten, humanen Myelom Zelllinien OPM-2, JJN-3 und L-363 entstammen der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen des Leibniz Instituts ([DSMZ], Braunschweig, Deutschland). OPM-2 wurde 1982 aus dem peripheren Blut einer 56-jährigen Frau mit Multiplem Myelom (Typ IgG $\lambda$ ) gewonnen<sup>94</sup>. Die Zelllinie JJN-3 entstammt einer 57 Jahre alten Patientin mit Plasmazelleukämie (Typ IgA $\kappa$ ), wobei die Erstdiagnose 1987 gestellt wurde<sup>94</sup>. Sie ist ein Subklon der parentalen Zelllinie JJN-1. Die zudem verwendeten L-363-Zellen konnten aus dem peripheren Blut einer 36-jährigen Patientin, mit einer 1977 diagnostizierten Plasmazelleukämie vom Typ IgG, etabliert werden<sup>94</sup>.

### 2.2.2 Kulturbedingungen

Die zu untersuchenden Zellen wurden, sofern nicht anders beschrieben, immer in RPMI-1640 Nährlösung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Dafür wurden der Nährlösung vor Verwendung 10% FBS, 100U/mL Penicillin, 100 $\mu$ g/mL Streptomycin, 2mM Glutamin sowie 1mM Natriumpyruvat hinzugefügt<sup>95</sup>. Es erfolgten regelmäßige Kontrollen der Zellzahl im Kulturmedium und abhängig von den geplanten Experimenten wurden die Zellen beim Erreichen einer Zelldichte von etwa 1x10<sup>6</sup>/mL aufgeteilt. Beim sogenannten



Splitten wurde die Zellzahl im Verhältnis 1:2-1:8 verringert, wobei die überschüssigen Zellen verworfen und die verbleibende Zellkultur mit frischem Medium aufgefüllt wurde.

### 2.2.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zellzahlen wurde in regelmäßigen Abständen durchgeführt. Dafür wurden 20µL Zellsuspension 1:1 mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau versetzt. Da die intakte Zellmembran vitaler Zellen eine Aufnahme des Farbstoffs ins Zellinnere verhindert, erlaubt die Verwendung des Farbstoffs eine Unterscheidung vitaler und abgestorbener Zellen. Letztere werden durch das Trypanblau dunkelblau markiert<sup>96</sup>. Für das anschließende Zählen der Zellen kam eine Neubauer-Zählkammer zum Einsatz, welche die Bestimmung der Zelldichte lebender Zellen/mL erlaubt.

### 2.2.4 Kryokonservierung der Myelomzellen

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Myelomzellen wurde die Kryokonservierung verwendet. Dafür wurde zunächst die Zellzahl bestimmt (siehe 2.2.3). Anschließend wurde das gewünschte Volumen Zellsuspension mit enthaltenen  $5-10 \times 10^6$  Zellen in 50mL Falcons pipettiert und diese bei 1200rpm zentrifugiert. Der Überstand an Nährmedium wurde verworfen und die Zellpellets in je 1mL Einfriermedium (0,9mL FBS mit 0,1mL DMSO) resuspendiert. Zur Konservierung der Zellen wurden sogenannte Kryoröhrchen verwendet, welche bis zur Verwendung in Tanks mit flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden. Bevor eine längerfristige Kryokonservierung erfolgte, wurden die Zellkulturen auf die Abwesenheit von Mykoplasmen hin überprüft (siehe 2.2.5).

### 2.2.5 Mykoplasmen-PCR

Mykoplasmen sind kleine, zellwandlose Bakterien. Aufgrund ihrer sehr geringen Größe von  $0,2-0,4\mu\text{m}$ <sup>97</sup> ist der lichtmikroskopische Nachweis nicht möglich. Durch das bestehende Überangebot an Nahrung in den Nährlösungen für Zellkulturen bieten diese den Mykoplasmen einen optimalen Nährboden. Da den meisten gängigen Antibiotika durch die fehlende Zellwand bei den Mykoplasmen der Angriffspunkt fehlt, sind sie gegen diese nicht wirksam. Aus diesem Grund werden die Mykoplasmen bei den in der Zellkultur zur Anwendung kommenden Antibiotika nicht regelhaft miterfasst. Mykoplasmen beeinflussen aufgrund ihrer parasitären Lebensweise den Metabolismus der kultivierten Myelomzellen und können deshalb zu einer Verfälschung der gewonnenen experimentellen Ergebnisse führen<sup>98</sup>. Daher ist eine gewissenhafte Überprüfung der Proben auf die Abwesenheit von Mykoplasmen von großer Bedeutung.

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction [PCR]) ist eine sensitive und spezifische Möglichkeit eine Nährlösung auf das Vorhandensein von Mykoplasmen hin zu untersuchen. Für die Durchführung der PCR wurde je 1mL der zu analysierenden Medienüberstände in 1,5mL Eppendorfgefäße überführt und bei 4000rpm für 4 Minuten zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde wiederum in ein frisches Gefäß pipettiert und für 5 Minuten bei 98°C erhitzt. Abschließend erfolgte ein erneutes Pelletieren.

Der nachfolgend hergestellte PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

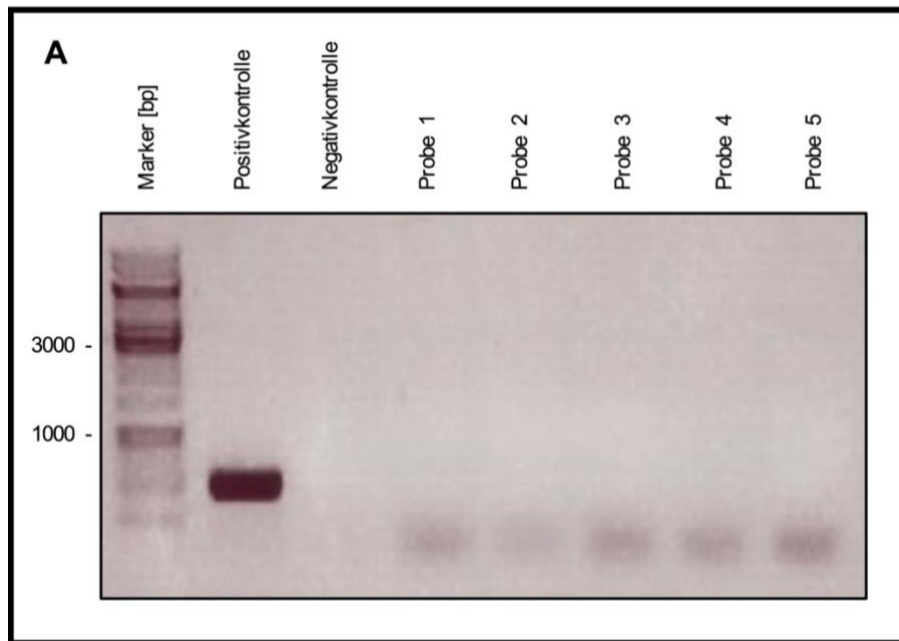
2,5µL	10x Dream Taq buffer
2,5µL	MgCl <sub>2</sub>
2,5µL	dNTP-Mix
1µL	MykoPrimer-Mix 5'
1µL	MykoPrimer-Mix 3'
0,3µL	Dream Taq
14,2µL	ddH <sub>2</sub> O
1µL	Probe

Zusätzlich zu den PCR-Ansätzen mit den zu analysierenden Proben, wurden immer auch ein PCR-Ansatz als Positivkontrolle (Mykoplasmen-DNA-haltige Probe) und ein Ansatz als Negativkontrolle (Zugabe von mykoplasmenfreiem ddH<sub>2</sub>O als Probe) hergestellt. Sämtliche Ansätze wurden für 35 Zyklen dem folgenden PCR-Schema unterzogen:

Denaturierung:	94°C für 30sec
Primeranlagerung:	60°C für 30sec
Elongation:	72°C für 1min

Nach Ablauf der PCR wurde ein Agarosegel mit den Proben, sowie der Positiv- und Negativkontrolle beladen und bei 80V mittels Gelelektrophorese (siehe 2.4.10) analysiert.

Ein mögliches Ergebnis ist in Abbildung 5 gezeigt.



**Abbildung 5: A:** Beispielbild einer Mykoplasmen-PCR.

Abkürzungen: bp = Basenpaare. In der Bahn der Positivkontrolle ist eine deutliche DNA-Bande für die amplifizierte Mykoplasmen-DNA zu erkennen. Diese Bande fehlt wie zu erwarten in der Negativkontrolle. In den Bahnen der Proben fehlt die Bande ebenso, weshalb in der Gesamtinterpretation dieser PCR davon ausgegangen werden kann, dass die getesteten Zellkulturen mykoplasmenfrei sind.

### 2.2.6 Transfektion mittels Elektroporation

Die Elektroporation wurde dazu verwendet den Zellen extrachromosomale DNA in Form von Plasmiden zuzuführen. Damit konnten Expressionskassetten für shRNAs (short hairpin RNA) und/oder für mRNAs zur Proteinexpression in die Zellen eingebracht und durch die Zelle prozessiert werden. Dabei bietet die Transfektion mittels Elektroporation gegenüber der häufig verwendeten Transfektion unter Verwendung lentiviraler Systeme verschiedene Vorteile. So ist die Anzucht der entsprechenden Viren zeitaufwendig und der Einsatz solcher lentiviraler Systeme erfordert außerdem das Arbeiten unter S2-Laborbedingungen. Unter anderem aus diesen Gründen kam in den Versuchsreihen dieser Arbeit ausschließlich die Elektroporation als Methode zur Transfektion von Plasmiden zum Einsatz.

Für die Elektroporation wurde zunächst die gewünschte Anzahl an Myelomzellen entnommen und für 5min bei 1200rpm zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet im passenden Volumen RPMI-1640 Nährmedium ohne weitere Zusätze resuspendiert. Für die Elektroporation in der 2mm Küvette kamen 200 $\mu$ L Zellsuspension und in der 4mm Küvette 500 $\mu$ L Zellsuspension zum Einsatz. Zusätzlich wurden den resuspendierten Zellen 20 $\mu$ g/mL der gewünschten Plasmid-DNA sowie weitere Reagenzien (siehe 2.2.7) beigelegt. Der

Elektroporationsansatz wurde anschließend in die passende 2mm bzw. 4mm Küvette überführt und bei der zuvor ermittelten optimalen Transfektionsspannung (siehe Tabelle 15) mittels des Gene Pulsers bei 960 $\mu$ Fd Kondensatorkapazität elektroporiert.<sup>95</sup>

**Tabelle 15:** Experimentell ermittelte Elektroporationsspannungen nach Steinbrunn et al. (2014)<sup>95</sup>.

Zelllinie	Spannung (in V) für Elektroporation mit 4mm Küvette	Spannung (in V) für Elektroporation mit 2mm Küvette
JJN-3	280	180
L-363	300	180
OPM-2	250	180

Bei der Verwendung der 2mm Küvette konnten 5-8x10<sup>6</sup> und bei der 4mm Küvette 10-20x10<sup>6</sup> Myelomzellen gleichzeitig elektroporiert werden. Unmittelbar nach erfolgter Elektroporation wurden die frisch transfizierten Zellen in auf 37°C vorgewärmtes RPMI-1640 Nährmedium ohne Zusätze überführt und verblieben dort jeweils so lange, bis alle Proben elektroporiert waren. Zuletzt wurden die Zellen in 20mL ebenfalls vorgewärmtes Nährmedium mit Zusätzen eingebracht und unter Standardbedingungen weiter kultiviert.

### 2.2.7 Herstellung transienter oder stabiler Zellklone

Bei der Verwendung elektroporierter Zellen kann zwischen transienter und stabiler Transfektion der Plasmid-DNA differenziert werden. Werden Zellen mit dauerhafter Expression der eingebrachten Gene gewünscht, so wird dem Elektroporationsansatz zusätzlich zur spezifischen *Sleeping Beauty*-basierten Plasmid-DNA für das Zielobjekt ein weiterer Expressionsvektor für das Enzym Transposase (30 $\mu$ g/mL) hinzugefügt, welches die stabile Integration von Expressionskassetten aus *Sleeping Beauty* in die genomische DNA der Zielzelle katalysiert. Die elektroporierte Myelomzellkultur wurde 2-3 Tage nach Transfektion mit einem passenden Antibiotikum versetzt und über 2 Wochen selektioniert. Durch die Zugabe des Antibiotikums konnten nur stabil transfizierte Zellen aufwachsen und somit bildeten auch nur solche Zellen das zu analysierende polyklonale Kollektiv. Die Selektion erfolgte mit Puromycin in folgenden Konzentrationen:

JJN-3	0,75 $\mu$ g/mL
OPM-2	1 $\mu$ g/mL
L-363	0,6 $\mu$ g/mL

War hingegen nur eine kurzzeitige Expression des transfizierten Plasmids gewünscht, so wurde dem Elektroporationsansatz kein Transposase-Plasmid hinzugefügt. Die

Zellen wurden dann am ersten Tag nach der Elektroporation mittels CD4-Beads aufgereinigt und analysiert. Für die Aufreinigung mit Hilfe von CD4-Beads wurden bei der Elektroporation 20µg/mL Proteinexpressionsplasmid für CD4 $\Delta$  (C-terminal trunkiertes CD4) kotransfiziert.

Um die Effizienz der Transfektion zu überprüfen konnten dem Elektroporationsansatz zusätzlich 5µg/mL eines Proteinexpressionsplasmids für verstärkt grün-fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein [eGFP]) hinzugefügt werden. Die Kotransfektion mit eGFP erlaubte die Analyse und Beurteilung der Transfektionseffizienz mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (fluorescence activated cell sorting [FACS]) an Tag 1 nach Elektroporation (siehe 2.2.8).

### 2.2.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die automatisierte Untersuchung einer Zellsuspension. Dabei wird ein konstanter Flüssigkeitsstrom der Probenlösung durch die Flusszelle erzeugt. In dieser erfolgt die Analyse der Zellen mithilfe eines Laserstrahls. Durch die Laserbestrahlung der Zellen kommt es zur Streuung des Lichtstrahls in verschiedenen Richtungen. Die Beugung des Lichtstrahls entlang des ursprünglichen Lichtweges wird als Vorwärtsstreulicht (forward scatter [FSC]) bezeichnet und lässt Rückschlüsse auf das Volumen der untersuchten Zellen zu. Beim außerdem zu beobachtenden Seitenstreulicht (side scatter [SSC]) kommt es zur Brechung des Laserstrahls in seitlicher Richtung und zur Detektion der Streuung mittels eines orthogonal zur Einfallsrichtung des Lichts angebrachten Sensors. Die Analyse des Seitenstreulichts erlaubt es Aussagen über die Granularität der Zelle, die Größe und Struktur ihres Zellkerns und die Menge der Vesikel zu treffen<sup>99</sup>. Durch die Gegenüberstellung von FSC und SSC in einem FSC/SSC Punktdiagramm wird es ermöglicht die Fraktion der lebenden Zellen (größeres Volumen und höhere Granularität, entsprechend stärkere Vorwärts- und Seitwärtsstreuung) gegenüber den toten Zellen abzugrenzen.

Zusätzlich können der Zellsuspension Fluoreszenzfarbstoffe hinzugefügt werden, welche eine nähere Charakterisierung der Zellen erlauben. Zur Untersuchung der Zellvitalität kamen in meinen Versuchen Propidiumiodid und Annexin V-FITC zum Einsatz.

Propidiumiodid ist ein roter Fluoreszenzfarbstoff der in doppelsträngige (Bereiche von) Nukleinsäuren interkaliert und nicht membrangängig ist, weshalb vitale Zellen mit intakter Zellmembran nicht markiert erscheinen<sup>100</sup>. Durch die Verwendung von Propidiumiodid können spät-apoptotische oder nekrotische Zellen detektiert werden, da

bei diesen die Integrität der Zellmembran geschädigt ist und somit eine Interkalation von Propidiumiodid in die nunmehr zugängliche genomische DNA stattfindet. Nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs kommt es zu einer Emission von Licht mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 617nm, welches wiederum mittels spezifischer Filter und Detektoren registriert werden kann. In den Versuchen wurde außerdem das Protein Annexin V gekoppelt an den grün fluoreszierenden Farbstoff FITC verwendet. Annexin V bindet Calcium-abhängig an Phosphatidylserin, einen Bestandteil der Zellmembran eukaryotischer Zellen<sup>101</sup>. Phosphatidylserin findet sich physiologisch auf der Innenseite der Zellmembran und kann somit bei vollständig intakten Zellen nicht von Annexin V erreicht werden. In der Frühphase der Apoptose verliert die Zellmembran ihre Asymmetrie, sodass Phosphatidylserin vermehrt auf der Außenseite erscheint und somit für Annexin V erreichbar wird. Durch die Bindung des an FITC gekoppelten Annexin V ist daher eine Erkennung von früh-apoptotischen Zellen (Annexin V-FITC-positiv, PI-negativ) möglich. Die Kombination der beiden Farbstoffe ermöglicht es daher zwischen vitalen, früh- und spät-apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen zu unterscheiden.

Des Weiteren war es möglich die Transfektionseffizienz der Elektroporationen mittels des kotransfizierten Proteinexpressionsplasmids für eGFP zu überprüfen. Dafür wurden die elektroporierten Zellen am Tag nach der Transfektion mittels Durchflusszytometrie analysiert und auf die Expression von eGFP untersucht. Parallel wurde eine Messung auf Propidiumiodid durchgeführt, um die Vitalität der fluoreszierenden Zellen nachzuweisen. eGFP ist ein gentechnisch modifiziertes Derivat eines ursprünglich aus einer Qualle gewonnenen Proteins, das bei Anregung grün fluoresziert<sup>102</sup>. Durch den Nachweis grün fluoreszierender, vitaler Zellen (eGFP-positiv, PI-negativ) konnte davon ausgegangen werden, dass neben der Transfektion dieses Proteinexpressionsplasmids auch die weiteren im Elektroporationsansatz befindlichen Plasmide erfolgreich in die grün markierten Zellen transfiziert wurden.

Eine gleichzeitige Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe war möglich, da diese zwar eine gemeinsame Anregungsfrequenz (488nm), jedoch unterschiedliche Emissionsfrequenzen besitzen und sich daher, durch die Verwendung entsprechender Filter-Detektor-Kombinationen, voneinander getrennt registrieren lassen.

Die Proben für die fluoreszenzzytometrischen Messungen wurden zunächst einer PBS-Waschung unterzogen (Zentrifugation von etwa 0,5-1mL Zellsuspension, Verwerfen des Überstands, Resuspension in Phosphat-gepufferter Salzlösung (phosphate-buffered saline [PBS]) und erneute Zentrifugation), um die Rückstände von Nährmedium zu

entfernen. Abschließend wurde das gewonnene Zellpellet in 200 $\mu$ L der passenden Trägerlösung resuspendiert (PBS oder bei Messung mit Annexin V: Annexin V-Bindepuffer) und der gewünschte Farbstoff (4 $\mu$ L Propidiumiodid- und/oder 1 $\mu$ L Annexin V-FITC-Lösung) hinzugegeben.

Alle fluoreszenzzytometrischen Messungen in dieser Arbeit wurden an einem FACSCalibur mit der Software CellQuest durchgeführt und anschließend mit dem Programm FlowJo ausgewertet.

### 2.2.9 Aufreinigung mittels CD4-MicroBeads

Wurde bei der zuvor durchgeführten Elektroporation das Proteinexpressionsplasmid für CD4 $\Delta$  mittransfiziert, so erfolgte am ersten Tag nach Transfektion die Aufreinigung der elektroporierten Zellen unter Verwendung von CD4-MicroBeads. Hierbei wurde die Gesamtzahl der elektroporierten Zellen auf solche selektioniert, die nach erfolgreicher starker Transfektion CD4 $\Delta$  auf ihrer Oberfläche exprimieren und entsprechend nach Inkubation mit anti-CD4-beschichteten paramagnetischen MicroBeads in einem Magnetfeld zurückgehalten werden. Dafür wurden die Zellen zunächst 5min bei 1200rpm zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand verworfen, die Zellen einer PBS-Waschung unterzogen und danach in kaltem MACS-Puffer resuspendiert und zentrifugiert. Nach diesem abschließenden Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vollständig verworfen und das verbliebene Zellpellet in 160 $\mu$ L MACS-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 40 $\mu$ L CD4-MicroBeads zur Zellsuspension, kam diese zur Inkubation für ca. 10min in den Überkopfschüttler. In der Zwischenzeit wurden die zur Aufreinigung verwendeten Säulen vorbereitet. Dies erfolgte, indem die Säulen in eine magnetische Haltevorrichtung eingespannt und zunächst zur besseren Benetzung 100 $\mu$ L Ethanol (100%) auf die Säule gegeben wurden. Nachfolgend wurde die Säule mit kaltem MACS-Puffer befüllt und das Ethanol vertrieben, bevor eine 23G Spritzenkanüle luftblasen-frei auf die Säule gesetzt und fixiert wurde. Anschließend wurde die gut durchmischte Zellsuspension, mit den an die CD4 $\Delta$ -positiven Zellen gebundenen MicroBeads, dem Überkopfschüttler entnommen, auf die Säule gegeben und nach dem Durchlaufen der Zellsuspension die Säule ein weiteres Mal mit MACS-Puffer befüllt. Nachdem der MACS-Puffer die Säule komplett durchlaufen hatte, wurde sie aus dem Magneten entnommen, die Kanüle entfernt, und die zurückgehaltenen CD4-positiven Zellen wurden in ein Auffangröhrchen transferiert. Dafür wurde Vollmedium auf die Säule gegeben und die Zellen unter Zuhilfenahme eines Stempels aus der Säule in ein Auffangröhrchen gedrückt. Anschließend wurde zentrifugiert (5min, 1200rpm), um in

einem nächsten Schritt tote Zellen, die ebenfalls in größerer Zahl auf der Säule verbleiben, mittels OptiPrep Gradientenzentrifugation abzutrennen.

### 2.2.10 Dichtegradientenzentrifugation

Die Aufreinigung mittels OptiPrep erlaubt das Auftrennen von intakten und zerstörten Zellen über einen Dichtegradienten. Durch die Wahl eines Zentrifugationsmediums mit höherer Dichte als die Dichte vitaler Zellen kann eine Auftrennung der beiden Zellfraktionen bei Zentrifugation erreicht werden. Der Verlust der Integrität der Zellmembran beim Absterben der Zellen führt dazu, dass das Zentrifugationsmedium in die toten Zellen eindringen kann, wohingegen es keinen Einfluss auf die Dichte vitaler Zellen hat und diese ihre natürliche Dichte beibehalten. Bei Zentrifugation im passenden Medium kommt es deshalb zur Sedimentation avitaler Zellen, während lebendige Zellen mit intakter Zellmembran an dessen Oberfläche flottieren. Bei der Dichtegradientenzentrifugation mittels OptiPrep wird das Zellpellet in einer Mischung aus 375µL OptiPrep-Puffer und 1,25mL Nährmedium mit Zusätzen resuspendiert und mit 200µL PBS vorsichtig überschichtet. Nach Zentrifugation (7min, 1800rpm) finden sich die vitalen Zellen an der Grenzschicht zwischen PBS und Medium/OptiPrep-Puffer und können von dort entnommen und in eine neue Eppendorf tube mit frischem Medium überführt werden. Die abgestorbenen Zellen bleiben am Boden des bei der Zentrifugation verwendeten Röhrchens zurück und werden verworfen. In einem abschließenden Zentrifugationsschritt wird verbliebenes OptiPrep entfernt, bevor die separierten, vitalen Zellen in Vollmedium ausgesät werden.

### 2.2.11 Einzelzellentnahme

Die Einzelzellentnahme ermöglicht es Zellkulturen heranzuzüchten, die als Klone von einer einzigen Ursprungszelle ausgehen. Durch die Anzucht von Klonen kann genug Zellmaterial gewonnen werden, um die ursprünglich entnommene Zelle, die ja nur einen Repräsentanten einer möglicherweise sehr heterogenen Zellkultur darstellt, mittels Western-Blot auf ihre Proteinexpression hin zu untersuchen. Diese Methode erlaubt es Hypothesen über die Zusammensetzung einer Zellkultur aufzustellen. Beispielsweise kann davon ausgegangen werden, dass nach Transfektion nicht alle Zellen einer Kultur die transfizierten Proteine im gleichen Maße exprimieren. Möglicherweise gewinnen dadurch einzelne Zellen, die ein bestimmtes Maß an Proteinexpression besitzen, gegenüber den anderen Zellen einen Wachstumsvorteil und dominieren im weiteren



Verlauf die Kultur. Um die Diversität der transfizierten Zellen untersuchen zu können eignet sich daher die Anzucht von Einzelzellklonen.

Für die Einzelzellentnahme wurden nach Transfektion die Zellen zunächst mittels eines Antibiotikums für mehrere Tage (ca. zwei Wochen) auf erfolgreich transfizierte Zellen selektioniert. Nach dem Absterben aller Zellen, welche die transfizierte DNA nicht stabil integriert hatten, wurden unter dem Mikroskop einzelne Zellen selektiert und in eine 96-Well-Platte umgesetzt. Zur Entnahme und dem Aussäen der Einzelzellen wurde eine über einer Bunsenbrennerflamme ausgezogene Pasteurpipette verwendet, die über ein Schlauchsystem zur oralen Bedienung modifiziert wurde. So konnten durch vorsichtiges Saugen am Schlauchsystem einzelne Zellen in die Pipette aufgenommen und durch nachfolgendes Pusten in vorher bereitgestelltem Nährmedium in einer 96-Well-Platte ausgesät werden. Durch das Ausziehen der Pipette über der Flamme eines Gasbrenners war es möglich eine neue, sehr feine Pipettenspitze (diese war im Idealfall nur geringgradig größer als eine einzelne Zelle) zu erzeugen. Die einzelnen Zellen wurden in je 100µL Medium mit Zusätzen in einer 96-Well-Platte ausgesät. Dabei wurden die äußeren 36 Wells nicht mit Zellen und Medium bestückt und stattdessen mit je 100µL PBS befüllt, um gleiche Wachstumsbedingungen für alle beimpften Wells zu gewährleisten. Die Zellen wurden für mehrere Wochen im Brutschrank inkubiert und bei erfolgreichem Heranwachsen eines Zellklons in ein größeres Gefäß zur weiteren Inkubation verpflanzt. Nachdem eine ausreichend große Zellzahl zur Analyse generiert werden konnte, wurden die einzelnen Zellklone mittels Western-Blotting (siehe 2.3.1) analysiert.

### 2.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.3.1 Western-Blotting

Der Western-Blot wurde 1979 entwickelt<sup>103</sup> und stellt eine Methode zur qualitativen Untersuchung eines Proteingemisches dar. In dieser Arbeit wurde das Western-Blotting verwendet, um Lysate der Myelomzellen auf ihre zytosolische Proteinexpression hin zu untersuchen. Dafür wurden die Zellen zunächst lysiert, die Proteine mittels einer SDS-PAGE anhand ihrer Größe aufgetrennt und diese dann auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Durch eine nachfolgende Inkubation der Membranen in einer Primärantikörperlösung und ein abschließendes Hinzugeben eines geeignet gekoppelten Zweitantikörpers konnte die Expression der Zielproteine mittels Lichtreaktion und Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

### 2.3.2 Vorbereiten der Myelomzellen

Um zytosolische Lysate der Zellen herzustellen, wurde zunächst die Zelldichte bestimmt (siehe 2.2.3). Dann wurde die gewünschte Zellmenge geerntet und durch Zentrifugation für 5min bei 1200rpm pelletiert. Im Anschluss daran wurden die entnommenen Proben einem Waschschrift mit PBS unterzogen und das entstandene Zellpellet umgehend, bis zur weiteren Verwendung, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Um eine Vergleichbarkeit der zu analysierenden Proben zu gewährleisten, wurden immer äquivalente Zellzahlen geerntet. Für die Lyse der gefrorenen Zellpellets, wurden diese auf Eis aufgetaut, pro  $1 \times 10^5$  Zellen je  $10\mu\text{L}$  Lysepuffer beigefügt und für 30min auf Eis inkubiert. Der verwendete Lysepuffer wurde zu jeder Verwendung frisch hergestellt, dafür wurden  $500\mu\text{L}$  an vorbereitetem Ip-Lysepuffer (siehe 2.1.11) mit  $10\mu\text{L}$  Proteaseinhibitorcocktail II,  $10\mu\text{L}$  Proteaseinhibitorcocktail III und  $20\mu\text{L}$  cOmplete vermischt. Nach erfolgter Lyse der Zellmembranen wurden durch Zentrifugation (10min, 13000rpm) die Membranbestandteile (Pellet) vom zytosolischen Lysat (Überstand) getrennt. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Eppendorf tube gegeben und konnte bis zur weiteren Nutzung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  verbleiben oder direkt weiterverarbeitet werden. In einem nächsten Schritt der Analyse wurde dann das Zelllysate im Verhältnis 1:1 mit Laemmli-Puffer (siehe 2.1.11) gemischt und für 3min bei  $98^{\circ}\text{C}$  zur Denaturierung der im Lysat befindlichen Proteine aufgekocht.

### 2.3.3 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis [SDS-PAGE]) wurde von Ulrich K. Laemmli entwickelt und ermöglicht die Auftrennung von Proteingemischen in einem elektrischen Feld anhand ihrer molekularen Masse<sup>104</sup>. Durch verschiedene Vorbereitungsschritte wird eine Linearisierung der Proteine bzw. eine Reduktion auf deren Primärstruktur erreicht. So führt das kurze Aufkochen zum Auflösen der Wasserstoffbrücken und das im Laemmli-Puffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol zur Spaltung der Disulfidbrücken in den Proteinen. Das sowohl im Laemmli-Puffer als auch in den SDS-Gelen verwendete Detergens Natriumdodecylsulfat erfüllt zwei Zwecke. Es führt einerseits durch Anlagerung an die Proteine zur Lösung nichtkovalenter Bindungen in deren Tertiär- und Quartärstruktur und andererseits zur Maskierung der Proteineigenladung mittels seiner negativen Ladung. Die Linearisierung der Proteine, das Binden von SDS und die damit verbundene Überlagerung durch eine konstant negative Ladung, erlauben es die Proteine anhand ihrer Kettenlänge, proportional zur Molekülmasse, aufzutrennen. Bei

der Wanderung der Proteine zur Anode durchlaufen diese das Gel, welches in seiner Filterfunktion bewirkt, dass kleinere Proteine schneller vorankommen als größere und die Proteine somit aufgrund der Größe differenziert werden können. Bei der in dieser Arbeit verwendeten diskontinuierlichen Form der SDS-PAGE durchlaufen die Proteine zunächst ein sogenanntes Sammelgel (ca. 15min, 90V). Dieses sorgt durch seine relativ große Porengröße und seinen neutralen pH-Wert dafür, dass sich eine gemeinsame Proteinfrent bildet. Beim nachfolgenden Eintritt in das kleinporige und basische Trenngel kommt es dann zu einem Zurückbleiben der großen Proteine gegenüber kleineren. Um die verschieden großen Proteine möglichst gut separieren zu können, erfolgte die Elektrophorese bei 130V im Trenngel so lange, bis die durch Bromphenolblau markierte Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Die Elektrophorese wurde in 1xTGS-Laufpuffer (siehe 2.1.11) in einer Elektrophoresekammer durchgeführt. Die Zusammensetzung des verwendeten Sammel-, sowie Trenngels sind unter 2.1.11 zu finden.

### 2.3.4 Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran

Der Proteintransfer der aufgetrennten Proteine auf eine proteinbindende Trägermembran (Nitrocellulosemembran) erfolgte unter Verwendung des Tank-Blottings. Hierfür wurde das SDS-Gel auf einer Nitrocellulosemembran platziert und zu beiden Seiten mit Filterpapier flankiert (Sandwich-Technik). Der Membran-Gel-Stapel wurde daraufhin in eine Haltevorrichtung eingespannt und in den Western-Blot-Tank gehängt. Durch Anlegen einer Spannung von 110V erfolgte der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Trägermembran. Zur Dokumentation der gleichmäßigen Proteinbeladung und des erfolgreichen Western-Blots wurde anschließend eine Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S durchgeführt. Dieser Farbstoff bindet dabei reversibel an positiv geladene Aminogruppen von Proteinen und lässt damit einen unspezifischen Nachweis derselben zu. Zur Entfärbung der Membran und um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren, wurde diese für 30min unter Schwenken mit 5% in TBS-T-Puffer gelöstem Magermilchpulver (Blockingpuffer, siehe 2.1.11) inkubiert.

### 2.3.5 Immunchemische Färbung

Bei der Methode der immunchemischen Färbung bedient man sich der Möglichkeit der spezifischen Proteinbindung eines Primärantikörpers und in einem zweiten Schritt der Visualisierung des gebundenen Primärantikörpers mittels eines Zweitantikörpers. Dabei

beruht die Spezifität des Sekundärantikörpers für den Fc-Teil des Primärantikörpers auf der passenden Spezies, aus welcher der Erstantikörper gewonnen wurde (Kaninchen, Maus, Ratte). Das Sichtbarmachen der gebundenen Antikörper gelang durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase [HRP]), welche in einer Lichtreaktion die Nachweisbarkeit mittels eines Röntgenfilms ermöglichte.

Zur Bindung des Primärantikörpers an das nachzuweisende Protein wurde dieser in einer Lösung aus 5% Magermilchpulver mit 0,1% Natriumazid in TBS-T-Puffer angesetzt und bei 4°C über Nacht mit der Trägermembran inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran 3-mal für je 10min mit TBS-T-Puffer gewaschen, bevor anschließend der jeweilige Sekundärantikörper (in einer Verdünnung von 1:20000 in TBS-T-Puffer gelöstem 5% Magermilchpulver angesetzt) hinzugegeben wurde. Die Nitrocellulosemembran wurde für 1-2h mit der Sekundärantikörperlösung inkubiert und abschließend drei weiteren Waschschritten mit TBS-T-Puffer unterzogen.

### 2.3.6 Analyse mittels Röntgenfilm

Zur Aktivierung der Meerrettich-Peroxidase und dem Nachweis der gebundenen Antikörper wurde die Membran zunächst für 1min mit verstärkter Chemolumineszenz (enhanced chemiluminescence [ECL])-Lösung (siehe 2.1.11) bedeckt. Anschließend wurde ein Röntgenfilm zur Belichtung in einer Dunkelkammer gegenüber der Membran exponiert. Durch die von der Peroxidase erzeugte Lichtemission konnte der Röntgenfilm an der Stelle der Proteinbande geschwärzt und nach der Belichtung in einer Röntgenfilmentwicklermaschine entwickelt werden. Abschließend wurde die visualisierte Proteinexpression der lysierten Myelomzellen mittels des Röntgenfilms analysiert.

Um verschiedene Proteine nachweisen zu können war es möglich die Membranen in aufeinanderfolgenden Färbe- und Entwicklungsschritten mittels unterschiedlicher Primär- und Sekundärantikörper zu untersuchen.

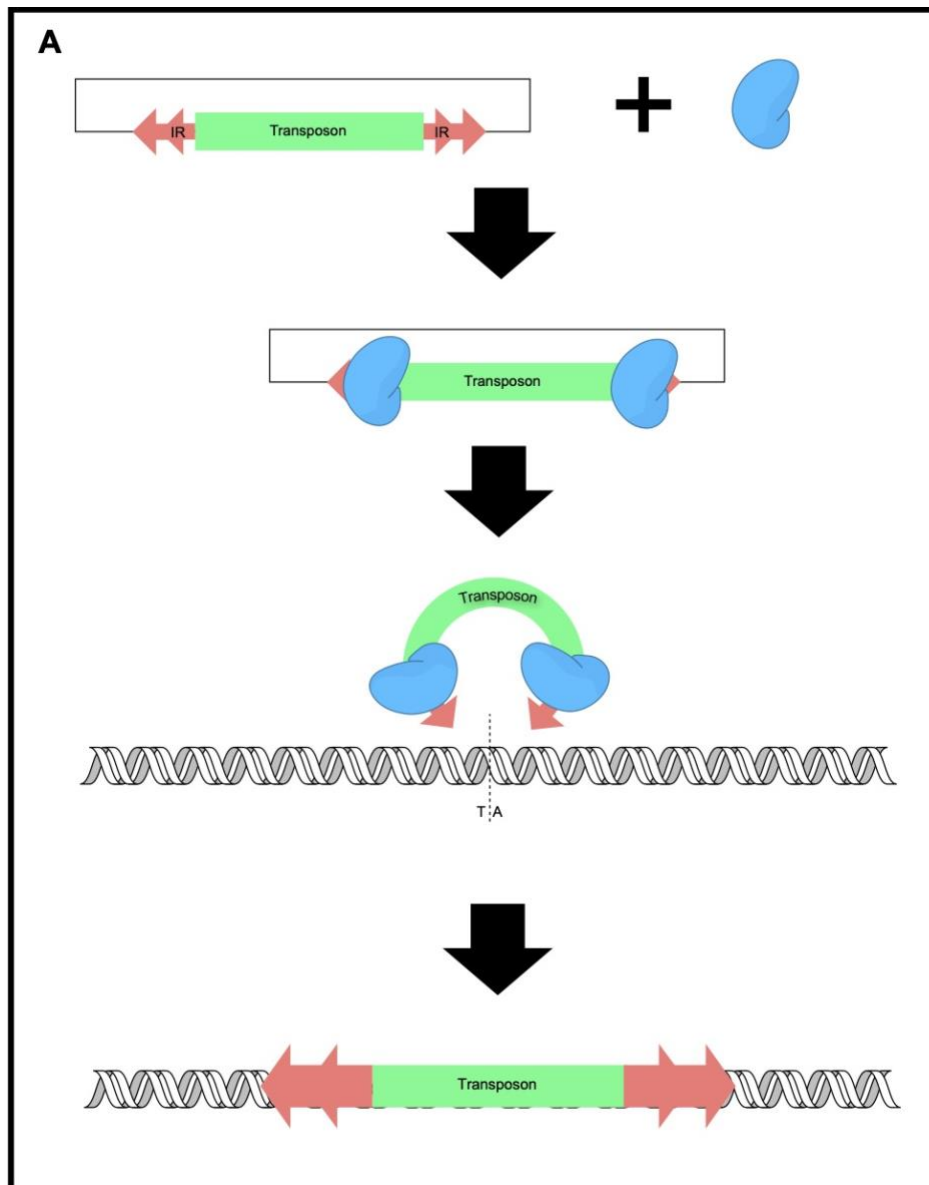
## 2.4 Molekularbiologische Methoden

Für die experimentelle Analyse der Überexpression verschiedener KRas-Mutationen in Myelomzelllinien und deren Auswirkung auf nachgeschaltete Signalwege wurde das plasmidbasierte Transposon System *Sleeping Beauty*, mit welchem die Arbeitsgruppe bereits gute Erfahrungen machen durfte, gewählt. Es wurden spezifische Vektoren, welche die genetische Anlage der unterschiedlichen KRas-Varianten beinhalteten, für die Transfektion in Myelomzellen designt und in Experimenten zum Einsatz gebracht.

Die nachfolgenden Abschnitte sollen die Methodik des Vektordesigns und der erforderlichen Klonierungsschritte näher erläutern.

### 2.4.1 Das *Sleeping Beauty* Transposon System

Die Verwendung des *Sleeping Beauty* Transposon Systems ermöglicht es definierte Sequenzen (Transposone) extrachromosomaler Plasmid-DNA in die genomische DNA einer Wirtszelle zu integrieren<sup>105</sup>. Das System bedient sich hierbei einer *Sleeping Beauty* spezifischen Transposase, welche das zu transferierende Transposon anhand bestimmter, flankierender Wiederholungssequenzen (inverted repeats) erkennt. Wurden die inverted repeats vom Enzym erkannt, so wird die Transposonsequenz aus der Plasmid-DNA entfernt, in den Zellkern transportiert und dort zufällig in ein TA-Dinukleotid stabil integriert (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Funktionsweise des Sleeping Beauty Transposon Systems<sup>106</sup>.  
Abkürzungen: IR = inverted repeats.

Gegenüber der viral vermittelten Integration bietet das *Sleeping Beauty* Transposon System verschiedene Vorteile. Durch die Verwendung des Transposon Systems kommt es zu einem deutlich selteneren Auftreten von Mutationen und zum anderen ermöglicht der zufällige Einbau in TA-Dinukleotide es, dass die Zielsequenz häufiger in nichtkodierenden Bereichen der DNA positioniert wird. Im Gegensatz zum viral vermittelten DNA-Transfer, welcher bevorzugt in codierenden Sequenzen stattfindet, wird damit die Wirts-DNA weniger stark beeinflusst. Das *Sleeping Beauty* Transposon System ermöglicht außerdem den Transfer bedeutend größerer DNA-Sequenzen (>10kB) als es durch ein virales System möglich ist. Des Weiteren zeigt die Verwendung von *Sleeping Beauty* fast keine eigenen Promotor-Eigenschaften bei annähernd mit viralen Systemen

vergleichbarer Transfereffizienz. Zuletzt birgt die bei der viral vermittelten Integration zum Einsatz kommende Reverse Transkriptase selbst auch die Gefahr eventueller Mutationen der DNA-Sequenz<sup>107</sup>.

Aufgrund der genannten Vorteile gegenüber den viralen DNA-Transfermöglichkeiten kamen bei meinen Experimenten *Sleeping Beauty* Transposon System basierte und für meine Versuche designte und klonierte Proteinexpressionsplasmide zum Einsatz. Dabei durfte ich mich der bereits in der Arbeitsgruppe vorhandenen *Sleeping Beauty*-Plasmide bedienen. Diese besaßen grundsätzlich ein Ampicillin-Resistenzgen, das die Anzucht transfizierter *E. coli* Bakterien auf mit Ampicillin versetzten Agarplatten ermöglichte. Durch die Kombination verschiedener Promotorsequenzen mit der Insertion der Hämagglutinin (HA)-getaggten KRas-Mutationsvarianten ließen sich erfolgreich Plasmide für den späteren experimentellen Einsatz in Myelomzelllinien klonieren. Die Vektorkarten sämtlicher zum Einsatz gekommener Vektoren sind im Anhang (siehe Appendix) zu finden.

### 2.4.2 Annealing von DNA-Oligonukleotiden

Da es bei den ersten Western-Blot-Versuchen schwierig war KRas mittels Antikörperbindung nachzuweisen, wurde entschieden bei allen folgenden Versuchen KRas mittels eines HA-Tags sichtbar zu machen. Dafür musste zunächst ein HA-Tag kodierendes dsDNA-Fragment hergestellt und unter Wahrung des Leserasters am 5'-Ende an die verschiedenen KRas-Gen-Varianten gekoppelt werden. In einem ersten Schritt mussten die spezifisch designten einzelsträngigen HA-Tag kodierenden Oligonukleotide aneinandergelagert werden. Dafür wurden die Oligonukleotide zu Beginn in ddH<sub>2</sub>O gelöst (100µM) und für eine Zusammenlagerung im Wasserbad folgendermaßen vorbereitet:

1,5µL	Forward Oligo (HA-Forward)
1,5µL	Reverse Oligo (HA-Reverse)
47µL	1x Oligonukleotid Annealing Puffer (siehe 2.1.11)

Der Ansatz wurde gründlich gevortext, in einem 95°C warmen Wasserbad platziert und darin langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Das langsame Reduzieren der Temperatur ermöglichte eine effiziente Anlagerung der revers komplementären Oligonukleotide.

### 2.4.3 Phosphorylierung der Doppelstrang-Oligonukleotide

In einem nächsten Schritt musste der frisch hergestellte DNA-Doppelstrang phosphoryliert werden, um die spätere Ligation in einen geschnittenen und dephosphorylierten Vektor zu ermöglichen. Für die Phosphorylierung mittels der ATP-abhängigen Polynukleotidkinase wurde folgender Ansatz hergestellt:

2µL	Doppelstrang-Oligonukleotid
1µL	10x T4-Polynukleotidkinase-Puffer
1µL	10mM ATP
1µL	T4-Polynukleotidkinase
5µL	ddH <sub>2</sub> O

Der Reaktionsansatz wurde zunächst gründlich gevortext, anschließend für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und zuletzt für 10min auf 70°C erhitzt. Das kurzzeitige Erhitzen diente dabei der Inaktivierung der Polynukleotidkinase, sodass in den folgenden Schritten keine ungewollte Re-Phosphorylierung der Vektorkomponente stattfinden konnte.

### 2.4.4 DNA-Restriktionsverdau

Der Verdau von DNA-Doppelsträngen mittels Restriktionsenzymen wurde verwendet, um zum einen Vektoren für den Einbau verschiedener Expressionskassetten vorzubereiten und zum anderen diese Expressionskassetten für den späteren Einbau aus ihrem Ursprungsplasmiden herauszuschneiden und die passenden Ligationsstellen zu bilden.

Der bei allen Restriktionsverdauvorgängen pipettierte Ansatz sah wie folgt aus:

Ansatzvolumen:	50µL
0,5-15µL	Plasmidlösung (abhängig von der Ausgangskonzentration)
je 0,5µL	Restriktionsenzym
xµL	Puffer (Pufferart von den verwendeten Restriktionsenzymen abhängig, Menge abhängig von der Ausgangskonzentration, z.B. 5µL bei Verwendung eines 10x Puffers)
ad 50µL	ddH <sub>2</sub> O

Der Ansatz wurde nach gründlichem Vortexen bei 37°C inkubiert (Dauer des Verdaus abhängig von der Art der verwendeten Restriktionsenzyme, in der Regel über Nacht).



Nachfolgend sind beispielhaft für den Restriktionsverdau einige Beispielansätze aufgeführt:

Vektorpräparation von TST603A-pBluescript II SK-NheI mit NheI und XbaI zum Einfügen der ds-HA-Oligonukleotide:

3,4µL (1µg)	TST603A-pBluescript II SK-NheI
0,5µL	NheI
0,5µL	XbaI
5µL	10x Puffer Tango
40µL	ddH <sub>2</sub> O

Vektorpräparation des Plasmids TST606-pBS-HA zur Insertion der KRas-DNA und Kopplung an das HA-Tag:

15µL (3µg)	TST606-pBS-HA
0,5µL	NheI
0,5µL	NotI
5µL	10x Puffer Tango
29µL	ddH <sub>2</sub> O

Insertpräparation der KRas-Expressionskassette mit NheI und NotI zur Insertion in den geschnittenen Vektor TST606-pBS-HA:

13µL (400ng)	KRas-WT (DNA des KRas-Wildtyps)
0,5µL	NheI
0,5µL	NotI
5µL	10x Puffer Tango
31µL	ddH <sub>2</sub> O

### 2.4.5 Vektorpräparation: Dephosphorylierung und DNA-Fällung

Um die Möglichkeit der Ligation des Inserts in den geschnittenen Vektor zu gewährleisten und einen vorzeitigen Verschluss der geöffneten Insertionsstelle zu verhindern wurde der Vektor im nächsten Schritt dephosphoryliert. Hierfür wurde dem verdauten Vektor 1µL Shrimp alkalische Phosphatase hinzugefügt und das Gemisch für 1h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte durch kurzes Erhitzen des Gemisches auf 80°C (für 10min) die Hitzeinaktivierung aller Enzyme.

Die Fällung der geschnittenen und dephosphorylierten DNA aus dem Ansatz (50µL) erfolgte durch die Zugabe von 125µL Ethanol (96%) und 5µL 3M Natriumacetat. Der DNA-Fällungsmix wurde anschließend für 20min bei -80°C verwahrt und dann 25min bei 13200rpm zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und die pelletierte DNA kurz luftgetrocknet. Durch Zugabe von ddH<sub>2</sub>O wurde die gewünschte DNA-Konzentration eingestellt und der erfolgreiche Verdau auf einem 1%-Agarosegel überprüft (siehe 2.4.10).

### 2.4.6 Insertpräparation: Gelextraktion

Auch die mittels Restriktionsenzymen vorbereiteten Inserts wurden zunächst der Hitzeinaktivierung bei 80°C unterzogen, bevor nachfolgend die Auftrennung der behandelten DNA mittels eines 1% Agarosegels erfolgte. Die dem herausgeschnittenen Insert entsprechende Bande wurde mit einem Skalpell möglichst präzise aus dem Gel herausgetrennt. Um im Anschluss die enthaltene DNA aus dem Gelstück zu extrahieren wurde mit einem Gelextraktionskit (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up) gearbeitet und nach entsprechendem Protokoll vorgegangen<sup>108</sup>.

### 2.4.7 Ligation

Die Insertion in den dephosphorylierten Vektor erfolgte durch eine vom Enzym T4-DNA-Ligase katalysierte kovalente Bindung. Dafür wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt und 90min bei Raumtemperatur inkubiert:

20-100ng	Vektor-DNA
1:1 bis 1:5	Insert-DNA
2µL	10x T4-DNA-Ligase-Puffer
1µL	T4-DNA-Ligase
ad 20µL	H <sub>2</sub> O

### 2.4.8 Transformation in kompetente *E. coli* Bakterien

Im Anschluss an die Ligation wurden kompetente *E. coli* XL-1 Blue Zellen verwendet, um die Plasmid-DNA zu transfizieren. Dafür wurden 2µL der Ligationsreaktion zu 50µL auf Eis aufgetauten *E. coli* Zellen gegeben und auf einer Ampicillin-haltigen, vorgewärmten Agarplatte ausplattiert. Während der Inkubation der Agarplatte bei 37°C über Nacht konnten nur solche *E. coli* Kolonien wachsen, die erfolgreich ein Plasmid mit dem enthaltenen Resistenzgen aufgenommen hatten. Diese Kolonien konnten am

Folgetag anhand ihres Wachstums identifiziert und in den nächsten Schritten weiterverwendet werden.

### 2.4.9 Selektion ausgewählter Klone mittels PCR

Da die Kolonien für das Wachstum auf der Agarplatte lediglich das Ampicillinresistenzgen benötigten und über das Wachstum allein nicht auf eine erfolgreiche Klonierung geschlossen werden konnte, wurden Kolonien mittels PCR näher charakterisiert. Um Kolonien in einer PCR-Analyse untersuchen zu können, wurden sie mit einem Zahnstocher gepickt und in den PCR-Ansatz überführt. Nach erfolgter PCR unter Verwendung geeigneter Primer konnten durch Agarosegelelektrophorese diejenigen Kolonien identifiziert werden, bei denen die Ligation des Inserts erfolgreich war.

Der PCR-Ansatz wurde folgendermaßen hergestellt:

2,5µL	10x Dream Taq Puffer
0,5µL	dNTP-Mix
0,1µL	Vorwärts-Primer
0,1µL	Rückwärts-Primer
0,1µL	Dream Taq Polymerase
ad 25µL	ddH <sub>2</sub> O

Die Reaktionsansätze wurden für 30-35 Zyklen folgendem PCR-Protokoll unterzogen:

Denaturierung:	94°C für 30sec
Primeranlagerung:	55-65°C für 30sec (Temperatur abhängig von der Schmelztemperatur der beiden verwendeten Primer)
Elongation:	72°C für 30sec/500bp

Die PCR-Produkte wurden anschließend mit einer Gelelektrophorese (siehe 2.4.10) auf einem 1% Agarosegel analysiert.

### 2.4.10 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Elektrophorese bedient sich der Möglichkeit der Auftrennung der negativ geladene DNA in einem elektrischen Feld. Dabei wandert ein Gemisch aus linearen DNA-Fragmenten größenabhängig durch die Agarosegelmatrix. Nach der Wanderung entlang der angelegten Spannung können die zu analysierenden, linearen DNA-Abschnitte durch die vorherige Zugabe eines DNA-bindenden Fluoreszenzmarkers unter ultraviolettem (UV)-Licht sichtbar gemacht werden. Die Auftragung eines

Größenstandards in einer benachbarten Geltasche lässt dabei eine Längenzuordnung der DNA-Fragmente zu. Durch die UV-Beleuchtung gelingt somit die Identifikation der entsprechenden DNA-Banden auf dem mit dem Fluoreszenzfarbstoff HD-Green versetzten Gel.

### 2.4.11 Plasmidextraktion mittels Reaktionsset

Um ausreichend Plasmidmaterial für die Sequenzierung und die spätere Transfektion zu gewinnen, war es nötig die DNA in den *E. coli* Zellen zu amplifizieren und aus diesen zu extrahieren. Dafür wurde ein Schüttelgefäß mit LB-Medium gefüllt (je nach gewünschter zu gewinnender Plasmidmenge, z.B. Mini-Präparation 3-10mL oder Midi-Präparation 100-300mL) und mit einer der in der Colony-PCR identifizierten, erfolgreich transfizierten Kulturen mit einem Zahnstocher beimpft. Dem LB-Medium wurde wiederum das passende Antibiotikum (Ampicillin), gegen welches das Resistenzgen im Plasmid enthalten war, in einer Konzentration von 100µg/ml hinzugefügt. Im Anschluss daran wurde die Nährlösung über Nacht bei 37°C unter kontinuierlichem Schwenken (150-200 Umdrehungen/min) inkubiert. Für die eigentliche Extraktion des Plasmids aus den kompetenten Bakterienzellen wurden kommerzielle Extraktionskits nach Protokoll verwendet (Mini-Präparation: RNeasy® Mini Kit<sup>109</sup>, Midi-Präparation: NucleoBond® Xtra Midi<sup>110</sup>). Diese sorgen mittels alkalischer Lyse für eine Zerstörung der bakteriellen Zellmembran und die mitgelieferten Säulen binden die im Lysat enthaltene Plasmid-DNA. Nach Waschschritten wird schließlich die zu gewinnende DNA von der Säule in ein sauberes Gefäß eluiert und mittels Isopropanol gefällt. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde anschließend in etwas Wasser resuspendiert, die Konzentration mittels NanoDrop bestimmt und ggf. mit ddH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 5µg/µL eingestellt.

### 2.4.12 DNA-Sequenzierung

Um die korrekte DNA-Sequenz der hergestellten Proteinexpressionsplasmide vor der weiteren experimentellen Verwendung zu verifizieren, wurde eine DNA-Sequenzierung der gewonnenen Plasmide durchgeführt. Diese erlaubt, im Gegensatz zur PCR, mit welcher lediglich eine Einschätzung der Anzahl an Basenpaaren möglich ist, durch die genaue Angabe der Basenabfolge den Ausschluss von Punktmutationen, Deletionen und Insertionen im klonierten Plasmidkonstrukt und ermöglicht daher eine Interpretierbarkeit der mit den Expressionsplasmiden erzielten Ergebnisse. Die Sequenzierung der hergestellten Proteinexpressionsplasmide erfolgte durch die Firma

LGC Genomics, Berlin, Deutschland, anhand von mir zuvor nach Firmenangaben vorbereiteten Proben.

### 2.4.13 RNA-Isolierung

Um auftretende Unterschiede in den Proteinexpressionsspiegeln verschiedener KRas-Mutanten besser interpretieren zu können, wurde eine RNA-Isolierung und Amplifikation durchgeführt. So sollte geprüft werden, ob die Unterschiede eher transkriptionell oder translationell begründet waren.

Zunächst wurden gleiche Anzahlen an Zellen, welche mit Plasmiden der verschiedenen Genvarianten transfiziert worden waren, geerntet. Dann wurde die enthaltene RNA mittels RNA-Extraktionskit gewonnen und durch reverse Transkription in komplementäre DNA (complementary DNA [cDNA]) umgeschrieben.

Für die reverse Transkription wurden folgende Reagenzien auf Eis gemischt:

1 $\mu$ L	Template RNA
1,5 $\mu$ L	Primer
9,5 $\mu$ L	ddH <sub>2</sub> O

Der Ansatz wurde für 5min auf 65°C erhitzt und dann auf Eis gekühlt. Anschließend wurden weitere Zutaten in der aufgeführten Reihenfolge hinzugegeben:

4 $\mu$ L	5x Reaktionspuffer
1 $\mu$ L	RiboLock RNase Inhibitor
2 $\mu$ L	dNTP-Mix
1 $\mu$ L	RevertAid Reverse Transkriptase

Der Ansatz wurde für 1h bei 40°C inkubiert und anschließend hitzeinaktiviert. Zuletzt wurde die revers transkribierte cDNA in einer PCR amplifiziert und auf einem Agarosegel analysiert.

### 2.4.14 Cycloheximid-Assay

Für die Bestimmung von Differenzen in der Protein-Halbwertszeit der unterschiedlichen KRas Mutanten kam ein Cycloheximid-Assay zum Einsatz. Cycloheximid ist im weiteren Sinne ein Antibiotikum, das die eukaryotische Translation blockiert. Durch gleichzeitige Zugabe von Cycloheximid in verschiedene Zellkulturen, simultanes Ernten zu mehreren Zeitpunkten und abschließende Analyse mittels Western-Blot, ist es möglich die zeitliche Abnahme eines exprimierten Proteins zu verfolgen und damit ungefähr dessen biologische Halbwertszeit abzuschätzen. So ist ein abschließendes Vergleichen der Halbwertszeiten der verschiedenen KRas-Mutanten gegeneinander möglich.

### 3 Ergebnisse

Das Thema meiner Experimente entstammt einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Ellen Leich-Zbat (Pathologisches Institut, Universität Würzburg). In dieser Arbeitsgruppe wurden bereits thematisch analoge Versuche durchgeführt, bei welchen jedoch eine andere Methodik zum Einsatz kam, die zu sehr heterogenen Ergebnissen bezüglich der Expressionsspiegel verschiedener KRas Mutanten (KRas<sup>p.G12A</sup>, KRas<sup>p.A146T</sup> und KRas<sup>p.A146V</sup>) führte. Daher sollten die Ergebnisse des dort für die Überexpression von KRas verwendeten lentiviralen Vektorsystems durch *Sleeping Beauty* Transposon-basierte transiente und stabile Expressionsansätze komplementiert und erweitert werden.

Eine Verwendung der lentiviralen Vektoren in den Myelomzelllinien JJN-3 und OPM-2 brachte in der Arbeitsgruppe Leich das Problem mit sich, dass es nicht möglich war eine gleich hohe Expression der vier KRas-Varianten zu erreichen (KRas-Wildtyp war deutlich stärker exprimiert als die Mutanten). Dies erschwerte die Interpretation der Auswirkungen onkogener Mutationen auf die Aktivitätsspiegel nachgeschalteter Signalwege.

Aus vorangegangenen Experimenten in der eigenen Arbeitsgruppe war bekannt, dass der Nachweis des Ras Proteins mittels Antikörperfärbung eines Western Blots häufig nicht leicht zu realisieren war. So bediente man sich in der Arbeit von Steinbrunn et al. (2011) der Möglichkeit der N-terminalen Kopplung eines HA-Tags an das Ras-Protein. Der Nachweis der Ras-Konstrukte im Western Blot konnte in der Folge mit einem gegen den HA-Tag gerichteten Antikörper erfolgen, was gleichbleibend gute Ergebnisse generierte<sup>81</sup>. Aus diesem Grund wurde auch für dieses Projekt eine Verknüpfung der KRas-Varianten mit einem HA-Tag durchgeführt. Ein weiterer Vorteil, den die Markierung des per *Sleeping Beauty* exprimierten KRas-Proteins mit sich brachte, war, dass bei separater Färbung des Western Blots sowohl mittels eines gegen KRas gerichteten Antikörpers als auch mit einem anti-HA-Tag-Antikörper eine Unterscheidung zwischen endogenem KRas und dem durch Transfektion zusätzlich exprimierten Protein möglich war.

Um die in der Arbeitsgruppe Leich generierten Ergebnisse zu vervollständigen und um zu einer weiteren Charakterisierung der KRas-Mutationen KRas<sup>p.G12A</sup>, KRas<sup>p.A146T</sup> und KRas<sup>p.A146V</sup> beizutragen, sollte im Rahmen meiner Dissertation die funktionelle Analyse

des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs bei (Über-) Expression der genannten KRas-Mutationen erfolgen.

### 3.1 Herstellung und Transfektion von zur KRas-Expression geeigneten Plasmiden

#### 3.1.1 Auswahl eines passenden Promotors

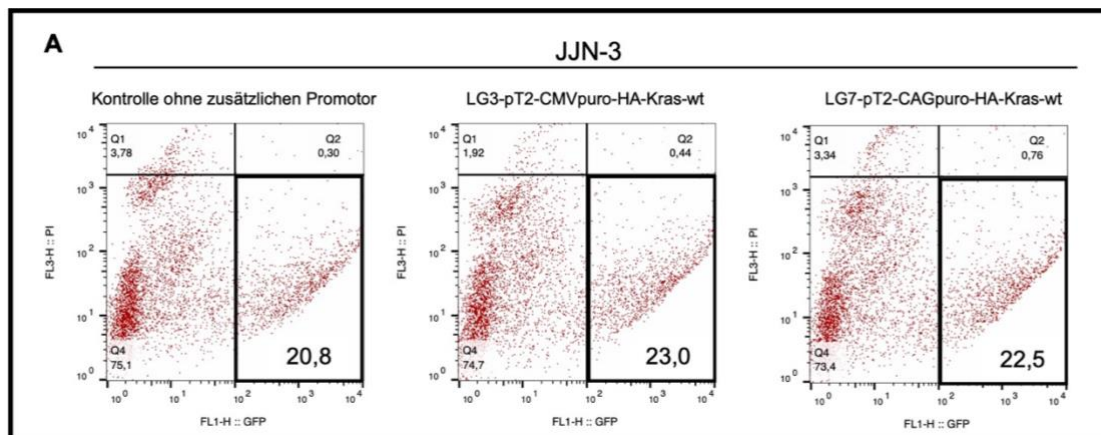
In der Arbeitsgruppe konnte die Erfahrung gemacht werden, dass die erfolgreiche (Über-) Expression eines Proteins in Myelomzellen mitunter stark von der, im Proteinexpressionsvektor verwendeten, Expressionskassette abhängig ist<sup>81</sup>. Aus diesem Grund galt es in einem ersten Schritt herauszufinden, welche der beiden zur Verfügung stehenden Varianten für meine Experimente die Geeignetste war. Dabei wurde die Auswahl zwischen zwei Promotoren getroffen, dem CMV-Promotor (aus dem humanen Cytomegalievirus) und dem synthetisch hergestellten CAG-Promotor. Diese synthetisch zusammengesetzte Promotorsequenz besteht aus dem Enhancerelement (Verstärkerelement) des humanen Cytomegalievirus, Bestandteilen, einschließlich des Promotors, des  $\beta$ -Aktin-Gens von Hühnern und DNA-Fragmenten des  $\beta$ -Globin-Gens von Kaninchen<sup>111</sup>. Beide verwendeten Promotoren sind bezogen auf ihre 3'-UTR (untranslated region = untranslatierter Bereich) nicht identisch, weshalb zusätzlich zum Promotor auch die jeweilige Zusammensetzung dieses Bereiches einen starken Einfluss auf den dazugehörigen mRNA-Spiegel haben kann<sup>112</sup>.

Es wurden mittels verschiedener, sequenzieller Klonierungsschritte zwei auf dem *Sleeping Beauty* Transposon System basierende Proteinexpressionsvektoren hergestellt. Jeder der Vektoren enthielt dabei die Genkassette für die Expression des KRas-Wildtypen, sowie für einen der beiden Promotoren (Vektorkarten siehe Appendix). Die erstellten Plasmide wurden mittels transients Transfektion in die Myelomzelllinie JJN-3 implementiert. Es wurde JJN-3 gewählt, da diese Zelllinie es erlaubt die Population stark transfizierter Zellen unter Verwendung der CD4-Microbead-Methode herauszuselektionieren, sodass nur diese Zellen in die anschließende Western Blot-Analyse eingehen (siehe 2.2.9).

Um vor der Western-Blot Analyse einen Vergleich der Transfektionseffizienz zwischen den unterschiedlichen Promotoren ziehen zu können, wurden die transfizierten Zellen vor der Aufreinigung mittels CD4-Microbeads und Dichtegradientenzentrifugation einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen. Die Analyse der eGFP-Expression (in Abbildung 7 zu sehen) zeigt, dass zwischen den verschiedenen Transfektionsansätzen

### 3 Ergebnisse

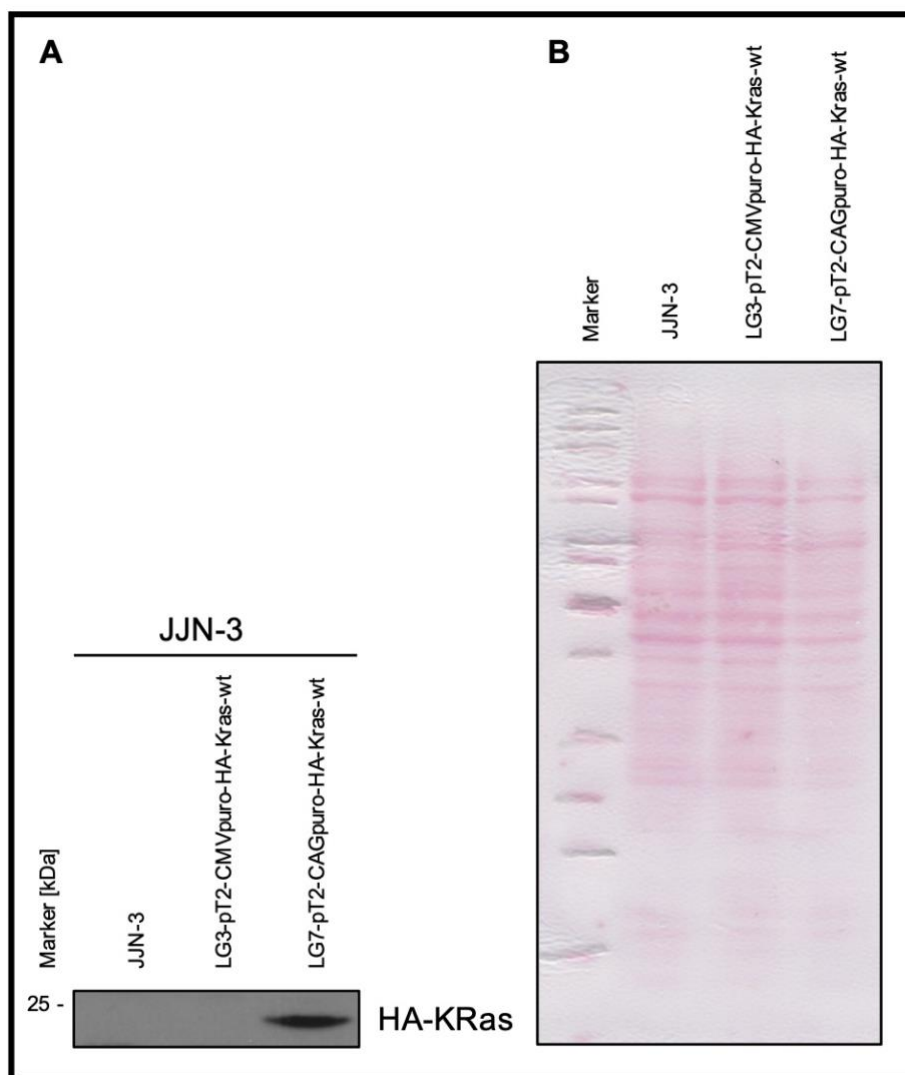
(Kontrolle, CMV-Promotor und CAG-Promotor) hinsichtlich der Viabilität und der Transfektionseffizienz kein signifikanter Unterschied besteht.



**Abbildung 7:** Durchflusszytometrische Analyse zum Einsatz zweier verschiedener Promotorsysteme. Zellen der Myelomzelllinie JLN-3 wurden mit je einem Proteinexpressionsplasmid für das KRas-Wildtypprotein, welche zwei unterschiedliche Promotoren enthielten (LG3 – CMV-Promotor, LG7 – CAG-Promotor) elektroporiert. Zusätzlich sind als Kontrolle JLN-3 Zellen zu sehen, welche ohne die Zugabe eines entsprechenden Plasmids elektroporiert wurden. Die Expression von eGFP dient als Nachweis für die erfolgreiche Plasmidaufnahme und zur Beurteilung der Integrität der Zellen.

Im, in Abbildung 8, gezeigten Western Blot ist die verstärkte Expression des HA-markierten KRas-Proteins unter Verwendung des CAG-Promotors deutlich sichtbar. Im Gegensatz dazu scheint unter Einsatz des CMV-Promotors entweder keine ausreichende Expression der Genkassette möglich zu sein oder aber die generierte mRNA ist nicht hinreichend stabil. Basierend auf diesem Versuch wurden in der Folge für alle weiteren Expressionsversuche *Sleeping Beauty*-Plasmide mit CAG-Promotor getriebener Kassette verwendet.





**Abbildung 8:** Vergleichender Western Blot zum Einsatz zweier verschiedener Promotorsysteme. Abkürzungen: kDa = Kilodalton, HA = Hämagglutinin, KRas = Kirsten Rat sarcoma. Zellen der Myelomzelllinie JJN-3 wurden mit je einem Proteinexpressionsplasmid für das KRas-Wildtypprotein, welche zwei unterschiedliche Promotoren enthielten (LG3 – CMV-Promotor, LG7 – CAG-Promotor) elektroporiert. **A:** Nach Aufreinigung mittels CD4-Microbeads am Tag nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und ein Western Blot davon angefertigt. **B:** Das zugehörige Ponceau S-Bild dient als Ladekontrolle.

### 3.1.2 Klonierung der Proteinexpressionsplasmide

Nach erfolgter Auswahl des passenden Promotors, musste zunächst ein kompletter Plasmidsatz (für KRas-Wildtyp und die drei KRas-Mutanten G12A, A146T und A146V) zur CAG-Promotor kassettengetriebenen KRas-Expression hergestellt werden. Die dafür notwendigen Klonierungsschritte sollen in diesem Abschnitt dargestellt werden.

Das Ziel der Klonierung war die Herstellung von Proteinexpressionsplasmiden, welche sich für die konstitutiv stabile Expression in Wirtszellen eignen. Dafür war es notwendig, dass das Zielplasmid ein Resistenzgen gegen ein Antibiotikum exprimierte, mit welchem die Selektion der elektroporierten Zellkultur auf die erfolgreich stabil transfizierten Klone

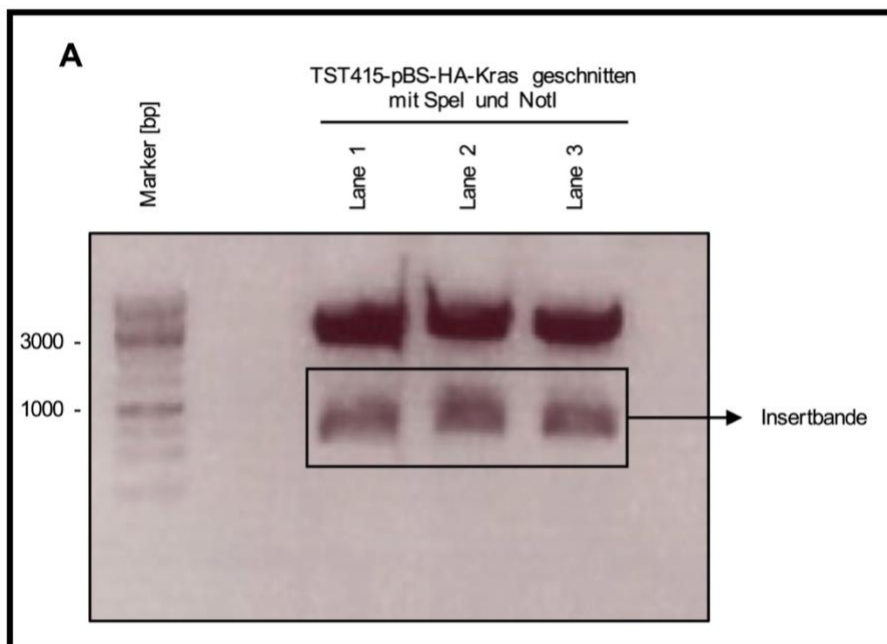
möglich war (hier das Resistenzgen gegen Puromycin, die Puromycin-N-Acetyltransferase). Außerdem musste der Zielvektor die für die stabile Integration in die Wirts-DNA notwendigen *Sleeping Beauty* Transposon Elemente, sowie die CAG-Promotor-getriebene Expressionskassette für die KRas-Varianten enthalten. Ein solches Plasmid war in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden (TST212-pT2BN-SVpuroCAG). Um dieses Plasmid jedoch in meinen Versuchen zur Anwendung bringen zu können, mussten zunächst einmal die verschiedenen KRas-Varianten mit einer HA-Markierung versehen und in einem nächsten Schritt in das Ziel-Plasmid eingefügt werden. Alle durchgeführten Klonierungsschritte waren für die vier KRas-Proteinexpressionsplasmide ansonsten identisch, lediglich in der Verwendung der inserierten KRas-DNA wurde unterschieden.

Im ersten Klonierungsschritt ging es darum die zu einem dsDNA-Fragment aneinandergelagerten HA-Oligonukleotide (siehe 2.4.2) in ein Plasmid zu integrieren, das es ermöglicht die HA-Markierung leserasterkonform mit dem KRas-Gen zu verknüpfen. Dafür wurde der TST603A-pBluescript II SK-NheI-Vektor verwendet, welcher mit der Vielzahl an Restriktionsschnittstellen in seiner Mehrfachklonierungsstelle (Multiple Cloning Site [MCS]) die Möglichkeit zur Integration verschiedener DNA-Sequenzen nebeneinander bietet. Dieser Vektor wurde dafür zunächst mit den Restriktionsenzymen NheI und XbaI geschnitten (siehe Abbildung 10.A). Dann konnte der HA-DNA-Doppelstrang mit seinen, zu den Schnittstellen komplementären, 5'-Überhängen (CTAG) in den Vektor ligiert werden, wobei bei richtiger Orientierung die beiden Schnittstellen wiederhergestellt wurden, sodass sie für spätere Schritte erneut verwendet werden konnten. Da aufgrund der übereinstimmenden Basensequenz der beiden 5'-Überhänge prinzipiell eine Ligation der HA-DNA in beiden Orientierungen möglich war, wurden simultan mehrere Mini-Präparationen hergestellt, sequenziert und eine Präparation mit korrekt orientierter Ligation für die Weiterverwendung ausgewählt.

Der hergestellte Vektor TST606-pBS-HA wurde anschließend ebenso wie die einzuklonierende KRas-DNA mit den Restriktionsenzymen NheI und NotI zur Ligation vorbereitet (siehe Abbildung 10.B). Nach erfolgter Ligation, wobei die Restriktionsschnittstellen wiederum regeneriert wurden, wurde mittels Colony-PCR eine Anzahl von Bakterienkolonien auf das prinzipielle Vorhandensein des KRas-Inserts geprüft und anschließend positive Klone zur Herstellung von Plasmid-Minipräparationen

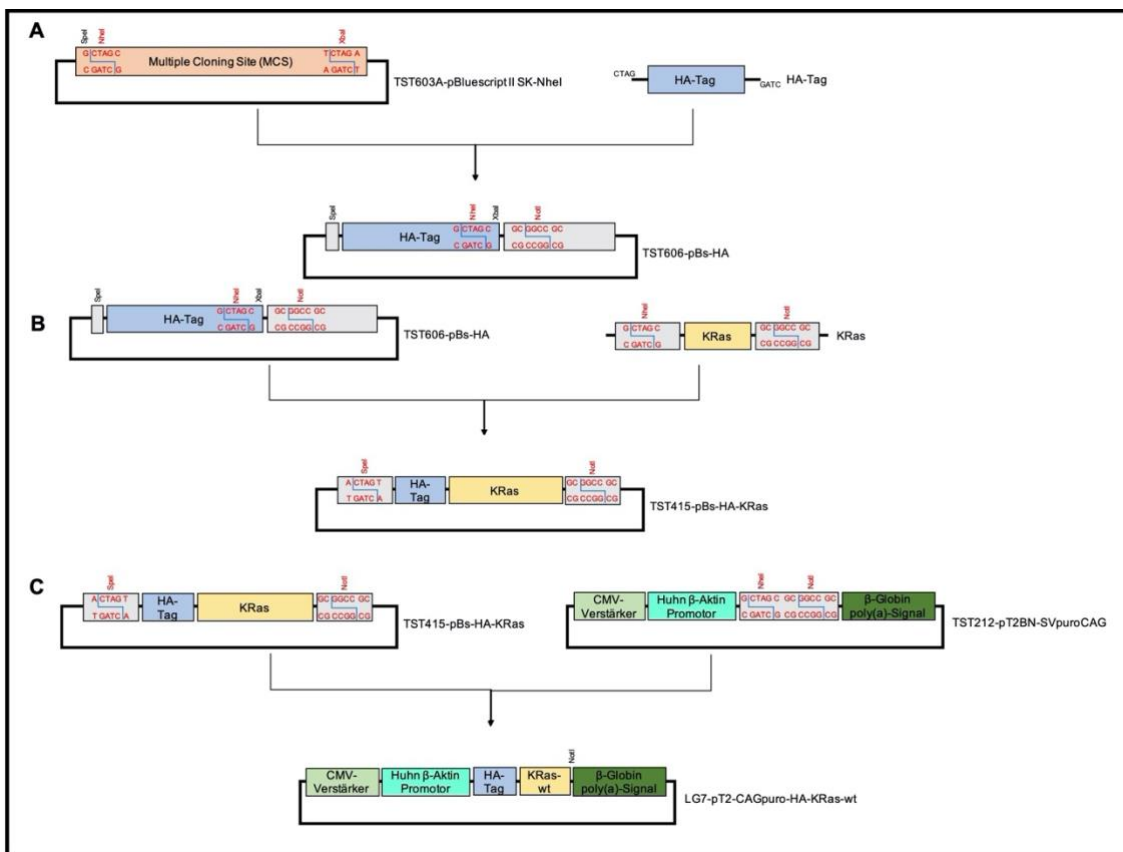
ausgewählt. Für eine definitive Sequenzvalidierung des Plasmids TST415-pBS-HA-KRas wurde es zur Sequenzierung geschickt.

Für den letzten Schritt der Klonierung wurde der Vektor TST415-pBS-HA-KRas mit den Restriktionsenzymen SpeI und NotI geschnitten. Zur Separation des für die Ligation notwendigen Inserts wurde das geschnittene Plasmid auf einem Agarosegel aufgetrennt, die Insert-DNA Bande aus dem Gel herausgeschnitten und extrahiert (siehe 2.4.6 und Abbildung 9).



**Abbildung 9: A:** Auftrennung des geschnittenen TST415-pBS-HA-KRas-Vektors mittels eines Agarosegels. Abkürzungen: bp = Basenpaare. Der Restriktionsverdau wurde volumenbedingt in drei nebeneinanderliegenden Spuren aufgetragen. Die deutlich von der Vektorbande abtrennbare Insertbände wurde aus dem Agarosegel mithilfe eines Skalpell herausgeschnitten (etwa entlang des eingezeichneten schwarzen Kastens) und die Insert-DNA aus dem Gel extrahiert.

Simultan dazu wurde der Zielvektor TST212-pT2BN-SVpuroCAG mittels der Restriktionsenzyme NheI und NotI für die anschließende Insertion vorbereitet. Die Ligation konnte dann durch die komplementären Überhänge der Schnittstellen SpeI und NheI (beide 5'-Überhänge CTAG), sowie der beiden NotI geschnittenen Überhänge (GGCC) durchgeführt werden (siehe Abbildung 10.C).



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der durchgeführten Klonierungsschritte für die Herstellung der verwendeten Plasmide.  
**A:** Insertion der HA-DNA in den TST603A-pBluescript II SK-NheI-Vektor. **B:** Insertion der KRas-DNA in den TST606-pBs-HA-Vektor. **C:** Insertion der HA-markierten KRas-DNA in den TST212-pT2BN-SVpuroCAG-Zielvektor.

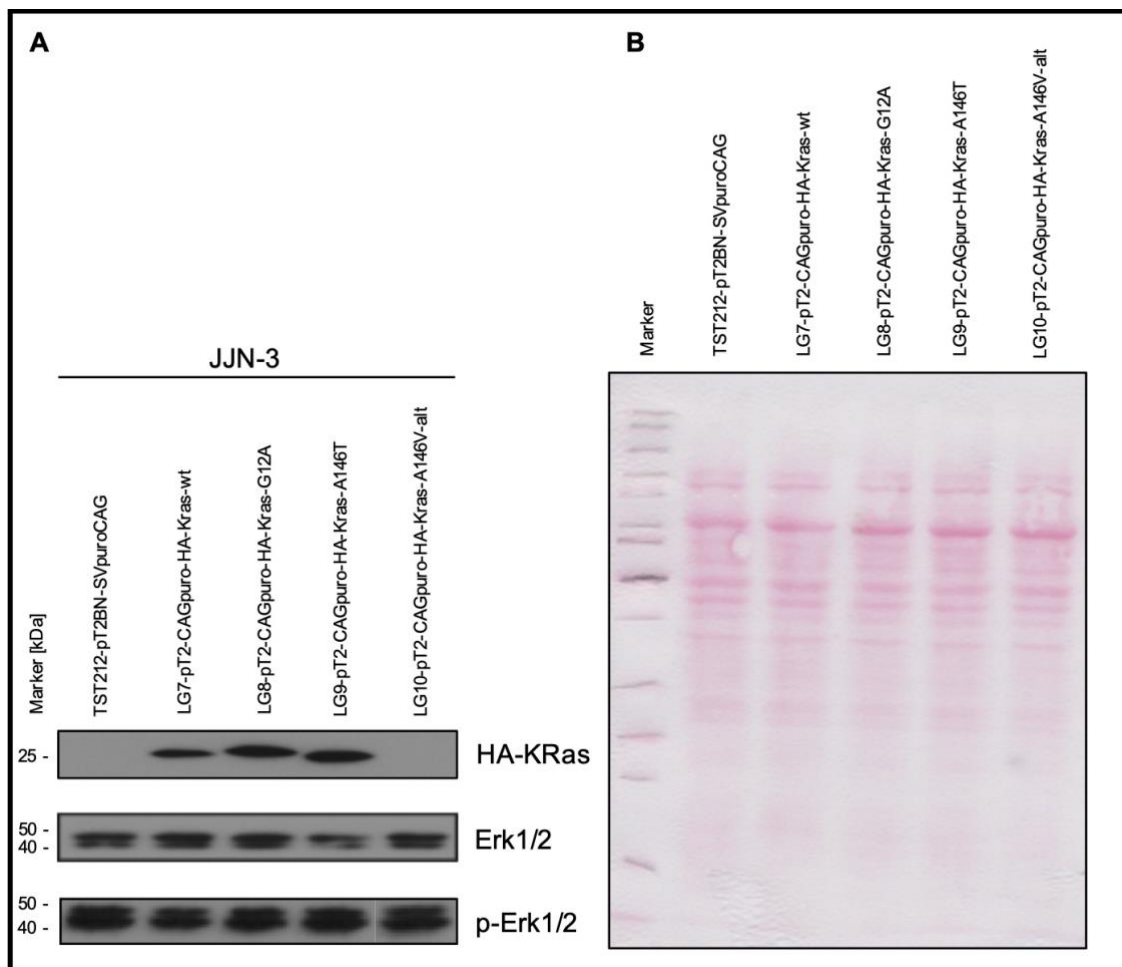
Durch äquivalent durchgeführte Klonierungsschritte konnten zusätzlich zu LG7 (pT2-CAGpuro-HA-Kras-wt) die Proteinexpressionsplasmide für die drei Mutanten KRas<sup>p.G12A</sup> (LG8-pT2-CAGpuro-HA-Kras-G12A), KRas<sup>p.A146T</sup> (LG9-pT2-CAGpuro-HA-Kras-A146T) und KRas<sup>p.A146V</sup> (LG10-pT2-CAGpuro-HA-Kras-A146V) gewonnen werden.

### 3.1.3 Auswahl der Zelllinie und erste Transfektionsversuche

Mit der abgeschlossenen Herstellung verifizierter Arbeits-Plasmide konnte die Untersuchung der Proteinexpression in Myelomzellen beginnen. Zuvor musste jedoch noch die Frage nach geeigneten Zelllinien geklärt werden. Um die KRas-(mutations-)abhängige Signalwegsaktivität untersuchen zu können, benötigte man Zelllinien, welche für KRas keine intrinsische Mutation aufweisen. Nur so war es möglich die Veränderung der Expressions- und Aktivierungsspiegel von Signalmolekülen abhängig von der eingebrachten KRas-Mutation zu analysieren. Ohne KRas-Mutation hatten die Myelomzellen den KRas-Wildtyp als Anlage und somit war zumindest in Bezug auf KRas mit einer physiologischen Ausgangssituation zu rechnen. Aus diesem Grund wurden für

meine Versuche die Zelllinien JJN-3 und L-363, die beide eine NRas-Mutation haben für KRas aber wildtypisch sind, sowie die Zelllinie OPM-2, die sowohl im K- als auch NRas-Gen keine Mutationen trägt, ausgewählt. Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen den eingesetzten Zelllinien war, dass nur JJN-3 und L-363 in transienten Expressionsassays verwendet werden konnten. Dies liegt an der relativ schlechten Transfizierbarkeit von OPM-2 Zellen, die nur mit unverhältnismäßig hohem Aufwand die oben beschriebene Aufreinigung hinreichender Mengen von stark transfizierten Zellen erlaubt. Daher konnte OPM-2 für eine spezifische Analyse von transient HA-KRas-transfizierten Zellen nicht verwendet werden und kam erst im späteren Verlauf meiner Arbeit für die Analyse stabil transfizierter Zellkulturen zum Einsatz.

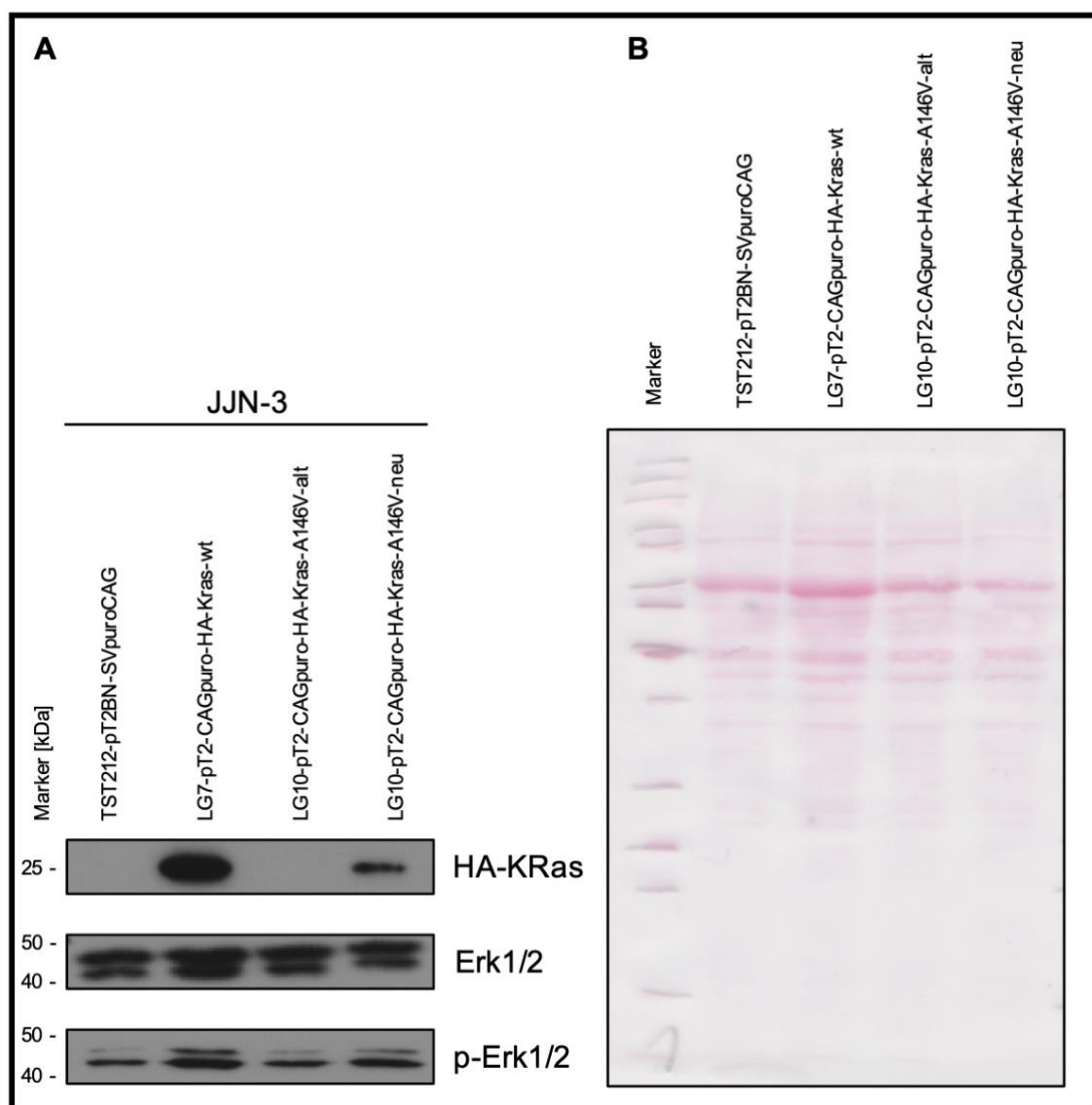
Um die Funktionalität der klonierten Plasmide zu prüfen, wurde zunächst die Myelomlinie JJN-3 gewählt. Mittels Elektroporation wurden transient plasmidexprimierende Zellen hergestellt und am Tag nach der Transfektion aufgereinigt. Die erzeugten Lysate dieser Zellpopulationen wurden dann für eine Western Blot-Analyse herangezogen (Ergebnis siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Transiente HA-KRas-Proteinexpressionsanalyse in JJN-3.

Abkürzungen: kDa = Kilodalton, HA = Hämagglutinin, KRas = Kirsten Rat sarcoma, Erk = Extrazellulär Signal-regulierte Kinase, pErk = phosphoryliertes Erk. **A:** Western Blot für die klonierten KRas-Proteinexpressionsplasmide in transient transfizierten JJN-3 Zellen. **B:** Das zum Western Blot zugehörige Ponceau S-Bild als Lade- und Laufkontrolle.

Es ist zu erkennen, dass die eingesetzten Plasmide für das Wildtypprotein sowie für die beiden Mutanten KRas<sup>p.G12A</sup> und KRas<sup>p.A146T</sup> zu einer deutlichen Expression des HA-markierten KRas-Proteins führen. Lediglich die mit dem für KRas<sup>p.A146V</sup>-kodierenden Plasmid transfizierten Zellen konnten das Protein nicht nachweisbar exprimieren. Für das KRas<sup>p.A146V</sup>-kodierende Plasmid wurde eine neue Midi-Präparation angesetzt. Mit der neuen Präparation wurde wiederum ein transienter Expressionsversuch gleicher Vorgehensweise in JJN-3 durchgeführt. Das korrespondierende Western Blot Ergebnis ist in Abbildung 12 gezeigt.



**Abbildung 12:** Transiente Proteinexpressionsanalyse vom neu präparierten  $KRas^{p.A146V}$ -Plasmid. Abkürzungen: kDa = Kilodalton, HA = Hämagglutinin, KRas = Kirsten Rat sarcoma, Erk = Extrazellulär Signal-regulierte Kinase, pErk = phosphoryliertes Erk. **A:** Western Blot zur Testung der zweiten Midi-Präparation des  $KRas^{p.A146V}$ -Proteinexpressionsplasmids in transient transfizierten JJN-3 Zellen. **B:** Das zugehörige Ponceau S-Bild als Ladekontrolle.

Der angefertigte Western Blot (Abbildung 12) zeigt eine deutliche Expression von HA-KRas in Lane 4. Daher kann von einer im zweiten Anlauf erfolgreichen Herstellung eines Expressionsplasmids für  $KRas^{p.A146V}$  ausgegangen werden. Zum Vergleich kann dabei Lane 3 herangezogen werden, in welcher das Lysat von Myelomzellen, welche mit einem bei der ersten Midi-Präparation gewonnen Proteinexpressionsplasmid transfiziert wurden, aufgetragen ist. Dennoch konnte auch mit der neuen Variante des Expressionsplasmids für  $KRas^{p.A146V}$  nicht das gleiche Expressionslevel von HA-KRas erreicht werden wie für die Wildtypvariante.

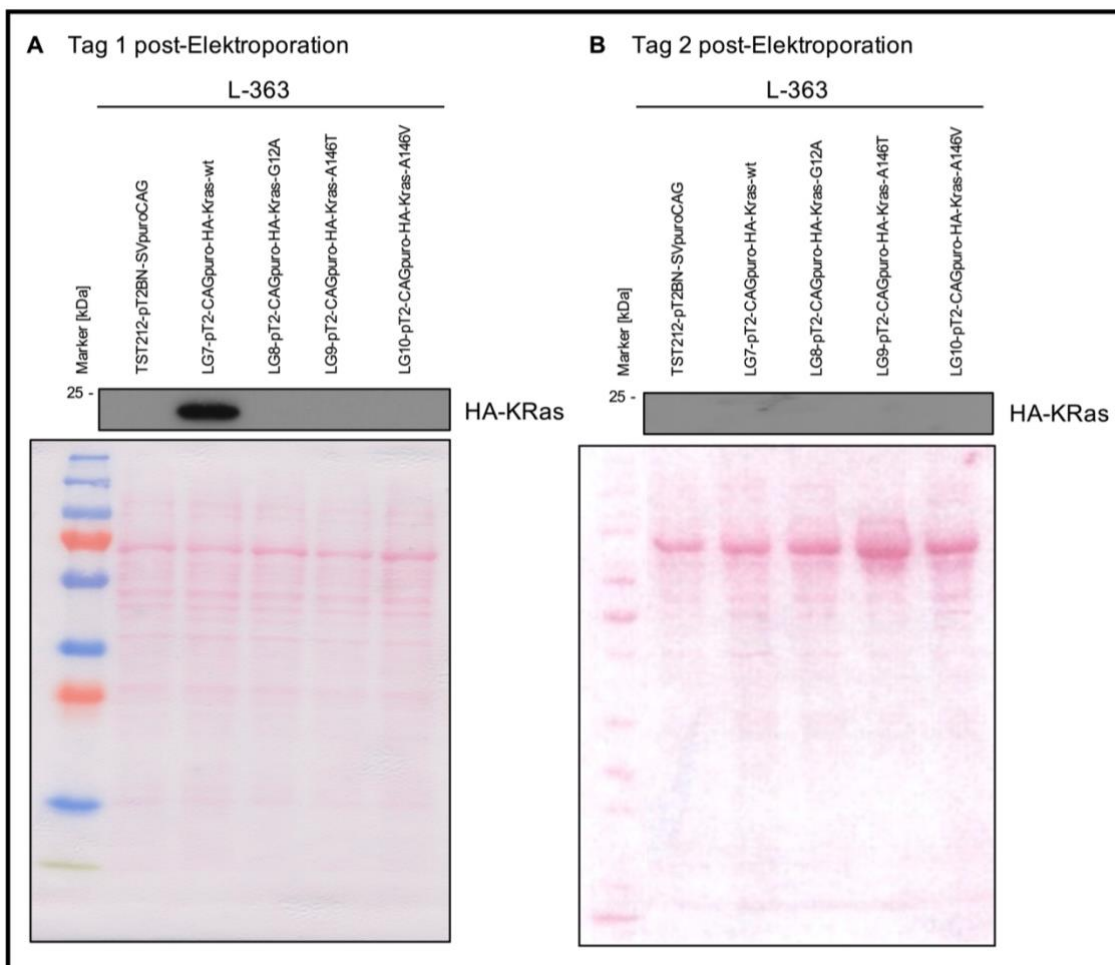
Darüber hinaus lässt Abbildung 11 den Schluss zu, dass sich das Expressionsniveau von HA-KRas für KRas<sup>p.G12A</sup> und KRas<sup>p.A146T</sup> auf einem ähnlichen Niveau wie für das Wildtyp-Protein befindet. Setzt man das Expressionslevel von HA-KRas unter Verwendung des neu präparierten KRas<sup>p.A146V</sup>-Plasmids zu dem der anderen Mutanten in Bezug, so ist zu sagen, dass letztlich auch das neu hergestellte Proteinexpressionsplasmid in JJN-3 Zellen immer noch zu einer geringeren HA-KRas-Expression zu führen scheint.

### 3.2 Proteinexpressionsanalysen

#### 3.2.1 Transiente Proteinexpressionsversuche

Nach erfolgreichem Testen der generierten Plasmide wurden erste transiente Proteinexpressionsanalysen durchgeführt. Dabei war es zunächst wichtig die Proteinexpression im zeitlichen Verlauf beurteilen zu können. Wie Steinbrunn et al. (2011)<sup>81</sup> bereits zeigen konnten nimmt die Proteinexpression von Ras-Expressionsplasmiden bei transient transfizierten Zellen relativ schnell ab. Um für die nachfolgenden Experimente den Zeitpunkt der maximalen HA-KRas-Expression nutzen zu können wurde zunächst eine transiente Proteinexpressionsanalyse in der Zelllinie L-363 durchgeführt. Diese wurde dafür mit der Plasmid-DNA elektroporiert, am Tag nach der Transfektion mittels CD4-Microbeads aufgereinigt und gleiche Zellmengen an Tag 1 und Tag 2 nach Transfektion geerntet. Die erhaltenen Zelllysate wurden jeweils für Western Blot-Analysen verwendet, welche in Abbildung 13 zu finden sind.





**Abbildung 13:** Transiente Proteinexpressionsanalyse für HA-KRas im zeitlichen Verlauf. Abkürzungen: kDa = Kilodalton, HA = Hämagglutinin, KRas = Kirsten Rat sarcoma. Transfizierte Myelomzellen der Zelllinie L-363 wurden an Tag 1 nach Transfektion mit CD4-Beads aufgereinigt. Gleiche Zellmengen wurden dann an Tag 1 (A) und Tag 2 (B) post-Elektroporation geerntet. Für beide Zeitpunkte sind im oberen Bildabschnitt die aus den geernteten Zellen angefertigten Western Blots und im unteren Bildabschnitt die als Ladekontrollen fungierenden, zugehörigen Ponceau S-Bilder gezeigt.

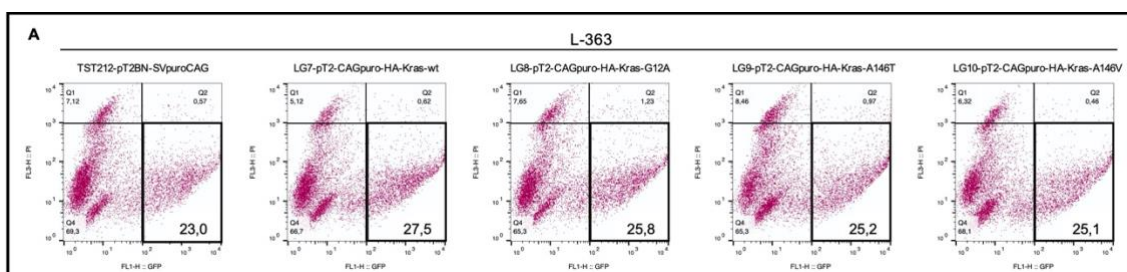
Zunächst einmal fällt auf, dass es nicht möglich war eine gleichmäßige HA-KRas-Expression für alle vier Varianten zu erreichen. Im Gegenteil, so war es überhaupt nur für KRas<sup>WT</sup> möglich eine visualisierbare Proteinexpression zu erlangen (siehe Abbildung 13.A). Vergleicht man die beiden Western Blots von Tag 1 und Tag 2 so fällt auf, dass die an Tag 1 deutliche Expression des HA-markierten Wildtyp-KRas an Tag 2 bereits so stark abgenommen hatte, dass sie im Western Blot nicht mehr sichtbar war. Aus diesem Grund wurden für die anschließend im Rahmen meiner Arbeit durchgeführten transienten Proteinexpressionsanalysen die transfizierten Myelomzellen jeweils an Tag 1 aufgereinigt und geerntet.

In einer nachfolgenden Versuchsreihe erfolgte dann eine genauere Analyse der Expressions- und Aktivierungsspiegel von KRas-nachgeschalteten Signalmolekülen. Dabei wurde wiederum die Myelomzelllinie L-363 verwendet und äquivalent zu oben

### 3 Ergebnisse

beschrieben mit den transfizierten Zellen verfahren. Am Tag nach Transfektion, vor der CD4-Aufreinigung, erfolgte standardmäßig eine Analyse der transfizierten Zellen mittels Durchflusszytometrie zur Beurteilung der Transfektionseffizienz. Dabei ließ die Kotransfektion eines Expressionsplasmids für eGFP Aussagen darüber zu, in welchem Ausmaß vitale, stark transfizierte Zellen in den Elektroporationsansätzen vorhanden waren. Die Stärke der Fluoreszenz konnte dabei als Richtwert dafür verwendet werden, in welchem Umfang auch weitere Plasmide (Proteinexpressionsplasmide für die KRas-Varianten und für CD4 $\Delta$ ) des Transfektionsansatzes bei der Elektroporation in die Myelomzellen gelangt waren<sup>95</sup>. Tatsächlich konnte im Rahmen meiner Versuche beobachtet werden, dass die erhaltenen FACS-Messwerte eine gute Vorhersage für den Anteil nach CD4-Aufreinigung verbleibender, transient transfizierter Zellen ermöglichten. In den stabilen Transfektionsversuchen korrelierte die Rate vitaler, eGFP-positiver Zellen gut mit einer erfolgreichen Etablierung polyklonaler, stabil transfizierter Zellkulturen. Zwar konnten auch bei niedriger Transfektionseffizienz stabil transfizierte Zellkulturen selektiert werden, jedoch war dies in solchen Fällen entsprechend langwieriger und basierte mutmaßlich auf einer geringeren Zahl von transponierten Ausgangszellen.

Beispielhaft für eine transiente Transfektion von L-363-Myelomzellen ist in Abbildung 14 die FACS-Auswertung für einen kompletten KRas-Expressionsansatz gezeigt.



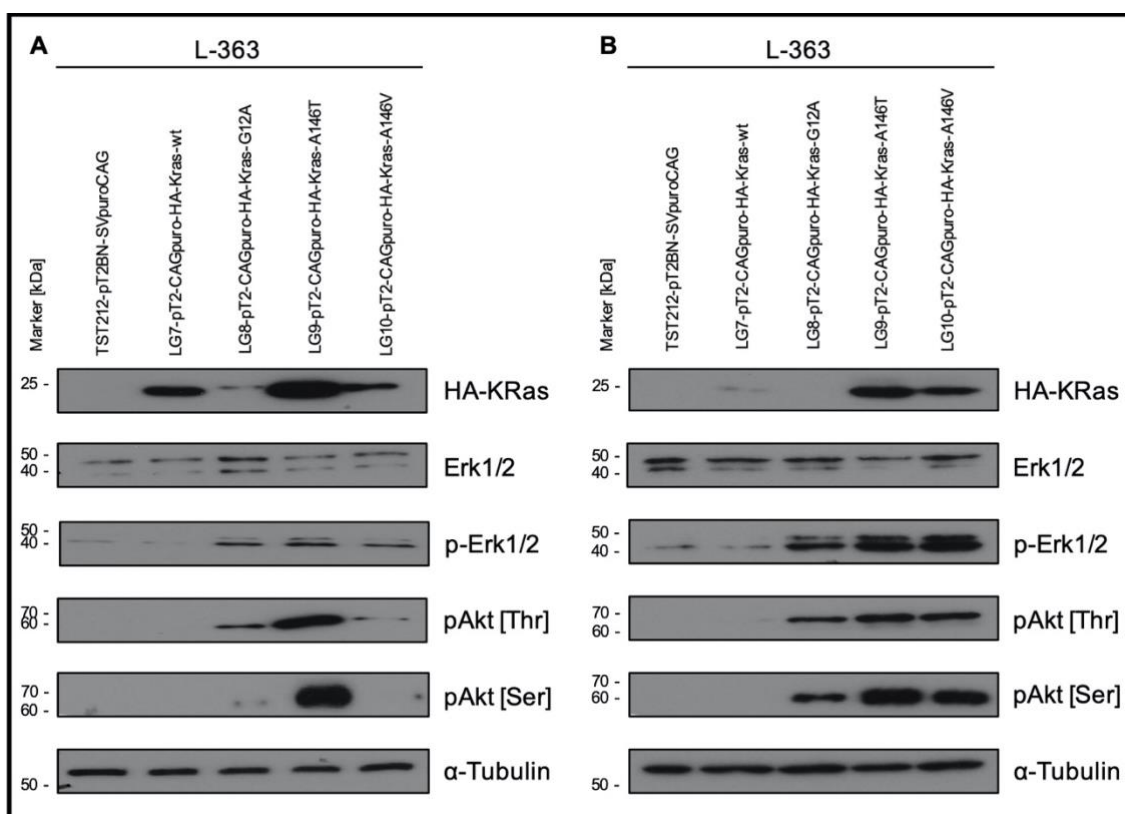
**Abbildung 14: A:** FACS-Analyse transfizierter L-363-Myelomzellen. Dargestellt sind die erhaltenen Analysebilder der, mit den KRas-Plasmiden, transfizierten Zellen. In diesen sind die Stärke des eGFP-Signals (verstärkt Grün-fluoreszierendes Protein) gegen die Signalintensität des Propidiumiodids aufgetragen. Markiert wurde durch eine Umrandung der Anteil vitaler, stark eGFP-positiver Zellen (PI negativ, GFP positiv).

In den gezeigten FACS-Bildern sind für alle Plasmide vergleichbar hohe Anteile vitaler, grün fluoreszierender Zellen (PI negativ, GFP positiv) registrierbar, mit einem Anteil von 23-27,5% an den gemessenen Zellen. Auch nach CD4-Aufreinigung konnten für alle Transfektionsansätze sehr ähnliche Zellzahlen gewonnen werden (jeweils etwa  $1 \times 10^6$  Zellen), weshalb von einer äquivalenten Transfektion auch des CD4 $\Delta$ -Plasmids, sowie analog dazu auch der KRas Expressionsplasmide ausgegangen werden konnte. Demzufolge war auch nicht davon auszugehen, dass die Transfektion eines oder

### 3 Ergebnisse

verschiedener der KRas-Expressionsplasmide zu einem schnellen Zelltod der transfizierten Zellen führt und somit (mit-) ursächlich für die oben beschriebenen unterschiedlichen Expressionsspiegel sein könnte. Die FACS-Analyse, welche an dieser Stelle beispielhaft gezeigt wird, wurde für alle Experimente am Tag nach der Transfektion durchgeführt, um als erste Kontrolle Vorhersagen für das Gelingen des Experiments zu ermöglichen. Wurden bereits in der FACS-Auswertung unzureichende bzw. ungleiche Transfektionseffizienzen registriert, so wurde zur Vermeidung eines möglichen Fehlers das Experiment wiederholt.

Der Versuch der transienten HA-KRas-Proteinexpression in der Zelllinie L-363 wurde mehrfach durchgeführt und stellvertretend für die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 15 zwei der angefertigten Western Analysen gezeigt.



**Abbildung 15:** Transiente Proteinexpressionsanalyse für KRas-Konstrukte und Aktivierungsspiegel nachgeschalteter Signalmoleküle.

Abkürzungen: kDa = Kilodalton, HA = Hämagglutinin, KRas = Kirsten Rat sarcoma, Erk = Extrazellulär Signal-regulierte Kinase, pErk = phosphoryliertes Erk, pAkt = phosphoryliertes Akt. **A** und **B**: Zu sehen sind zwei, in separat voneinander durchgeführten Experimenten, generierte Western Blots. Diese wurden zusätzlich zu dem durch die Proteinexpressionsplasmide exprimierten HA-KRas auf weitere nachgeschaltete Signalmoleküle des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs, sowie des PI3K/Akt-Signalwegs gefärbt. Als Ladekontrolle für eine gleichmäßige Beladung der einzelnen Spuren diente  $\alpha$ -Tubulin.

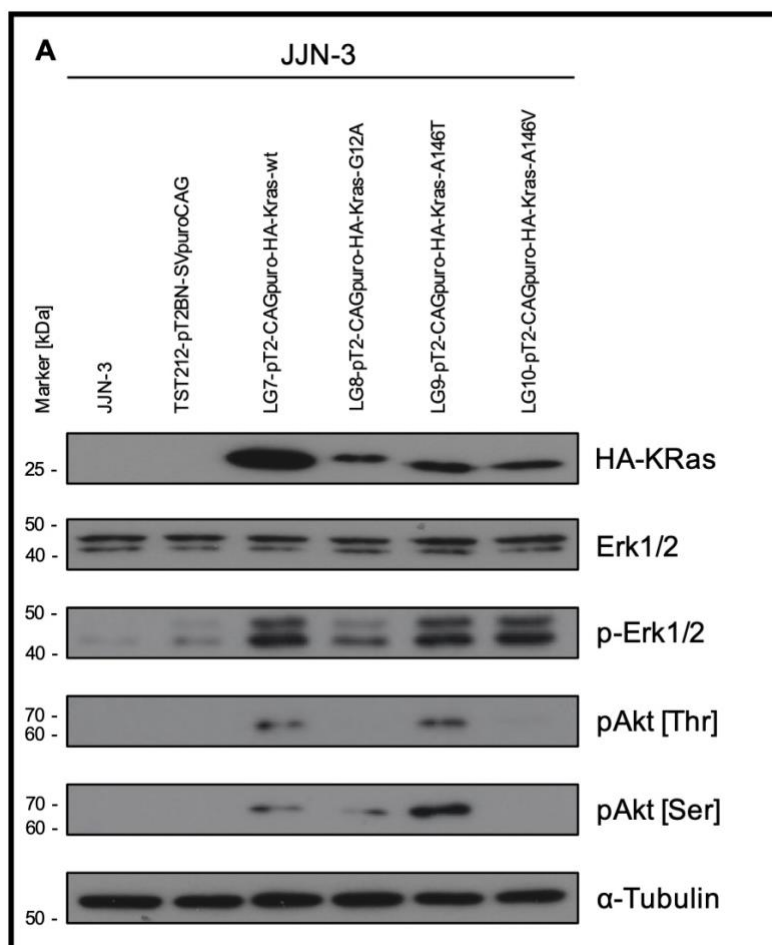
In beiden gezeigten Western Blot-Bildern ist zu sehen, dass es zu deutlichen Unterschieden im Expressionsniveau der verschiedenen HA-KRas Varianten kam. So wurde für die beiden Exon 4-Mutanten in den gezeigten Versuchen ein deutlich höherer

Proteinspiegel erreicht als für die Exon 2-Mutante. Bezogen auf die plasmidbasierte Expression des KRas-Wildtyps kam es bei KRas<sup>p.A146T</sup> in beiden Experimenten zu einer deutlich stärkeren Expression der mutierten Form. Für das Proteinexpressionsplasmid für KRas<sup>p.A146V</sup> wurde eine KRas-Expression auf dem gleichen Level wie für den Wildtyp bzw. in einem der durchgeführten Versuche sogar eine stärkere Expression erreicht. Bezogen auf den Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweg führten trotz der unterschiedlichen Expressionsspiegel dennoch alle drei KRas-Mutationen zu einer signifikant verstärkten Aktivierung des Signalwegs. Dies kann aufgrund der deutlich erhöhten Spiegel von phosphoryliertem Erk1/2 gefolgert werden, die ausschließlich auf eine verstärkte Aktivierung des Proteins zurückzuführen sind, da in allen Testansätzen ein vergleichbares Level von Erk1/2 vorlag. Diese Über-Aktivierung von Erk1/2 konnte wiederum nur in den Myelompopulationen beobachtet werden, die eine der KRas-Mutationen trugen. Daher kann von einem verstärkten Aktivierungspotenzial des Signalwegs in MM-Zellen die eine der untersuchten KRas-Mutationen tragen ausgegangen werden. Möglicherweise ist diese Aktivierung in ihrer spezifischen Stärke dennoch abhängig von dem individuellen Mutationsprofil der betreffenden Myelomzelle. So konnte in Myelomzellen die mit dem Proteinexpressionsplasmiden für die Exon 2-Mutation transfiziert worden waren, trotz deutlich geringerer HA-KRas-Expression, eine annähernd gleich starke Phosphorylierung von Erk1/2 verglichen mit den Exon 4-Mutationen erzielt werden. Des Weiteren war in L-363-Zellen nicht nur der aktivierende Einfluss der untersuchten KRas-Mutationen auf den Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweg zu beobachten, sondern auch für die Phosphorylierungsspiegel von Akt konnte eine starke Differenz zwischen KRas-Wildtyp-(über-) exprimierenden-Zellen und solchen mit KRas-Mutation beobachtet werden (Abbildung 15). Diese Aktivierung war absolut gesehen für die Exon 4-Mutationen auf einem höheren Niveau als für die Exon 2-Mutante, jedoch war die Exon 2-mutierte KRas-Variante auch deutlich schwächer exprimiert. Beide Experimente ergaben in groben Zügen eine Überaktivierung von Akt, die mit dem Expressionsniveau der KRas-Mutanten korrelierte. Die Western Blots im Rahmen meiner Experimente zeigen die Färbung auf zwei verschiedene Phosphorylierungsstellen von Akt. Dabei ist die Phosphorylierung von Akt an Threonin308 Voraussetzung für die anschließende Phosphorylierung an Serin473<sup>113</sup>. Erst die zweite Phosphorylierung führt zur vollen Aktivität des Proteins. Übereinstimmend mit dieser schrittweisen Aktivierung von Akt sind bei erfolgreicher Färbung auf an Thr308 phosphoryliertes Akt auch entsprechende Banden für die Phosphorylierung von Ser473 nachzuweisen.

### 3.2.2 Stabile Proteinexpressionsversuche

Nachdem die transiente Überexpression von KRas zur verstärkten Aktivierung verschiedener nachgeschalteter Signalmoleküle führte, wurde in einem nächsten Schritt die dauerhafte Expression der KRas-Mutanten in Myelomzellen untersucht. Bei den stabilen Proteinexpressionsversuchen wurde durch die Verwendung des *Sleeping Beauty* Transposon Systems und die Kotransfektion von Transposase-DNA eine stabile Integration der KRas-Mutation in das Genom der Wirtszelle ermöglicht und somit dauerhaft ein mutiertes KRas-Protein exprimiert. Da dieser Versuch dem physiologischen Zustand im Myelom mit einer dauerhaft erworbenen Mutation am nächsten kommt, war es interessant zu beobachten, ob die Zelle mit der exogen hinzugefügten Mutation und der vermuteten Aktivierung der nachgeschalteten Signalmoleküle einen dauerhaften Selektionsvorteil hatte oder aber ob die zusätzliche Mutation des Protoonkogens KRas bei dauerhafter Expression auch Gegenregulationsmechanismen in Gang brächte. Insbesondere war auch denkbar, dass angesichts der großen abwärtsgerichteten Dynamik der KRas Spiegel in den transienten Experimenten die nach Puromycinselektion etablierten, stabilen Zellkulturen weniger starke Differenzen in den Expressionsspiegeln der eingebrachten KRas-Konstrukte aufweisen würden. Dafür wurden die Zelllinien JJN-3 und OPM-2, welche beide vom Genotyp her KRas-wildtypisch sind, verwendet (JJN-3 besitzt eine Mutation für die Isoform NRas).

Für die primär durchgeführte Proteinexpressionsanalyse wurden Zellen der Myelomzelllinie JJN-3 per Elektroporation mit den *Sleeping Beauty* Proteinexpressionsplasmiden für KRas transfiziert (siehe 2.2.6), sowie durch Ko-Transfektion eines Transposase exprimierenden Plasmids der stabile Einbau in die genomische DNA transfizierter Zellen katalysiert. Den Kulturen wurde 2-3 Tage nach erfolgter Transfektion Puromycin zur Selektion hinzugefügt. Da die Proteinexpressionsplasmide zusätzlich zur KRas-DNA auch die genetische Information zur Puromycinresistenz beinhalten, konnte durch eine zweiwöchige Puromycinzugabe die Elimination aller nicht-transfizierten Zellen erreicht werden. Nach Überleben der plasmidtragenden Subpopulation wurde diese weiter herangezogen, nach Erreichen einer ausreichenden Zelldichte geerntet und für die Analyse mittels Western Blot vorbereitet (siehe Abbildung 16).



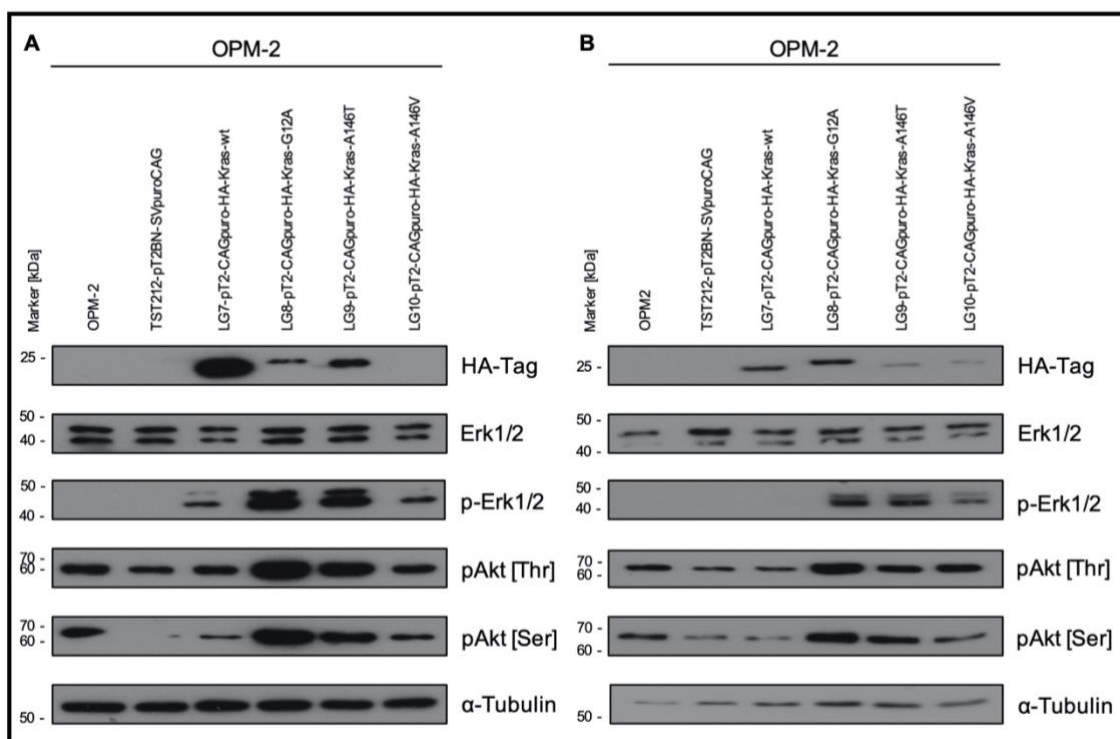
**Abbildung 16: A:** Western Blot der stabilen Integration der Proteinexpressionsplasmide für die verschiedenen KRas-Mutationen in der Myelomzelllinie JJN-3.

Abkürzungen: kDa = Kilodalton, HA = Hämagglutinin, KRas = Kirsten Rat sarcoma, Erk = Extrazellulär Signal-regulierte Kinase, pErk = phosphoryliertes Erk, pAkt = phosphoryliertes Akt. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung des Western Blots dient die Färbung von  $\alpha$ -Tubulin.

Der in Abbildung 16 gezeigte Western Blot lässt eine annähernd gleichmäßige KRas-Expression der drei mutierten Proteine erkennen. Diese ist jedoch bedeutend schwächer als die Expression von HA-KRas in den Zellen mit dem Proteinexpressionsplasmid für Wildtyp-KRas. Allerdings konnten trotz der Differenz in der Expression des HA-KRas zwischen dem Wildtyp-Plasmid und den Exon 4-Mutationen annähernd gleiche Signallevel für aktiviertes Erk1/2 erhalten werden (mit etwas weniger starker Phosphorylierung von Erk1/2 in den Zellen, welche mit dem Plasmid für die Exon 2-Mutation transfiziert worden waren), so dass dies möglicherweise ein entscheidender Faktor bei der Herausbildung der stabilen Population ist. Für die Spiegel von phosphoryliertem Akt ergab sich in den stabil transfizierten Zellen dagegen ein heterogeneres Bild, mit deutlicher konstitutiver Aktivierung in den stark KRas-Wildtyp überexprimierenden Zellen, sowie in der KRas<sup>p.A146T</sup>-exprimierenden Kultur. Für die anderen beiden Mutationen konnte entweder nur die Serin473-Phosphorylierung

(KRas<sup>p.G12D</sup>) oder gar kein Signal (KRas<sup>p.A146V</sup>) erhalten werden. Bei längerer Belichtung des Röntgenfilms wäre möglicherweise auch für die Exon 2-Mutation und KRas<sup>p.A146V</sup> eine deutlichere Phosphorylierung von Akt zu zeigen gewesen, jedoch absolut auf einem niedrigeren Niveau als für KRas<sup>WT</sup> und KRas<sup>p.A146T</sup>.

Als zweite Zelllinie für stabile Proteinexpressionsversuche kam OPM-2 zum Einsatz. Bei der Vorbereitung für den Western Blot wurde mit den Zellen bezüglich Transfektion und Selektion in gleicher Weise verfahren wie zuvor mit JJN-3. Ein Unterschied beim Expressionsassay mit OPM-2 war, dass zu zwei verschiedenen Zeitpunkten Western Blots der transfizierten Zellen angefertigt wurden. Dabei war als Datum für die Anfertigung des ersten Western Blots ein Zeitpunkt kurz nach abgeschlossener Puromycin-Selektion gewählt worden (siehe Abbildung 17.A). Die zweite Ernte von Zellen zur Western Blot-Analyse erfolgte etwa einen Monat später (Abbildung 17.B). Diese gestaffelte Analyse sollte eventuelle langfristige Trends in den zellulären HA-KRas-Spiegeln nachweisen (z.B. als Folge physiologischer Regulationsmechanismen oder aber als Folge fortschreitender klonaler Evolution/Selektion in der polyklonalen, stabil transfizierten Zellkultur), bzw. die zunächst erhaltenen Ergebnisse durch den zweiten Western Blot verifizieren.



**Abbildung 17:** Zwei sequenziell angefertigte Western Blots der stabilen Integration der Proteinexpressionsplasmide für die verschiedenen KRas-Mutationen in der Myelomzelllinie OPM-2. Abkürzungen: kDa = Kilodalton, HA = Hämagglutinin, KRas = Kirsten Rat sarcoma, Erk = Extrazellulär Signal-regulierte Kinase, pErk = phosphoryliertes Erk, pAkt = phosphoryliertes Akt. A: Zellernte und -lyse

*erfolgte kurz nach erfolgreicher Puromycinselektion. B: Anfertigung des zweiten Western Blots etwa einen Monat nach Puromycinselektion. In beiden Fällen dient die Färbung von  $\alpha$ -Tubulin als Nachweis für die gleichmäßige Beladung.*

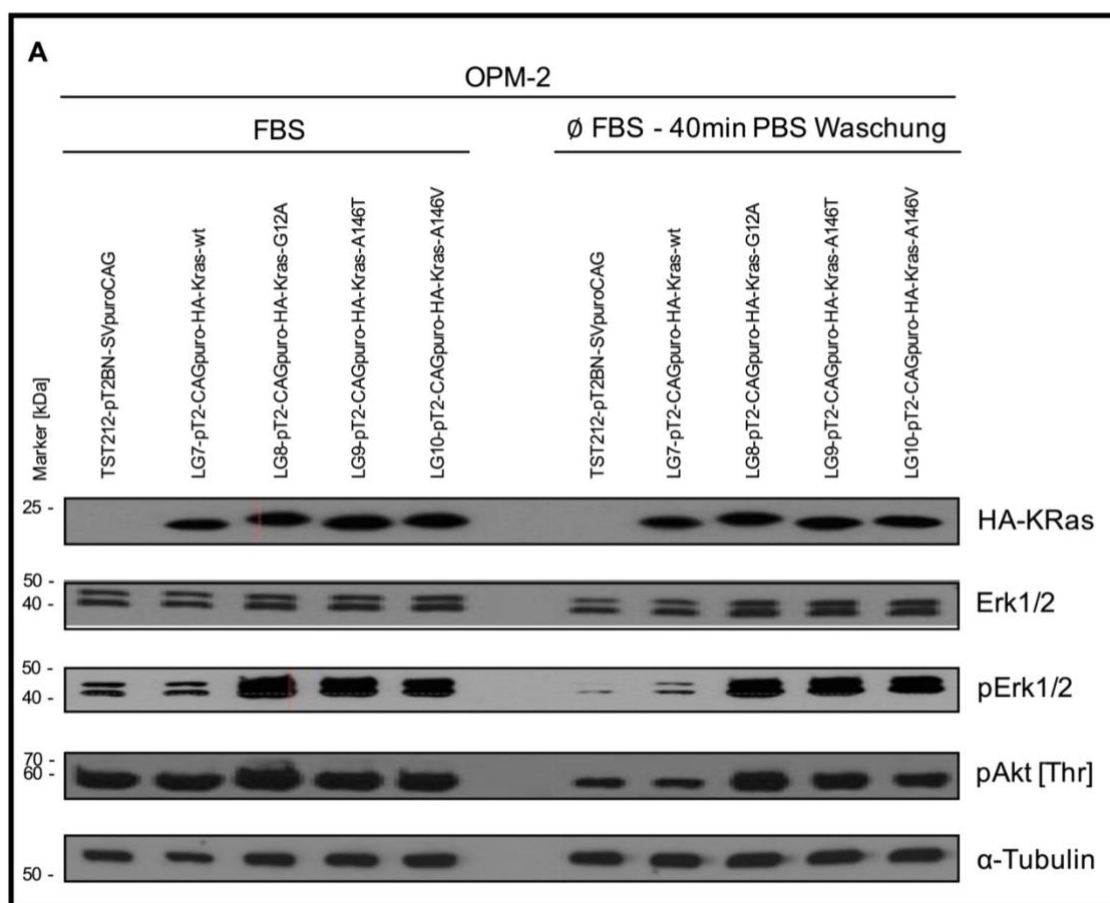
Beide in Abbildung 17 gezeigten Western Blots zeigen Differenzen im Expressionsniveau der verschiedenen KRas-Varianten, wobei das Ergebnis zu einem frühen Zeitpunkt nach der Selektion (A) durchaus dem Resultat des oben gezeigten Experiments in JJN-3 ähnelt, in welchem eine deutlich stärkere Expression von KRas-Wildtyp verglichen mit den KRas-mutierten Expressionsplasmiden sichtbar ist. Unter den drei KRas-Mutanten führen KRas<sup>p.G12A</sup> und KRas<sup>p.A146T</sup> zu einem ähnlichen Level an exprimiertem HA-KRas-Protein (KRas<sup>p.A146T</sup> zeigt ein etwas stärkeres Signalniveau). Für die zweite Exon 4-Mutante von KRas konnte in Blot A keine Signalbande erhalten werden, was bei noch längerer Belichtung des Röntgenfilms vermutlich relativierbar gewesen wäre, da eine gewisse Überaktivierung von phosphoryliertem Erk1/2 nachweisbar ist. Einen Monat später ist insbesondere eine Angleichung der Proteinexpressionsspiegel aller vier KRas-Varianten augenfällig. Die beiden Exon 4-Mutationen werden nunmehr gleich stark exprimiert, zwar weniger stark als die Exon 2-Mutante und der KRas-Wildtyp, aber dennoch auf insgesamt eher ähnlichem Niveau. Vergleicht man die beiden Western Blots, so scheint es durch Regulations- oder Selektionsmechanismen zu einer Veränderung der HA-KRas-Expression gekommen zu sein, weshalb eine Angleichung der Signalintensität zueinander zu beobachten war. In beiden angefertigten Western Blots konnte eine unter Einfluss der Mutanten deutlich verstärkte konstitutive Aktivierung von pErk1/2 detektiert werden. Für Wildtyp-KRas war im ersten Western-Blot noch ein deutliches Signal für pErk1/2 sichtbar, welches bis zur Anfertigung des nächsten jedoch verloren ging. Ebenso zeigen auch die Signalbanden für pAkt eine verstärkte Aktivierung bei Expression der mutierten KRas-Proteine, dabei kommt es bei Expression der Exon 2-Mutation zu einer stärkeren Aktivierung als bei den Exon 4-Mutationen. Dieses Signal blieb über die Zeit konstant.

#### 3.2.3 Einfluss von FBS auf die Aktivität des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs im Kontext von KRas Mutationen

Um die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Aktivierung von Akt und Erk1/2 abhängig von dem Vorhandensein einer KRas-Mutation gegenüber dem extrazellulären Einfluss von FBS beurteilen zu können (intrinsische vs. extrinsische Aktivierung), wurde in einem nächsten experimentellen Schritt der Einfluss von FBS im Zellkulturmedium analysiert. Als Versuchszelllinie wurde OPM-2 in ihren stabil HA-KRas exprimierenden Sublinien gewählt und es wurde in gleicher Art und Weise wie in Abschnitt 3.2.2



beschrieben vorgegangen. Der Unterschied zum vorangegangenen Versuch lag dabei in der Methodik beim Ernten der Zellen. So wurden die stabil transfizierten Myelomzellen zunächst gezählt und die gewünschte Zellzahl in doppelter Menge entnommen. Die eine Hälfte der Zellen wurde dann nach Durchführung des PBS-Waschschriffs für 40min weiter in PBS belassen. Durch diesen Zwischenschritt sollte ein Herunterfahren der extrinsisch bedingten Anteile der Phosphorylierungsspiegel onkogener Signalwegskomponenten erreicht werden, sodass intrinsisch bedingte Anteile deutlicher sichtbar werden. Die zweite Zellprobe wurde keiner besonderen zusätzlichen Behandlung unterzogen, sondern wie üblich (siehe 2.3.2) weiterverarbeitet. Abschließend wurden beide hergestellten Zelllysate auf einem gemeinsamen Western Blot analysiert, um identische Behandlungs- und Belichtungsbedingungen zu gewährleisten (siehe Abbildung 18).



**Abbildung 18: A:** Western Blot von stabil transfizierten Myelomzellen der Zelllinie OPM-2 unter besonderer Berücksichtigung der Veränderung der Signalintensität abhängig von FBS-Anwesenheit.

Abkürzungen: kDa = Kilodalton, HA = Hämagglutinin, KRas = Kirsten Rat sarcoma, Erk = Extrazellulär Signal-regulierte Kinase, pErk = phosphoryliertes Erk, pAkt = phosphoryliertes Akt. Auf der linken Seite sind die erhaltenen Signale für den Teil der Zellen der wie üblich behandelt wurde und auf der rechten Seite sind die Signale der für 40min in PBS belassenen Zellen gezeigt. Zur Beurteilung der Gleichmäßigkeit der Beladung wurde zusätzlich der Spiegel von  $\alpha$ -Tubulin bestimmt. Dieser Blot wurde unter Verwendung der von mir generierten stabil transfizierten OPM2-Sublinien direkt im Anschluss an meine Laborarbeit von

*Evelyn Brandt angefertigt und mir freundlicherweise für die Abfassung meiner Dissertation zur Verfügung gestellt.*

Betrachtet man zunächst nur die linke Seite des Western Blots, so sind die gezeigten Ergebnisse erwartungsgemäß sehr ähnlich zu den vorherigen, in OPM-2 generierten, Ergebnissen. Erfreulicherweise gelang es für die hier durchgeführte Transfektion und Selektion tatsächlich weitgehend identische Expressionsspiegel der verschiedenen HA-getaggten KRas Konstrukte zu erzielen. So konnte wiederum gezeigt werden, dass es in den Zellgruppen, welche eines der drei mutierten HA-KRas-Proteine exprimierten, zu einer deutlich stärkeren Aktivierung von Erk1/2 und einer etwas stärkeren Aktivierung von Akt kam als unter Leervektorbedingungen oder bei Expression von HA-KRas<sup>WT</sup>. Vergleicht man im Western Blot die normal geernteten Zellen mit den PBS-ausgewaschenen Zellen, so bleibt das Phosphorylierungsniveau von Erk1/2 und Akt auch unter dem fehlenden Einfluss von FBS in allen Proben der KRas-Mutanten gleich. Im Unterschied dazu nimmt der Aktivierungsspiegel sowohl von Akt als auch von Erk1/2 in Proben, die mit dem Expressionsplasmid für KRas-Wildtyp bzw. einem Leervektor transfiziert worden waren, signifikant ab. Beide Signale bestätigen damit eine intrinsische Signalwegsaktivierung durch sowohl die Exon 2 als auch die Exon 4 KRas Mutationen. Während diese Aktivierung im Falle von phosphoryliertem-ERK1/2 auch in normaler Zellkultur bereits den Löwenanteil des Signalspiegels in OPM2-Zellen ausmacht, ist im Falle von phosphoryliertem-Akt in normaler Kultur ein erheblicher Anteil scheinbar auf FBS/Rezeptortyrosinkinase-vermittelte Aktivierung zurückzuführen. Der Verlust desselben kann jedoch bei FBS-Entzug offenbar weitgehend durch die intrinsische Aktivität der KRas-Mutanten kompensiert werden.

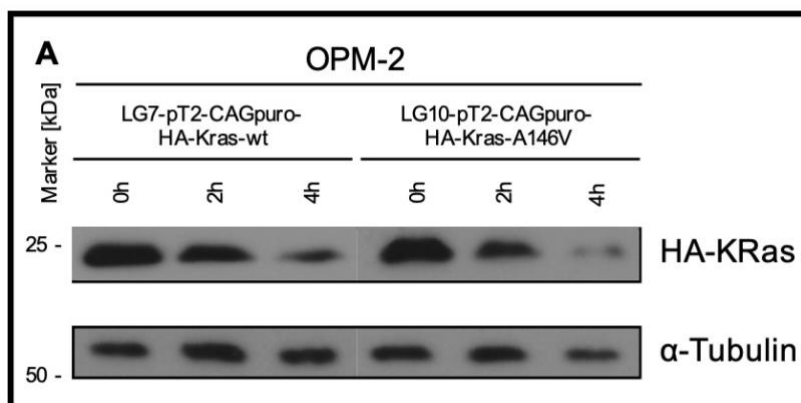
### 3.3 Weiterführende Experimente zur Analyse der möglichen Ursachen der Uneinheitlichkeit bei der Expression von KRas-Konstrukten

Im Laufe meiner Arbeiten zur funktionellen Analyse der verschiedenen KRas-Mutationen kamen weitere Versuchsmethoden zum Einsatz. Damit sollte vorwiegend das Problem der unterschiedlich starken Expression der verschiedenen KRas-Varianten zueinander adressiert werden. So sollte ein Erklärungsansatz gefunden werden, anhand dessen die unterschiedlichen Expressionslevel nachvollziehbar und gegebenenfalls adressierbar würden.

## 3.3.1 Cycloheximidassay

Eine Vermutung bezüglich der unterschiedlich starken Expression zwischen den vier KRas-Varianten war, dass es möglicherweise durch die Mutationen zu einer Veränderung der Stabilität des Proteins kam. Durch die Zunahme an Instabilität würde das Protein dann möglicherweise vermehrt dem intrazellulären Abbau zugeführt werden, wodurch verschieden hohe Signalspiegel aufträten. Diese Vermutung wurde insbesondere durch die ersten Experimente mit transienter Transfektion untermauert, die oft für die HA-KRas-Wildtyp Variante die mit Abstand höchsten Expressionsspiegel erbachten.

Zur Identifizierung möglicher Unterschiede in der Degradationsgeschwindigkeit kam ein Cycloheximidassay zum Einsatz. Dabei wurden kultivierte Zellen mit 100µg/mL Cycloheximid versetzt und nach 0, 2 und 4 Stunden geerntet. Untersucht wurde beispielhaft das Abbauverhalten von KRas<sup>WT</sup> und KRas<sup>p.A146V</sup>, da diese in den vorangegangenen Expressionsversuchen die gegensätzlichsten Signalintensitäten zeigten. Zum Einsatz kamen stabil transfizierte OPM2 Sublinien, die die beiden Konstrukte auf ähnlichem Niveau exprimierten. Mit Hilfe von Cycloheximid als Translationshemmer (= Unterbindung jeglicher Neusynthese) konnte mit diesen Zellen per Western Blotting ein Vergleich der Degradationsdynamik der beiden KRas-Varianten vorgenommen werden.



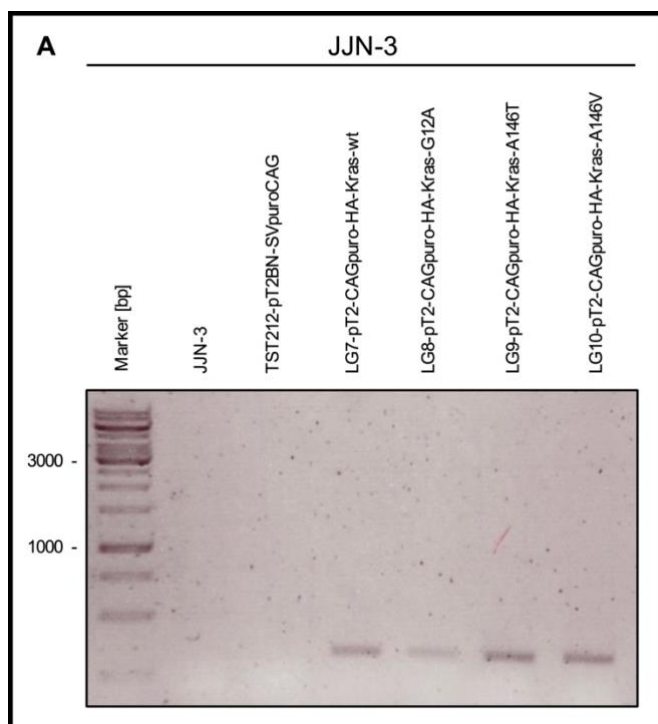
**Abbildung 19: A:** Western Blot der mit Cycloheximid kultivierten Zellen. Abkürzungen: kDa = Kilodalton, HA = Hämagglutinin, KRas = Kirsten Rat sarcoma. Es wurden die beiden KRas-Varianten KRas<sup>WT</sup> und die Exon 4-Mutation KRas<sup>p.A146V</sup> mit 100µg/mL Cycloheximid versetzt und nach 0, 2 und 4h geerntet. Als Färbekontrolle für die gleichmäßige Beladung und damit zur Gewährleistung der Interpretierbarkeit diente alpha-Tubulin.

Abbildung 19 zeigt, dass es zwischen dem Wildtyp-Protein und dem A146V-mutierten-Protein zu keinem signifikanten Unterschied in der Geschwindigkeit des Abbaus kam. Zu den drei Zeitpunkten an welchen Zellen geerntet wurden, waren jeweils ähnliche Signalintensitäten des HA-KRas Proteins zu erhalten. Daher kann nicht von einer

unterschiedlichen Stabilität mit veränderter Degradationsrate des mutierten KRas gegenüber dem Wildtyp-Protein ausgegangen werden.

#### 3.3.2 Semiquantitative Analyse der cDNA-Spiegel

Da durch Differenzen in der Proteinstabilität die Unterschiede in der Expression der KRas-Proteine nicht zu erklären waren, wurde die eher unwahrscheinliche Möglichkeit, dass die Mutation der DNA eine Veränderung der Stabilität auf RNA-Ebene bewirkt, näher untersucht. Dafür wurde die RNA von mit den Expressionsplasmiden stabil transfizierten JJN-3-Zellen isoliert und nach Einstellung der DNA-Konzentration auf gleiche Level mittels Reverser Transkription unter Verwendung eines *Sleeping Beauty*-spezifischen Primers in cDNA umgeschrieben. Die erhaltenen cDNAs wurden in identischer Weise mittels einer PCR amplifiziert, um Unterschiede in der Zahl der Matrizen sichtbar zu machen. Die semiquantitative Analyse der PCR-Produkte erfolgte abschließend auf einem Agarosegel.



**Abbildung 20: A:** Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten mit den revers transkribierten cDNAs der verschiedenen Versuchsansätze als Matrize. Abkürzungen: bp = Basenpaare. Untransfizierte Myelomzellen der Zelllinie JJN-3, sowie mit dem Leervektor TST212 (ohne zusätzliches exogenes KRas) transfizierte Zellen sind als Negativkontrolle aufgetragen. In den weiteren Lanes sind die Amplifizierungsprodukte für KRas<sup>WT</sup>, KRas<sup>p.G12A</sup>, KRas<sup>p.A146T</sup> und KRas<sup>p.A146V</sup> zu sehen.

Wie Abbildung 20 erkennen lässt, wurden nach Amplifikation weitgehend äquivalente Mengen an PCR-Produkt für die vier verschiedenen KRas-Varianten erhalten. Die geringfügig geringere Bandenstärke für die G12A Variante ist bei weitem nicht

hinreichend, um daraus auf geringere mRNA-Stabilität zu schließen. Daher spricht dieses Experiment eher für die Äquivalenz der Transkription der verschiedenen HA-KRas-Konstrukte und für eine identische Stabilität der gebildeten mRNAs.

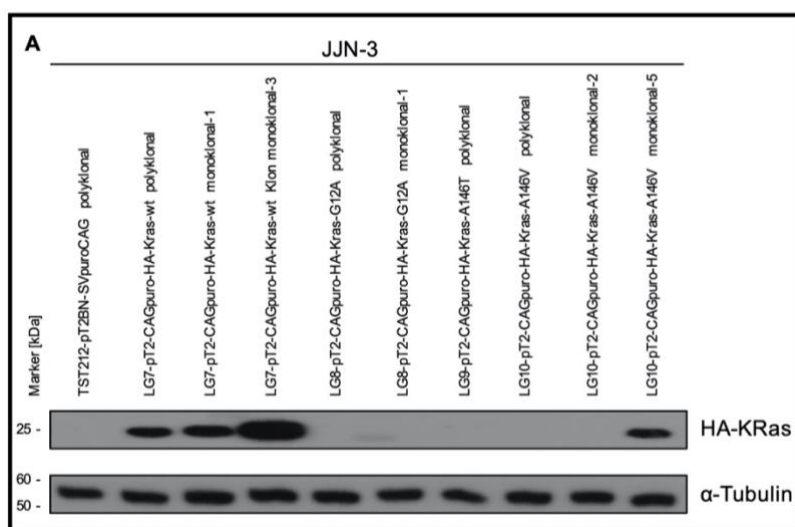
#### 3.3.3 Einzelzellklone

Weitere Erklärungsansätze für die unterschiedlich starke KRas-Expression lagen darin begründet, dass die individuell transfizierten Zellen unterschiedliche Mengen an Plasmid-DNA aufnehmen, dass beim Einbau der HA-KRas-Expressionskassetten mittels Transposase in die genomische DNA nicht alle Zellen gleich viele Genkopien inserieren und dass sich die zufällig selektionierten Einbauorte voneinander unterscheiden. Somit bildet jeder Transfektionsansatz wiederum ein heterogenes Zellgemisch individueller Klone (trotz des gleichen übertragenen Plasmids). Daher würde dieses Zellgemisch bei der Western Blot-Analyse potenziell einen Mittelwert der Proteinexpression von Zellen, aus solchen die viele KRas-Genkopien besitzen und KRas in großer Menge exprimieren und solchen die eher wenige Genkopien besitzen, liefern. Da die Signalintensität somit nicht Ausdruck eines bestimmten Zellklons wäre, sondern durch die individuelle, zufällige Zusammenstellung im Rahmen der Transfektion zustande kommen würde, könnte die unterschiedlich starke Expression zwischen den KRas-Mutanten und KRas-Wildtyp dadurch erklärt werden. Zusätzlich dazu kann ein weiterer Erklärungsansatz, welcher vor allem die Signalintensitätsunterschiede für HA-KRas in stabil transfizierten Zellen erklären würde, aufgestellt werden. Demnach besäße der Zellklon dieses heterogenen Zellgemisches, der die optimalste Anzahl an Genkopien transfiziert bekam gegenüber den anderen Zellen einen Selektionsvorteil und würde die anderen Zellen daher nach und nach überwachsen. Das Expressionslevel für KRas würde sich demnach zunehmend dem des bestimmenden Klons anpassen. Dabei kann die optimale Anzahl an Genkopien zwischen den verschiedenen KRas-Proteinen durchaus variieren. So könnte beispielsweise eine Zelle, die ein mutiertes KRas-Gen trägt, weniger Genkopien benötigen als eine KRas-Wildtyp-Zelle, um möglichst schnell und effektiv zu wachsen. Bei der mutierten Zelle wären demnach weniger, aber auch mehr Genkopien mit einem langsameren Zellwachstum verbunden, da deren Proteinexpression die Signalwege zu wenig oder zu viel, in einem toxischen Ausmaß, aktiviert. Nur solche Zellen, die das bestangepasste Expressionsniveau für KRas besitzen, wären demnach im Western Blot zu detektieren.

Um daher der Frage auf den Grund zu gehen, ob die einzelnen Zellen KRas nach Transfektion in einem unterschiedlichen Maße exprimieren, wurde die Aufzucht

originaler Einzelklone durchgeführt. Eine weitere mit diesem Versuch verbundene Hoffnung war es, Klone der verschiedenen KRas-Varianten zu finden, die ein ähnliches HA-KRas Signalniveau zeigen, um diese dann einer Analyse der KRas-nachgeschalteten Signalwegsmoleküle zu unterziehen.

Für die Analyse einzelner Zellklone wurden dem transfizierten polyklonalen Zellgemisch nach Selektion mittels Puromycin einzelne transfizierte JJN-3-Zellen entnommen (siehe 2.2.11) und in den Wells einer 96-well Platte individuell herangezogen. Dabei war das Heranwachsen einer ausreichend großen Zellmenge zur Analyse durch einen Western Blot sehr zeitaufwendig (ca. ein Monat nach Aussaat der einzelnen Zellen bis zur Ernte und Anfertigung des Western Blots).



**Abbildung 21: A:** Western Blot zum Vergleich monoklonaler und polyklonaler HA-KRas transfizierter JJN-3 Sublinien.

Abkürzungen: kDa = Kilodalton, HA = Hämagglutinin, KRas = Kirsten Rat sarcoma, Erk = Extrazellulär Signal-regulierte Kinase, pErk = phosphoryliertes Erk, pAkt = phosphoryliertes Akt. Es sind dabei für die einzelnen KRas-Varianten unterschiedlich viele monoklonale Proben gezeigt, da nicht für alle Varianten gleich viel Erfolg in der Aufzucht erzielt werden konnte. Die monoklonalen Proben sind zusätzlich zur Genvariante mit einer Nummer entsprechend der ursprünglich vergebenen Nummer in der 96-Well-Platte benannt.  $\alpha$ -Tubulin dient in der Analyse des Western Blots als Ladekontrolle.

In Abbildung 21 sind zusätzlich zu einzelnen monoklonalen Zelllysaten auch deren stabil transfizierte, polyklonale Äquivalente aufgetragen. Als Zelllinie kam JJN-3 zum Einsatz, da diese von den zuvor verwendeten Zelllinien die schnellste Proliferation zeigte und somit die Wachstumsphase der Einzelzellklone zumindest etwas verkürzt werden konnte. Von den ursprünglich 20 pro KRas-Variante ausgesäten Zellen konnten jeweils nur wenige monoklonale Kulturen von verwertbar großer Zellzahl innerhalb einer Anzuchtzeit von 8 Wochen erfolgreich erhalten werden:

- HA-KRas<sup>WT</sup> – 3 monoklonale Kulturen
- HA-KRas<sup>p.G12A</sup> – 1 monoklonale Kultur
- HA-KRas<sup>p.A146T</sup> – 1 monoklonale Kultur

#### HA-KRas<sup>p.A146V</sup> – 3 monoklonale Kulturen

Zudem verlief die Anzucht für die einzelnen Klone unterschiedlich schnell, weshalb im gezeigten Western Blot in Abbildung 21 für die Proteinvarianten jeweils verschieden viele monoklonale Lysate gezeigt sind. Die zusätzlich zu dem gezeigten Western Blot angefertigten Blots der langsamer herangewachsenen Zellklone zeigten jedoch ein äquivalentes Ergebnis, weshalb dieser Blot hier stellvertretend gezeigt wird.

Es ist zu erkennen, dass innerhalb der verschiedenen Zellkulturen, welche mit dem gleichen Plasmid transfiziert wurden, hier KRas-Wildtyp und KRas-A146V, die Expression an Protein unterschiedlich stark ist. Dies bestätigt die Vermutung, dass nach Transfektion ein heterogenes Zellgemisch aus Zellen mit unterschiedlicher Anzahl an Genkopien existiert. Jedoch war es nicht möglich mittels dieser Methode Klone der verschiedenen KRas-Varianten zu isolieren, die ein ähnliches Expressionslevel an HA-markiertem KRas zeigten. Würde man das single cell picking mit einer größeren Anzahl an Zellklonen wiederholen, so könnte es eventuell gelingen Zellklone mit gleicher Signalintensität zu finden.

Auch wenn es nicht möglich war ein gemeinsames KRas-Expressionsniveau mittels des single cell pickings zu erreichen, so konnte der Versuchsansatz zeigen, dass bestimmte Einzelzellklone auch über einen längeren Zeitraum hohe Spiegel an HA-KRas exprimieren, sogar auf einem höheren Niveau als eine polyklonale Kultur.

### 4 Diskussion

In dem Bestreben eine wirkungsvolle und zielgerichtete Therapie für Patientinnen und Patienten mit Multiplem Myelom zu finden, wurde über die letzten beiden Jahrzehnte eine intensive Suche nach lohnenden Zielmolekülen und deren Involvierung in der Tumorgenese betrieben. Dabei gibt es viele Tumorerkrankungen in deren Entwicklung Treibermutationen Kinasen oder Signalwege aktivieren und zur unregulierten Tumorzellproliferation führen<sup>114,115</sup>. Durch die Identifizierung dieser Signalwege und deren therapeutische Adressierung konnten bei verschiedenen soliden und hämatologischen Tumoren bereits beeindruckende Behandlungserfolge erzielt werden<sup>116-118</sup>. Besonders Tumore die einheitlich eine bestimmte Treibermutation zeigen lassen sich so zielgerichtet therapieren. Ein Beispiel wie eine gezielte Therapie einer Treibermutation die Krebstherapie verändern und die Prognose der Patientinnen und Patienten verbessern kann, ist die gegen die BCR-ABL-Translokation gerichtete Therapie bei der chronischen myeloischen Leukämie<sup>119</sup>. Leider ist die Situation beim MM, mit seinem hohen Maß an genetischer Heterogenität sowohl zwischen verschiedenen Patientinnen und Patienten als auch innerhalb jeder einzelnen Myelomerkrankung, weitaus komplexer<sup>86,120</sup>. Bei MM-Tumorsequenzierungen zur Identifikation von Treibermutationen konnten nur wenige Gene identifiziert werden, die im Patientenkollektiv gehäuft mutiert vorkamen<sup>121</sup>. Dabei fiel das Augenmerk insbesondere auf zwei Isoformen von Ras für welche nachgewiesen werden konnte, dass sie mit einer vergleichsweise hohen Frequenz im Multiplem Myelom auftreten<sup>86</sup>. Hier zeigten sich bei insgesamt etwa 40% der Patientenfälle Punktmutationen von KRas oder NRas<sup>63,122</sup>, wobei die beiden Isoformen im Gegensatz zum Mutationsmuster anderer Tumorentitäten im Multiplen Myelom in etwa gleich häufig mutiert sind. Doch auch darüber hinaus wurden höherfrequent Mutationen anderer Bestandteile des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs, insbesondere Mutationen der Raf-Isoform BRaf, gefunden. Dabei war die Zahl der Mutationen von Ras oder Raf bei Patientinnen und Patienten mit neudiagnostizierter Erkrankung signifikant niedriger als bei solchen mit Rezidiven der Erkrankung<sup>122,123</sup>. Dies begründet die Möglichkeit, dass eine wirkungsvolle Blockade des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs besonders für Patientinnen und Patienten mit einem Rezidiv der Erkrankung unter der herkömmlichen Therapie eine Therapiealternative oder -erweiterung darstellen könnte.

Des Weiteren scheinen Mutationen des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von prämaligen Vorläuferstadien hin zum Multiplen Myelom zu spielen. Während in Patientinnen und Patienten mit MGUS Ras-Mutationen



signifikant seltener auftreten, nehmen diese Mutationen im Verlauf und der Entwicklung der Myelomkrankung zu<sup>63,123,124</sup>.

Bei der Deregulation des MAPK-Signalwegs kommt es jedoch nur in den seltensten Fällen zu kombiniert auftretenden Mutationen verschiedener an diesem Signalweg beteiligter Moleküle<sup>125</sup>. Dies und die Tatsache mit welcher Häufigkeit Mutationen des Signalwegs auftreten lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine Deregulation des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs in der Myelom-Entwicklung eine Schlüsselrolle spielt.

So konnte für die häufiger auftretenden Mutationen von NRas, KRas und BRAf bereits gezeigt werden, dass diese zu einer vermehrten Aktivierung der nachgeschalteten Signalmoleküle führen<sup>122</sup>. Für die selteneren KRas-Mutationen im MM p.G12A, p.A146T und p.A146V fehlten Untersuchungen hinsichtlich des aktivierenden Potentials bisher noch. Da auch diese im Patientenkollektiv zu beobachten und hinsichtlich ihrer Rolle in der Tumorgenese einzuordnen sind, war es notwendig eine funktionelle Analyse dieser Mutationen durchzuführen<sup>93</sup>.

Analog zu den mit einem alternativen molekularen Ansatz erzielten Ergebnissen in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Ellen Leich-Zbat, konnten die Ergebnisse dieser Arbeit eine intrinsisch aktivierende Funktionalität der beiden Exon 4-KRas-Mutationen sowie der Exon 2-KRas-Mutation bestätigen. So konnte für alle drei Mutationen in den Expressionsversuchen ein Einfluss des mutierten KRas auf den Aktivierungsspiegel von Erk reproduziert und darüber hinaus auch ein Einfluss auf den Aktivierungsspiegel von Akt gezeigt werden. Die Expression eines mutierten KRas-Proteins führte dabei in den Zellen zu einer stärkeren Aktivierung dieser nachgeschalteten Signalmoleküle als das Wildtyp-Protein.

Dabei erwies sich der Einsatz des *Sleeping Beauty* Transposon Systems als verlässlicher Ansatz hinsichtlich der Verwendung in Überexpressionsanalysen zur Generierung und Reproduktion von Daten. Es konnten damit äquivalente Ergebnisse verglichen mit dem Einsatz von lentiviralen Expressionsvektoren gewonnen werden<sup>93</sup>. Wie das Beispiel der Expression von IKZF (Ikaros Zink Finger)-Proteinen bei Barrio et al. (2019)<sup>126</sup> veranschaulicht, kann auch im *Sleeping Beauty* System nicht grundsätzlich eine erfolgreiche Protein-Expression vorausgesetzt werden, da diese u.a. von den verwendeten Promotoren und auch von Struktureigenschaften des 3'-untranslatierten Bereichs der mRNA beeinflusst sein kann. Die Ras-Proteine gehören dabei eher zu den problematisch zu exprimierenden Proteinen, wie vor Jahren bereits in unserer Arbeitsgruppe bei Verwendung von pcDNA3.1 und pCAGGS-Expressionsvektoren

beobachtet wurde<sup>81</sup>. Insgesamt gesehen, erscheinen die mittels des *Sleeping Beauty* Ansatzes reproduzierbar generierten Expressionslevel im Rahmen meiner Versuche somit durchaus zufriedenstellend.

Jedoch zeigte auch der Einsatz von *Sleeping Beauty* in diesem Kontext die gleichen Probleme wie zuvor das lentivirale System. Im Rahmen beider Expressionsanalysen war es eine Herausforderung ein gleichwertiges Niveau an (HA-markiertem) KRas zu generieren. So variierte die Expression von KRas und die Aktivierung der nachgeschalteten Signalmoleküle sowohl bezüglich der verschiedenen Mutationsvarianten als auch zwischen den verwendeten Zelllinien deutlich. Daher kann keine gültige Aussage über die Potenz der einzelnen Mutationen bezüglich der Aktivierung von nachgeschalteten Signalmolekülen getroffen werden. Aus welchen Gründen keine äquivalenten Proteinspiegel für die verschiedenen HA-KRas Expressionskonstrukte erreicht werden konnten blieb letztendlich auch weiterhin unbekannt, doch wurden zumindest verschiedene Erklärungsansätze näher untersucht.

Veränderungen hinsichtlich der RNA- und Protein-Stabilität, welche die unterschiedlich starke HA-KRas-Expression erklären könnten, wurden mittels der Versuche der RNA-Isolierung und des Cycloheximidassays näher untersucht und als Erklärungsansätze wieder verworfen.

Ebenso erscheint es eher unwahrscheinlich, dass die unterschiedlich hohen Expressionslevel direkt als Folge von strukturellen Unterschieden durch die Mutationen zustande kommen, da die individuellen Expressionslevel der verschiedenen mutierten KRas-Proteine im Laufe der mehrfach durchgeführten Experimente schwankten. So war weder bei Wiederholung eines Experiments in der gleichen Zelllinie noch bei Untersuchung in einer anderen Myelomzelllinie ein durchgehend gleiches Proteinexpressionsverhältnis für KRas zwischen den drei Mutationen zu erreichen.

Bezüglich der unterschiedlich starken KRas-Expression beim Wechsel der in den Experimenten verwendeten Zelllinien ist anzumerken, dass sowohl L-363 als auch JJN-3 Zellen bereits eine endogene, aktivierende Mutation der Isoform NRas tragen<sup>81</sup>. Da somit bereits endogen eine verstärkte Grundaktivität dieser Überlebenssignale-vermittelnden Proteine besteht, müssen die ektopisch eingebrachten Konstrukte in diesen Zellen nicht notwendigerweise zu einem vergleichbaren Aktivierungseffekt wie in Ras-Wildtyp Zellen führen. Dies legt die Vermutung nahe, dass zu hohe

Aktivierungslevel eine Beeinträchtigung der Zellen verursachen und somit ein Grundmaß an negativer Rückkopplung und Regulation auch in Myelomzellen besteht. Anders als in JJN-3 und L-363 Zellen besitzt die OPM-2-Zelllinie, in welcher es zu einer relativ stärkeren Aktivierung von Erk und Akt kam als in den anderen Zelllinien, keine Mutation von NRas. In OPM-2 besteht darüber hinaus ein genetischer Mangel der Phosphatase PTEN (Phosphatase und Tensin homolog). Diese Phosphatase ist unter anderem für die Dephosphorylierung von Akt zuständig<sup>127</sup>, weshalb ein Mangel an PTEN durch eine verlangsamte Deaktivierung von Akt zusätzlich zu dem verstärkten Phospho-Akt-Signal in OPM-2 Zellen beitragen kann. Leider bieten Plasmazellen zur Analyse der KRas-mutationsabhängigen funktionellen Regulation kein experimentell zugängliches Modell. Darüber hinaus tragen alle verwendbaren Myelomzelllinien bereits Mutationen, welche eine Deregulation verschiedener Ras-abhängiger Signalwege bedingen, weshalb eine exakte Analyse des Effekts der drei untersuchten Mutationen im physiologischen Kontext nicht erfolgen konnte.

Das Expressionsexperiment in Einzelzellklonen zeigt uns, dass die selektionierte, stabil transfizierte Zellkultur nach initialer *Sleeping Beauty* Transposition aus einer heterogenen Masse unterschiedlichster Zellklone besteht. Sowohl der Integrationsort im Genom als auch die Zahl transponierter Expressionskassetten sind für die verschiedenen Zellklone unterschiedlich, was zu deutlichen Schwankungen im KRas-Überexpressionsmuster führen kann. Darüber hinaus ist eine Zellkultur ein dynamisches System, das ständigen Regulations- und Selektionsmechanismen unterworfen ist. So kann es im Rahmen des Wachstums einer Zellkultur dazu kommen, dass zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils verschiedene Zellklone die Kultur dominieren und damit das Proteinexpressionsniveau bestimmen. In diesem System ist ein Western Blot lediglich eine Momentaufnahme, welche in relativ kruder Weise die mittlere Proteinexpression in der Zellkultur zu einem bestimmten Zeitpunkt abbildet.

Inwieweit das single cell picking einen guten Ansatz für das Finden äquivalent KRas-exprimierender Klone und die Signalwegsanalyse bietet ist dennoch fraglich. Um passende Klone zu erhalten, wäre es notwendig die Anzucht und Analyse einer deutlich größeren Anzahl an Einzelzellklonen zu verfolgen. Vor dem Hintergrund, dass nicht jede Anzucht eines Einzelzellklons erfolgreich ist, wäre dies wiederum sehr zeit- und ressourcenaufwändig und vermutlich ohnehin nur für hinreichend schnell wachsende Myelomzelllinien durchführbar.

Die unabhängig von der absoluten Signalintensität versuchs- und zelllinienübergreifend nachgewiesene verstärkte Aktivierung des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs wie auch des PI3K/Akt-Signalwegs in Gegenwart der untersuchten KRas-Mutationen lassen die Hoffnung zu, dass in Gegenwart eines passenden Inhibitors die Deregulation medikamentös adressiert werden könnte. Da Ras als ubiquitär vorkommendes Protein ohne aktive Bindungsstelle als schwer medikamentös inhibierbar gilt, konnte bisher kein spezifisch Ras-inhibierendes Medikament für den klinischen Einsatz beim Multiplen Myelom gefunden werden. Daher wird neben der Suche nach einer zielgerichteten Therapie gegen mutiertes Ras auch der Ansatz einer Downstream gerichteten Signalmolekülblockade verfolgt, um so die mutationsabhängig verstärkte Aktivierung zu regulieren. Gerade bei Patientinnen und Patienten, bei denen die herkömmliche Myelomtherapie nur unzureichend wirkt oder die darunter rezidivieren, möchte man mit der zielgerichteten Signalwegstherapie eine zusätzliche Therapiemöglichkeit bieten.

Der Schwerpunkt der Inhibitoren des MAPK-Wegs liegt daher auf den nachgeschalteten Zielen von Ras, wie Raf, Mek und Erk. Jedoch zeigte sich, dass die bloße Inhibierung nachgeschalteter Signalmoleküle nicht zwingend erfolgreich sein muss. So hat sich beispielsweise bei anderen Krebsarten gezeigt, dass die Behandlung von Patientinnen und Patienten mit BRAf-Inhibitoren zu einer paradoxen Aktivierung des Signalwegs führen kann<sup>128</sup>. Signalwege sind in den meisten Fällen nicht nur lineare Abfolgen von Signalmolekülen, sondern es gibt unzählige, parallel verlaufender Signalwege, die ein breit gefächertes Signalnetzwerk bilden. Die Tatsache, dass diese Interaktionen bisher nur in ihren Grundzügen verstanden sind macht es schwer Vorhersagen zu treffen, inwiefern Karzinome unter dem Selektionsdruck einer gezielten Behandlung reagieren und welche Ausweich- bzw. Resistenzmechanismen sich auf eine medikamentöse Behandlung hin bilden<sup>129</sup>.

Beim Einsatz von Inhibitoren der nachgeschalteten Moleküle gilt es bezüglich der zu behandelnden Patientinnen und Patienten eine möglichst präzise Vorauswahl zu treffen, um den größtmöglichen therapeutischen Benefit zu erreichen. Doch auch dabei ist Vorsicht geboten. So zeigte sich in einer retrospektiven Studie von Heuck et al. (2016), die die Auswirkungen einer Behandlung mit dem Mek1/2-Inhibitor Trametinib untersuchte, dass trotz der Vorauswahl von Patientinnen und Patienten nach bekannten onkogenen Mutationen in NRas, KRas und BRAf nur 40% dieser zumindest ein partielles Ansprechen erreichten (bei Kombinationstherapie mit weiteren Wirkstoffen). Darüber

hinaus zeigte sich nur bei 10% ein partielles Ansprechen, wenn sie mit Trametinib als Einzelwirkstoff behandelt wurden<sup>130</sup>.

Daher gilt es eine genaue Identifizierung der Patientinnen und Patienten vorzunehmen, die von einer Hemmung des MAPK-Signalwegs profitieren. In aktuelleren Studien wurden daher nur Erkrankte mit einer BRAf-V600E/K-Mutation eingeschlossen, die in einer Reihe anderer Tumorentitäten bereits ausreichend genau untersucht wurde und einen nachweislich durchgängig aktivierenden Einfluss auf Erk hat. Für diese Mutation sind außerdem bereits mehrere Wirkstoffe, wie Vemurafenib, Encorafenib und Dabrafenib, zur Behandlung anderer Tumoren bei akzeptablem Nebenwirkungsprofil im Einsatz.

Aus der Therapie anderer Tumorerkrankungen mit BRAf-Inhibitoren ist bekannt, dass diese hochwirksam sind, aber es zu einer raschen Resistenzentwicklung kommt (insbesondere, wenn sie als Monotherapie verabreicht werden)<sup>131</sup>. Beim Einsatz von Mek-Inhibitoren wiederum hat sich gezeigt, dass es zu einer Verstärkung anderer Signalwege, wie z.B. des PI3K/Akt-Wegs, kommen kann und sich so eine Therapieresistenz bildet<sup>132</sup>. Die Kombination der beiden Wirkstoffe zur parallelen Inhibition auf zwei Ebenen der Signalkaskade wurde im Melanom bereits praktiziert und zeigte bei dieser Tumorerkrankung gute Ergebnisse<sup>133</sup>. Daher konzentrieren sich aktuelle Studien auch beim Multiplen Myelom auf eine duale Inhibition des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs. In der GMMG-BIRMA-Studie kamen die BRAf- und Mek-Inhibitoren Entrafenib und Binimetinib bei Patientinnen und Patienten mit BRAfV600E- oder BrafV600K-Mutation kombiniert zum Einsatz. Die vorläufigen Studienergebnisse zeigen eine gute Ansprechrate von 82%, wobei 9 von 11 Patientinnen und Patienten mindestens eine partielle Remission erreichten<sup>134</sup>. Darüber hinaus gibt es weitere Studien zur Kombination von MAPK-Signalwegsinhibitoren beim MM, die sich in frühen klinischen Phasen der Erprobung befinden. Eine detaillierte Auflistung dieser Studien findet sich bei John et al. (2021)<sup>135</sup>. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nur wenige MM-Patientinnen und Patienten auf die Hemmung des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs ansprechen, die Hemmung des Signalwegs aber bei einer Untergruppe von Personen vielversprechende Wirkung zeigt. Für die Auswahl der Patientengruppe, die von einer Inhibitortherapie profitiert, gilt es zukünftig verlässliche Therapieprädiktoren zu bestimmen, um den Patientinnen und Patienten die individuell bestmögliche Therapie zu bieten.

Da im MM auch eine vermehrte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs gezeigt werden konnte, wurden auch gegen Moleküle dieses Signalwegs gerichtete Inhibitoren bereits

erprobt. Leider zeigten sich bei Inhibition des PI3K/Akt-Signalwegs bisher keine bahnbrechenden Ergebnisse<sup>135</sup>. Eine kombinierte Blockade des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs und des PI3K/Akt-Signalwegs ist bisher aufgrund zu starker Nebenwirkungen der kombinierten Therapie noch nicht möglich<sup>136</sup>.

Doch auch abseits der MAPK-Signalweg-Blockierung gibt es Entwicklungen in der Therapie des Multiplen Myeloms. Neben der Erprobung und Zulassung neuer Medikamente in bestehenden Wirkstoffklassen, wie z.B. neuer Proteasom-inhibitoren, und der Integration neuer Wirkstoffkombinationen in die Behandlung gibt es momentan auch neuere Wirkstoffklassen die vielversprechende Ergebnisse zeigen und zukünftig möglicherweise regelhaft in der Myelomtherapie Anwendung finden.

Eine Wirkstoffklasse mit welcher bei verschiedenen B-Zell Lymphomen bereits sehr gute Behandlungserfolge erzielt werden konnten sind die chimären Antigenrezeptor-T-Zellen (chimeric antigen receptor T-cells [CAR-T])<sup>137</sup>. Dabei handelt es sich bei der CAR-T-Therapie um patienteneigene T-Zellen, welche entnommen werden und mittels Plasmidtransfektion die Eigenschaft zur Erkennung krebspezifischer Antigene erhalten. Dabei wird mittels Plasmid die genetische Information zur Ausbildung spezifischer chimärer Rezeptoren auf die T-Zellen übertragen, womit nach Reimplantation in die Patientinnen und Patienten eine, gegen die Tumorzellen gerichtete, Immunreaktion ausgelöst wird<sup>138,139</sup>. Aus der Klasse der CAR-T wurde 2021 erstmals ein Wirkstoff für die Anwendung beim Multiplen Myelom in der Rezidivtherapie zugelassen. Es handelt sich dabei um Idecabtagen vicleucel, eine gegen das B-Zell Reifungsantigen (B-cell maturation antigen [BCMA]) gerichtete CAR-T-Therapie<sup>140</sup>.

Ein weiterer aktueller Ansatz ist die Entwicklung sogenannter bispezifischer monoklonaler Antikörper (bispecific monoclonal antibody [BsMAb]). Bei diesen handelt es sich um künstlich hergestellte Hybridantikörper, deren Arme in der Funktion monoklonaler Antikörper an unterschiedliche Zielstrukturen binden und verschiedene Effekte auslösen können. Eine Unterform der BsMAb sind die BiTEs (bispecific T-cell engager), welche mit einem ihrer Arme Oberflächenantigene von T-Zellen erkennen (üblicherweise der CD3-Rezeptor) während mit dem zweiten Arm die Tumorzellen gebunden werden. Durch die Verknüpfung der Tumorzelle mit der T-Zelle und die entstandene räumliche Nähe wird die T-Zelle aktiviert und beginnt mittels zytotoxischer Effekte die Apoptose der Tumorzelle einzuleiten. Während für andere Erkrankungen solche BsMAb bereits zugelassen wurden, befinden sich die Studien bezüglich des Einsatzes von BiTEs beim Multiplen Myelom momentan in frühen klinischen Phasen<sup>141</sup>.

Doch auch abseits dieser innovativen neuen Wirkstoffe, die bezüglich der langfristigen Krankheitskontrolle bei Patientinnen und Patienten mit Multiplem Myelom Hoffnung geben, verfolgt man weiterhin die Suche nach direkten Inhibitoren von mutiertem Ras-Protein. Die strukturellen Gegebenheiten von Ras, mit dem Fehlen einer aktiven Bindungsstelle für kleine Moleküle, erschweren die Suche und das Designen spezifischer Wirkstoffe. Da für eine spezifische Targetierung von mutiertem KRas andere Bindungsstellen gefunden werden müssen, ohne dass die physiologischen Ras-Isoformen vom Wirkstoff angegriffen werden dürfen, macht dies die Entwicklung eines spezifisch agierenden Wirkstoffs zu einer Herausforderung<sup>83,142</sup>. Doch trotz all dieser Hürden gibt es Hoffnung bei der Entwicklung von KRas-spezifischen Wirkstoffen. So konnte mit AMG-510 (Sotorasib) erstmals ein Wirkstoff gefunden werden, der spezifisch eine KRas-Mutation adressiert<sup>143</sup>.

Es handelt sich hierbei um die Exon 2-Mutation im Codon 12 von Guanin zu Cystein, welche durch den Wirkstoff kovalent gebunden wird. Somit können spezifisch Zellen erreicht werden, welche diese mit 11-14% häufigste in NSCLC-Patientinnen und Patienten auftretende KRas-Mutation enthalten<sup>144,145</sup>. Der Wirkstoff wurde 2021 in den ersten Ländern und im Januar 2022 in der europäischen Union für den klinischen Einsatz als Monotherapie bei Erwachsenen nach Progression unter vorangegangener systemischer Therapie bei NSCLC zugelassen<sup>146</sup>.

Durch die G12C Mutation können Sotorasib oder auch andere in der klinischen Erprobung befindliche Wirkstoffe gegen diese Mutation KRas kovalent binden und inaktivieren. Andere Mutationen von KRas bieten diesen strukturellen Angriffspunkt für eine kovalente Bindung nicht, was die Entwicklung von spezifisch agierenden Wirkstoffen verkompliziert. Aktuell befindet sich ein selektiver Inhibitor von KRas G12D in der präklinischen Testung. Der Inhibitor MRTX1133 bindet nichtkovalent an G12D-mutiertes KRas und war *in vitro* dazu in der Lage die intrazelluläre Signalaktivität zu unterdrücken. Außerdem konnte in einem *in vivo* Mausmodell seine antitumorale Wirkung gezeigt werden<sup>147</sup>. Inwieweit sich MRTX1133 oder darauf aufbauende Derivate für den klinischen Einsatz an Patientinnen und Patienten eignen, wird sich in den anschließenden klinischen Studien zeigen.

Die durchgeführten funktionellen Analysen lassen vermuten, dass sowohl die Exon 2-Mutation als auch die beiden Exon 4-Mutationen durch die Aktivierung von Überlebenssignalen eine wichtige Rolle im Überleben der Myelomzellen spielen. Letztlich kann jedoch auch mit Hilfe der durchgeführten Analysen keine exakte

Vorhersage getroffen werden, welche genaue Bedeutung die spezifischen Mutationen von KRas für die Entwicklung des Multiplen Myeloms bei Patientinnen und Patienten haben. Aufgrund hoher zu beobachtender Allelfrequenzen sowohl für die Exon 2-Mutationen des Codons 12 als auch für die von Codon 146 in Exon 4 in Myelompatientinnen und -patienten kann vermutet werden, dass beide Mutationsorte für die Entwicklung klonaler Dominanz wichtig sind und als Driver-Mutationen fungieren können<sup>93</sup>. Aus diesem Grund und aufgrund der funktionellen, aktivierenden Aspekte, welche für KRas<sup>p.G12D</sup> und die selten auftretenden Varianten KRas<sup>p.A146T</sup> und KRas<sup>p.A146V</sup> gefunden wurden, scheint es wichtig diese Mutationen in der Tumorgenetik der Myelompatientinnen und -patienten vollständig zu berücksichtigen. Darüber hinaus sollten Patientinnen und Patienten mit entsprechenden Mutationen in eine zielgerichtete, inhibierende Therapie des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs miteinbezogen werden, sobald diese zur Verfügung steht.



### 5 Zusammenfassung

Das Multiple Myelom (MM) ist eine seltene, maligne Störung der Plasmazellen, welche trotz gehöriger Therapiefortschritte in den letzten Jahrzehnten nach wie vor als unheilbare Erkrankung betrachtet werden muss. Obwohl eine sehr große intra- und interindividuelle Heterogenität beim Multiplen Myelom beobachtet werden kann, gibt es verschiedene Mutationen, die mit höherer Frequenz in Myelompatientinnen und -patienten gefunden werden. Eines dieser häufiger betroffenen Proteine ist KRas mit Mutationen in etwa 20% der Fälle. Da die Ras-Proteine und somit auch ihre Isoform KRas zu Beginn der Ras/Raf/Mek/Erk-Signalkaskade stehen und dementsprechend einen großen Einfluss auf die Übermittlung von Wachstums- und Überlebenssignalen in Zellen besitzen, ist eine nähere funktionelle Analyse verschiedener KRas-Mutationen von großer Relevanz. Während für einige Mutationen von KRas bereits funktionelle Analysen existieren, wurden die häufig auftretende Exon 2-Mutation KRas<sup>p.G12A</sup>, sowie die beiden seltenen Exon 4-Mutationen KRas<sup>p.A146T</sup> und KRas<sup>p.A146V</sup> bisher in ihrer funktionellen Rolle im MM noch nicht näher charakterisiert. Um die funktionellen Aspekte dieser genannten Mutationen von KRas näher zu untersuchen, kamen im Rahmen meiner Versuchsreihe *Sleeping Beauty* Transposon System basierte Expressionsvektoren zur transienten und dauerhaften Proteinexpression in verschiedenen Myelomzelllinien zum Einsatz. Durch Transfektion dieser Plasmide in die KRas-Wildtyp tragenden Zellen mit nachfolgender Transposition in die genomische DNA konnte gezielt die Überexpression der verschiedenen Mutationen realisiert werden.

So konnte durch die funktionelle Proteinauslese mittels der Anfertigung von Western Blots gezeigt werden, dass jede der drei getesteten Mutationen zu einer verstärkten Phosphorylierung und damit Aktivierung von KRas-nachgeschalteten Proteinen wie z.B. Erk führt. Zusätzlich wurde für die KRas-Mutationen auch ein aktivierender Effekt auf den PI3K/Akt-Signalweg anhand einer erhöhten Phosphorylierung des Proteins Akt nachgewiesen.

Ebenso wie andere bereits besser charakterisierte KRas-Mutationen haben demnach auch die getesteten KRas-Mutationen KRas<sup>p.G12A</sup>, KRas<sup>p.A146T</sup> und KRas<sup>p.A146V</sup> einen positiven Einfluss auf die intrazellulären Überlebenssignale und könnten daher eine elementare Rolle in der Entwicklung des Multiplen Myeloms bei Patientinnen und Patienten spielen. Es gilt daher, die drei in dieser Arbeit untersuchten KRas-Mutationen, zukünftig in die Wirkstoffsuche KRas-spezifischer Therapeutika miteinzubeziehen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood* 2008; 111(6): 2962-72.
2. Wörmann B, Driessen C, Einsele H, et al. Multiples Myelom. 2018. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/multiples-myelom/@@guideline/html/index.html> (accessed 21.04.20).
3. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014; 15(12): e538-48.
4. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Tabellen zum GEKID-Atlas. 2020. <https://atlas.gekid.de/CurrentVersion/atlas.html> (accessed 21.04.2020).
5. Landgren O, Gridley G, Turesson I, et al. Risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African American and white veterans in the United States. *Blood* 2006; 107(3): 904-6.
6. Buadi F, Hsing AW, Katzmann JA, et al. High prevalence of polyclonal hypergamma-globulinemia in adult males in Ghana, Africa. *Am J Hematol* 2011; 86(7): 554-8.
7. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009; 113(22): 5412-7.
8. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006; 354(13): 1362-9.
9. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002; 346(8): 564-9.
10. Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2005; 106(3): 812-7.
11. Anguille S, Bryant C. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Cmaj* 2013; 185(15): 1345.
12. Rajkumar SV. Preventive strategies in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Am J Hematol* 2012; 87(5): 453-4.
13. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007; 356(25): 2582-90.
14. Perez-Persona E, Mateo G, Garcia-Sanz R, et al. Risk of progression in smoldering myeloma and monoclonal gammopathies of unknown significance: comparative analysis of the evolution of monoclonal component and multiparameter flow cytometry of bone marrow plasma cells. *Br J Haematol* 2010; 148(1): 110-4.
15. Larsen JT, Kumar SK, Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Rajkumar SV. Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia* 2013; 27(4): 941-6.
16. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer* 2012; 12(5): 335-48.
17. Abe M, Hiura K, Wilde J, et al. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood* 2002; 100(6): 2195-202.
18. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2003; 78(1): 21-33.
19. The International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003; 121(5): 749-57.

20. Regelink JC, Minnema MC, Terpos E, et al. Comparison of modern and conventional imaging techniques in establishing multiple myeloma-related bone disease: a systematic review. *Br J Haematol* 2013; 162(1): 50-61.
21. Dimopoulos MA, Hillengass J, Usmani S, et al. Role of magnetic resonance imaging in the management of patients with multiple myeloma: a consensus statement. *J Clin Oncol* 2015; 33(6): 657-64.
22. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008; 111(5): 2516-20.
23. Anderson KC. The 39th David A. Karnofsky Lecture: bench-to-bedside translation of targeted therapies in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2012; 30(4): 445-52.
24. Greipp PR, Miguel JS, Durie BG, et al. International staging system for multiple myeloma. *Journal of clinical oncology* 2005; 23(15): 3412-20.
25. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975; 36(3): 842-54.
26. Bataille R, Durie BG, Grenier J, Sany J. Prognostic factors and staging in multiple myeloma: a reappraisal. *Journal of Clinical Oncology* 1986; 4(1): 80-7.
27. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* 2015; 33(26): 2863-9.
28. Barlogie B, Mitchell A, van Rhee F, Epstein J, Morgan GJ, Crowley J. Curing myeloma at last: defining criteria and providing the evidence. *Blood* 2014; 124(20): 3043-51.
29. San-Miguel JF, Mateos MV. Can multiple myeloma become a curable disease? *Haematologica* 2011; 96(9): 1246-8.
30. Barlogie B, Jagannath S, Vesole DH, et al. Superiority of tandem autologous transplantation over standard therapy for previously untreated multiple myeloma. *Blood* 1997; 89(3): 789-93.
31. Gay F, Oliva S, Petrucci MT, et al. Chemotherapy plus lenalidomide versus autologous transplantation, followed by lenalidomide plus prednisone versus lenalidomide maintenance, in patients with multiple myeloma: a randomised, multicentre, phase 3 trial. *The lancet oncology* 2015; 16(16): 1617-29.
32. Palumbo A, Cavallo F, Gay F, et al. Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. *New England Journal of Medicine* 2014; 371(10): 895-905.
33. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, et al. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone with transplantation for myeloma. *New England Journal of Medicine* 2017; 376(14): 1311-20.
34. Cavo M, Gay FM, Patriarca F, et al. Double autologous stem cell transplantation significantly prolongs progression-free survival and overall survival in comparison with single autotransplantation in newly diagnosed multiple myeloma: an analysis of phase 3 EMN02/HO95 study. *Blood* 2017; 130(Suppl 1): 401.
35. Muchtar E, Dingli D, Kumar S, et al. Autologous stem cell transplant for multiple myeloma patients 70 years or older. *Bone marrow transplantation* 2016; 51(11): 1449-55.
36. Mateos MV, San Miguel JF. Management of multiple myeloma in the newly diagnosed patient. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2017; 2017(1): 498-507.
37. Merz M, Jansen L, Castro FA, et al. Survival of elderly patients with multiple myeloma—Effect of upfront autologous stem cell transplantation. *European Journal of Cancer* 2016; 62: 1-8.
38. Straka C, Liebisch P, Salwender H, et al. Autotransplant with and without induction chemotherapy in older multiple myeloma patients: long-term outcome of a randomized trial. *Haematologica* 2016; 101(11): 1398-406.
39. Moreau P. How I treat myeloma with new agents. *Blood* 2017; 130(13): 1507-13.

40. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2017; 28(suppl\_4): iv52-iv61.
41. Giralt S. 200 mg/m<sup>2</sup> melphalan—the gold standard for multiple myeloma. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2010; 7(9): 490-1.
42. Mai EK, Benner A, Bertsch U, et al. Single versus tandem high-dose melphalan followed by autologous blood stem cell transplantation in multiple myeloma: long-term results from the phase III GMMG-HD2 trial. *British Journal of Haematology* 2016; 173(5): 731-41.
43. Auner HW, Iacobelli S, Sbianchi G, et al. Melphalan 140 mg/m<sup>2</sup> or 200 mg/m<sup>2</sup> for autologous transplantation in myeloma: results from the Collaboration to Collect Autologous Transplant Outcomes in Lymphoma and Myeloma (CALM) study. A report by the EBMT Chronic Malignancies Working Party. *haematologica* 2018; 103(3): 514-21.
44. Qazilbash MH, Bashir Q, Thall PF, Milton DR, Shah N, Patel KK. A randomized phase III trial of busulfan+ melphalan vs melphalan alone for multiple myeloma. *Blood* 2017; 130(Suppl 1): 399.
45. Sonneveld P, Beksac M, van der Holt B, et al. Consolidation Followed By Maintenance Therapy Versus Maintenance Alone in Newly Diagnosed, Transplant Eligible Patients with Multiple Myeloma (MM): A Randomized Phase 3 Study of the European Myeloma Network (EMN02/HO95 MM Trial). *Blood* 2016; 128(22): 242-.
46. Stadtmauer EA, Pasquini MC, Blackwell B, et al. Comparison of Autologous Hematopoietic Cell Transplant (autoHCT), Bortezomib, Lenalidomide (Len) and Dexamethasone (RVD) Consolidation with Len Maintenance (ACM), Tandem Autohct with Len Maintenance (TAM) and Autohct with Len Maintenance (AM) for up-Front Treatment of Patients with Multiple Myeloma (MM): Primary Results from the Randomized Phase III Trial of the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN 0702 - StaMINA Trial). *Blood* 2016; 128(22): LBA-1-LBA-.
47. McCarthy PL, Holstein SA, Petrucci MT, et al. Lenalidomide Maintenance After Autologous Stem-Cell Transplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Meta-Analysis. *Journal of Clinical Oncology* 2017; 35(29): 3279-89.
48. Goldschmidt H, Lokhorst HM, Mai EK, et al. Bortezomib before and after high-dose therapy in myeloma: long-term results from the phase III HOVON-65/GMMG-HD4 trial. *Leukemia* 2018; 32(2): 383-90.
49. Jackson G, Davies FE, Pawlyn C, et al. Lenalidomide maintenance significantly improves outcomes compared to observation irrespective of cytogenetic risk: results of the myeloma XI trial. *Blood* 2017; 130(Supplement 1): 436-.
50. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, et al. Bortezomib plus Melphalan and Prednisone for Initial Treatment of Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine* 2008; 359(9): 906-17.
51. Benboubker L, Dimopoulos MA, Dispenzieri A, et al. Lenalidomide and Dexamethasone in Transplant-Ineligible Patients with Myeloma. *New England Journal of Medicine* 2014; 371(10): 906-17.
52. Durie BG, Hoering A, Abidi MH, et al. Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet* 2017; 389(10068): 519-27.
53. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302(5909): 575-81.
54. Nussenzweig MC. Immune receptor editing: revise and select. *Cell* 1998; 95(7): 875-8.

55. Wilson PC, Bouteiller Od, Liu Y-J, et al. Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *The Journal of experimental medicine* 1998; 187(1): 59-70.
56. Goossens T, Klein U, Küppers R. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; 95(5): 2463-8.
57. Liu Y-J, Arpin C, de Bouteiller O, et al. Sequential triggering of apoptosis, somatic mutation and isotype switch during germinal center development. *Seminars in Immunology* 1996; 8(3): 169-77.
58. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2011; 364(11): 1046-60.
59. Anderson K, Lutz C, Van Delft FW, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* 2011; 469(7330): 356-61.
60. González D, van der Burg M, García-Sanz R, et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2007; 110(9): 3112-21.
61. Chesi M, Bergsagel PL. Advances in the pathogenesis and diagnosis of multiple myeloma. *International journal of laboratory hematology* 2015; 37: 108-14.
62. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy Jr J. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 2005; 106(1): 296-303.
63. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 2011; 471(7339): 467-72.
64. Chesi M, Matthews GM, Garbitt VM, et al. Drug response in a genetically engineered mouse model of multiple myeloma is predictive of clinical efficacy. *Blood* 2012; 120(2): 376-85.
65. Boyd KD, Ross FM, Walker BA, et al. Mapping of chromosome 1p deletions in myeloma identifies FAM46C at 1p12 and CDKN2C at 1p32. 3 as being genes in regions associated with adverse survival. *Clinical cancer research* 2011; 17(24): 7776-84.
66. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; 351 Pt 2: 289-305.
67. Orton RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V, Calder M, Gilbert DR, Kolch W. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem J* 2005; 392(Pt 2): 249-61.
68. McCormick F. Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature* 1993; 363(6424): 15-6.
69. Moodie SA, Wolfman A. The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends Genet* 1994; 10(2): 44-8.
70. Yung Y, Dolginov Y, Yao Z, et al. Detection of ERK activation by a novel monoclonal antibody. *FEBS Lett* 1997; 408(3): 292-6.
71. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 1998; 74: 49-139.
72. Davie JR, Spencer VA. Signal transduction pathways and the modification of chromatin structure. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001; 65: 299-340.
73. Mansour SJ, Resing KA, Candi JM, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphorylation of MAP kinase kinase: determination of phosphorylation sites by mass spectrometry and site-directed mutagenesis. *J Biochem* 1994; 116(2): 304-14.
74. Castellano E, Downward J. Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010; 346: 143-69.
75. Castellano E, Downward J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer* 2011; 2(3): 261-74.

76. Ehrhardt A, Ehrhardt GR, Guo X, Schrader JW. Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together. *Exp Hematol* 2002; 30(10): 1089-106.
77. Vakiani E, Solit DB. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *The Journal of pathology* 2011; 223(2): 220-30.
78. Jančík S, Drábek J, Radzioch D, Hajdúch M. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *BioMed Research International* 2010; 2010.
79. Repasky GA, Chenette EJ, Der CJ. Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends in cell biology* 2004; 14(11): 639-47.
80. Cox AD, Der CJ. Ras history: The saga continues. *Small GTPases* 2010; 1(1): 2-27.
81. Steinbrunn T, Stühmer T, Gattenlöhner S, et al. Mutated RAS and constitutively activated Akt delineate distinct oncogenic pathways, which independently contribute to multiple myeloma cell survival. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2011; 117(6): 1998-2004.
82. Mulligan G, Lichter DI, Di Bacco A, et al. Mutation of NRAS but not KRAS significantly reduces myeloma sensitivity to single-agent bortezomib therapy. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2014; 123(5): 632-9.
83. McCormick F. Progress in targeting RAS with small molecule drugs. *Biochemical Journal* 2019; 476(2): 365-74.
84. Leich E, Steinbrunn T. RAS mutations - for better or for worse in multiple myeloma? *Leuk Lymphoma* 2016; 57(1): 8-9.
85. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nature Communications* 2014; 5(1): 2997.
86. Lohr Jens G, Stojanov P, Carter Scott L, et al. Widespread Genetic Heterogeneity in Multiple Myeloma: Implications for Targeted Therapy. *Cancer Cell* 2014; 25(1): 91-101.
87. Melchor L, Brioli A, Wardell CP, et al. Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia* 2014; 28(8): 1705-15.
88. Walker BA, Wardell CP, Melchor L, et al. Intracлонаl heterogeneity and distinct molecular mechanisms characterize the development of t(4;14) and t(11;14) myeloma. *Blood* 2012; 120(5): 1077-86.
89. Stephen AG, Esposito D, Bagni RK, McCormick F. Dragging ras back in the ring. *Cancer cell* 2014; 25(3): 272-81.
90. Milburn M, Tong L, deVos A, et al. Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 1990; 247(4945): 939-45.
91. Janakiraman M, Vakiani E, Zeng Z, et al. Genomic and biological characterization of exon 4 KRAS mutations in human cancer. *Cancer research* 2010; 70(14): 5901-11.
92. Feig LA, Cooper GM. Relationship among guanine nucleotide exchange, GTP hydrolysis, and transforming potential of mutated ras proteins. *Molecular and cellular biology* 1988; 8(6): 2472-8.
93. Weissbach S, Heredia-Guerrero SC, Barnsteiner S, et al. Exon-4 Mutations in KRAS Affect MEK/ERK and PI3K/AKT Signaling in Human Multiple Myeloma Cell Lines. *Cancers* 2020; 12(2).
94. Drexler HG, Matsuo Y. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Leuk Res* 2000; 24(8): 681-703.
95. Steinbrunn T, Chatterjee M, Bargou RC, Stuhmer T. Efficient transient transfection of human multiple myeloma cells by electroporation--an appraisal. *PLoS One* 2014; 9(6): e97443.
96. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology* 1997; 21(1): A.3B.1-A.3B.2.

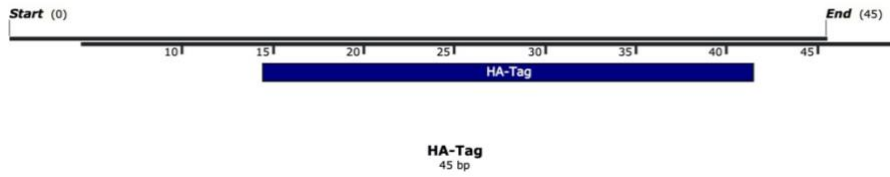
97. Zhao H, Dreses-Werringloer U, Davies P, Marambaud P. Amyloid-beta peptide degradation in cell cultures by mycoplasma contaminants. *BMC Res Notes* 2008; 1: 38-.
98. Uphoff CC, Drexler HG. Detecting mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* 2011; 731: 93-103.
99. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum* 1972; 43(3): 404-9.
100. Hudson B, Upholt WB, Devanny J, Vinograd J. The use of an ethidium analogue in the dye-buoyant density procedure for the isolation of closed circular DNA: the variation of the superhelix density of mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969; 62(3): 813-20.
101. Geisow MJ. Common domain structure of Ca<sup>2+</sup> and lipid-binding proteins. *FEBS Letters* 1986; 203(1): 99-103.
102. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 1962; 59: 223-39.
103. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(7): 3116-20.
104. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-5.
105. Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvak Z. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* 1997; 91(4): 501-10.
106. Antibody N. Sleeping Beauty Transposon System User Manual. 2015. <https://www.neuromics.com/itrium/reference/D8xc31ex8x1/User%20Manual.pdf> (accessed 27.05.2020).
107. Izsvak Z, Chuah MK, Vandendriessche T, Ivics Z. Efficient stable gene transfer into human cells by the Sleeping Beauty transposon vectors. *Methods* 2009; 49(3): 287-97.
108. MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG. PCR clean-up Gel extraction. 2017. [https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/NucleoSpin%20Gel%20and%20PCR%20Clean-up%20User%20Manual\\_Rev\\_04.pdf](https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/NucleoSpin%20Gel%20and%20PCR%20Clean-up%20User%20Manual_Rev_04.pdf) (accessed 24.05.2020).
109. QIAGEN. RNeasy® Mini Handbook. 2019. <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en> (accessed 20.04.2020).
110. MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG. Plasmid DNA purification. 2014. [https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/NucleoBond%20Xtra%20Plasmid%20DNA%20Purification%20User%20Manual%20\(PT4011-1\)\\_Rev\\_12.pdf](https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/NucleoBond%20Xtra%20Plasmid%20DNA%20Purification%20User%20Manual%20(PT4011-1)_Rev_12.pdf) (accessed 19.04.2020).
111. Jun-ichi M, Satoshi T, Kimi A, et al. Expression vector system based on the chicken  $\beta$ -actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene* 1989; 79(2): 269-77.
112. Mazumder B, Seshadri V, Fox PL. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends in Biochemical Sciences* 2003; 28(2): 91-8.
113. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal* 1996; 15(23): 6541-51.
114. Cicenas J, Zalyte E, Bairoch A, Gaudet P. Kinases and Cancer. *Cancers* 2018; 10(3): 63.
115. Hunter T, Cooper JA. PROTEIN-TYROSINE KINASES. *Annual Review of Biochemistry* 1985; 54(1): 897-930.

116. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *New England Journal of Medicine* 2011; 364(26): 2507-16.
117. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2001; 344(14): 1031-7.
118. Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol* 2012; 13(10): 1011-9.
119. Rowley JD. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature* 1973; 243(5405): 290-3.
120. Rasche L, Chavan SS, Stephens OW, et al. Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. *Nat Commun* 2017; 8(1): 268.
121. Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, et al. Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma. *Blood* 2018; 132(6): 587-97.
122. Xu J, Pfarr N, Endris V, et al. Molecular signaling in multiple myeloma: association of RAS/RAF mutations and MEK/ERK pathway activation. *Oncogenesis* 2017; 6(5): e337-e.
123. Chng WJ, Gonzalez-Paz N, Price-Troska T, et al. Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia* 2008; 22(12): 2280-4.
124. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular Pathogenesis and a Consequent Classification of Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23(26): 6333-8.
125. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, et al. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol* 2015; 33(33): 3911-20.
126. Santiago B, Umair M, Yuan Xiao Z, et al. IKZF1/3 and CRL4CRBN E3 ubiquitin ligase mutations and resistance to immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Haematologica* 2020; 105(5): e237-e41.
127. Hyun T, Yam A, Pece S, et al. Loss of PTEN expression leading to high Akt activation in human multiple myelomas. *Blood* 2000; 96(10): 3560-8.
128. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 2010; 464(7287): 431-5.
129. Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell* 2017; 170(1): 17-33.
130. Heuck CJ, Jethava Y, Khan R, et al. Inhibiting MEK in MAPK pathway-activated myeloma. *Leukemia* 2016; 30(4): 976-80.
131. Johnson DB, Menzies AM, Zimmer L, et al. Acquired BRAF inhibitor resistance: A multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms. *European Journal of Cancer* 2015; 51(18): 2792-9.
132. Turke AB, Song Y, Costa C, et al. MEK Inhibition Leads to PI3K/AKT Activation by Relieving a Negative Feedback on ERBB Receptors. *Cancer Research* 2012; 72(13): 3228-37.
133. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, et al. Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. *New England Journal of Medicine* 2014; 371(20): 1877-88.
134. Raab MS, Giesen N, Scheid C, et al. Safety and Preliminary Efficacy Results from a Phase II Study Evaluating Combined BRAF and MEK Inhibition in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (rrMM) Patients with Activating BRAF V600E Mutations: The GMMG-Birma Trial. *Blood* 2020; 136(Supplement 1): 44-5.

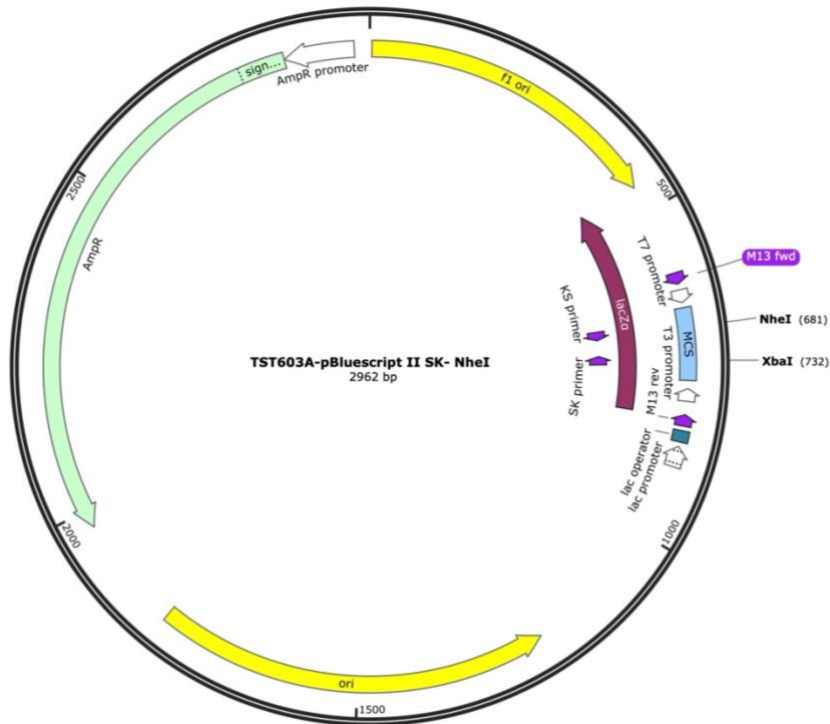


135. John L, Krauth MT, Podar K, Raab MS. Pathway-Directed Therapy in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)* 2021; 13(7).
136. Tolcher AW, Patnaik A, Papadopoulos KP, et al. Phase I study of the MEK inhibitor trametinib in combination with the AKT inhibitor afuresertib in patients with solid tumors and multiple myeloma. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2015; 75(1): 183-9.
137. Brudno JN, Kochenderfer JN. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for lymphoma. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2018; 15(1): 31-46.
138. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The Basic Principles of Chimeric Antigen Receptor Design. *Cancer Discovery* 2013; 3(4): 388-98.
139. Kochenderfer JN, Rosenberg SA. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2013; 10(5): 267-76.
140. Munshi NC, Anderson LD, Shah N, et al. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine* 2021; 384(8): 705-16.
141. Caraccio C, Krishna S, Phillips DJ, Schürch CM. Bispecific Antibodies for Multiple Myeloma: A Review of Targets, Drugs, Clinical Trials, and Future Directions. *Front Immunol* 2020; 11: 501.
142. McGregor LM, Jenkins ML, Kerwin C, Burke JE, Shokat KM. Expanding the scope of electrophiles capable of targeting K-Ras oncogenes. *Biochemistry* 2017; 56(25): 3178-83.
143. Canon J, Rex K, Saiki AY, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature* 2019; 575(7781): 217-23.
144. Zuberi M, Khan I, O'Bryan JP. Inhibition of RAS: proven and potential vulnerabilities. *Biochem Soc Trans* 2020; 48(5): 1831-41.
145. Biernacka A, Tsongalis PD, Peterson JD, et al. The potential utility of re-mining results of somatic mutation testing: KRAS status in lung adenocarcinoma. *Cancer Genet* 2016; 209(5): 195-8.
146. AMGen. EUROPEAN COMMISSION APPROVES LUMYKRAS® (SOTORASIB) FOR PATIENTS WITH KRAS G12C-MUTATED ADVANCED NON-SMALL CELL LUNG CANCER. 2022. <https://www.amgen.com/newsroom/press-releases/2022/01/european-commission-approves-lumykras-sotorasib-for-patients-with-kras-g12cmutated-advanced-nonsmall-cell-lung-cancer> (accessed 31.01.2022).
147. Wang X, Allen S, Blake JF, et al. Identification of MRTX1133, a Noncovalent, Potent, and Selective KRAS(G12D) Inhibitor. *J Med Chem* 2021.

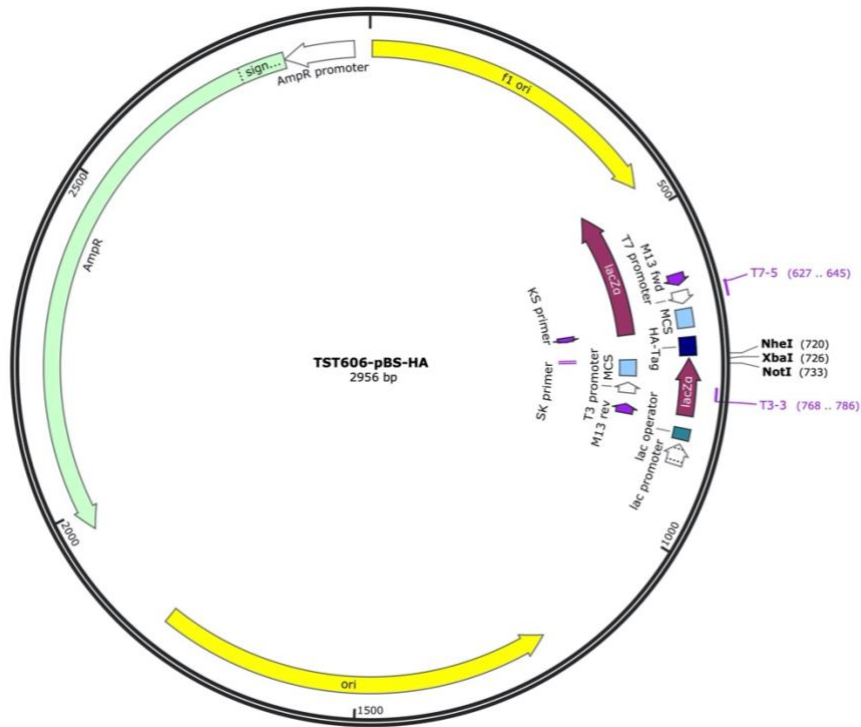
Appendix



**Abbildung 22:** Vektorkarte der Zusammengelagerten Oligonukleotide des HA-Tags.  
 Abkürzungen: HA = Hämagglutinin. Die Oligonukleotide wurden mittels der NheI und XbaI komplementären Überhänge in einem nächsten Schritt in den geschnittenen TST-603A-pBluescript II SK-NheI-Vektor eingefügt. Sämtliche Vektorkarten wurden mit SnapGene erstellt.

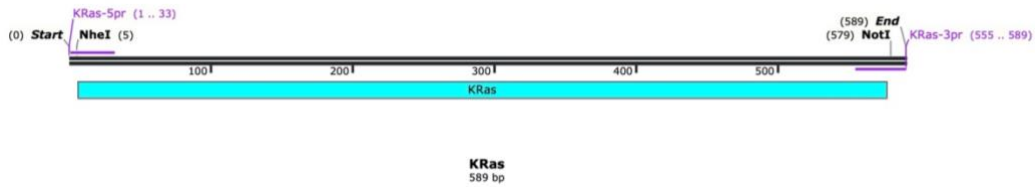


**Abbildung 23:** TST603A-pBluescript II SK-NheI.  
 Abkürzungen: MCS = Multiple Cloning Site (Mehrfachklonierungsstelle). Die Multiple Cloning Site dieses Vektors wurde verwendet, um den HA-Tag über NheI und XbaI in den Vektor zu klonieren und anschließend an KRas zu koppeln.



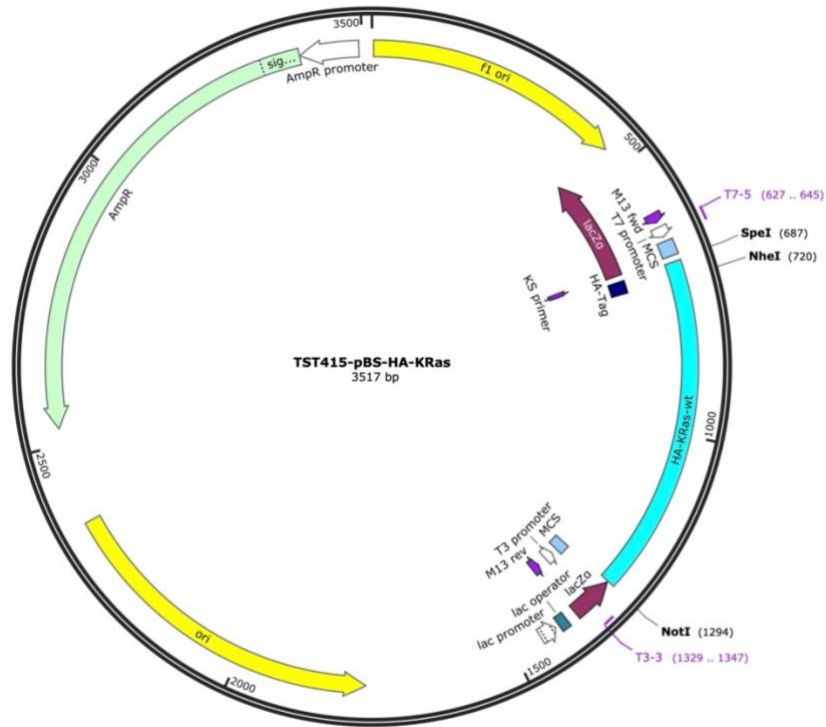
**Abbildung 24:** TST606-pBS-HA.

Abkürzungen: HA = Hämagglutinin, MCS = Multiple Cloning Site (Mehrfachklonierungsstelle). In den ursprünglichen TST-603A pBluescript II SK-NheI-Vektor wurde der HA-Tag eingefügt. In einem nächsten Schritt wurde mittels NheI und NotI (unter Verlust der XbaI-Schnittstelle) KRas leserastergerecht an den HA-Tag gekoppelt.



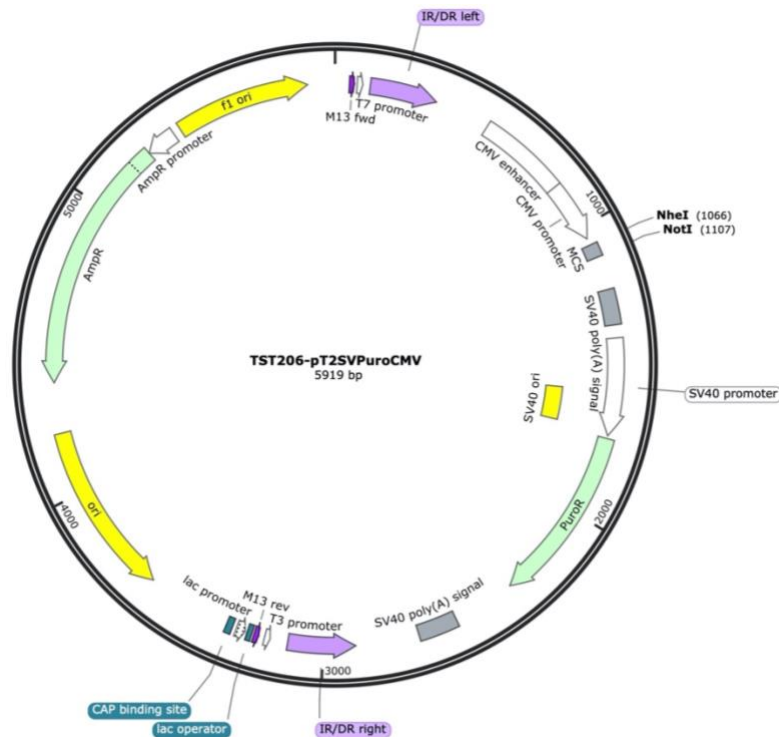
**Abbildung 25:** Vektorkarte des KRas-Gens.

Abkürzungen: KRas = Kirsten Rat sarcoma 2 viral oncogene homolog. Zunächst wurde die DNA-mittels PCR unter Verwendung der eingezeichneten Primer amplifiziert und anschließend unter Verwendung der NheI und NotI Schnittstellen in den TST-606-pBS-HA-Vektor eingefügt.



**Abbildung 26:** TST415-pBS-HA-KRas.

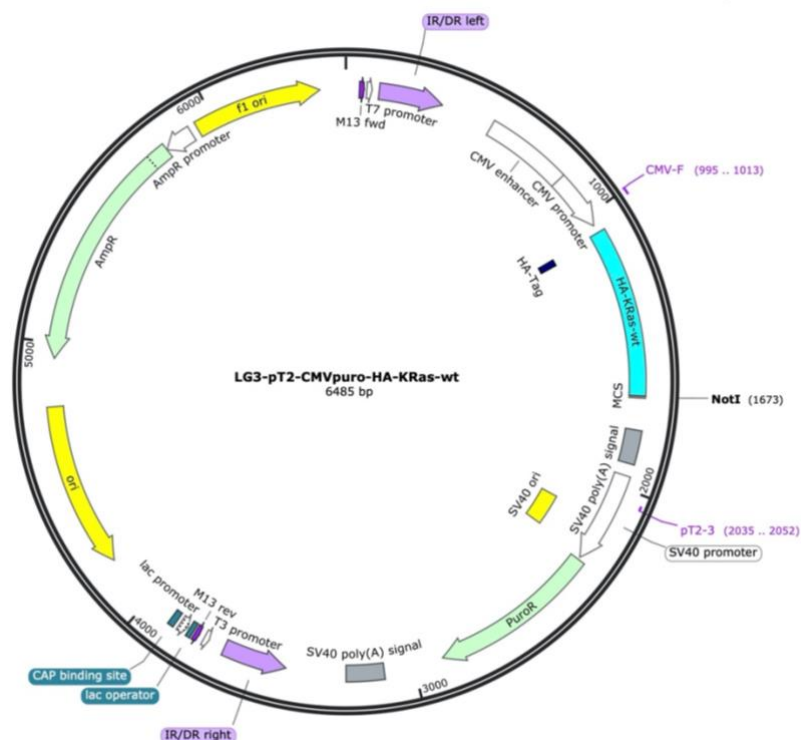
Abkürzungen: HA = Hämagglutinin, MCS = Multiple Cloning Site (Mehrfachklonierungsstelle), KRas = Kirsten Rat sarcoma 2 viral oncogene homolog. Mit Hilfe der vorangegangenen Klonierung konnte das KRas-Gen mit der Sequenz des HA-Tags gekoppelt werden. Im letzten Schritt der Klonierung wurde über die Restriktionsenzyme SpeI und NotI das HA-KRas-Gen in den verwendeten Sleeping Beauty Expressionsvektor (mit CMV- oder CAG-Promotor) integriert.



**Abbildung 27:** TST206-pT2SVPuroCMV.

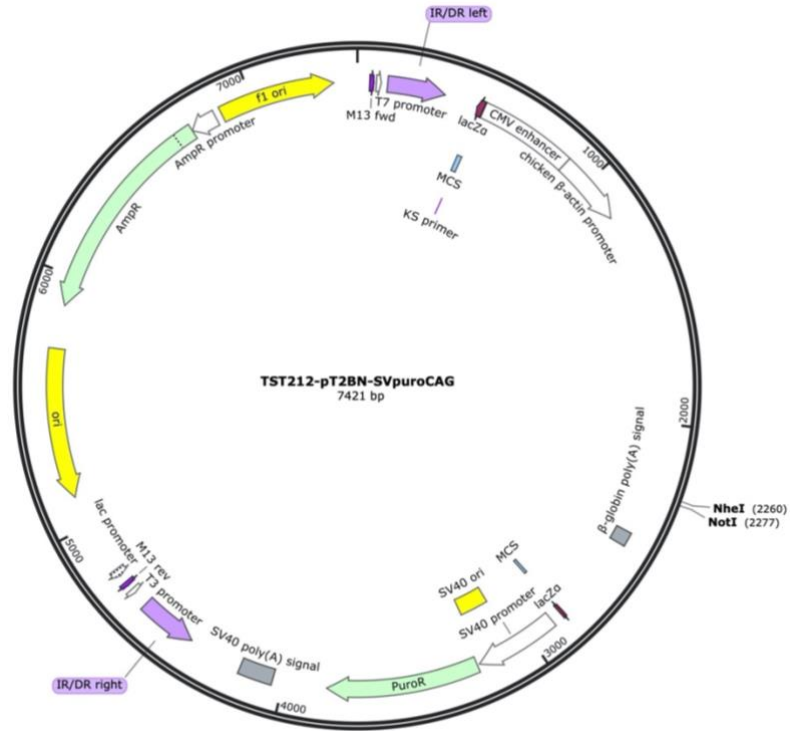
## Appendix

Abkürzungen: MCS = Multiple Cloning Site (Mehrfachklonierungsstelle). In diesen Vektor wurde das HA-markierte KRas über NheI und NotI eingefügt, um das Proteinexpressionsplasmid in Myelomzellen zu verwenden.



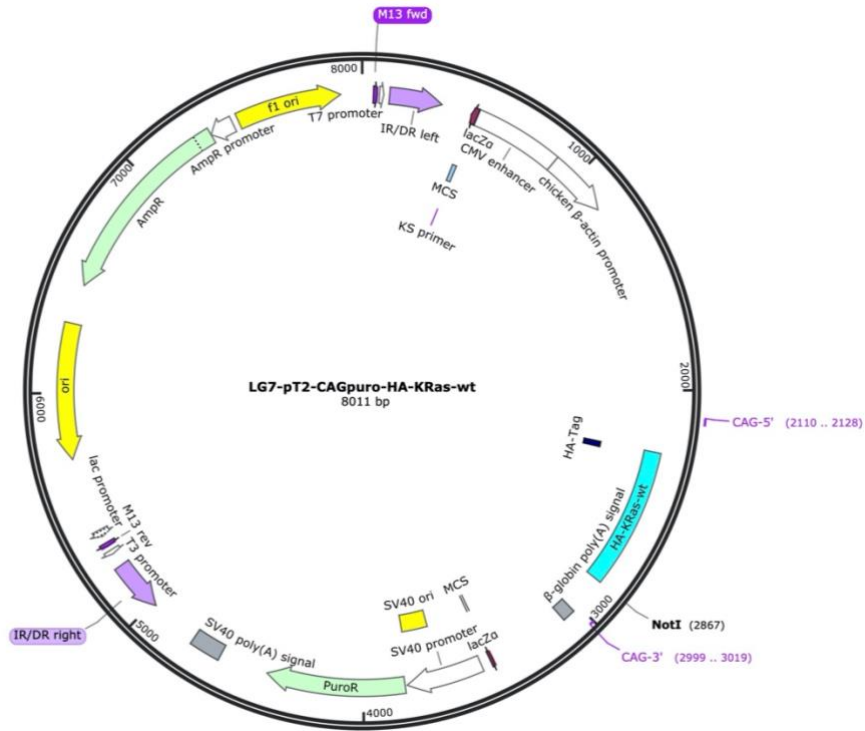
**Abbildung 28:** LG3-pT2-CMVpuro-HA-KRas-wt.

Abkürzungen: HA = Hämagglutinin, MCS = Multiple Cloning Site (Mehrfachklonierungsstelle), KRas = Kirsten Rat sarcoma 2 viral oncogene homolog. Die Abbildung zeigt einen Vektor zur Proteinexpression in Myelomzellen, welcher das HA-getaggte KRas-Gen trägt. Reguliert wird die Expression durch den enthaltenen CMV-Promotor. Da jedoch die Expression unter diesem Promotor geringer ausfiel als mit dem CAG-Promotor, kam der Vektor nicht bevorzugt zum Einsatz.



**Abbildung 29:** TST212-pT2BN-SVpuroCAG.

Abkürzungen: MCS = Multiple Cloning Site (Mehrfachklonierungsstelle). Dieses Plasmid diente nach Integration von HA-KRas über NheI und NotI im Rahmen der weiteren Versuche der Proteinexpression in Myelomzellen. Zusätzlich zur verwendeten Klonierungsstelle enthält der Vektor auch die Sequenz für den CAG-Promotor.

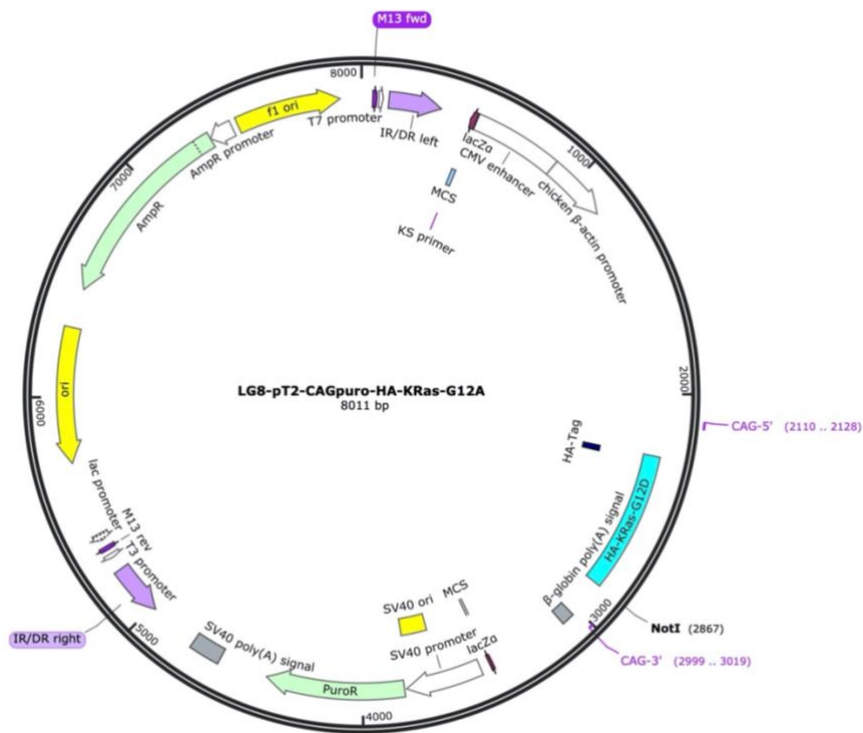


**Abbildung 30:** LG7-pT2-CAGpuro-HA-KRas-wt.

Abkürzungen: HA = Hämagglutinin, MCS = Multiple Cloning Site (Mehrfachklonierungsstelle), KRas = Kirsten Rat sarcoma 2 viral oncogene homolog. Dieses Proteinexpressionsplasmid beinhaltet das an die

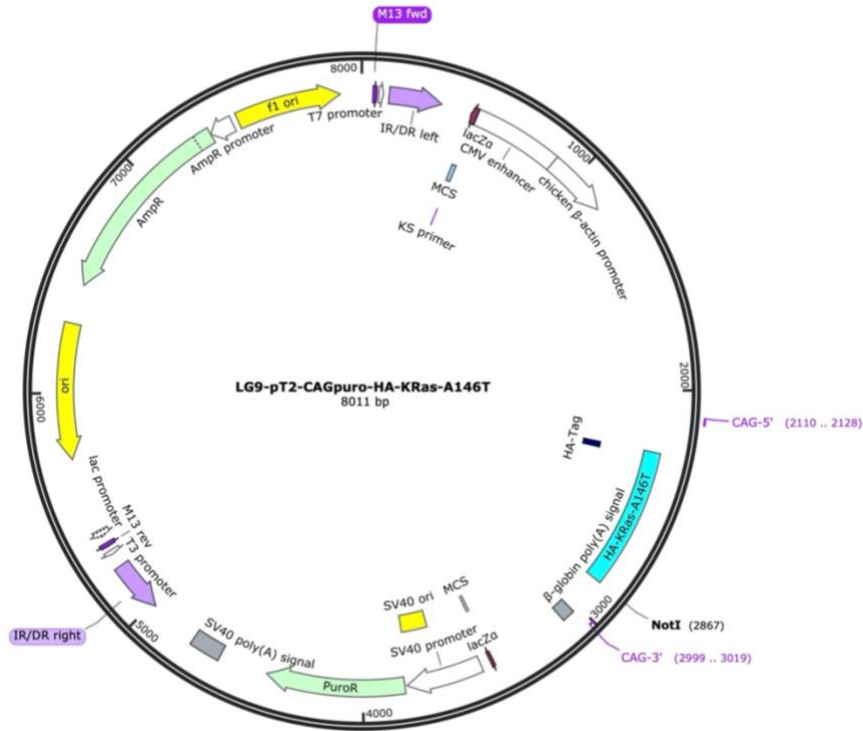
## Appendix

HA-Sequenz gekoppelte KRas-Wildtyp-Gen, sowie den CAG-Promotor. Dieses Plasmid kam im Rahmen aller meiner durchgeführten Proteinexpressionsversuche in den Myelomzellen zur Expression von KRas-Wildtyp-Protein zum Einsatz.

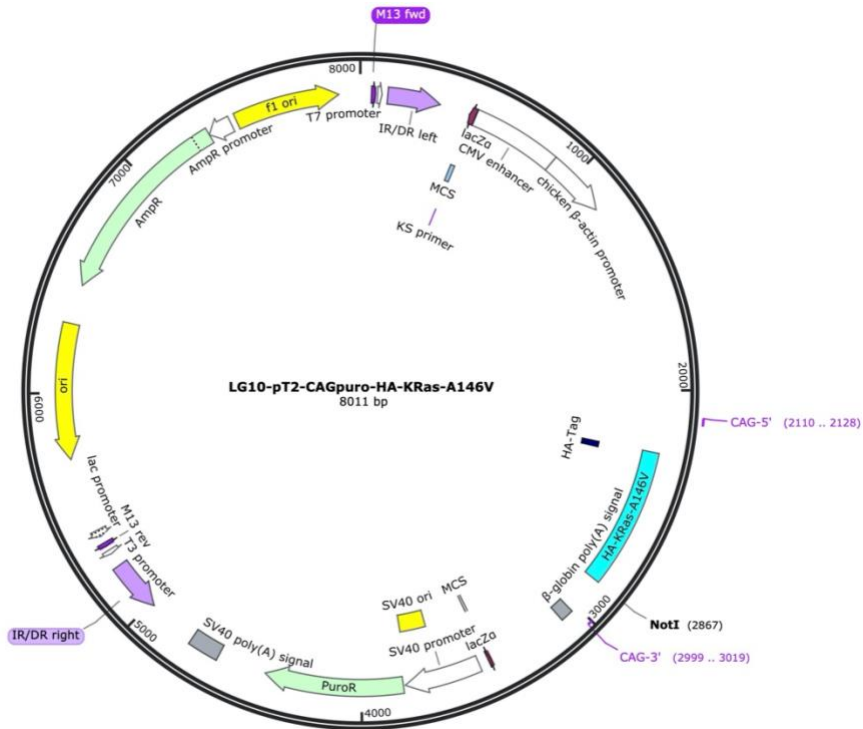


**Abbildung 31:** LG8-pT2-CAGpuro-HA-KRas-G12A.

Abkürzungen: HA = Hämagglutinin, MCS = Multiple Cloning Site (Mehrfachklonierungsstelle), KRas = Kirsten Rat sarcoma 2 viral oncogene homolog. Der dargestellte Vektor ist vom Aufbau äquivalent zu LG7-pT2-CAGpuro-HA-KRas (siehe Abbildung 30) und wurde verwendet, um in den Myelomzellen die KRas-Mutante KRas<sup>p.G12A</sup> zu exprimieren.



**Abbildung 32:** LG9-pT2-CAGpuro-HA-KRas-G12A.  
 Abkürzungen: HA = Hämagglutinin, MCS = Multiple Cloning Site (Mehrfachklonierungsstelle), KRas = Kirsten Rat sarcoma 2 viral oncogene homolog. Der dargestellte Vektor ist vom Aufbau äquivalent zu LG7-pT2-CAGpuro-HA-KRas (siehe Abbildung 30) und wurde im Rahmen meiner Experimente dazu verwendet die KRas-Mutante KRas<sup>p.A146T</sup> zu exprimieren.



**Abbildung 33:** LG10-pT2-CAGpuro-HA-KRas-G12A.  
 Abkürzungen: HA = Hämagglutinin, MCS = Multiple Cloning Site (Mehrfachklonierungsstelle), KRas = Kirsten Rat sarcoma 2 viral oncogene homolog. Der dargestellte Vektor wurde in meinen



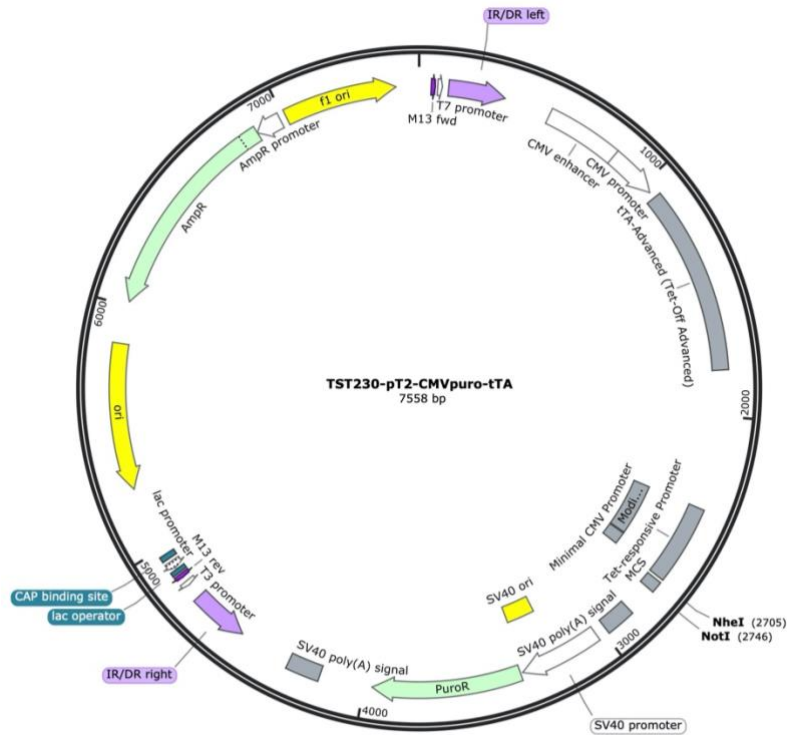
## Appendix

Proteinexpressionsanalysen benutzt, um die KRas-Mutante KRas<sup>p.A146V</sup> in den Myelomzellen zu exprimieren. Dabei ist der Aufbau des Vektors äquivalent zu LG7-pT2-CAGpuro-HA-KRas (siehe Abbildung 30).



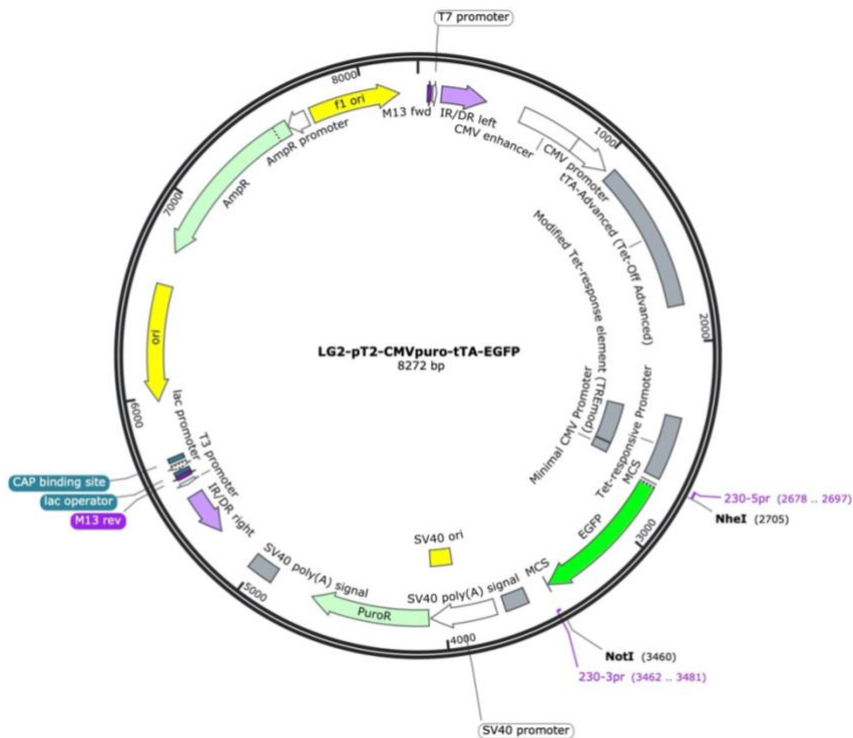
**Abbildung 34:** TST210-pt2SVneo-CMV-EGFP.

Abkürzungen: eGFP = enhanced green fluorescent protein (verstärkt grün fluoreszierendes Protein). Mittels der Restriktionsenzyme NheI und NotI wurde das enthaltene Gen für die weitere Klonierung aus dem Vektor herausgeschnitten.



**Abbildung 35:** TST230-pT2-CMVpuro-tTA.

Dieser Vektor beinhaltet unter anderem ein Tetracyclin-Repressor-System und unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen für NheI und NotI wurde nachfolgend eGFP in den Vektor kloniert.



**Abbildung 36:** LG2-pT2-CMV-puro-tTA-EGFP.

Abkürzungen: eGFP = enhanced green fluorescent protein (verstärkt grün fluoreszierendes Protein). Proteinexpressionsvektor für eGFP, dessen Expression mittels des enthaltenen Tetracyclin-Repressor-Systems gesteuert werden kann.

## I Abkürzungsverzeichnis

%	–	Prozent
°C	–	Grad Celsius
A	–	Adenin
APS	–	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	–	Adenosintriphosphat
BCMA	–	B-cell maturation antigen = B-Zell Reifungsantigen
BiTE	–	bispecific T-cell engager
bp	–	Basenpaar,e
BsMAb	–	bispecific monoclonal antibody = bispezifischer monoklonaler Antikörper
C	–	Cytosin
CAR-T	–	chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen
CAS	–	Chemical Abstract Service
CD4 $\Delta$	–	C-terminal trunkiertes CD4
cDNA	–	complementary DNA = komplementäre DNA
CO <sub>2</sub>	–	Kohlenstoffdioxid
CRAB	–	increased <b>C</b> alcium (erhöhtes Calcium), <b>R</b> enal insufficiency (Niereninsuffizienz), <b>A</b> nemia (Anämie), <b>B</b> one lesions (Knochenläsionen)
D-Segment	–	diversifying = diversifizierendes
ddH <sub>2</sub> O	–	doppelt destilliertes Wasser
dL	–	Deziliter
DMSO	–	Dimethylsulfoxid
DNA	–	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	–	desoxy Nukleosidtriphosphat
DSMZ	–	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECL	–	Enhanced Chemiluminescence = verstärkte Chemolumineszenz
EDTA	–	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	–	enhanced green fluorescent protein = verstärkt grün fluoreszierendes Protein
EGFR	–	epidermal growth factor receptor = Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
Etk	–	Ets like = Ets ähnlich
Erk	–	Extrazellulär Signal-regulierte Kinase
Ets	–	Erythroblasten transformationsspezifisch
FACS	–	fluorescence activated cell sorting = Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FBS	–	fötales bovines Serum
FITC	–	Fluoresceinisothiocyanat
FLC	–	free light chain = freie Leichtketten
FSC	–	forward scatter = Vorwärtsstreulicht
g	–	Gramm
G	–	Guanin

## I Abkürzungsverzeichnis

---

GDP	–	Guanosindiphosphat
GFR	–	Glomeruläre Filtrationsrate
GTP	–	Guanosintriphosphat
h	–	Stunde,n
H-Kette	–	heavy = schwer
H <sub>2</sub> O	–	Wasser
HA	–	Hämagglutinin
HRas	–	Harvey Rat sarcoma
HRP	–	horseradish peroxidase = Meerrettich Peroxidase
Ig	–	Immunglobulin
IKZF	–	Ikaros Zink Finger
ISS	–	International Staging System = Internationales Staging-System
J-Segment	–	joining = verbindend
kB	–	Kilobase,n
KRas	–	Kirsten Rat sarcoma 2 viral oncogene homolog
L	–	Liter
L-Kette	–	light = leicht
LDH	–	Laktatdehydrogenase
M	–	Molar
M-Protein	–	monoklonales Protein
m <sup>2</sup>	–	Quadratmeter
MAPK	–	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	–	Mitogen-aktivierte Proteinkinasekinase
MAPKKK	–	Mitogen-aktivierte Proteinkinasekinasekinase
MCS	–	Multiple Cloning Site = Mehrfachklonierungsstelle
Mek	–	Mitogen-aktivierte Erk Kinase
mg	–	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	–	Magnesiumchlorid
MGUS	–	monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MHC	–	major histocompatibility complex = Haupthistokompatibilitätskomplex
min	–	Minute
mL	–	Milliliter
mm	–	Millimeter
mM	–	Millimolar
MM	–	Multiplles Myelom
mmol	–	Millimol
Mo.	–	Monat,e
MPC	–	Myeloma propagating cell = Myelom vermehrende Zelle
MRT	–	Magnetresonanztomographie
nL	–	Nanoliter
nm	–	Nanometer
NRas	–	Neuroblastoma Rat sarcoma
NSCLC	–	non small cell lung carcinoma = nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom

## I Abkürzungsverzeichnis

---

OAB	–	oligonukleotide annealing buffer = Oligonukleotid Zusammenlagerungspuffer
PBS	–	phosphate buffered saline = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	–	Polymerase chain reaction = Polymerase Ketten Reaktion
PDAC	–	Pancreatic ductal adenocarcinoma = pankreatisch duktales Adenokarzinom
PI	–	Propidiumiodid
PI3K	–	Phosphoinositol 3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	–	Phosphoinositol (4,5)-biphosphat
PIP <sub>3</sub>	–	Phosphoinositol (3,4,5)-triphosphat
PTEN	–	Phosphatase und Tensin homolog
Raf	–	Rattenfibrosarkom
Ras	–	Rat sarcoma = Rattensarkom
RNA	–	Ribonukleinsäure
rpm	–	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
RSK	–	Ribosomale S6 Kinase
SAP	–	Shrimp alkalische Phosphatase
SDS	–	sodium dodecyl sulfate = Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	–	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel elektrophoresis = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	–	Sekunde
shRNA	–	short Hairpin Ribonukleinsäure
SMM	–	Smouldering Multiple Myeloma = Schwelendes Multiples Myelom
Sos	–	son of sevenless
SSC	–	side scatter = Seitenstreulicht
T	–	Thymin
U	–	units = Einheiten
UTR	–	untranslated region = untranslatierter Bereich
UV	–	ultraviolett
V	–	Volt
V-Segment	–	variable = variables
µF	–	Mikrofarad
µg	–	Mikrogramm
µL	–	Mikroliter
µm	–	Mikrometer
µM	–	Mikromolar
µmol	–	Mikromol

## II Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Initiation und Progression des Multiplen Myeloms nach Morgan et al. (2012).....	4
<b>Abbildung 2:</b> Überarbeitete Diagnosekriterien der International Myeloma Working Group nach Rajkumar et al. (2014).....	7
<b>Abbildung 3:</b> Therapie-Algorithmus bei Erstdiagnose Multiples Myelom nach Moreau et al. (2017).....	11
<b>Abbildung 4:</b> Skizze des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalwegs nach Kolch (2000).....	17
<b>Abbildung 5:</b> Beispielbild einer Mykoplasmen-PCR. ....	33
<b>Abbildung 6:</b> Schematische Darstellung der Funktionsweise des Sleeping Beauty Transposon Systems.....	44
<b>Abbildung 7:</b> Durchflusszytometrische Analyse zum Einsatz zweier verschiedener Promotorsysteme. ....	54
<b>Abbildung 8:</b> Vergleichender Western Blot zum Einsatz zweier verschiedener Promotorsysteme. ....	55
<b>Abbildung 9:</b> Auftrennung des geschnittenen TST415-pBS-HA-KRas-Vektors mittels eines Agarosegels. ....	57
<b>Abbildung 10:</b> Schematische Darstellung der durchgeführten Klonierungsschritte für die Herstellung der verwendeten Plasmide. ....	58
<b>Abbildung 11:</b> Transiente HA-KRas-Proteinexpressionsanalyse in JJN-3.....	60
<b>Abbildung 12:</b> Transiente Proteinexpressionsanalyse vom neu präparierten KRas <sup>p.A146V</sup> -Plasmid.....	61
<b>Abbildung 13:</b> Transiente Proteinexpressionsanalyse für HA-KRas im zeitlichen Verlauf.....	63
<b>Abbildung 14:</b> FACS-Analyse transfizierter L-363-Myelomzellen. ....	64
<b>Abbildung 15:</b> Transiente Proteinexpressionsanalyse für KRas-Konstrukte und Aktivierungsspiegel nachgeschalteter Signalmoleküle.....	65
<b>Abbildung 16:</b> Western Blot der stabilen Integration der Proteinexpressionsplasmide für die verschiedenen KRas-Mutationen in der Myelomzelllinie JJN-3. ....	68
<b>Abbildung 17:</b> Zwei sequenziell angefertigte Western Blots der stabilen Integration der Proteinexpressionsplasmide für die verschiedenen KRas-Mutationen in der Myelomzelllinie OPM-2.....	69
<b>Abbildung 18:</b> Western Blot von stabil transfizierten Myelomzellen der Zelllinie OPM-2 unter besonderer Berücksichtigung der Veränderung der Signalintensität abhängig von FBS-Anwesenheit.....	71

<b>Abbildung 19:</b> Western Blot der mit Cycloheximid kultivierten Zellen. ....	73
<b>Abbildung 20:</b> Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten mit den revers transkribierten cDNAs der verschiedenen Versuchsansätze als Matrize. ....	74
<b>Abbildung 21:</b> Western Blot zum Vergleich monoklonaler und polyklonaler HA-KRas transfizierter JJN-3 Sublinien. ....	76
<b>Abbildung 22:</b> Vektorkarte der Zusammengelagerten Oligonukleotide des HA-Tags. 96	
<b>Abbildung 23:</b> TST603A-pBluescript II SK-NheI. ....	96
<b>Abbildung 24:</b> TST606-pBS-HA. ....	97
<b>Abbildung 25:</b> Vektorkarte des KRas-Gens. ....	97
<b>Abbildung 26:</b> TST415-pBS-HA-KRas. ....	98
<b>Abbildung 27:</b> TST206-pT2SVPuroCMV. ....	98
<b>Abbildung 28:</b> LG3-pT2-CMVpuro-HA-KRas-wt. ....	99
<b>Abbildung 29:</b> TST212-pT2BN-SVpuroCAG. ....	100
<b>Abbildung 30:</b> LG7-pT2-CAGpuro-HA-KRas-wt. ....	100
<b>Abbildung 31:</b> LG8-pT2-CAGpuro-HA-KRas-G12A. ....	101
<b>Abbildung 32:</b> LG9-pT2-CAGpuro-HA-KRas-G12A. ....	102
<b>Abbildung 33:</b> LG10-pT2-CAGpuro-HA-KRas-G12A. ....	102
<b>Abbildung 34:</b> TST210-pt2SVneo-CMV-EGFP. ....	103
<b>Abbildung 35:</b> TST230-pT2-CMVpuro-tTA. ....	104
<b>Abbildung 36:</b> LG2-pT2-CMV-puro-tTA-EGFP. ....	104

### III Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Revised Staging System nach Palumbo et al. (2015). .....	8
<b>Tabelle 2:</b> Liste der verwendeten technischen Ausrüstung aufgelistet alphabetisch nach Geräteart, Produktname und Hersteller. ....	20
<b>Tabelle 3:</b> Liste der verwendeten Software aufgelistet alphabetisch nach Produktname und Hersteller. ....	21
<b>Tabelle 4:</b> Auflistung der eingesetzten Chemikalien, Zellkulturmedien und Zusätze alphabetisch sortiert nach Produktname, CAS-Nummer (CAS = Chemical Abstracts Service) und Hersteller. ....	22
<b>Tabelle 5:</b> Alphabetische Nennung der eingesetzten Enzyme und zugehörigen Puffer, nach Produktname und Hersteller sortiert. ....	24
<b>Tabelle 6:</b> Eingesetzte Restriktionsenzyme in alphabetischer Reihenfolge sortiert nach Restriktionsenzymname, Erkennungssequenz mit Schnittstelle und Hersteller. ....	25
<b>Tabelle 7:</b> Liste der verwendeten Längenstandards mit Verwendungszweck, Produktname und Hersteller (in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet). ....	25
<b>Tabelle 8:</b> Im Rahmen meiner Arbeiten zum Einsatz gekommene Primärantikörper alphabetisch aufgelistet mit Namen, Ursprungsspezies, Verdünnung für Western Blotting und Hersteller. ....	25
<b>Tabelle 9:</b> In den Experimenten verwendete Sekundärantikörper alphabetisch aufgelistet mit Namen, Ursprungsspezies, Verdünnung für Western Blotting und Hersteller. ....	26
<b>Tabelle 10:</b> Für meine Arbeiten eingesetzte Reaktionssets mit Namen und Hersteller in alphabetischer Reihenfolge. ....	26
<b>Tabelle 11:</b> Verwendete Myelomzelllinien mit Namen und Angabe des Vertreibers. ...	27
<b>Tabelle 12:</b> Für PCRs und Sequenzierungen eingesetzte Primer mit Angabe des Namens und der Basensequenz. ....	27
<b>Tabelle 13:</b> Verwendete Oligonukleotide zur Generierung eines dsDNA-Klonierungselements, das eine 1x HA-Tag Sequenz kodiert (Startcodon unterstrichen) mit Angabe der Nukleotidsequenz. ....	27
<b>Tabelle 14:</b> Auflistung aller selbst hergestellten Puffer und Lösungen mit Angabe ihrer Zusammensetzung. ....	28
<b>Tabelle 15:</b> Experimentell ermittelte Elektroporationsspannungen nach Steinbrunn et al. (2014). ....	34



### IV Danksagung

Zunächst möchte ich mich sehr herzlich bedanken bei Herrn Prof. Dr. med Ralf C. Bargou für die Möglichkeit zur Ausarbeitung meiner Dissertation, die Bereitstellung des Themas und die Übernahme des Erstgutachtens.

Bei Frau PD Dr. rer. nat. Ellen Leich-Zbat möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie die Betreuung im Rahmen des Promotionskomitees herzlichst bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Thorsten Stühmer, der mir sowohl während des experimentellen Teils als auch während der Überarbeitung der schriftlichen Fassung stets mit wertvollen Ratschlägen zur Seite stand und dessen konstante und angenehme Betreuung wesentlich zur Qualität meiner Arbeit beigetragen hat.

Darüber hinaus möchte ich mich sehr bei Frau Evelyn Brandt bedanken, die mir während der Zeit meiner experimentellen Arbeit zu jeder Zeit helfend, beratend und auch unterstützend zur Seite stand.

Außerdem gilt meinen Freunden ein großes Dankeschön für die jahrelange wunderschöne gemeinsame Zeit und dass ich mich immer auf euch verlassen kann.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Großeltern von tiefstem Herzen danken für all die Jahre voller Liebe und Unterstützung.

Mein größter Dank gilt Pia Reiser für ihre Geduld, ihre Rückendeckung, ihren Beistand und ihre Liebe.

## V Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Name                      Lukas Friedrich Großhans

### BERUF

---

Seit 04/2022            **Arzt in Weiterbildung im Fach Augenheilkunde**, Klinik und  
Poliklinik für Augenheilkunde, Universitätsklinikum Würzburg

### AUSBILDUNG UND STUDIUM

---

10/2014 – 12/2021    **Studium der Humanmedizin** an der **Julius-Maximilians-Universität Würzburg**  
Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note „sehr gut“ (1,0)  
Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note „gut“ (2,0)  
Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note „gut“ (2,0)

2005 – 2014            **Allgemeine Hochschulreife**, Gymnasium am Rittersberg,  
Kaiserslautern  
Abschlussnote „sehr gut“ (1,2)

2001 – 2005            Theodor-Heuss-Grundschule, Kaiserslautern

### WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

---

2018 – 2022            **Experimentelle Dissertation** bei Prof. Dr. med. Ralf C. Bargou  
Lehrstuhl für Translationale Onkologie, Medizinische Klinik und  
Poliklinik II, Universitätsklinikum Würzburg  
„Funktionelle Validierung von seltenen KRas-Mutationen in  
Zelllinien des Multiplen Myeloms“

02/2020                **Co-Autorenschaft** einer Publikation in der Fachzeitschrift  
„Cancers“  
„Exon-4 Mutations in KRAS Affect MEK/ERK and PI3K/AKT  
Signaling in Human Multiple Myeloma Cell Lines“, Cancers 2020,  
12(2), 455

Würzburg, den

Lukas Großhans

## VI Publikationen

Weißbach S, Heredia-Guerrero SC, Barnsteiner S, **Großhans L**, Bodem J, Starz H, Langer C, Appenzeller S, Knop S, Steinbrunn T, Rost S, Einsele H, Bargou RC, Rosenwald A, Stühmer T und Leich E. Exon-4 Mutations in KRAS Affect MEK/ERK and PI3K/AKT Signaling in Human Multiple Myeloma Cell Lines. *Cancers* 2020; 12(2).