

**Aus dem Institut für Pathologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Andreas Rosenwald**

**Untersuchungen zum Einfluss des Insulin-like growth factor Rezeptors
auf Signalnetzwerke im Multiplen Myelom**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Julia Felicia Pickert
aus Weinsberg**

Freiburg, September 2023



Referentin: Frau PD Dr. Ellen Leich-Zbat

Korreferent: Herr Prof. Dr. Ralf C. Bargou

Dekan: Herr Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2024

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	<u>II</u>
<u>1 EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1 MULTIPLES MYELOM	1
1.1.1 DEFINITION.....	1
1.1.2 PATHOGENESE	2
1.1.3 B-ZELL DIFFERENZIERUNG	4
1.1.4 HETEROGENITÄT DES MM	5
1.2 RTK-SIGNALTRANSDUKTION	6
1.3 INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I REZEPTOR	7
1.3.1 AUFBAU DES IGF1R.....	7
1.3.2 FUNKTION UND SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE DES IGF1R	8
1.3.3 KLINISCHE BEDEUTUNG DES IGF1R.....	11
1.3.4 FOKALE ADHÄSIONS-KINASEN	11
1.3.5 VORANGEGANGENE UNTERSUCHUNGEN	12
1.4 ZIEL DER ARBEIT	13
<u>2 MATERIALIEN UND METHODEN</u>	<u>14</u>
2.1 MATERIAL	14
2.1.1 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEREN	14
2.1.2 LÖSUNGEN UND PUFFER	15
2.1.3 TECHNISCHES EQUIPMENT	16
2.1.4 VERBRAUCHSMATERIALEN.....	18
2.1.5 SOFTWARE.....	19
2.1.6 KITS.....	19
2.1.7 GRÖßENMARKER	19
2.1.8 BESTANDTEILE DER ZELLKULTURMEDIEN.....	20
2.1.9 ZELLINIEN	20
2.1.10 ANTIKÖRPER	22
2.1.11 RNA	23
2.2 METHODEN	23

Inhaltsverzeichnis

2.2.1	ZELLKULTUR DER HMZL	23
2.2.2	WESTERN BLOTS.....	24
2.2.3	SIRNA VERMITTELTEN KNOCKDOWN VON IGF1R.....	26
2.2.4	AUSWERTUNG	27
3	<u>ERGEBNISSE</u>	29
3.1	IGF1R-EXPRESSION UND IGF1R-KNOCKDOWN IN VERSCHIEDENEN HMZL	29
3.2	EINFLUSS DES SIRNA VERMITTELTEN IGF1R-KNOCKDOWNS AUF IGF1R UND NACHGESCHALTETE EFFEKTOREN.....	30
3.2.1	DER SIRNA VERMITTELTE KNOCKDOWN VON IGF1R FÜHRT ZU EINER ABNAHME DER IGF1R-EXPRESSION UND DESSEN AKTIVIERUNG IN ALLEN HMZL	31
3.2.2	DER KNOCKDOWN VON IGF1R FÜHRT ZU EINER ABNAHME DER AKT-EXPRESSION UND DESSEN AKTIVIERUNG IN ALLEN HMZL.....	34
3.2.3	DER KNOCKDOWN VON IGF1R HAT EINEN HETEROGENEN EFFEKT AUF DIE EXPRESSION UND AKTIVIERUNG VON ERK	37
3.2.4	DER KNOCKDOWN VON IGF1R FÜHRT IN ETWA DER HÄLFTE DER HMZL ZU EINER ABNAHME IN DER EXPRESSION UND AKTIVIERUNG VON MEK.....	40
3.2.5	DER KNOCKDOWN VON IGF1R HAT IN HMZL NUR WENIG EINFLUSS AUF DIE MYC EXPRESSION	43
3.2.6	DER KNOCKDOWN VON IGF1R HAT EINEN DEUTLICHEN EINFLUSS AUF DIE AKTIVIERUNG VON PYK2	44
4	<u>DISKUSSION.....</u>	50
4.1	DIE AKT-AKTIVIERUNG WIRD IN HMZL DURCH DEN IGF1R-KNOCKDOWN REDUZIERT	50
4.2	DER RAS/RAF/MEK/ERK SIGNALWEG WIRD VOR ALLEM IN DEN PCL HMZL L-363 UND MM.1S DURCH DEN IGF1R-KNOCKDOWN BEEINFLUSST	52
4.3	DIE MYC-EXPRESSION WIRD DURCH DEN IGF1R KNOCKDOWN IN HMZL NUR WENIG BEEINFLUSST	54
4.4	DER IGF1R-KNOCKDOWN FÜHRT IM MM KONSTANT ZU EINER REDUZIERTEN AKTIVIERUNG VON PYK2.....	55
4.5	AKTUELLE ARBEITEN UND AUSBLICK	56
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	58

Inhaltsverzeichnis

SUMMARY	59
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	60
APPENDIX.....	69
EINFLUSS DES siRNA VERMITTELTEN IGF1R-KNOCKDOWNS AUF IGF1R UND NACHGESCHALTETE EFFEKTOREN IM DRITTEN VERSUCH	69
I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	73
II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	75
III. TABELLENVERZEICHNIS	76
IV. DANKSAGUNG	77

1 Einleitung

1.1 Multiples Myelom

1.1.1 Definition

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne Erkrankung der terminal differenzierten Plasmazellen, die sich meist im Knochenmark (KM) klonal vermehren und Paraproteine sezernieren. Mit einer weltweiten Inzidenz von 0,9 % und 159985 Neuerkrankungen im Jahr 2018 ist es die zweithäufigste maligne hämatologische Erkrankung nach Lymphomen [1, 2]. Mit einem medianen Überleben von 5 – 7 Jahren ist das MM noch immer unheilbar [3]. Im Jahr 2018 sind 106105 Patientinnen und Patienten weltweit an dieser Erkrankung verstorben [1].

Seit Einführung zielgerichteter Therapien mit Proteasomen-Inhibitoren, Immunmodulatoren und Immuntherapien mit monoklonalen Antikörpern konnte das Gesamtüberleben verlängert werden [4-6]. Jedoch treten im Krankheitsverlauf fast immer Rezidive und Therapieresistenzen auf [4-6]. Die aktuellen, vielfältigen Therapieregime orientieren sich an verschiedenen Faktoren wie Alter, allgemeiner Zustand und Komorbiditäten, Risikostratifizierung anhand zytogenetischer Anomalien und Tumorlast [3]. Besonders wirkungsvoll zeigten sich Bortezomib, Lenalidomid, Dexamethason und monoklonale Antikörper wie Daratumumab, sowie Melphalan mit anschließender autologer Stammzelltransplantation [3, 7, 8]. Es wird an neuen zielgerichteten Tumorthérapien geforscht, wie z.B. der Inhibition von BCL2, XPO1 und BCMA [9-12].

Klinisch präsentiert sich das MM vor allem durch Fatigue (extreme Müdigkeit) und Knochenschmerzen [3]. Diese werden durch die in 73 % der Fälle begleitende Anämie und die in 80 % der Fälle auftretenden Knochenläsionen verstärkt bzw. hervorgerufen [3]. Bei weiterer diagnostischer Abklärung zeigt sich häufig eine Hyperkalziämie und Niereninsuffizienz [13]. Die oben genannten Endorganschäden werden unter den CRAB Kriterien zusammengefasst und

Einleitung

definieren in Verbindung mit $\geq 10\%$ klonalen Plasmazellen im KM oder monoklonalem Protein im Serum oder Urin das MM [13]. Weitere Diagnosekriterien sind $\geq 60\%$ klonale Plasmazellen im KM, ein freier Leichtketten-Quotient von ≥ 100 im Serum und der Nachweis mindestens einer fokalen Läsion durch geeignete Bildgebung (MRT, CT, „low-dose“ Ganzkörper-CT, PET-CT) [14]. Je nach Art der sezernierten Immunglobuline und Leichtketten kann das MM in verschiedene Paraproteintypen unterteilt werden. Am häufigsten kommen IgG- und IgA- Myelome vor, Leichtkettenmyelome sind mit ca. 20 % seltener [15].

Das Staging erfolgt anhand des Revised International Staging Systems und bewertet die Tumorlast anhand von laborchemischen Markern (Serum Albumin, Serum β -2-Mikroglobulin und Laktatdehydrogenase (LDH)), sowie eventuell vorhandener zytogenetischer Anomalien und ihrer Auswirkung auf die Prognose [14]. Als Hochrisiko Anomalien wurden Del(17p), t(4;14), t(14;16), t(14;20) und ampl(1q21) identifiziert [14, 16, 17].

Da das durchschnittliche Erkrankungsalter beim MM bei 66 Jahren liegt und der demographische Wandel in Deutschland zu einer alternden Gesellschaft führt, wird die Verbesserung der Therapiemöglichkeiten für das MM zunehmend an Bedeutung gewinnen [15].

1.1.2 Pathogenese

Das MM entwickelt sich fast immer aus seinen Vorstufen Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) und Smoldering Myeloma (SMM) [18, 19]. Die MGUS ist eine prä-maligne Plasmazell-Erkrankung, die über $< 10\%$ klonale Plasmazellen im KM und fehlende Endorganschäden definiert ist [14]. Sie kann, je nach Art der Proteinsekretion, in drei Subgruppen unterteilt werden: Die Non-IgM, IgM und Leichtketten MGUS [14]. Der Krankheitsverlauf ist meist asymptomatisch und wird häufig als Zufallsbefund entdeckt. Das Progressionsrisiko zu einem MM beträgt etwa 1 % pro Jahr [20]. Das SMM hingegen hat ein Progressionsrisiko von 10 % in den ersten 5 Jahren, welches

Einleitung

anschließend sinkt [21]. Es definiert sich, ähnlich wie die MGUS, über 10 – 60 % klonale Plasmazellen im KM, sowie teils auch in Serum oder Urin detektierbare Paraproteine [14]. Ob eine Therapie bereits beim SMM begonnen werden sollte, ist Gegenstand aktueller Forschung, allerdings noch kein Teil der International Myeloma Working Group [22].

Neben den Vorstufen des MM gibt es weitere Varianten dieser Erkrankung. So ist das solitäre Plasmozytom dadurch definiert, dass nur eine einzelne Läsion vorliegt, die durch eine Biopsie gesichert wurde und nachweislich klonale Plasmazellen enthält [14]. Die Läsion kann im Knochen oder extramedullär vorliegen [14]. Das KM muss nachweislich frei von klonalen Plasmazellen sein [14]. Ist es nicht frei, spricht man bei < 10 % klonaler Plasmazellen von einem solitären Plasmozytom „with minimal marrow involvement“ [14]. Das Progressionsrisiko beim solitären Plasmozytom beträgt ca. 10 % in 3 Jahren, wenn das Stadium des „minimal marrow involvement“ hinzukommt, beträgt es im gleichen Zeitraum zwischen 20 – 60 % [14]. Daher wird das Plasmozytom auf der Skala der MM Varianten zwischen dem MGUS/SMM und MM eingeordnet [14]. Die Therapie besteht aus einer lokalen Bestrahlung mit ca. 50 Gy und gegebenenfalls einer zusätzlichen Operation [23].

Die Plasmazell-Leukämie (PCL) ist die aggressivste Variante der monoklonalen Gammopathien und wird durch einen Anteil von $\geq 5\%$ Plasmazellen im peripheren Blut definiert [24, 25]. Man unterscheidet zwischen einer primären PCL, welche sich „de novo“ ohne vorheriges Vorliegen eines MM entwickelt, und einer sekundären PCL, welches sich in der Regel aus einem refraktären oder rezidierten MM transformiert [26]. Die PCL weist eine sehr niedrige Inzidenz auf, bei sekundären PCL ca. 2 – 4 % der MM mit annähernd gleichen Werten für die primären PCL [27]. Die Therapie lehnt sich an die etablierten Schemata des MM an, zeigt jedoch keine befriedigenden Resultate. Daher ist die aktuelle Empfehlung des European Myeloma Networks, alle PCL Patientinnen und Patienten in klinischen Studien unterzubringen [28].

1.1.3 B-Zell Differenzierung

Plasmazellen stammen von B-Zellen ab und dienen der Produktion von spezifischen Antikörpern. Ihre Entwicklung beginnt mit hämatopoetischen Stammzellen im KM, die sich über mehrere Vorläuferzell-Stadien hinweg zu Pro-B-Zellen entwickeln [29]. Diese durchlaufen mehrere somatische Rekombinationen der schweren Kette (IgH). Zunächst werden die („diversity“) D – und („joining“) J Segmente umgelagert und im nächsten Schritt wird das („variable“) V Segment an das DJ Segment angelagert [30]. Dadurch können B-Zell Antikörper später bis zu 5×10^{13} verschiedene Antigene erkennen und sind gleichzeitig ein häufiger Auslöser von ungewollten Translokationen, die eine ausschlaggebende Rolle bei der Entwicklung des MM spielen [30, 31].

Nach der somatischen Rekombination exprimiert die Zelle den Prä-B-Zell-Rezeptor und wird dadurch zur Prä-B-Zelle. Diese lagern die Gensegmente der leichten Kette (IgL), genauer der λ -Kette und der κ -Kette, um [29]. Die Prä-B-Zelle exprimiert nach erfolgreicher Umlagerung ein IgM Molekül auf der Zelloberfläche und zählt damit zu den unreifen B-Zellen [30]. Vor Verlassen des KM werden die unreifen B-Zellen auf Autoreaktivität geprüft. Bei fehlender Immuntoleranz wird entweder eine Rettung durch erneute Umlagerung der IgL versucht oder die Apoptose eingeleitet [29]. Die unreifen B-Zellen wandern in die B-Zell-Follikel der sekundär lymphatischen Organe und vollenden dort ihre Reifung zu follikulären B-Zellen oder Randzonen B-Zellen [29]. Dies findet im Keimzentrum statt, wo die follikulären B-Zellen durch T-Zell gestützte Antigenpräsentation aktiviert werden, zu Zentroblasten differenzieren und schließlich proliferieren [32].

Nun folgt die somatische Hypermutation der IgV Segmente, um die Affinität der B-Zelle zum Antigen zu verbessern [33]. Durch die hierbei entstehenden DNA-Doppelstrangbrüche entstehen häufig auch Deletionen, Insertionen oder Translokationen, die zur Entstehung des MM beitragen können [34]. Zentroblasten, denen keine affinitätssteigernde Mutation gelingt, gehen in die Apoptose. Diejenigen, deren Mutationen erfolgreich sind, werden aktiv von $CD4^+$

T-Zellen und follikulär dendritische Zellen (FDZ) ausgewählt [33]. Parallel dazu kann es zu einem Klassenwechsel/Isotypenwechsel kommen, bei dem ein Wechsel von IgM zu IgG, IgA oder IgE erfolgt. Da der Klassenwechsel ebenfalls mit DNA-Brüchen einhergeht, kann es auch hierbei zu chromosomalen Translokationen kommen, die die Entwicklung eines MM wahrscheinlicher machen [33]. Letztendlich verlassen die B-Zellen entweder als Plasmazellen oder als Gedächtniszellen das Keimzentrum.

1.1.4 Heterogenität des MM

Das MM ist ein sehr heterogenes Krankheitsbild, was sich nicht nur im klinischen Verlauf, sondern auch auf genetischer Ebene widerspiegelt [35]. Im Laufe der B-Zell Entwicklung können neben erwünschten Veränderungen zur Ausdifferenzierung der Plasmazelle auch onkogene Mutationen erworben werden. Sie entstehen vor allem während der VDJ Rekombination, der somatischen Hypermutation und dem Klassenwechsel, da hier DNA-Brüche vorliegen und Fehler in der Reparatur häufig sind [36]. Die Mutationen sind jedoch meist nicht der Auslöser des MM, sondern ermöglichen es den ausdifferenzierten Plasmazellen trotzdem zu proliferieren [37].

Es wird zwischen primären und sekundären genetischen Events unterschieden [35]. Zu den primär genetischen Events zählt die Hyperdiploidie der Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21. Etwa 50 % der MM Patientinnen und Patienten sind davon betroffen [38].

Weitere grundlegende primäre genetische Events sind Translokationen der IgH Gene [37]. Hierbei geraten die Onkogene *CCND1*, *CCND3*, *MAF*, *MAFB*, *FGFR3* und *MMSET* unter die Kontrolle des IGH-Enhancers [39, 40]. Das Auftreten der Hyperdiploidie schließt das Auftreten der IgH Translokationen nahezu aus [41]. Sowohl IgH Translokationen, als auch Hyperdiploidie zeigen sich in allen MM Stadien, vom MGUS bis zum rezidivierenden MM, was sie als primäre genetische Ereignisse kennzeichnet [37].

Zu den sekundären genetischen Ereignissen zählen chromosomale Verluste in 13q, 1p, und 17p sowie chromosomale Zugewinne in 1q [42-44]. Weitere sekundäre Events sind zunehmend seltener oder entwickeln sich erst im Verlauf der Erkrankung. Ein Beispiel hierfür sind karyotypische Anomalien des *MYC* Gens, die nur in 30 – 50% der Patientinnen und Patienten mit fortgeschrittenem MM auftreten [45]. Ebenso tritt der chromosomale Verlust in 17p (del(17p13.1)) äußerst selten bei MGUS auf, in ca. 10 % der MM Fälle, aber dafür deutlich gehäuft in 56 – 83 % der PCL [46-48]. Mutationen in Genen des nicht kanonischen NF- κ B Signalweg (20 % im MM) oder Genen des RAS-Signalweg (20 % im MM) zeichnen sich dadurch aus, dass die einzelnen Gene sehr selten betroffen sind, sich jedoch rekurrierend Mutationen in den gleichen Signalwegen wiederfinden [37, 49, 50]. Dies führt zur Annahme, dass die Deregulierung der Signalwege wichtiger ist als die Mutationen einzelner Gene [50].

1.2 RTK-Signaltransduktion

In verschiedenen Tumorentitäten sind Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) mutiert oder überexprimiert und stellen einen wirkungsvollen Angriffspunkt für zielgerichtete Tumorthérapien dar. Ein bekanntes Beispiel ist eine Amplifikation auf Chromosom 17 in 15-20% der Mammakarzinome, die mit einer Überexpression der Human epidermal growth factor 2 (ERBB2) RTK einhergeht [51]. Trastuzumab, ein monoklonaler Antikörper der spezifisch an ERBB2 wirkt, verlängert das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben signifikant [52].

Auch im MM spielen RTK und die RTK-Signaltransduktion eine wichtige Rolle. „Whole exome sequencing“ Studien haben z.B. gezeigt, dass sich beim MM Mutationen eher in zusammenhängenden Gensets als in individuellen Genen anhäufen [53-55]. So konnten Frau Dr. Leich und ihre Arbeitsgruppe sowohl in primären Patientenproben, als auch in humanen Myelom Zelllinien (HMZL) eine Anhäufung von Mutationen in einem Netzwerk aus Adhäsionsmolekülen, RTKs und deren Effektoren beobachten [54]. Nahezu 100 % der MM Patientinnen und Patienten waren durch mindestens eine Mutation in diesem Netzwerk betroffen

und die Hälfte der Patientinnen und Patienten von mindestens zwei Mutationen [54, 55]. Die RTK Effektoren *NRAS* und *KRAS* zählen mit je 20 % zu den am häufigsten mutierten Genen [56]. Auch Mutationen in dem RTK Effektor *BRAF* finden sich in ca. 4 % der MM [53]. Zudem konnte eine erhöhte Aktivierung des RTK Effektor Proteinkinase B (AKT) in Patientinnen und Patienten mit MM im Vergleich zu Vorstufen wie SM oder MGUS nachgewiesen werden [57]. Durch molekulare und funktionale Analysen konnte an primärem Patientenmaterial und HMZL Subgruppen zwischen AKT – abhängigen und AKT – unabhängigen MM unterschieden werden [58]. Weiterhin gibt es Studien mit Inhibitoren gegen den RTK Effektor Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) am MM, die Hinweise auf die Abhängigkeit vom Mitogen-activated protein kinase /Extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) Signalweg liefern [59, 60].

1.3 Insulin-like growth factor I Rezeptor

Der Insulin-like growth factor I Rezeptor (IGF1R) wurde als wichtiger Wachstumsfaktor im MM beschrieben und einige Untersuchungen deuten zudem auf eine prognostische Relevanz von IGF1R im MM hin [61-64]. Des Weiteren war der IGF1R im Rahmen von Sequenzierstudien in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Ellen Leich-Zbat unter den am häufigsten mutierten RTK [54]. Erste klinische Studien mit einem IGF1R Inhibitor blieben jedoch bisher ohne Erfolg [65, 66].

1.3.1 Aufbau des IGF1R

Der IGF1R ist ein transmembranäres, heterotetramäres Glykoprotein und gehört zur Unterfamilie der Insulinrezeptoren und damit zu den RTK [67-69]. Er besteht aus je zwei α -Untereinheiten und zwei β -Untereinheiten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und liegt, anders als andere Unterfamilien der RTK, auch ohne Ligand als Homodimer vor (**Abbildung 1**) [67, 68, 70]. Die Ektodomäne des IGF1R besteht aus den α -Untereinheiten und besitzt am N-Terminus zwei homologe Domänen, die durch eine cysteinreiche Domäne getrennt werden [68, 70]. Der C-Terminus besteht aus drei Fibronectin III

Einleitung

Domänen. Die transmembranen β -Untereinheiten bilden mit der katalytischen Tyrosinkinase die Endodomäne, welche von einer juxtamembranen Region und einem C-Ende umrahmt wird [68, 70].

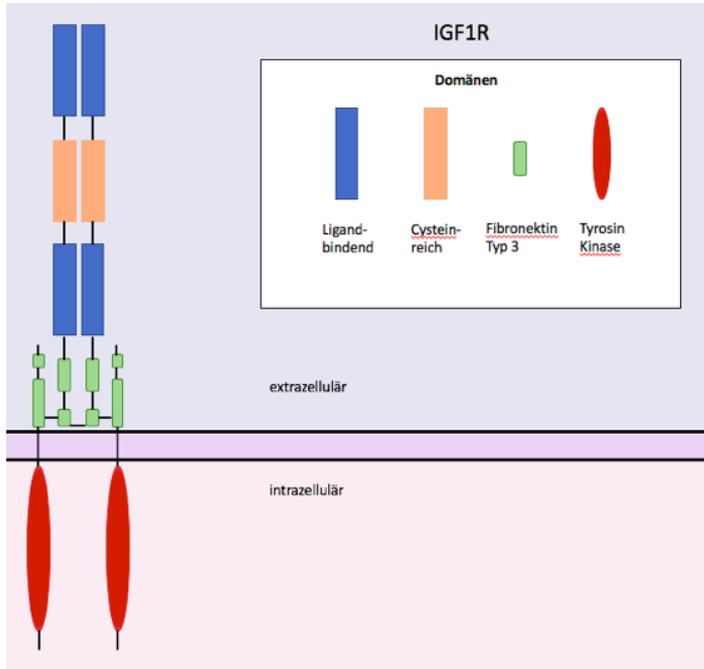


Abbildung 1: Schematische Darstellung des IGF1R

Der IGF1R besteht aus zwei α -Untereinheiten, welche die Ektodomäne bilden und zwei β -Untereinheiten, welche die Endodomäne bilden [68]. Er liegt als Homodimer vor. (Abbildung modifiziert nach Schlessinger *et al.* 2020 [71] mit Erlaubnis von Elsevier, Lizenznummer 5293051390715)

1.3.2 Funktion und Signaltransduktionswege des IGF1R

Das Insulin-like growth factor (IGF) System besteht aus den Liganden IGF-1 und IGF-2, welche für die Regulierung des Wachstums zuständig sind und zusätzlich zur Verhinderung der Apoptose in Fibroblasten, hämatopoetischen und neuronalen Zellen beitragen [72-75]. Durch Bindung an den extrazellulären Teil des IGF1R kommt es zur Autophosphorylierung an der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne, welche wiederum die Phosphorylierung von Carboxy-terminalen Serinresten oder juxtamembranen Tyrosinresten zur Folge hat. Diese dienen als Bindungsstellen für Src homology, Adapterprotein Shc und Insulinrezeptor Substrat (IRS) 1-4 und aktivieren ihrerseits die Signaltransduktionskaskaden Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) /AKT und MAPK/ERK (**Abbildung 2**) [76].

Einleitung

Der PI3K/AKT Signalweg beginnt mit der Phosphorylierung von IRS Proteinen, welche sowohl die regulatorische p85 Untereinheit als auch die katalytische p110 Untereinheit der PI3K rekrutieren. Diese regen die Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-trisphosphat zu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat an, welches die PDK-1 aktiviert. Die PDK-1 phosphoryliert AKT an Threonin 308. Der IGF1R aktiviert über einen bisher unbekanntem Weg den Mammalian target of Rapamycin (mTOR) C2 Komplex, welcher AKT an Serin 473 phosphoryliert. Das nun aktivierte AKT wirkt sich auf zahlreiche Effektoren, unter anderem mTOR, aus [76, 77]. AKT ist beteiligt an Zellwachstum, Zellproliferation, Zellstoffwechsel, Angiogenese, Zellmigration und -invasion, sowie Inhibition der Apoptose [77].

Auch im MM spielt AKT eine wichtige Rolle. In mehreren Studien konnte der Zusammenhang zwischen AKT und der Regulierung von Apoptose und Zellzyklus im MM nachgewiesen werden, sodass eine Einflussnahme auf die Aktivierung von AKT als mögliche therapeutischer Angriffspunkt interessant ist [78, 79].

Die MAPK/ERK Signalkaskade ist auch als RAS/RAF/MEK/ERK Signalweg bekannt und reguliert die Genexpression durch Signaltransduktion von extrazellulären Signalen in Transkriptionsfaktoren [80]. Wie oben beschrieben, erfolgt nach Autophosphorylierung des IGF1R eine Bindung des Adapterproteins Shc, welcher einen Komplex mit einem weiteren Adapterprotein GRB2 eingeht und dadurch den Guanosintriphosphat (GTP) Austauschfaktor SOS binden kann [81]. Dieser kann das membrangebundene Ras durch den Austausch von Guanosindiphosphat durch GTP aktivieren [81]. Nun kann Ras eine Reihe von Signalwegen aktivieren, neben dem hier beschriebenen noch MEKK/SEK/JNK, PI3K/AKT/NF- κ B und RAF/MEK/IKK [82].

RAF-1, eine Serin/Threonin Kinase wird durch Ras aktiviert und aktiviert wiederum MEK. Diese aktiviert ERK, welche auch MAPK genannt wird. Sie ist ebenfalls eine Serin/Threonin Kinase und aktiviert durch zytoplasmatische

Einleitung

Faktoren und Transkriptionsfaktoren mitogene Vorgänge [82, 83]. Neben der Proliferation, der Differenzierung und dem Zellzyklus steuert die MEK/ERK Kaskade auch die Apoptose [84, 85]. Im MM gehört die MAPK/ERK Kaskade zu den am häufigsten mutierten Signalwegen. Mehrere Studien konnten zeigen, dass ca. 45 % der MM Patientinnen und Patienten eine Mutation an *KRAS*, *NRAS* oder *BRAF* aufweisen [50, 86].

Die meisten MM mit einer *RAS* Mutation haben zusätzlich eine ausgeprägte MYC-Expression [87]. MYC ist ein Onkogen, das als Transkriptionsfaktor fungiert und zur Familie der „basic helix loop helix leucine zipper“ gehört [88]. MYC spielt eine wichtige Rolle bei der Progression vom MGUS zum MM und ist zudem mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert [87, 89].

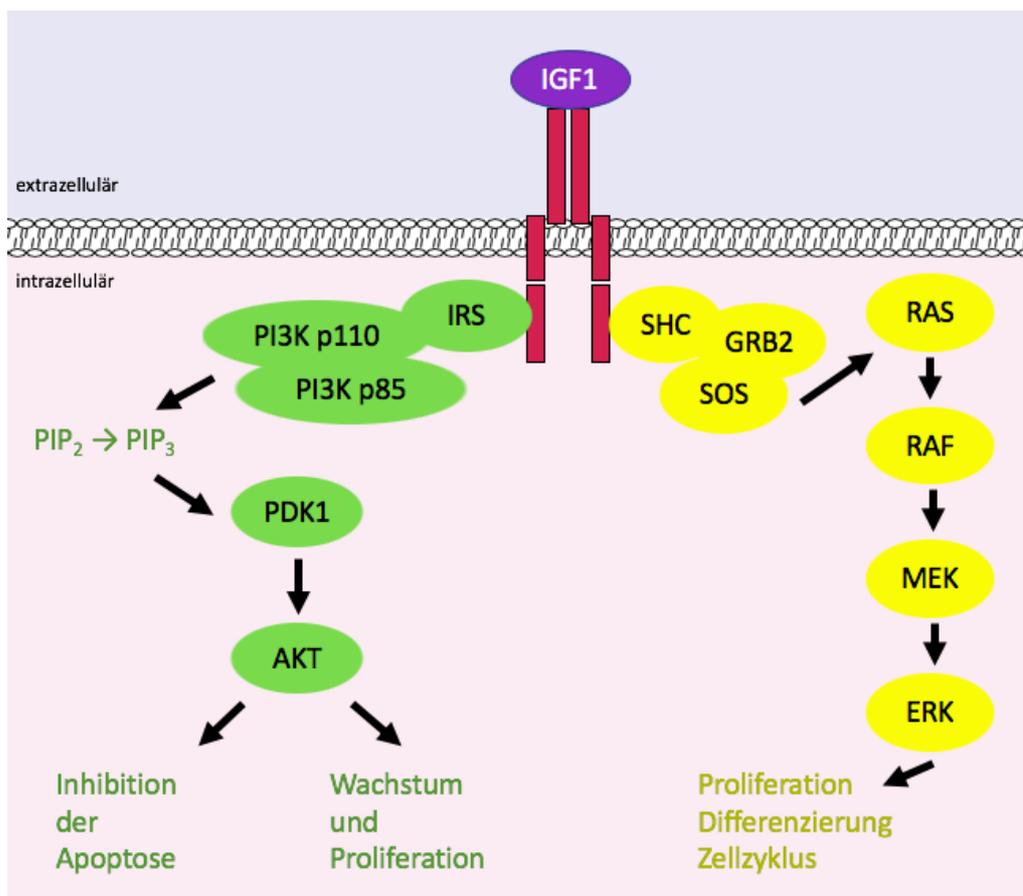


Abbildung 2: Signalwege des IGF1R

Die Bindung des Liganden IGF1 führt zur Phosphorylierung und Aktivierung des IGF1R. Nach Bindung der IRS an die intrazelluläre Domäne des IGF1R und der Rekrutierung der PI3K wird Phosphatidylinositol-4,5-trisphosphat zu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, woraufhin Phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) und AKT aktiviert werden. Dies führt zu

verstärktem Wachstum und Proliferation sowie Hemmung der Apoptose. Der SHC-GRB2-SOS-Komplex aktiviert nach Bindung an den IGF1R RAS. Folglich werden RAF, MEK und ERK phosphoryliert und aktiviert. Durch Transkriptionsfaktoren nimmt ERK Einfluss auf Proliferation, Differenzierung und den Zellzyklus. (Abbildung modifiziert nach Chitnis *et al.* 2008 [76, 90, 91] mit Erlaubnis der American Association of Cancer Research, Lizenznummer 5315790517670)

1.3.3 Klinische Bedeutung des IGF1R

Sowohl für Insulin, als auch für IGF-1 gibt es zahlreiche Belege, dass sie eine wichtige Rolle für das Wachstum von Neoplasien spielen, was sie zu interessanten therapeutischen Targets macht [92]. Bisher gibt es verschiedene therapeutische Angriffsmöglichkeiten am IGF1R, wie IGF1R spezifische monoklonale Antikörper, IGF-Liganden-neutralisierende monoklonale Antikörper, „small molecule“ Tyrosinkinaseinhibitoren oder „antisense oligonucleotides“ [65, 93]. Mehrere dieser Inhibitoren wurden bereits an verschiedenen Tumorentitäten, wie dem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom oder dem Adenokarzinom des Pankreas getestet, bisher jedoch ohne durchschlagenden Erfolg in Phase III Studien [65].

1.3.4 Fokale Adhäsions-Kinasen

Fokale Adhäsions-Kinasen (FAK) spielen eine Rolle bei der Zellmigration von normalen und Tumorzellen [94]. Sie können durch RTK und Rezeptor-Adhäsionsmoleküle aktiviert werden [63, 95-97]. Im MM beispielsweise wird FAK nach Stimulation mit IGF-1 via ITGB1 und IGF1R aktiviert [98]. Zur Familie der fokalen Adhäsions-Kinasen zählt neben FAK auch Proline rich tyrosine kinase 2 (PYK2). Beide sind Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und sich strukturell sehr ähnlich, sodass bei fehlender FAK Expression PYK2 kompensatorisch vermehrt exprimiert wird [99, 100]. In den hier untersuchten Zelllinien zeigt sich eine verstärkte PYK2-Expression und eine sehr geringe FAK-Expression, wie es auch an primären MM beobachtet wurde [99].

FAK wird speziesübergreifend in fast allen Zellarten exprimiert [101]. Zellinvasion, Zellbeweglichkeit und Zellüberleben werden mittels FAK über verschiedene Signaltransduktionswege reguliert [94, 102-104]. FAK kann über

diese Mechanismen einen Einfluss auf das Wachstum, das Überleben und die Invasivität von Tumoren nehmen [102]. Zudem beeinflusst es über das Mikromilieu die Progression von Tumoren [102]. Darüber hinaus wurde bereits eine funktionelle Wechselwirkung zwischen der fokalen Adhäsions-Kinase FAK und IGF1R beobachtet [105].

PYK2 kommt vor allem in hämatopoetischem und neuronalem Gewebe vor und findet sich insbesondere auf Podozyten und fokalen Adhäsionsstrukturen [91, 106, 107]. Es ist für Zelladhäsion, Zellproliferation, Zellmigration und Zellinvasion verantwortlich [101, 108]. Wie in HMZL und einem MM-Mausmodell gezeigt wurde, spielt es eine entscheidende Rolle in der Onkogen-Regulation und damit der Tumorprogression [99]. Zudem wird vermutet, dass PYK2 nicht nur durch die tumorzelleigene Überexpression, sondern auch über das Milieu des Knochenmarks einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat [99]. MM Zellen, die in Kontakt mit Knochenmarkstammzellen co-kultiviert werden, haben einen klaren Überlebensvorteil [109, 110]. Dieser wird unter anderem durch PYK2 vermittelt, welches durch fokale Adhäsionsstrukturen aktiviert wird, und über den JAK/STAT3 Signalweg das Überleben der Zelle reguliert [109]. Während für FAK und IGF1R bereits eine Wechselwirkung beschrieben wurde, liegen zu der Wechselwirkung von IGF1R und PYK2 noch keine Beobachtungen vor [98].

1.3.5 Vorangegangene Untersuchungen

In der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Leich-Zbat wurde durch „whole exome sequencing“ von primären Patientenproben und HMZL gezeigt, dass sich in nahezu 100 % der MM Mutationen in einem Netzwerk aus Adhäsionsmolekülen, RTK und deren Effektoren anhäufen [54]. Patientinnen und Patienten mit Mutationen in RTK wiesen ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben auf [61]. Die am häufigsten betroffene RTK war IGF1R [61].

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es den Einfluss eines IGF1R-Knockdowns auf die Signalwege PI3K/AKT und Ras/Raf/MEK/ERK sowie die Aktivierung von PYK2 in sechs HMZL zu untersuchen.

Hinweis: Große Teile dieser Arbeit flossen in ein Manuskript ein, das demnächst mit Julia Pickert als Koautorin bei der Fachzeitschrift Cancer Science eingereicht wird. Da das Manuskript zum Zeitpunkt der Einreichung dieser Promotion noch nicht publiziert war, wurde auf Zitate im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

2 Materialien und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
AccuGene Molecular Biology Water	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Acrylamid 30% (37,5:1; 0,8% Bisacrylamid) Rotiporese®	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose MP	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Ammonium persulfate (10%)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Aprotinin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Bovine Serum Albumine	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bradford Reagent	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
destilliertes H₂O (dest. H₂O)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DNA Loading Dye 6x	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
dNTP Mix 2mM	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
DTT	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
ECL Lösung	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
EDTA 0,5 M pH 8,0	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
EGTA pH 8,0	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 100%	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100% absolute	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Gel Loading Dye 6x, lila	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
GelRed	Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycine	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Hepes 1M pH 8,0	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Igepal	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
IL-6	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Iso-Propanol Molecular biology grade	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Materialien und Methoden

Magermilchpulver Bio	Heirler Cenovis, Radolfzell, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl₂)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Lonza, Braine-l'Alleud, Belgien
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
NP-40	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Pefabloc SC	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Taq DNA Polymerase Buffer	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
TEMED	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tris Hydrochlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tris ultrapure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trypan blau, Zellkultur getestet	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tween-20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

2.1.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 2: Lösungen und Puffer

Name	Inhaltsstoffe	Konzentration
1x DNA-Lyse Puffer	Tris-HCl pH 7.6 NaCl MgCl ₂ Igepal Tween-20	10 mM 50 mM 6,25 mM 0,045% 0,45%
1x Laufpuffer	10x Western Blot Puffer SDS	1x 0,1%
2x Lyse Puffer	Hepes pH 8.0 NaCl MgCl ₂ EDTA pH 8.0 EGTA pH 8.0	40 mM 700 mM 2 mM 1 mM 0,2 mM
Lyse Puffer	2x Lyse Puffer PMSF Pefablock Aprotinin	1x 0,6 µg/ml 0,1 mM 1 µg/ml

Materialien und Methoden

	Natriumorthovanadat DTT Igepal	1 mM 0,5% 0,1%
Ponceau S Lösung	Ponceau S Essigsäure	0,1% 5%
4x Probenpuffer	Tris-HCl pH 6.8 SDS Glycerol β-Mercaptoethanol EDTA Bromophenolblau	200 mM 8% 40% 4% 50 mM 0,08 %
1x Sammelgel Puffer pH 6.8	Tris SDS	0,5 M 15 mM
1x Trenngel Puffer pH 8.8	Tris SDS	1,5 M 15 mM
50x TAE	Tris (ultrapure) 0,5 M EDTA pH 8,0 Essigsäure 100% dest. H ₂ O	2 M 0,05 M 5,71%
1x TAE	50x TAE dest. H ₂ O	1x
10x TBS	Tris (ultrapure) NaCl	200 mM 1,37 M
1x TBS-T	10x TBS Tween-20	1x 0,1%
10x Western Blot Puffer	Glycine Tris (ultrapure)	1,92 M 250 mM
1x Western Blot Puffer	10x Western Puffer Methanol SDS	1x 20% 0,1%

2.1.3 Technisches Equipment

Tabelle 3: Technisches Equipment

Produkt	Name	Hersteller
DNA Gelelektrophoresekammer	MIDI-1 Electrophoresis Unit	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Elektroporationskammer	Gene Pulser II	Gene Pulser II, BioRad, München, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Herafreeze HFU 686 Basic	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Gel Dokumentationssystem	Gel Doc XR+	BioRad, München, Deutschland
Hämozytometer	Neubauerkammer, bright-lined	Hartenstein, Würzburg, Deutschland

Materialien und Methoden

Heizblock	Hypex Microsample Incubator	SciGene, Sunnyvale, USA
Heizblock	Thermo Stat plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Inkubator	Hera Cell 150 Heraeus	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte	MR 3001 K	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mikropipette	Eppendorf research	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikropipette	PIPETMAN classic	Gilson, Limburg-Offheim, Deutschland
Mikroskop	Fluovert	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop	Wilovert	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle	NN3256	Panasonic, Hamburg, Deutschland
Minizentrifuge	sproutTM	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Netzgerät	E835	Consort, Bruxelles, Belgien
Netzgerät	Power Pac 200, Bio-Rad	Bio-Rad, München, Deutschland
pH Meter	Inolab pH Level 1	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipettierhilfe	Accu-Jet pipetboy acu	Brand, Wertheim, Deutschland Integra, Biebertal, Deutschland
Protein Gel-Elektrophoresesystem	Mini PROTEAN Tetra System	Bio-Rad, München, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Hera Safe KS12	Thermo Fisher, Darmstadt, Deutschland
Spectrophotometer	Nanodrop ND-1000	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Vakuum Pumpe	KNF Laboport Mini-Membran-Vakuumpumpe N86	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Vortexmischer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage	LC1500	Labor Center, Fürth, Deutschland

Materialien und Methoden

Waage	P1200	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Wasserbad	GFL 1003	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Western Blot Wet Transfer System	PerfectBlue Tank-Elektroblotter	peQLab, Erlangen, Deutschland
Wippschüttler	Platform Mixer	Ratek Instruments Pty Ltd, Boronia, Australien
Zentrifuge	Megafuge 1,0, Heraeus	Thermo Fisher, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge	5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge gekühlt	5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Amersham Hyperfilm ECL	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Autoklavierbare Müllsäcke	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Biosphere SafeSeal Tube 1,5mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere SafeSeal Tube 2,0mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Blotting Papier, mittlere Absorptionsstärke, 0,35mm	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Cellstar Röhrchen, graduiert, 15ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Röhrchen, graduiert, 50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
CyroS 2ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
CyroS 5ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Einwegnadeln, Neobject	Dispomed, Gelnhausen, Deutschland
Einwegspritzen	Dispomed, Gelnhausen, Deutschland
Elektroporationsküvette, 2mm	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Elektroporationsküvette, 4mm	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Filterspitzen, steril	Nerbe Plus, Winsen, Deutschland
Gewebekulturplatte, TC-Plate 6 Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Identitape	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Müllbeutel	Brand, Wertheim, Deutschland

Materialien und Methoden

Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen, weite Öffnung, steril	VWR, Darmstadt, Deutschland
Röhrchen 13ml, atmungsaktiver Deckel	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen 15ml,	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röntgenkassette	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Skalpel	Bayha, Tuttlingen, Deutschland
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	ThermoFisher, Darmstadt, Deutschland
Well Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellheber	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Zellkulturflaschen, Cell Star (50, 250, 550ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	Hartenstein, Würzburg, Deutschland

2.1.5 Software

Tabelle 5: Software

Name	Herkunft
Image J	https://imagej.nih.gov/ij/
Microsoft Office Excel 2013 & 2016	Microsoft
Microsoft Office PowerPoint 2016	Microsoft
Microsoft Office Word 2016	Microsoft

2.1.6 Kits

Tabelle 6: Kits

Name	Hersteller
Venor®GeM OneStep	Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland

2.1.7 Größenmarker

Tabelle 7: Größenmarker

Name	Hersteller
Gene Ruler 100bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, USA
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, USA

2.1.8 Bestandteile der Zellkulturmedien

Tabelle 8: Bestandteile der Zellkulturmedien

Name	Hersteller
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Phosphate buffered Saline	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
FCS, EU Professional	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
L-Glutamine 200mM	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
OptiPrep	Progen, Heidelberg, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin 100U/ml/0,1 mg/ml	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
RPMI-1640	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

2.1.9 Zelllinien

Die HMZL AMO-1, JJN-3, KMS-12-BM und L-363 wurden von der deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSZM, Braunschweig, Deutschland) erworben. KMS11 wurde von der Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) und MM.1S von LGC Biolabs (Wesel, Deutschland) erworben.

Materialien und Methoden

Tabelle 9: Molekulare und zytogenetische Eigenschaften der HMZL

Adaptiert nach Moreaux *et al.* 2012 [111] mit Erlaubnis von der Ferrata Storti Foundation (siehe Appendix) [25, 112-114]

Zelllinie	Krankheitsstadium	Geschlecht	Translokation	Zielgen	CD-45	Molekulare Gruppe
AMO-1	Plasmozytom	F	t (12;14)	unbekannt	+	CD-2L
JJN-3	MM	F	t (14;16)	C-MAF	-/+	MF
KMS-11	MM	F	t (4;14)	MMSET/ FGFR3	-	MS
KMS-12-BM	MM	F	t (11;14)	CCND1	-	CD-2L
L-363	PCL	F	t (20;22)	MafB	-	CD-2L
MM.1S	PCL	F	t (14;16)	C-MAF	-	MF

2.1.10 Antikörper

2.1.10.1 Erstantikörper

Tabelle 10: Erstantikörper

Name	Nummer	Spezies	Größe [KDa]	Hersteller
AKT (C67E7)	#4691S	Rabbit	60	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
Phospho AKT (193H12)	#4058	Rabbit	60	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
GAPDH (D16H11)	#5174	Rabbit	37	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
IGF – I Receptor β (D23H3)	#9750S	Rabbit	95	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
Phospho IGF-I Receptor (Y1135)	#3918S	Rabbit	95	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
p44/42 MAPK (ERK1/2)	#9102	Rabbit	42, 44	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)	#9101	Rabbit	42, 44	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
MEK1/2	#9122S	Rabbit	45	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
Phospho MEK1/2	#9154	Rabbit	45	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
PYK2 (H364)	#3090S	Rabbit	116	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
Phospho PYK2 (Tyr402)	#3291	Rabbit	116	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
Anti-MYC Antibody (Y69)	ab32072	Rabbit	57	Abcam, Camebridge, Großbritannien

2.1.10.2 Zweitantikörper

Tabelle 11: Zweitantikörper

Name	Hersteller
Anti-rabbit IgG HRP linked	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
Anti-mouse IgG HRP linked	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
Peroxidase AffiniPure Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Europe Ltd, Newmarket, Großbritannien

2.1.11 RNA

Als negative Kontroll-RNA wurde die AllStars Negative Control small interfering RNA (siRNA) (Nr. 1027281) von Qiagen, Hilden, Deutschland verwendet.

Tabelle 12: siRNA

Name	Nummer	Sequenz	Hersteller
IGF1R HSS 105253	372675 D07	UCUUCAAGGGCAAUUUGCUCAUUAA	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutsch- land
	372675 D12	UUA AUGAGCAA AUUGCCCUUGAAGA	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutsch- land

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur der HMZL

Die Zelllinien, AMO-1, JJN-3, KMS-11, KMS-12-BM, L-363 und MM.1S, wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Vollmedium RPMI-1640 wurde mit 2 mmol/L L-glutamine, 1mM Natriumpyruvat und 10 % fötalem Kälberserum (FCS) versehen. Das Medium zum Einfrieren der Zellen enthielt 70 % RPMI-1640, 20 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage gesplittet und vor dem Splitten in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Dafür wurden die Zellen bei 800 revolutions per minute (rpm) für 4 min zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in neuem Medium suspendiert. Die Zellen wurden regelmäßig auf Kontamination mit Mykoplasmen überprüft, wofür das VenorGEM One-Step Kit nach Angaben des Herstellers verwendet wurde. Nach 3 Monaten wurden die Zellen verworfen und frische Zellen aufgetaut.

2.2.2 Western Blots

2.2.2.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Mittels einer Neubauer Zählkammer und Trypanblau erfolgte die Zählung der Zellen. Es wurden 1×10^7 Zellen bei 4 °C und 800 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde nach Absaugen des Überstandes in 1 ml Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) gewaschen und erneut bei 4 °C und 800 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das überschüssige PBS wurde verworfen, 500 µl Lysepuffer für 20 min dazugegeben und auf Eis ruhen gelassen. Anschließend wurde bei 4 °C und 13000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und entweder bei -80 °C eingefroren oder sofort für eine Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet.

2.2.2.2 Proteinkonzentrationsmessung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der hergestellten Zelllysate erfolgte mithilfe des Bradford-Assays. Die Lysate wurden 1:20 in H₂O verdünnt und eine bovines Serumalbumin (BSA) Standardreihe angelegt, deren Proteinkonzentration bekannt war. In einer 96-Well-Platte wurden Triplikate, mit je 290 µl Bradfordreagenz und 10 µl Probe, sowie einem Triplikat Negativkontrollen mit 300 µl Bradfordreagenz angelegt. Es erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur (RT) im Dunklen. Danach wurde die Absorption der Proben bei 595 Nanometer Wellenlänge im FLUOstar Omega gemessen und anhand der linearen Funktion der Standardreihe die Konzentration der Proben unter Berücksichtigung ihrer Verdünnung berechnet.

2.2.2.3 Vorbereitung der Zelllysate

40 µg der Zelllysate wurden mit dem 4x Probenpuffer 1:1 versetzt und bei 95 °C für 5 min auf der Heizplatte denaturiert. Sie wurden entweder bei -20 °C gelagert oder sofort für ein SDS-PAGE verwendet.

2.2.2.4 Proteinelektrotransfer

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde verwendet um die Proteine elektrophoretisch nach Größe und Ladung aufzutrennen. Hierfür wurden die vorbereiteten Zelllysate und ein Molekulargewichtsmarker auf ein aus Sammel- und Trenngel bestehendes Polyacrylamidgel (**Tabelle 12**) aufgetragen. Mithilfe des Mini PROTEAN®

Systems von BioRad wurde für 10 min eine Spannung von 90 V angelegt und dann für ca. 70 min eine Spannung von 140 V.

Tabelle 12: Inhaltsstoffe der Sammel- und Trenngele

Sammelgel		Trenngel	
Komponente	Volumen	Komponente	Volumen
Acrylamid (30 %)	700 µl	Acrylamid (30 %)	1,85 ml
APS (10 %)	42 µl	APS (10 %)	93,5 µl
H ₂ O	1,9 ml	H ₂ O	2,3 ml
TEMED	3,5 µl	TEMED	7,7 µl
Sammelgel-Puffer	875 µl	Trenngel-Puffer	1,38 ml

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mithilfe des PerfectBlue Tank Elektroblotters, einem „wet western transfer system“. Das Gel und die Membran wurden, von Blot Papier umschlossen, in die Kassette des Systems geklemmt, in den mit 1x Blotpuffer befüllten Tank gelegt und für 90 min bei 90 V und 400 mA Spannung angelegt. Die erfolgreiche und gleichmäßige Übertragung wurde hinterher durch eine reversible Färbung mit Ponceau S Lösung überprüft.

2.2.2.5 Immunodetektion von Proteinen

Die untersuchten Proteine wurden mithilfe eines proteinspezifischen Erstantikörpers und einem spezifisch an diesen bindenden Zweitantikörper detektiert. Hierfür wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert, je nach Antikörper für 1 h bei RT mit 5 % Milchpulver in Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween (TBS-T) oder 5 % BSA in TBS-T. Die Erstantikörper wurden in der angegebenen Verdünnung (**Tabelle 13**) für ca. 16 h bei 4 °C inkubiert und die Membran anschließend dreimal für 10 min in TBS-T gewaschen. Der entsprechende Zweitantikörper wurde verdünnt (**Tabelle 14**) und die Membran für 1 h bei RT auf einem Wippschüttler inkubiert. Die Membran wurde erneut 3 x für 10 min in TBS-T gewaschen und ECL-Lösung wurde zur Detektion der Proteinsignale mittels Chemolumineszenz hinzugegeben. Es erfolgte eine Detektion der Proteinsignale mit ECL-Hyperfilmen und eine Auswertung mit Image J.

Tabelle 13: Verdünnung der verwendeten Erstantikörper

Antikörper	Verdünnung	Lösung
AKT	1:4000	MP
MYC	1:250000	MP
ERK1/2	1:2000	BSA
GAPDH	1:100000	MP
IGF1R	1:5000	MP
MEK1/2	1:2000	BSA
pAKT_473	1:1000	BSA
pERK1/2	1:5000	BSA
pIGF1R Y1135	1:1000	BSA
pIGF1R Y980	1:1000	BSA
pMEK1/2	1:2000	BSA
pPYK2	1:1000	BSA
PYK2	1:8000	BSA

Tabelle 14: Verdünnung der verwendeten Zweitantikörper

Antikörper	Verdünnung	Lösung
Anti-mouse IgG HRP linked	1:3000	TBS-T
Anti-rabbit IgG HRP linked	1:2000	TBS-T
Peroxidase AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	1:10000	5 % MP in TBS-T

2.2.3 siRNA vermittelter Knockdown von IGF1R

Für den transienten Knockdown wurde eine für IGF1R spezifische siRNA mittels Elektroporation in die HMZL AMO-1, JJN-3, KMS-11, KMS-12-BM, L-363 und MM.1S eingebracht. Das Protokoll von Steinbrunn *et al.* wurde wie folgt verwendet [115]. Es wurden stets eine unbehandelte Negativkontrolle, eine elektroporierte Negativkontrolle und HMZL, die mit scrambled siRNA (scr) transfiziert wurden, als Negativkontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden 24 h vor Beginn der Elektroporation in neues Medium überführt, bestehend aus RPMI-1640, 15 % FCS, 2 mmol/L L-glutamine und Penicillin/Streptomycin. Vor der Elektroporation wurden die Zellen für 4 min bei 800 rpm zentrifugiert, in 40 ml Elektroporationsmedium resuspendiert und mit Trypanblau nach Neubauer in der Zellzählkammer gezählt. Die gesamten Zellen wurden für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, in 15 ml PBS resuspendiert und je 1 ml in die Eppendorf Caps

aliquotiert, sodass pro Elektroporation 6×10^6 Zellen vorhanden waren. Danach wurden die Zellen in den Eppendorf Caps erneut für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Zellpellets in insgesamt 200 μ l mit Medium und der jeweiligen siRNA oder scr Kontrolle in 2 mm Elektroporationsküvetten pipettiert. Diese wurden in die Elektroporationskammer des Gene Pulsers II von BioRad gesetzt und bei 960 μ F eine Zelllinien abhängige Spannung (**Tabelle 15**) angelegt. Anschließend wurden die Zellen direkt mit 500 μ l reinem RPMI-1640 versetzt, für 5 min bei RT inkubiert und über Nacht für 24 h in einer 6-well-Platte mit 7 ml Elektroporationsmedium kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und die Zellpellets je in 3,25 ml Elektroporationsmedium, mit OptiPrep versetzt, resuspendiert. Diese wurden in FACS Falcons pipettiert, mit je 200 μ l PBS überschichtet und für 5 min bei 3500 rpm zentrifugiert, um die toten von den lebendigen Zellen zu trennen. Die lebendigen Zellen wurden vorsichtig abpipettiert und in Elektroporationsmedium gegeben, um erneut für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert zu werden und die Zellpellets in Elektroporationsmedium zu resuspendieren. Die Zellen wurden für Analysen mittels Western Blot verwendet. Der IGF1R-Knockdown wurde in drei biologischen Replikaten untersucht.

Tabelle 15: Zelllinienabhängige Spannung des Elektroporationspulses

Zelllinie	Spannung [Volt]
AMO-1	180
JJN-3	180
KMS-11	190
KMS-12-BM	190
L-363	180
MM.1S	190

2.2.4 Auswertung

Die Western Blots wurden semi-quantitativ und densitometrisch mittels Image J ausgewertet. Die gleichmäßige Beladung des Gesamtproteins auf der Nitrozellulosemembran wurde durch reversibles Anfärben mit Ponceau S Lösung optisch überprüft. Zudem wurde eine Normalisierung mit dem konstitutiv

exprimierten Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Die „scrambled siRNA“ wurde als Kontrolle definiert. Die mit siRNA transfizierten Linien wurden als Probe definiert. Zur besseren Übersicht wurden die mittels Image J ermittelten Werte der „scrambled siRNA“ Kontrolle jeweils künstlich auf 1,0 gesetzt und die korrespondierende mit siRNA transfizierte Probe hierzu ins Verhältnis gesetzt. Diese relative Veränderung der Proteinexpression nach dem IGF1R-Knockdown wurde als „fold change“ angegeben und durch folgende Formel errechnet:

Formel 1

$$fold\ change = \frac{Probe_{normalisiert}}{Kontrolle_{normalisiert}}$$

Der „fold change“ stellt ein relatives Verhältnis dar und ist einheitslos.

3 Ergebnisse

3.1 IGF1R-Expression und IGF1R-Knockdown in verschiedenen HMZL

Die IGF1R-Expression verschiedener HMZL wurde mittels Western Blot auf Proteinebene untersucht (**Abbildung 3**). Die stärkste IGF1R-Expression wurde bei KMS-11 beobachtet, gefolgt von KMS-12-BM und JJN-3. Die schwächste IGF1R-Expression wurde bei AMO-1 verzeichnet.

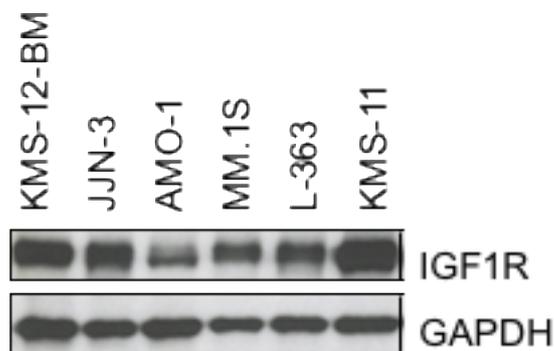


Abbildung 3: IGF1R-Expression in verschiedenen HMZL

Die Expression des IGF1R wurde über mehrere Zelllinien hinweg verglichen mittels Western Blot. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Der siRNA-Knockdown wurde an den HMZL AMO-1, JJN-3, KMS-11, KMS-12-BM, L-363 und MM.1S durchgeführt. Die IGF1R-Expression der unbehandelten Zellen (-/+ Elektroporation) und der mit scrambled siRNA transfizierten Kontrollzellen unterschied sich kaum. Nach IGF1R-Knockdown verringerte sich die IGF1R-Expression in allen untersuchten Zelllinien bereits nach 24h und nochmal deutlicher nach 48h (**Abbildung 4**).

Ergebnisse

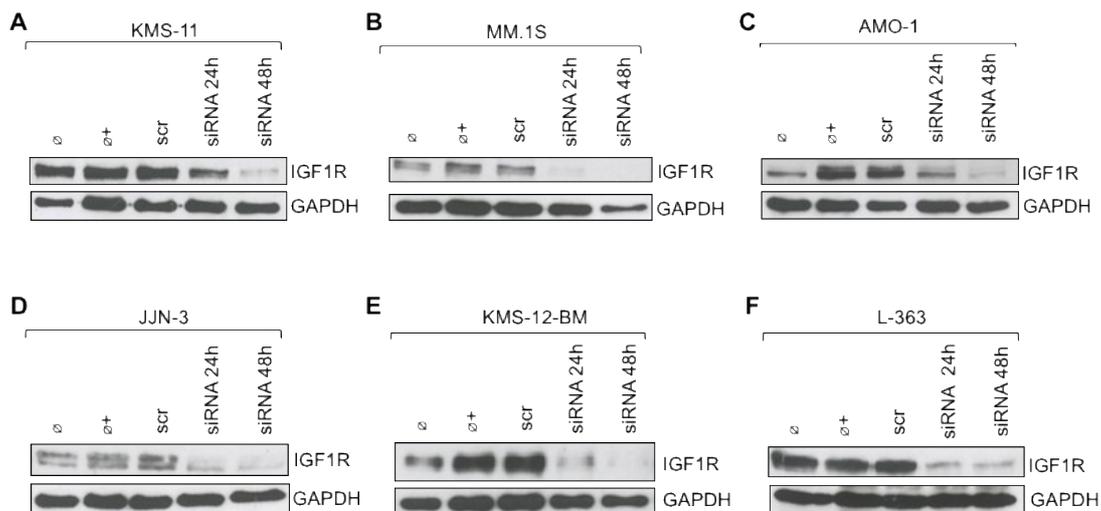


Abbildung 4: Bestimmung der Effizienz des IGF1R-Knockdowns

Darstellung der Abnahme der IGF1R-Expression nach IGF1R-Knockdown in den HMZL KMS-11 (A), MM.1S (B), AMO-1 (C), JJN-3 (D), KMS-12-BM (E) und L-363 (F). Um den Erfolg des Knockdowns zu überprüfen wurden jeweils drei Kontrollen mitgeführt. Eine unbehandelte Kontrolle (Ø), eine Kontrolle die elektroporiert wurde (Ø+) und eine Kontrolle, die sowohl elektroporiert wurde als auch mit scrambled siRNA transfiziert wurde (scr). Bei Elektroporation und Zugabe von IGF1R spezifischer siRNA kam es zu einer deutlichen Abnahme der IGF1R Expression nach 24h (siRNA 24h) und 48h (siRNA 48h). Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

3.2 Einfluss des siRNA vermittelten IGF1R-Knockdowns auf IGF1R und nachgeschaltete Effektoren

Nach erfolgreichem IGF1R-Knockdown an sechs HMZL wurde der Einfluss auf nachgeschaltete RTK Effektoren wie z.B. AKT, ERK, MEK, MYC und PYK2 mittels Western Blot Analyse untersucht. Die Untersuchung erfolgte 24 h nach siRNA Transfektion. Anhand von drei biologischen Replikaten und einer semi-quantitativ Auswertung konnte der „fold change“ der Proteinkonzentration angegeben werden (**Formel 1**). Der „fold change“ gibt die relative Veränderung der Proteinexpression im Verhältnis zur Kontrolle an. Für ein besseres Leseverständnis wurde die „scrambled siRNA“ Kontrolle durch sich selbst geteilt und damit artifizuell auf den Wert 1,000 gesetzt. Somit können Leserinnen und Leser auf einen Blick erkennen um welches Verhältnis sich die jeweilige Proteinexpression der untersuchten Zelllinie nach dem IGF1R-Knockdown geändert hat. MYC konnte aufgrund von Überbelichtung und diffuser Banden nur optisch ausgewertet werden, der „fold change“ konnte nicht berechnet werden.

3.2.1 Der siRNA vermittelte Knockdown von IGF1R führt zu einer Abnahme der IGF1R-Expression und dessen Aktivierung in allen HMZL

Die Expression von IGF1R nahm nach dem IGF1R-Knockdown in allen Zelllinien sehr deutlich ab, so dass optisch außer für die Zelllinien KMS-11 und KMS-12-BM keine IGF1R-Expression mehr detektiert werden konnte (**Abbildung 5, Tabelle 16, Abbildung 6**). Die IGF1R-Expression der Zelllinie L-363 wurde am deutlichsten im ersten und zweiten Versuch reduziert. Im dritten Versuch konnte die stärkste Abnahme der IGF1R-Expression für die Linie KMS-12-BM beobachtet werden. Dagegen war die geringste Reduktion der IGF1R-Expression in allen drei Versuchen für KMS-11 zu verzeichnen.

Auch die Menge an aktiviertem IGF1R verringerte sich nach dem IGF1R-Knockdown in allen Zelllinien deutlich. Besonders sichtbar war die Abnahme von pIGF1R in MM.1S im ersten Versuch, in JJN-3 und L-363 im zweiten Versuch und in KMS-12-BM im dritten Versuch. Bei KMS-12-BM war im zweiten Versuch die geringste Abnahme von pIGF1R nach dem IGF1R-Knockdown zu verzeichnen. Allerdings konnten im ersten Versuch bei der Zelllinie JJN-3 keine Banden auf dem Gel detektiert werden, so dass eine Berechnung des „fold change“ nicht möglich war. Auch bei KMS-12-BM konnte der erste Versuch aufgrund eines verschmierten Gels rechnerisch nicht bewertet werden, optisch ergibt sich jedoch eine Reduktion von pIGF1R nach IGF1R-Knockdown. Im zweiten Versuch konnte aufgrund einer diffusen und überbelichteten Bande der Zelllinie KMS-11 keine Berechnung des „fold change“ erfolgen, optisch ergab sich keine Reduktion von pIGF1R nach IGF1R- Knockdown.

Ergebnisse

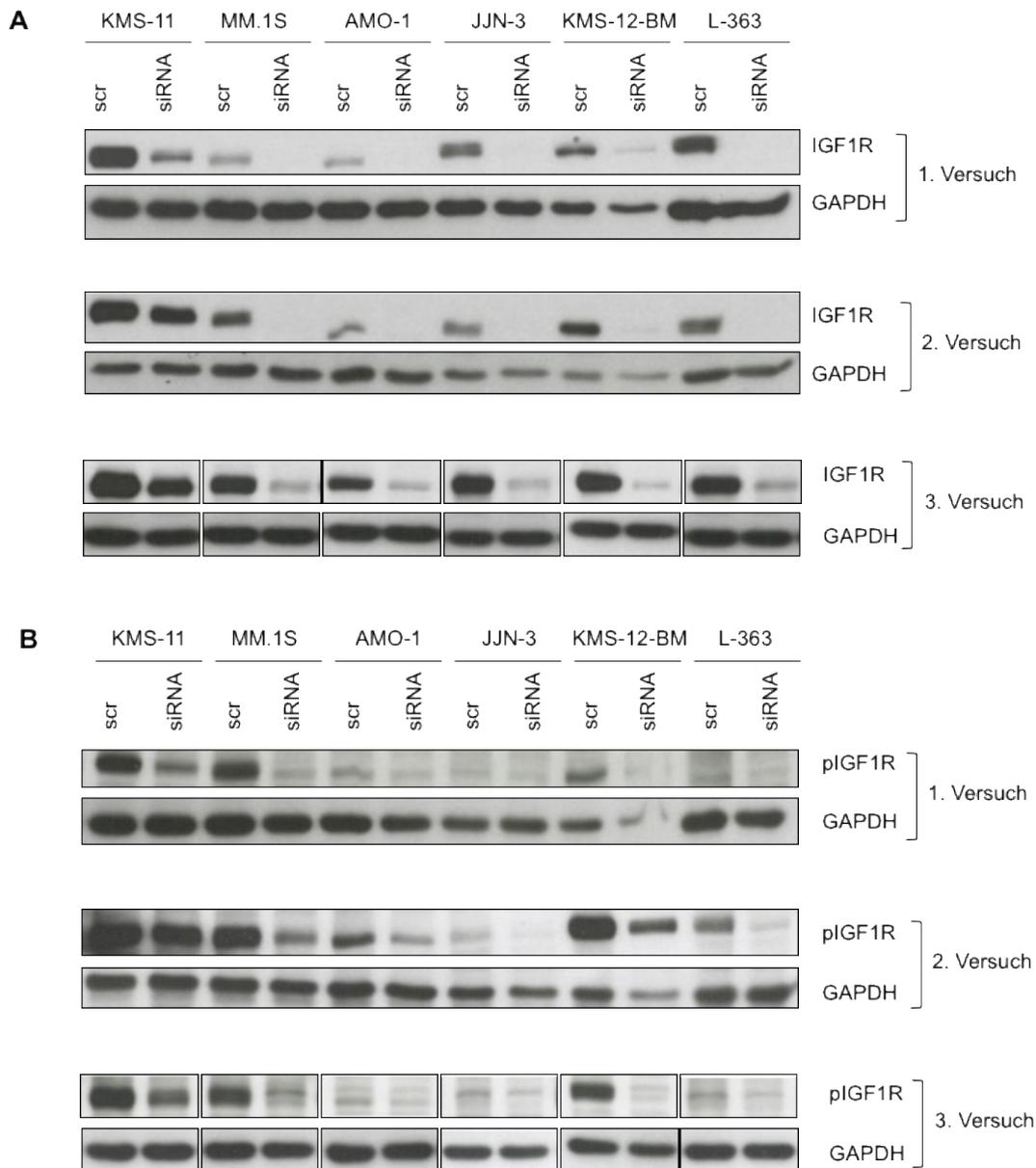


Abbildung 5: Einfluss des siRNA vermittelten IGF1R-Knockdowns auf die Expression (A) und Aktivierung (B) von IGF1R

Western Blot Analyse der sechs HMZL (AMO-1, JJN-3, KMS-11, KMS-12-BM, L-363 und MM.1S) nach IGF1R-Knockdown (siRNA) im Vergleich zur scrambled siRNA Kontrolle (scr). Die Membranen wurden über Nacht mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Im dritten Versuch wurden die Western Blots aufgrund einer geänderten Reihenfolge der Zelllinien für das bessere Verständnis des Lesers zerschnitten. Die Original Western Blots finden sich im Appendix (**S_Abbildung 16**).

Ergebnisse

Tabelle 16: Expression und Aktivierung von IGF1R nach IGF1R-Knockdown

Zelllinie	Protein	Kontrolle	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
KMS-11	IGF1R	1,000	0,312	0,782	0,827
	pIGF1R	1,000	0,426	n.a.	0,453
MM.1S	IGF1R	1,000	0,059	0,024	0,220
	pIGF1R	1,000	0,128	0,497	0,553
AMO-1	IGF1R	1,000	0,052	0,053	0,210
	pIGF1R	1,000	0,600	0,477	0,436
JJN-3	IGF1R	1,000	0,056	0,050	0,184
	pIGF1R	1,000	n.a.	0,129	0,463
KMS-12-BM	IGF1R	1,000	0,135	0,043	0,087
	pIGF1R	1,000	n.a.	0,853	0,132
L-363	IGF1R	1,000	0,014	0,015	0,255
	pIGF1R	1,000	0,596	0,095	0,326

Die Änderung der Proteinexpression nach dem IGF1R-Knockdown wurde mithilfe des „fold change“ (**Formel 1**), unter Berücksichtigung des mitgeführten Housekeepers GAPDH, berechnet. n.a.: nicht auswertbar. Bei pIGF1R im zweiten Versuch war aufgrund einer diffusen und überbelichteten Bande der Zelllinie KMS-11 keine Berechnung möglich. Auch bei KMS-12-BM konnte der erste Versuch aufgrund eines verschmierten Gels rechnerisch nicht bewertet werden. Die pAKT Banden war im ersten Versuch sowohl zu schwach als auch zu diffus um den „fold change“ berechnen zu können.

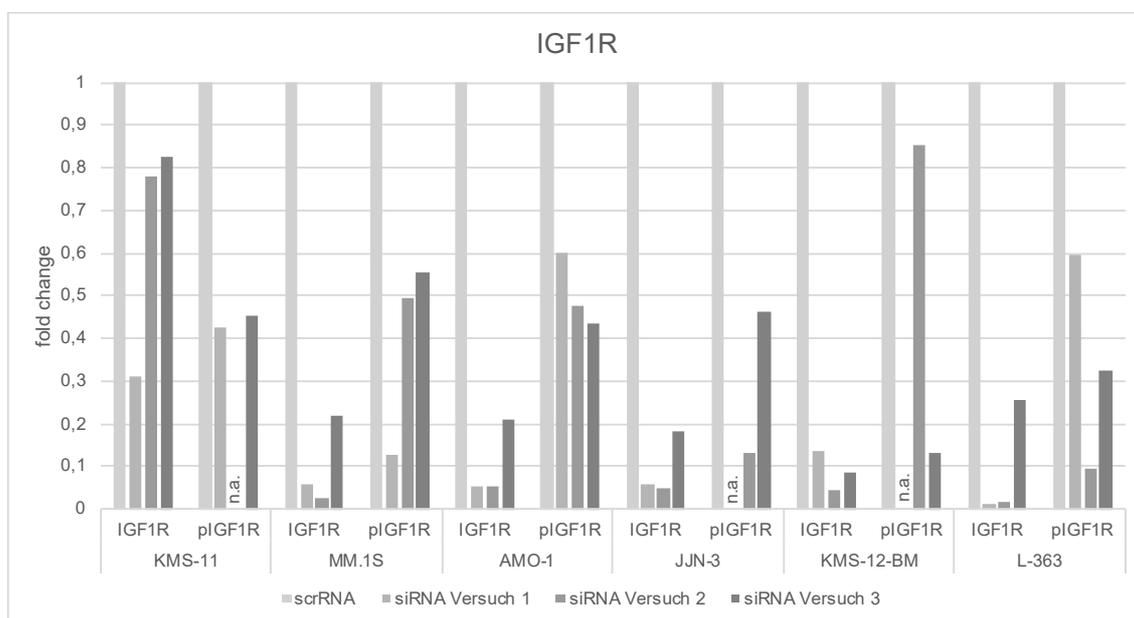


Abbildung 6: Vergleich der relativen Veränderung der Proteinexpression- und Aktivierung von IGF1R in verschiedenen Zelllinien nach IGF1R-Knockdown

Die relative Veränderung der Proteinexpression von IGF1R (IGF1R) und Proteinaktivierung von IGF1R (pIGF1R) nach IGF1R-Knockdown wurde als „fold change“ für die Zelllinien AMO-1, JJN-3, KMS-11, KMS-12-BM, L-363 und MM.1S dargestellt. Die Kontrolle (scrRNA) aller drei Versuche wurde zur besseren Übersicht nur einmal dargestellt, da der Wert immer auf 1,000 gesetzt wurde. Der „fold change“ konnte für folgende Versuche nicht ausgewertet werden (n.a.) und wurde daher im Diagramm nicht dargestellt: Zweiter Versuch der Zelllinie KMS-11 bei

Ergebnisse

pIGF1R, erster Versuch der Zelllinie JJN-3 bei pIGF1R und erster Versuch der Zelllinie KMS-12-BM bei pIGF1R.

3.2.2 Der Knockdown von IGF1R führt zu einer Abnahme der AKT-Expression und dessen Aktivierung in allen HMZL

Nach IGF1R-Knockdown konnte eine Reduktion der AKT-Expression in fast allen Versuchen beobachtet werden (**Abbildung 7, Tabelle 17, Abbildung 8**). Insbesondere die Zelllinien AMO-1 und KMS-12-BM zeigten eine deutliche Abnahme nach IGF1R-Knockdown. Im zweiten Versuch lag ein starkes Ungleichgewicht bei der Ladekontrolle von AMO-1 vor, jedoch änderte sich die AKT-Expression nach IGF1R-Knockdown in dieser Runde nicht. Bei der Linie KMS-12-BM nahm der „fold change“ nach dem IGF1R-Knockdown im zweiten Versuch aufgrund einer zu geringen Beladung des Housekeepers zu, auch wenn optisch eine Reduktion der AKT-Expression beobachtet wurde.

Die Menge an aktiviertem AKT nahm nach dem IGF1R-Knockdown in allen Zelllinien deutlich ab. Dabei war die stärkste Reduktion von pAKT für die Zelllinien AMO-1, JJN-3 und im dritten Versuch auch für KMS-12-BM zu verzeichnen. Der erste und zweite Versuch der Linie KMS-12-BM konnten aufgrund zu schwacher Banden nicht ausgewertet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass IGF1R in allen HMZL von Bedeutung für die Aktivierung von AKT ist.

Ergebnisse

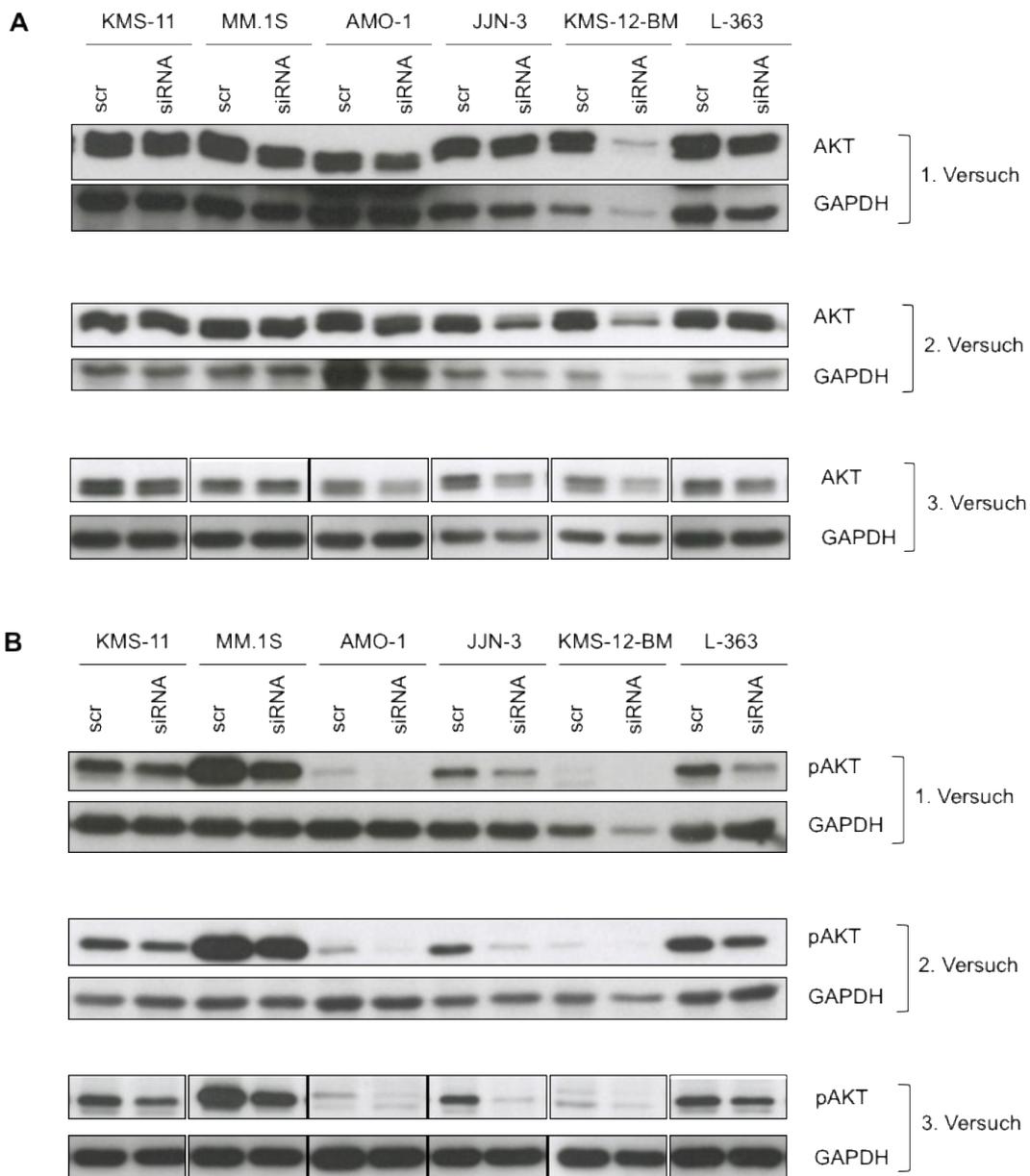


Abbildung 7: Einfluss des siRNA vermittelten IGF1R-Knockdowns auf die Expression (A) und Aktivierung (B) von AKT

Western Blot Analyse der sechs HMZL (AMO-1, JJN-3, KMS-11, KMS-12-BM, L-363 und MM.1S) nach IGF1R-Knockdown (siRNA) im Vergleich zur scrambled siRNA Kontrolle (scr). Die Membranen wurden über Nacht mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Im dritten Versuch wurden die Western Blots aufgrund einer geänderten Reihenfolge der Zelllinien für das bessere Verständnis des Lesers zerschnitten. Die Original Western Blots finden sich im Appendix (**S_Abbildung 16**).

Ergebnisse

Tabelle 17 Expression und Aktivierung von AKT nach IGF1R-Knockdown

Zelllinie	Protein	Kontrolle	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
KMS-11	AKT	1,000	1,063	0,962	0,843
	pAKT	1,000	0,777	0,673	0,566
MM.1S	AKT	1,000	0,817	0,861	0,921
	pAKT	1,000	0,706	0,870	0,723
AMO-1	AKT	1,000	0,668	0,918	0,577
	pAKT	1,000	0,203	0,165	0,436
JJN-3	AKT	1,000	0,893	0,720	0,802
	pAKT	1,000	0,460	0,148	0,112
KMS-12-BM	AKT	1,000	0,608	1,592	0,602
	pAKT	1,000	n.a.	n.a.	0,207
L-363	AKT	1,000	0,745	0,862	0,814
	pAKT	1,000	0,297	0,514	0,684

Die Änderung der Proteinexpression nach dem IGF1R-Knockdown wurde mithilfe des „fold change“ (**Formel 1**), unter Berücksichtigung des mitgeführten Housekeepers GAPDH, berechnet. n.a.: nicht auswertbar. Im ersten und zweiten Versuch waren die pAKT Banden zu schwach, sodass keine Berechnung des „fold change“ erfolgen konnte.

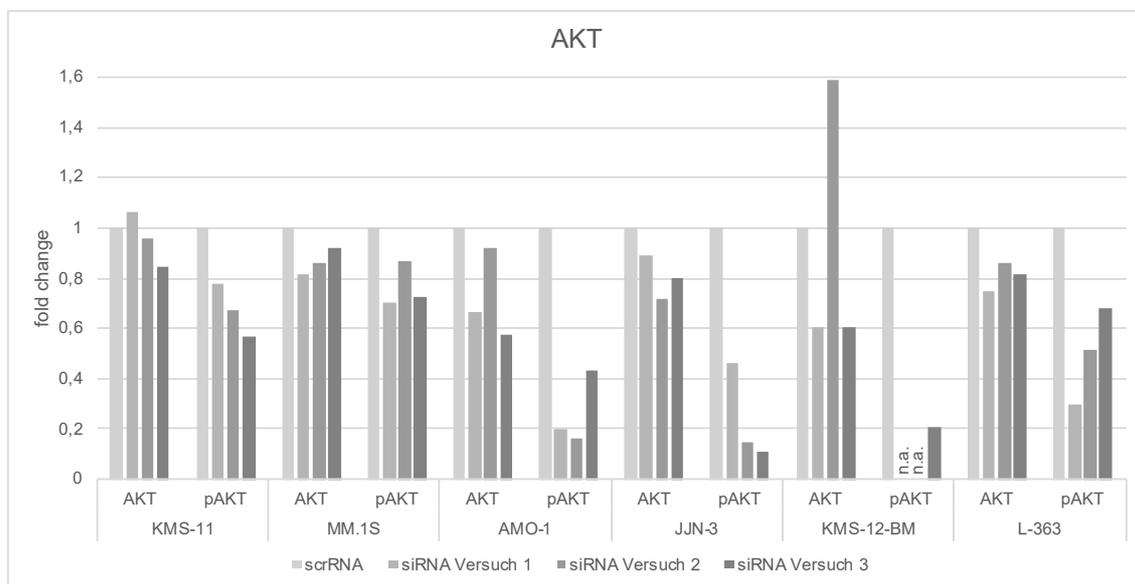


Abbildung 8: Vergleich der relativen Veränderung der Proteinexpression- und Aktivierung von AKT in verschiedenen Zelllinien nach IGF1R-Knockdown

Die relative Veränderung der Proteinexpression von AKT (AKT) und Proteinaktivierung von AKT (pAKT) nach IGF1R-Knockdown wurde als „fold change“ für die Zelllinien AMO-1, JJN-3, KMS-11, KMS-12-BM, L-363 und MM.1S dargestellt. Die Kontrolle (scrRNA) aller drei Versuche wurde zur besseren Übersicht nur einmal dargestellt, da der Wert immer auf 1,000 gesetzt wurde. Der „fold change“ konnte für folgende Versuche nicht ausgewertet werden (n.a.) und

wurde daher im Diagramm nicht dargestellt: Erster und zweiter Versuch der Zelllinie KMS-12-BM bei pAKT.

3.2.3 Der Knockdown von IGF1R hat einen heterogenen Effekt auf die Expression und Aktivierung von ERK

Der IGF1R-Knockdown führte ausschließlich in den Zelllinien AMO-1 und KMS-12-BM zu einer deutlich reduzierten Expression von ERK in drei unabhängigen Versuchen (**Abbildung 9, Tabelle 18, Abbildung 10**). Dabei nahm die ERK-Expression in der Zelllinie L-363 nur im ersten Versuch deutlich ab. Dementgegen zeigte sich bei KMS-11 nach IGF1R-Knockdown ein Anstieg ERK-Expression im zweiten Versuch, ansonsten blieb die ERK-Expression dieser Zelllinie weitestgehend unbeeinflusst.

Obwohl die Expression von ERK nach IGF1R-Knockdown in L-363 nur in einem Versuch deutlich abnahm und in MM.1S und JJN-3 überwiegend unbeeinflusst blieb, kam es in diesen Linien nach IGF1R-Knockdown in drei unabhängigen Versuchen zu einer deutlichen Abnahme von pERK. Im Gegensatz hierzu war in AMO-1 und KMS-11 keine deutliche Reduktion von pERK nach IGF1R-Knockdown erkennbar. Für die Zelllinie KMS-12-BM konnte keine pERK Bande detektiert werden, wodurch eine Auswertung nicht möglich war. Der Housekeeper GAPDH war bei AMO-1 im zweiten Versuch überbelichtet, die Menge an pERK nahm weder optisch noch rechnerisch deutlich ab. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass ein Knockdown von IGF1R die Expression und Aktivierung von ERK in einigen Linien beeinflusst, aber insgesamt einen sehr unterschiedlichen Effekt in den einzelnen HMZL hat.

Ergebnisse

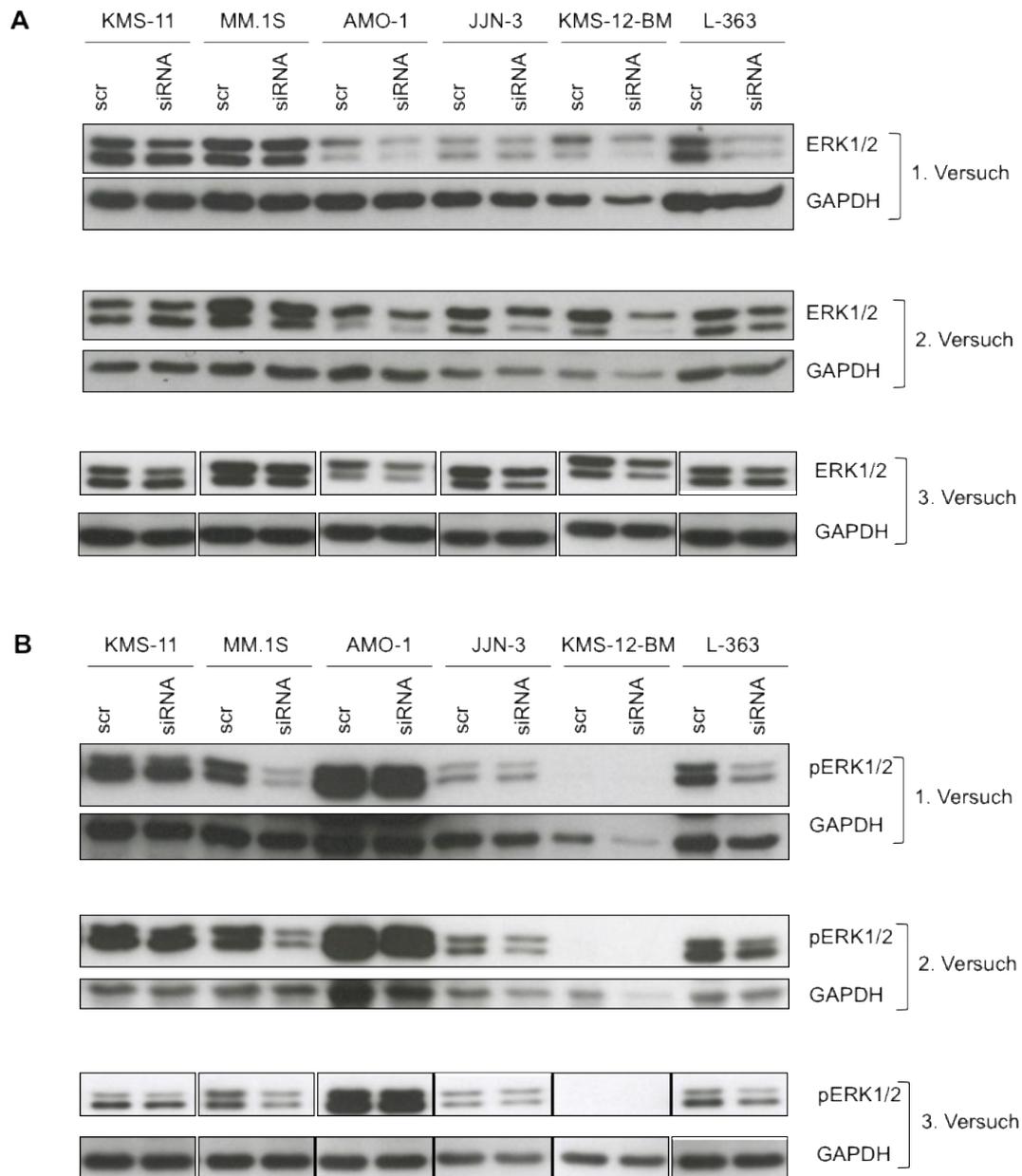


Abbildung 9: Einfluss des siRNA vermittelten IGF1R-Knockdowns auf die Expression (A) und Aktivierung (B) von ERK1/2

Western Blot Analyse der sechs HMZL (AMO-1, JJN-3, KMS-11, KMS-12-BM, L-363 und MM.1S) nach IGF1R-Knockdown (siRNA) im Vergleich zur scrambled siRNA Kontrolle (scr). Die Membranen wurden über Nacht mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Im dritten Versuch wurden die Western Blots aufgrund einer geänderten Reihenfolge der Zelllinien für das bessere Verständnis des Lesers zerschnitten. Die Original Western Blots finden sich im Appendix (**S_Abbildung 16**).

Ergebnisse

Tabelle 18 Expression und Aktivierung von ERK1/2 nach IGF1R-Knockdown

Zelllinie	Protein	Kontrolle	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
KMS-11	ERK1/2	1,000	0,846	1,277	0,983
	pERK1/2	1,000	0,965	0,857	0,749
MM.1S	ERK1/2	1,000	1,003	0,790	0,928
	pERK1/2	1,000	0,350	0,471	0,407
AMO-1	ERK1/2	1,000	0,449	0,769	0,707
	pERK1/2	1,000	0,876	0,998	0,948
JJN-3	ERK1/2	1,000	0,935	0,778	0,756
	pERK1/2	1,000	0,594	0,613	0,745
KMS-12-BM	ERK1/2	1,000	0,734	0,503	0,646
	pERK1/2	1,000	n.a.	n.a.	n.a.
L-363	ERK1/2	1,000	0,328	0,809	0,923
	pERK1/2	1,000	0,369	0,686	0,636

Die Änderung der Proteinexpression nach dem IGF1R-Knockdown wurde mithilfe des „fold change“ (**Formel 1**), unter Berücksichtigung des mitgeführten Housekeepers GAPDH, berechnet. n.a.: nicht auswertbar. Bei KMS-12-BM konnte in keinem der Versuche pERK1/2 Banden detektiert werden, so dass keine Auswertung erfolgen konnte.

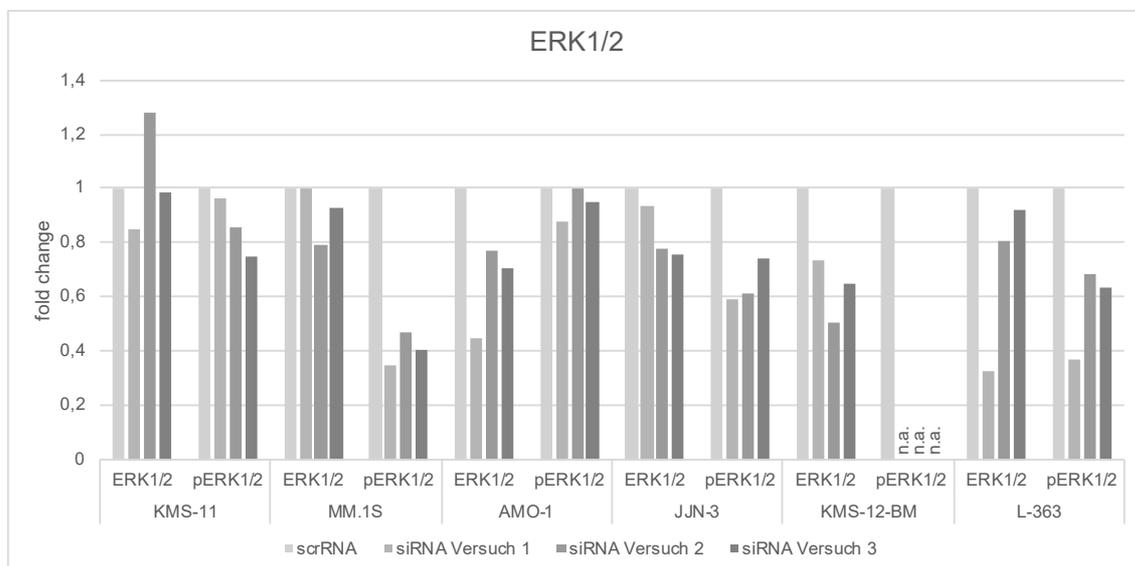


Abbildung 10: Vergleich der relativen Veränderung der Proteinexpression- und Aktivierung von ERK1/2 in verschiedenen Zelllinien nach IGF1R-Knockdown

Die relative Veränderung der Proteinexpression von ERK1/2 (ERK1/2) und Proteinaktivierung von ERK1/2 (pERK1/2) nach IGF1R-Knockdown wurde als „fold change“ für die Zelllinien AMO-1, JJN-3, KMS-11, KMS-12-BM, L-363 und MM.1S dargestellt. Die Kontrolle (scrRNA) aller drei Versuche wurde zur besseren Übersicht nur einmal dargestellt, da der Wert immer auf 1,000 gesetzt wurde. Der „fold change“ konnte für folgende Versuche nicht ausgewertet werden (n.a.)

und wurde daher im Diagramm nicht dargestellt: Alle drei Versuche und die Kontrolle der Zelllinie KMS-12-BM bei pERK1/2.

3.2.4 Der Knockdown von IGF1R führt in etwa der Hälfte der HMZL zu einer Abnahme in der Expression und Aktivierung von MEK

Der IGF1R-Knockdown führte in fünf der sechs Zelllinien in mindestens einem Versuch zu einer reduzierten MEK-Expression. Dabei konnte für die Zelllinien AMO-1 und KMS-12-BM im zweiten und dritten Versuch sogar eine deutliche Abnahme der MEK-Expression beobachtet werden (**Abbildung 11, Tabelle 19, Abbildung 12**). Allerdings war die MEK-Expression von AMO-1 und KMS-12-BM beim ersten Versuch nicht ausreichend nachweisbar, um den Effekt des IGF1R-Knockdowns rechnerisch oder optisch bewerten zu können.

Die Menge an aktiviertem MEK verringerte sich nach dem IGF1R-Knockdown in den Zelllinien JJN-3 und MM1.S in allen drei Versuchen, bei L-363 nur in den ersten beiden Versuchen, jedoch weniger deutlich als bei pERK. Für AMO-1 konnte im zweiten Versuch eine deutliche Reduktion von pMEK verzeichnet werden. Dagegen waren im ersten und dritten Versuch die Banden bei AMO-1 sehr schwach, so dass eine Berechnung der Abnahme nach IGF1R-Knockdown nicht möglich war. Ebenfalls war für KMS-11 im ersten Versuch eine leichte Reduktion von pMEK nach dem IGF1R-Knockdown zu beobachten, die sich im zweiten und dritten Versuch jedoch nicht bestätigte. Für die Zelllinie KMS-12-BM war aufgrund zu schwacher Banden in allen Versuchen keine Berechnung der Intensitäten möglich. Insgesamt führt dies zu der Annahme, dass ein Knockdown von IGF1R in etwa der Hälfte der HMZL einen Einfluss auf die Expression und die Aktivierung von MEK hat.

Ergebnisse

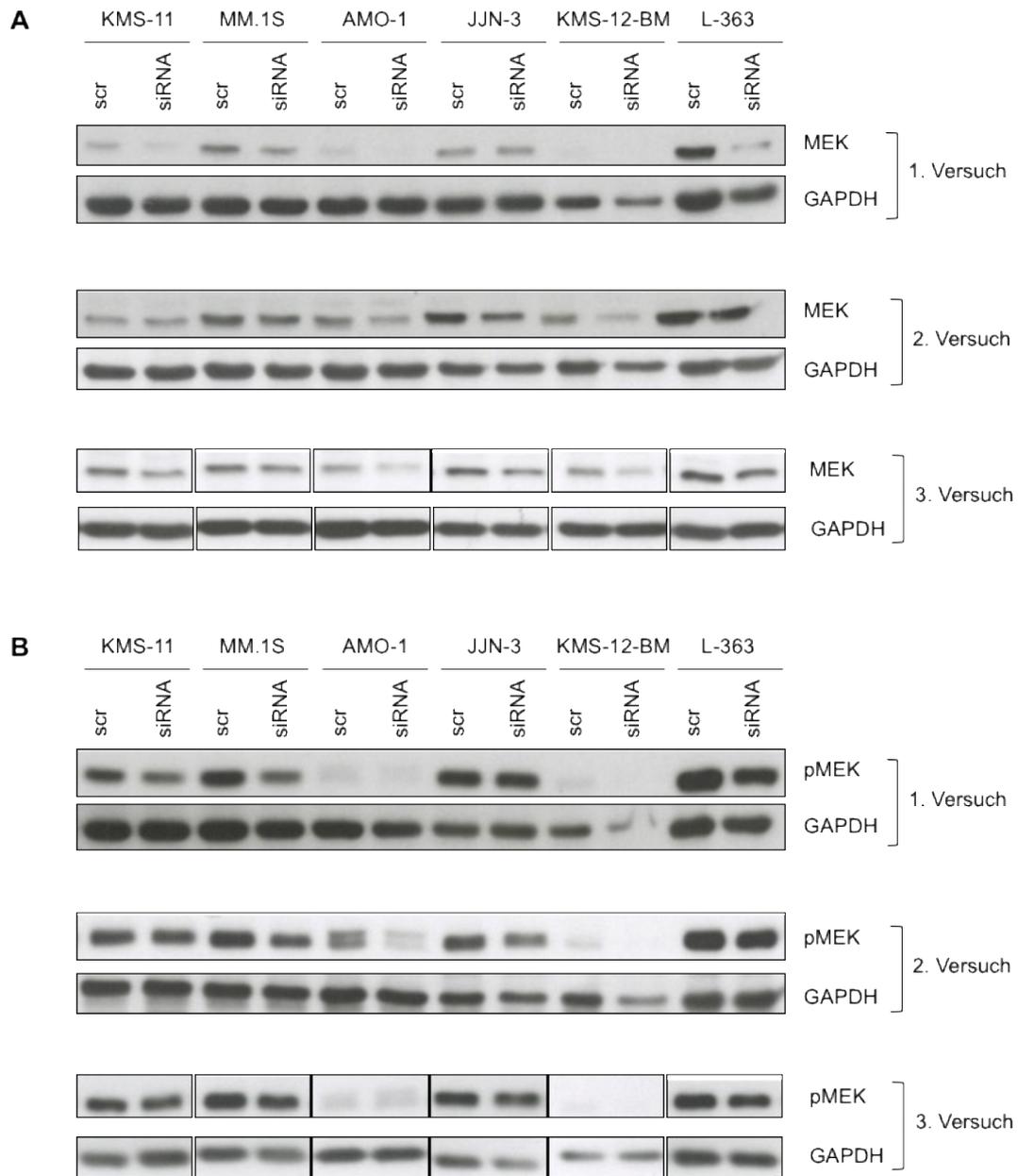


Abbildung 11: Einfluss des siRNA vermittelten IGF1R-Knockdowns auf die Expression (A) und Aktivierung (B) von MEK

Western Blot Analyse der sechs HMZL (AMO-1, JJN-3, KMS-11, KMS-12-BM, L-363 und MM.1S) nach IGF1R-Knockdown (siRNA) im Vergleich zur scrambled siRNA Kontrolle (scr). Die Membranen wurden über Nacht mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Im dritten Versuch wurden die Western Blots aufgrund einer geänderten Reihenfolge der Zelllinien für das bessere Verständnis des Lesers zerschnitten. Die Original Western Blots finden sich im Appendix (**S_Abbildung 16**).

Ergebnisse

Tabelle 19: Expression und Aktivierung von MEK nach IGF1R-Knockdown

Zelllinie	Protein	Kontrolle	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
KMS-11	MEK	1,000	0,347	0,864	0,644
	pMEK	1,000	0,682	1,034	0,989
MM.1S	MEK	1,000	0,531	0,837	0,799
	pMEK	1,000	0,635	0,765	0,833
AMO-1	MEK	1,000	n.a.	0,491	0,369
	pMEK	1,000	n.a.	0,398	n.a.
JJN-3	MEK	1,000	1,058	0,701	0,724
	pMEK	1,000	0,865	0,721	0,754
KMS-12-BM	MEK	1,000	n.a.	0,529	0,502
	pMEK	1,000	n.a.	n.a.	n.a.
L-363	MEK	1,000	0,179	0,833	0,869
	pMEK	1,000	0,776	0,792	1,064

Die Änderung der Proteinexpression nach dem IGF1R-Knockdown wurde mithilfe des „fold change“ (**Formel 1**), unter Berücksichtigung des mitgeführten Housekeepers GAPDH, berechnet. n.a.: nicht auswertbar. Im ersten Versuch konnte aufgrund sehr schwacher Banden bei AMO-1 und KMS-12-BM rechnerisch keine Auswertung der Änderung der MEK-Expression erfolgen. Für pMEK konnte aufgrund sehr schwacher Banden weder für AMO-1 im ersten und dritten Versuch noch für KMS-12-BM in allen drei Versuchen eine Berechnung erfolgen.

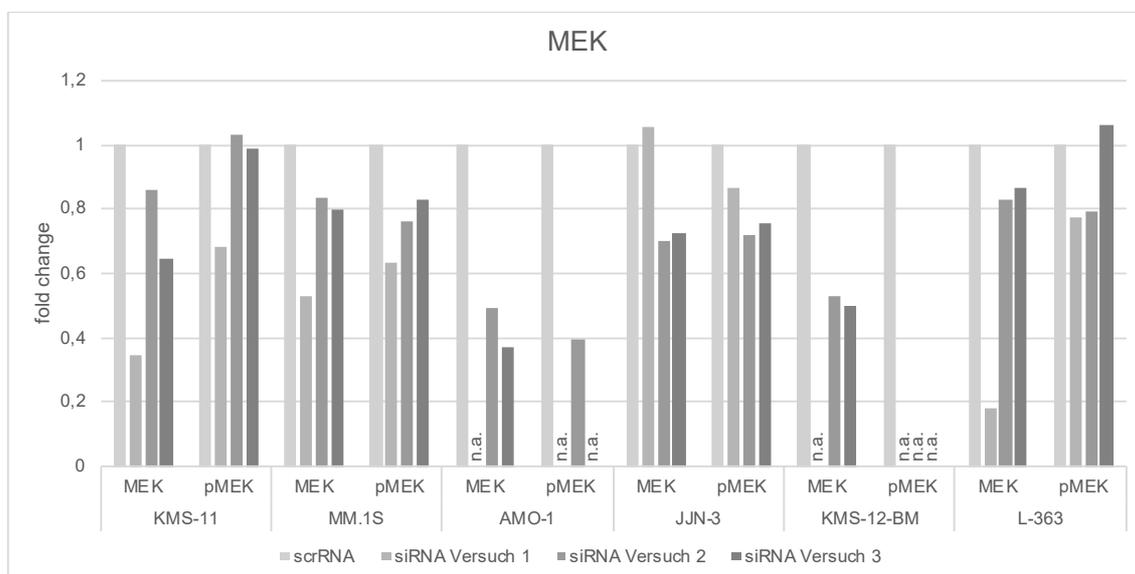


Abbildung 12: Vergleich der relativen Veränderung der Proteinexpression- und Aktivierung von MEK in verschiedenen Zelllinien nach IGF1R-Knockdown

Die relative Veränderung der Proteinexpression von MEK (MEK) und Proteinaktivierung von MEK (pMEK) nach IGF1R-Knockdown wurde als „fold change“ für die Zelllinien AMO-1, JJN-3, KMS-11, KMS-12-BM, L-363 und MM.1S dargestellt. Die Kontrolle (scrRNA) aller drei Versuche wurde zur besseren Übersicht nur einmal dargestellt, da der Wert immer auf 1,000 gesetzt

Ergebnisse

wurde. Der „fold change“ konnte für folgende Versuche nicht ausgewertet werden (n.a.) und wurde daher im Diagramm nicht dargestellt: Erster Versuch der Zelllinie AMO-1 bei MEK, erster und dritter Versuch der Zelllinie AMO-1 bei pMEK, erster Versuch der Zelllinie KMS-12-BM bei MEK und alle drei Versuche inklusive der Kontrolle der Zelllinie KMS-12-BM bei pMEK.

3.2.5 Der Knockdown von IGF1R hat in HMZL nur wenig Einfluss auf die MYC Expression

Die Expression von MYC war in allen drei Versuchen in den untersuchten Zelllinien stark ausgeprägt (**Abbildung 13**), sodass aufgrund der überbelichteten Western Blots nur eine optische Auswertung erfolgen konnte. Nach dem IGF1R-Knockdown zeigte sich bei der Zelllinie KMS-12-BM optisch eine deutliche Reduktion der MYC-Expression in allen drei Versuchen, jedoch fiel optisch auch eine Reduktion des Housekeepers GAPDH im ersten und zweiten Versuch auf. Bei JJN-3 konnte im zweiten und dritten Versuch eine Abnahme der MYC-Expression beobachtet werden, nicht jedoch im ersten Versuch. Darüber hinaus nahm die MYC-Expression der Linien L-363 und MM.1S im ersten Versuch ab, jedoch fiel bei L-363 wie auch schon bei KMS-12-BM eine Reduktion des Housekeepers in der siRNA-Probe auf. Des Weiteren zeigte sich bei den Zelllinien AMO-1 und KMS-11 keine Änderung der MYC-Expression nach IGF1R-Knockdown, allerdings waren die Western Blots überbelichtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Knockdown von IGF1R in HMZL (z.B. JJN-3, KMS-12-BM und MM.1S) wenig oder keinen Einfluss auf die MYC-Expression hat.

Ergebnisse

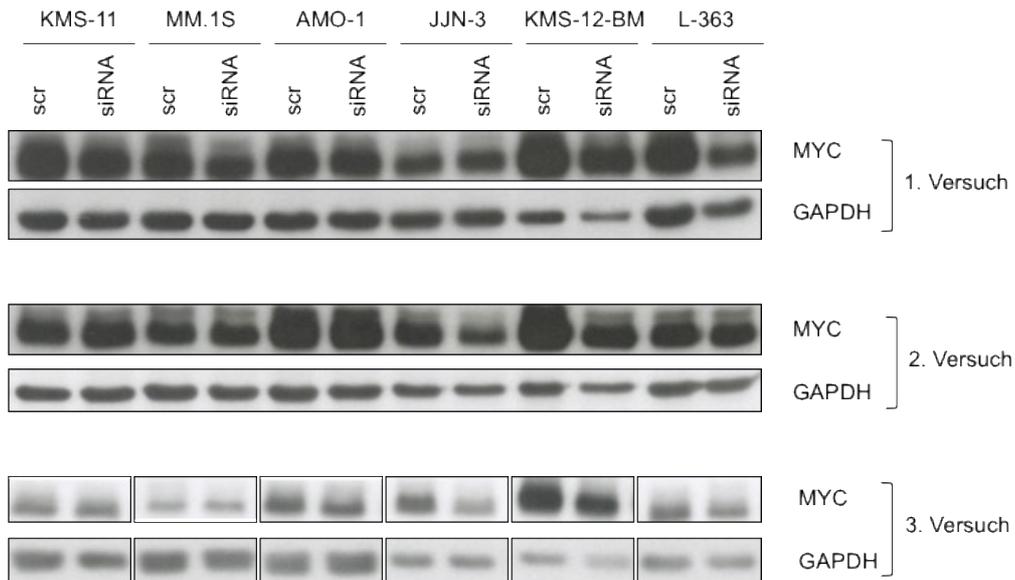


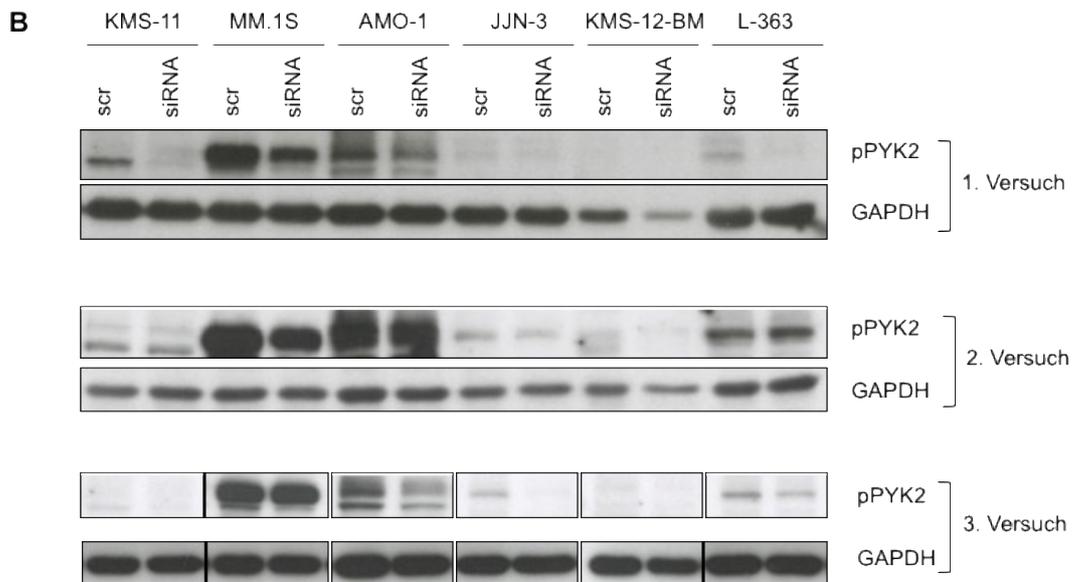
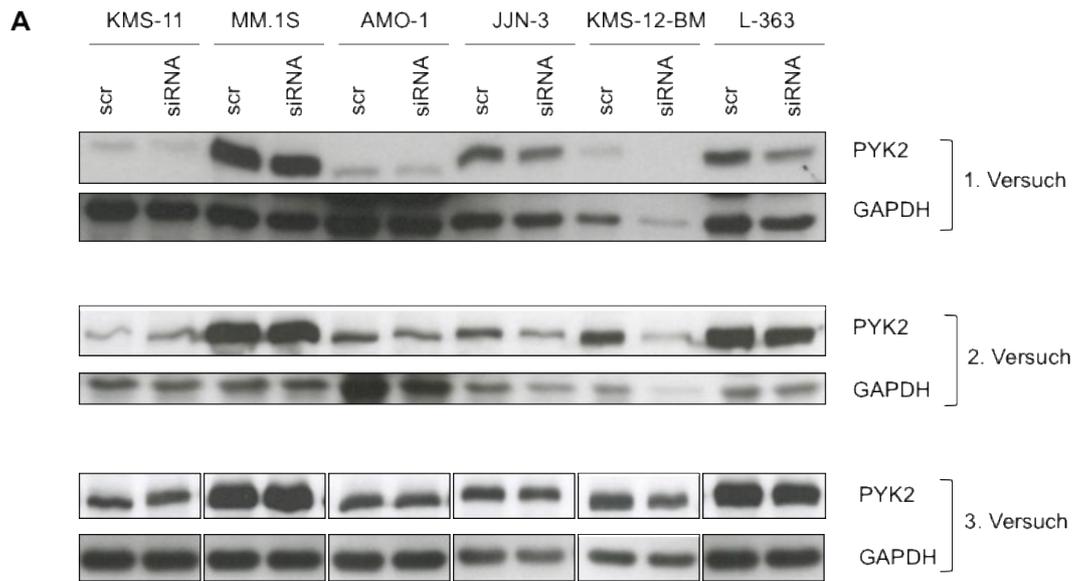
Abbildung 13: Einfluss des siRNA vermittelten IGF1R-Knockdowns auf die Expression von MYC

Western Blot Analyse der sechs HMZL (AMO-1, JJN-3, KMS-11, KMS-12-BM, L-363 und MM.1S) nach IGF1R-Knockdown (siRNA) im Vergleich zur scrambled siRNA Kontrolle (scr). Die Membranen wurden über Nacht mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Im dritten Versuch wurden die Western Blots aufgrund einer geänderten Reihenfolge der Zelllinien für das bessere Verständnis des Lesers zerschnitten. Die Original Western Blots finden sich im Appendix (**S_Abbildung 16**).

3.2.6 Der Knockdown von IGF1R hat einen deutlichen Einfluss auf die Aktivierung von PYK2

Der IGF1R-Knockdown hatte zwischen den Zelllinien, aber auch innerhalb einer Zelllinie einen sehr heterogenen Effekt auf die Expression von PKY2 (

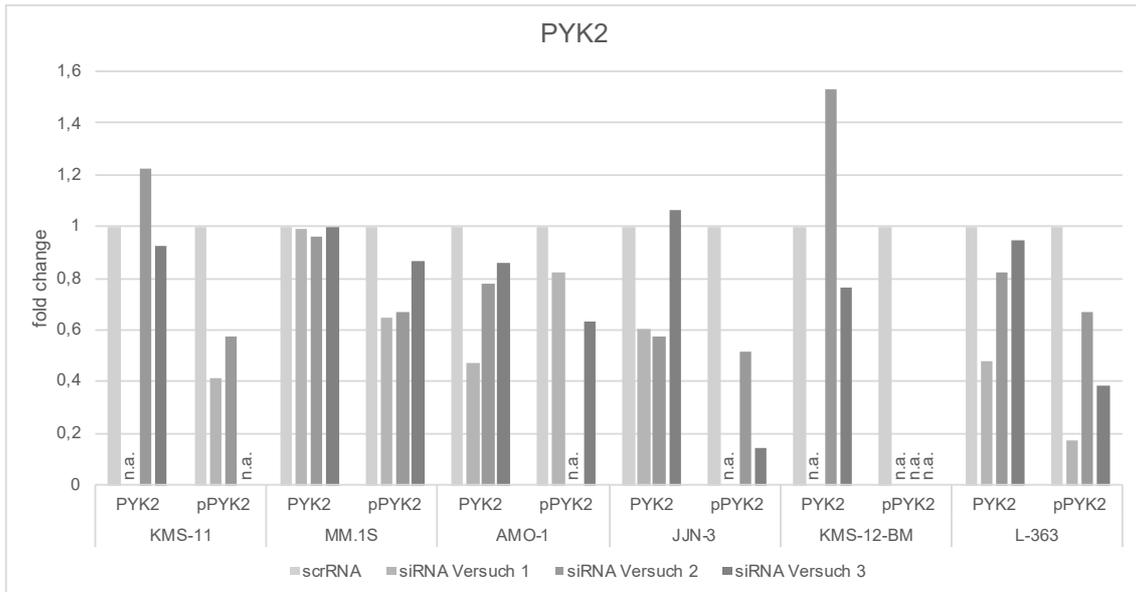
Ergebnisse



Tabelle

20,

Ergebnisse



). Eine deutliche Reduktion der PYK2-Expression konnte jeweils im ersten Versuch für AMO-1 und L-363 verzeichnet werden. In den anderen Versuchen war für diese Zelllinien eine geringe bis mäßige Abnahme in der PYK2-Expression zu beobachten. Auch in der Linie JLN-3 war im ersten und zweiten Versuch eine deutliche Abnahme wahrzunehmen, während sich im dritten Versuch keine wesentliche Änderung der PYK2-Expression zeigte. Bei der Linie KMS-12-BM nahm der „fold change“ nach dem IGF1R-Knockdown im zweiten Versuch aufgrund einer zu geringen Beladung des Housekeepers GAPDH deutlich zu, auch wenn optisch eine Abnahme der PYK2-Expression beobachtet wurde. Die Expression von PYK2 war in den Zelllinien KMS-11 und KMS-12-BM im ersten Versuch bereits vor dem Knockdown sehr niedrig und die Bande daher so schwach, dass eine Reduktion der PYK2-Expression rechnerisch nicht bewertet werden konnte.

Die Menge an aktiviertem PYK2 verringerte sich nach dem IGF1R-Knockdown in den Zelllinien JLN-3, KMS-11, L-363 und MM.1S in mindestens zwei der Versuche deutlich. Auch bei AMO-1 war eine deutliche Reduktion von pPYK2 nach IGF1R-Knockdown in einem der Versuche zu verzeichnen. Allerdings war für die Zelllinien AMO-1, JLN-3 und KMS-11 jeweils ein Versuch aufgrund zu schwacher pPYK2 Banden nicht auswertbar. Zudem konnte in keinem der Versuche für KSM12BM eine pPYK2 Bande nachgewiesen werden, wodurch

Ergebnisse

weder eine rechnerische noch eine optische Auswertung möglich war. Zusammenfassend hat der IGF1R-Knockdown einen geringen und heterogenen Einfluss auf die Expression von PYK2, aber in allen Zelllinien mit nachweisbarer pPYK2 Bande in mindestens zwei von drei Runden einen deutlichen Einfluss auf die Aktivierung von PYK2.

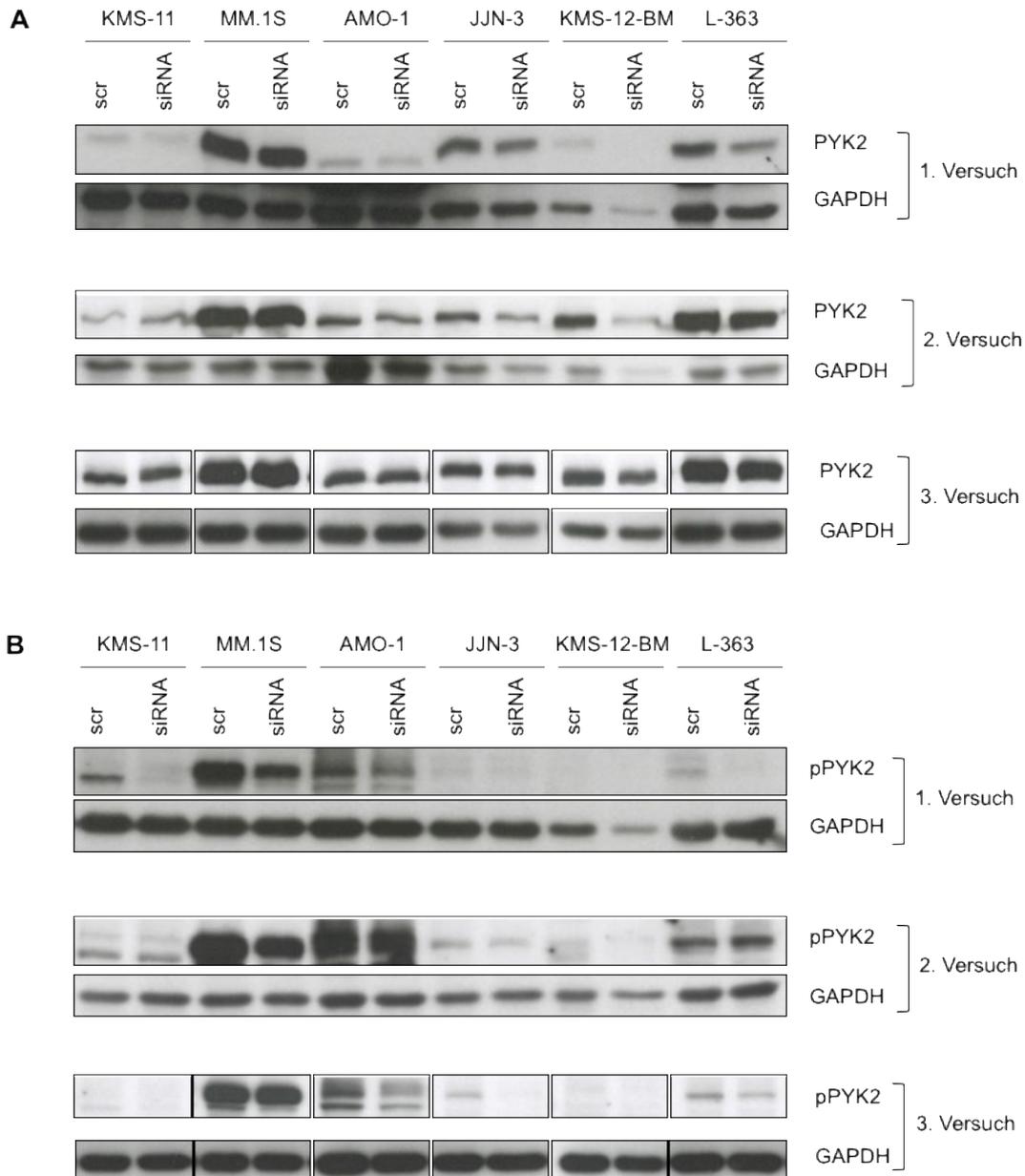


Abbildung 14: Einfluss des siRNA vermittelten IGF1R-Knockdowns auf die Expression (A) und Aktivierung (B) von PYK2

Western Blot Analyse der sechs HMZL (AMO-1, JJN-3, KMS-11, KMS-12-BM, L-363 und MM.1S) nach IGF1R-Knockdown (siRNA) im Vergleich zur scrambled siRNA Kontrolle (scr). Die Membranen wurden über Nacht mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Im dritten Versuch wurden die Western Blots aufgrund einer

Ergebnisse

geänderten Reihenfolge der Zelllinien für das bessere Verständnis des Lesers zerschnitten. Die Original Western Blots finden sich im Appendix (**S_Abbildung 16**).

Tabelle 20: Expression und Aktivierung von PYK2 nach IGF1R-Knockdown

Zelllinie	Protein	Kontrolle	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
KMS-11	PYK2	1,000	n.a.	1,221	0,925
	pPYK2	1,000	0,416	0,572	n.a.
MM.1S	PYK2	1,000	0,993	0,960	0,997
	pPYK2	1,000	0,647	0,666	0,869
AMO-1	PYK2	1,000	0,473	0,778	0,861
	pPYK2	1,000	0,821	n.a.	0,631
JJN-3	PYK2	1,000	0,604	0,578	1,064
	pPYK2	1,000	n.a.	0,515	0,140
KMS-12-BM	PYK2	1,000	n.a.	1,535	0,764
	pPYK2	1,000	n.a.	n.a.	n.a.
L-363	PYK2	1,000	0,477	0,822	0,947
	pPYK2	1,000	0,174	0,672	0,382

Die Änderung der Proteinexpression nach dem IGF1R-Knockdown wurde mithilfe des „fold change“ (**Formel 1**), unter Berücksichtigung des mitgeführten Housekeepers GAPDH, berechnet. n.a.: nicht auswertbar. Im ersten Versuch war aufgrund von schwachen Banden bei den Zelllinien KMS-11 und KMS-12-BM keine Berechnung der Änderung der PYK2-Expression möglich. Auch für pPYK2 konnte aufgrund von schwachen Banden bei JJN-3 im ersten Versuch, bei KMS-11 im dritten Versuch und bei KMS-12-BM in allen drei Versuchen keine rechnerische Auswertung erfolgen. Bei AMO-1 waren die pPYK2 Banden im zweiten Versuch überbelichtet und der „fold change“ konnte nicht berechnet werden.

Ergebnisse

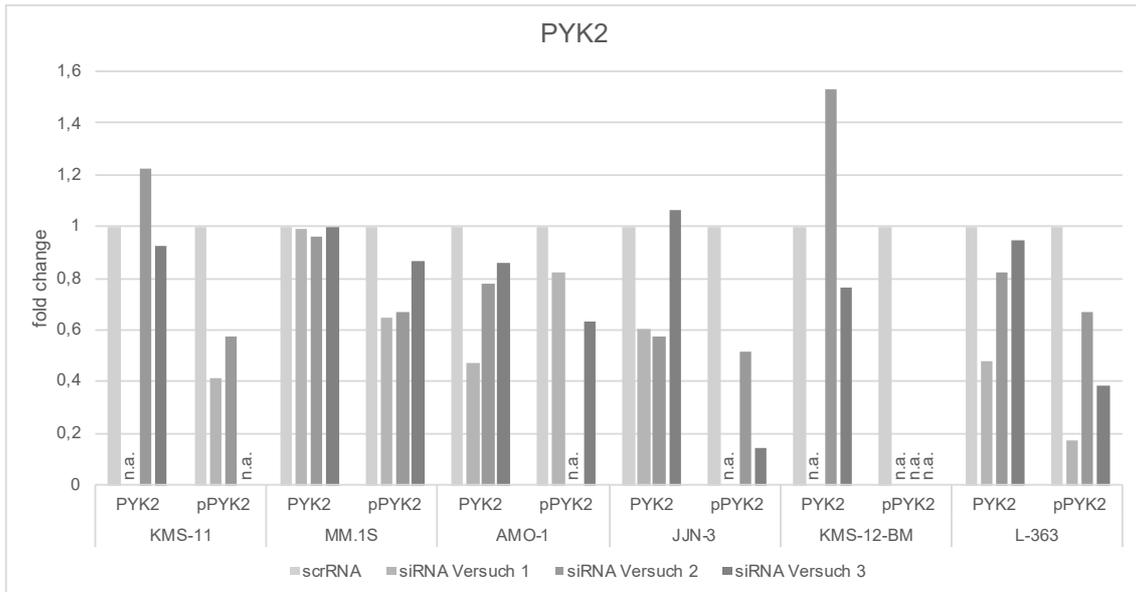


Abbildung 15: Vergleich der relativen Veränderung der Proteinexpression- und Aktivierung von PYK2 in verschiedenen Zelllinien nach IGF1R-Knockdown

Die relative Veränderung der Proteinexpression von PYK2 (PYK2) und Proteinaktivierung von PYK2 (pPYK2) nach IGF1R-Knockdown wurde als „fold change“ für die Zelllinien AMO-1, JJN-3, KMS-11, KMS-12-BM, L-363 und MM.1S dargestellt. Die Kontrolle (scrRNA) aller drei Versuche wurde zur besseren Übersicht nur einmal dargestellt, da der Wert immer auf 1,000 gesetzt wurde. Der „fold change“ konnte für folgende Versuche nicht ausgewertet werden (n.a.) und wurde daher im Diagramm nicht dargestellt: Erster Versuch der Zelllinie KMS-11 bei PYK2, dritter Versuch der Zelllinie KMS-11 bei pPYK2, zweiter Versuch der Zelllinie AMO-1 bei pPYK2, erster Versuch der Zelllinie JJN-3 bei pPYK2, erster Versuch der Zelllinie KMS-12-BM bei PYK2 und alle drei Versuche inklusive der Kontrolle der Zelllinie KMS-12-BM bei pPYK2.

4 Diskussion

4.1 Die AKT-Aktivierung wird in HMZL durch den IGF1R-Knockdown reduziert

Die Suche nach effektiven Therapien für das MM wird durch die genetische Heterogenität der Erkrankung erschwert [35]. Krankheitsprogression und therapeutische Maßnahmen erhöhen die klonale Konkurrenz unter den verschiedenen Tumorzellsubpopulationen und fördern die Entstehung von multiplen, klonalen Subgruppen, deren relative Häufigkeit im Krankheitsverlauf fluktuiert [116, 117]. Man nimmt an, dass besonders Patientinnen und Patienten mit einer zytogenetischen Hochrisikokonstellation von einer Kombinationstherapie aller bei ihnen existierenden Subklone profitieren würden [117].

Um die genetische Heterogenität des MM in unseren funktionellen Untersuchungen zu berücksichtigen, wurden sechs verschiedene HMZL ausgewählt. Drei der Zelllinien stammen von Patientinnen mit MM ab, zwei von Plasmazelleukämiepatientinnen und eine Zelllinie von einer Plasmazytompantin [111]. Gemäß der "Updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Guidelines 2013" wurden Patientinnen und Patienten mit gewissen strukturellen Chromosomenaberrationen anhand ihres klinischen Verlaufs in drei Risikokategorien eingeteilt [118]. Zu den Hochrisikotranslokationen zählt unter anderem t(14;16), welche auch bei JJN-3 und MM.1S vorliegt [111, 118]. Dagegen liegt ein intermediäres Risiko bei der Patientin von der die Linie KMS-11 mit t(4;14) stammt vor und ein Standardrisiko bei den Patientinnen mit den Linien AMO-1 mit t(12;14) und KMS-12-BM mit t(11;14) vor [111, 113, 118]. L-363 wurde aus dem MM einer Plasmazelleukämiepatientin generiert, was im Kontext einer Primärerkrankung ebenfalls als ein Hochrisikoparamter gilt, [24, 25].

Diskussion

Darüber hinaus definierten Moreaux *et al.* anhand der molekularen und zytogenetischen Besonderheiten der verschiedenen HMLZ sechs unterschiedliche Subgruppen, von denen drei durch die in dieser Arbeit untersuchten HMZL repräsentiert werden [111]. Auch diese Klassifikation stützt sich auf Gene und Translokationen, die auch heute noch in der Risikostratifizierung des klinischen Verlaufs und zur Prognose des MM verwendet werden [3, 14, 119].

Es wurden insbesondere Interleukin-6 (IL-6) unabhängige HMZL (L-363, MM.1S, KMS12-BM, KMS-11) ausgewählt, die nur selten CD45 exprimieren [111, 114]. CD45 negative HMZL werden laut Literatur, im Gegensatz zu CD45-positiven HMZL (JJN-3, AMO-1) die sich überwiegend von IL-6 stimulieren lassen, durch IGF-1 und weitere Wachstumsfaktoren zur Koloniebildung angeregt [114, 120].

IGF1R wird in MM mit schlechter Prognose häufig überexprimiert und stellt somit einen interessanten therapeutischen Angriffspunkt dar [121, 122]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der IGF1R-Knockdown in allen sechs Zelllinien nach 24 Stunden eine sichtbare Reduktion der Expression und der Aktivierung von IGF1R zur Folge hatte und auch, dass sich diese darüber hinaus bei der Mehrheit der HMZL nicht wesentlich änderte, wenn sie nach 48 Stunden untersucht wurden. Alle IGF1R-Knockdown Experimente wurden nach 24 Stunden ausgewertet. Dabei ist die noch relevante Expression und Aktivierung des IGF1R nach IGF1R-Knockdown der Zelllinie KMS-11 möglicherweise auf die starke IGF1R-Expression und die limitierende Menge an siRNA zurückzuführen.

Für die exemplarische Untersuchung des PI3K/AKT Signalwegs wurde AKT ausgewählt. Der PI3K/AKT Signalweg wird im MM unter anderem durch den Wachstumsfaktor IGF-1 aktiviert, welcher über den IGF1R auf die Zelle wirkt [123, 124]. Die Aktivierung von AKT über den PI3K/AKT Signalweg vermittelt anti-apoptotische Signale und wird in fortgeschrittenen Krankheitsstadien häufig beobachtet, wohingegen sie im MGUS selten detektierbar ist [57, 124]. CD45 negative HMZL weisen ein höheres Level an AKT-Aktivierung auf als CD45

positive HMZL [125]. Darüber hinaus wurden AKT-unabhängige und AKT-abhängige Myelom Subgruppen entdeckt, wobei letztere Plasmazellen sich CD45 negativ präsentierten [58, 125]. Die AKT-abhängigen Plasmazellen (z.B. MM.1S) reagierten bei AKT-Knockdown sowie bei pharmakologischer AKT-Inhibition mit Apoptose, wohingegen die CD45 positiven Zelllinien, wie auch AMO-1, überwiegend unbeeinflusst blieben [58]. In dieser Arbeit wurde eine deutliche Reduktion der AKT-Aktivierung nach dem IGF1R-Knockdown in allen untersuchten HMZL unabhängig von ihrem CD-45 Phänotyp (**Tabelle 9**) beobachtet. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer bereits publizierten Untersuchung von Kuhn *et al.* an zwei weiteren HMZL, OPM2 und RPMI8226, bei der sowohl der „small molecule“ Inhibitor Picropodophyllin als auch ein IGF1R-Knockdown mittels short hairpin RNA (shRNA) eine Verringerung der AKT-Aktivierung in diesen beiden Zelllinien zur Folge hatte [62].

Die AKT-Expression von KMS12BM nahm in einem der Versuche nach dem IGF1R-Knockdown aufgrund einer zu geringen Beladung des Housekeepers GAPDH deutlich zu. Die Auswertung mit Image J ist bei sehr schwachen oder diffusen Banden nicht immer hinreichend möglich. In einzelnen Fällen ist daher eine präzise Auswertung nicht möglich gewesen.

Interessanterweise nahm die AKT-Aktivierung nach IGF1R-Knockdown auch bei der CD45 positiven HMZL AMO-1 ab. Die Inhibierung des IGF1R könnte somit ein möglicher Ansatz sein mittels RTK Inhibitoren auch in AKT-unabhängigen Subgruppen in den PI3K/AKT Signalweg einzugreifen und zu untersuchen ob dies zur vermehrten Apoptose führt.

4.2 Der Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg wird vor allem in den PCL HMZL L-363 UND MM.1S durch den IGF1R-Knockdown beeinflusst

Der Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg spielt eine wichtige Rolle im menschlichen Körper und wirkt auf Zellmigration, Zellproliferation, Angiogenese und das

Diskussion

Überleben der Zelle ein [126]. Addiert man K-Ras und N-Ras Mutationen, ist Ras das am häufigsten mutierte Gen im MM [126]. In mehreren Studien hat sich bestätigt, dass RAS Mutationen im MM mit einer Aktivierung von ERK1/2 assoziiert werden [127-129].

Nach dem IGF1R-Knockdown nahm sowohl die ERK1/2-Expression als auch die MEK-Expression in den Zelllinien AMO-1 und KMS-12-BM deutlich ab. Des Weiteren verringerte sich die Aktivierung von ERK1/2 und MEK bei den HMZL JJN-3, L-363 und MM.1S deutlich nach dem IGF1R-Knockdown. JJN-3 und MM.1S weisen beide die Translokation t(14;16) auf, die im Primär-MM eine zytogenetische Hochrisikokonstellation darstellt [113]. Sowohl L-363 als auch MM.1S stammen von Patientinnen mit PCL, die im Primär-MM ebenfalls als Hochrisikoerkrankung anzusehen ist [25, 111]. Der IGF1R-Knockdown hatte bei L-363 und MM.1S nicht nur den deutlichsten Effekt auf den Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg, sondern zudem auch einen Effekt auf den PI3K-AKT Signalweg. Es bedarf weiterer Untersuchungen mit verschiedenen PCL Zelllinien, um mögliche molekulare Subgruppen zu identifizieren. Bislang sind für Patientinnen und Patienten mit primärer PCL sowie sekundärer PCL wenige erfolgversprechende Therapieansätze vorhanden und das mediane Gesamtüberleben beträgt weniger als ein Jahr [130, 131].

Bei AMO-1 liegt eine KRAS Mutation vor, die wie bereits in der Literatur beschrieben, mit einer starken Aktivierung von ERK1/2 einher geht [128]. Eine Abnahme der ERK1/2-Aktivierung nach dem IGF1R-Knockdown konnte bei AMO-1 nicht verzeichnet werden, jedoch könnte eine geringfügige Änderung durch sehr stark ausgeprägte Banden maskiert worden sein. Nach IGF1R-Knockdown nahm die Aktivierung von MEK bei der Zelllinie AMO-1 deutlich ab, jedoch war hier nur einer der drei Versuche auswertbar. Weitere Untersuchungen sind notwendig um den Einfluss des IGF1R-Knockdowns auf den Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg in dieser Zelllinie besser bewerten zu können.

Zusammenfassend hat der IGF1R-Knockdown vor allem einen Einfluss auf den Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg der PCL Zelllinien L-363 und MM.1S, sowie auf die Zelllinie JJN-3 mit der Hochrisikotranslokation t(14;16).

4.3 Die MYC-Expression wird durch den IGF1R Knockdown in HMZL nur wenig beeinflusst

RAS Mutationen und strukturelle Genomvarianten des MYC zählen zu den sekundären genetischen Ereignissen in der Pathogenese des MM [39, 45]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der IGF1R-Knockdown Einfluss auf den Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg nimmt. Des Weiteren wird MYC von vielen weiteren Effektoren wie z.B. dem PI3K/AKT Signalweg beeinflusst [132]. Da es als Transkriptionsfaktor großen Einfluss auf Proliferation, Apoptose, Transkription und Translation sowie weitere zelluläre Funktionen hat, wurde der Effekt des IGF1R-Knockdowns auf die MYC Expression untersucht [133-137].

Insgesamt zeigten die hier untersuchten HMZL eine starke Expression von MYC, wie sie in der Literatur bereits beschrieben wurde [138]. Die Proteinbanden waren durchweg überbelichtet und zu diffus, so dass eine genaue rechnerische Bestimmung nicht möglich war und eine Wiederholung mit einer geringeren Proteinmenge nötig wäre, um Unterschiede besser sehen und messen zu können. Einer optischen Beurteilung nach führte der IGF1R-Knockdown in der Zelllinie JJN-3 zu einer Reduktion der MYC-Expression in zwei von drei Versuchen. Bei KMS-12-BM kam es in allen drei Knockdown-Experimenten zu einer Abnahme der MYC-Expression. Da es in zwei von drei Versuchen auch zu einer deutlichen Abnahme in der Expression des Housekeepers GAPDH kam, könnte es sich aber entweder um einen toxischen Nebeneffekt oder um einen Beladungsfehler handeln.

KMS-12-BM exprimierte MYC von den untersuchten HMZL am stärksten, wies aber im Vergleich nur eine sehr niedrige, optisch nicht sicher bewertbare und somit auch rechnerisch nicht messbare Aktivierung von AKT, ERK1/2, MEK und

PYK2 auf. Weitere Experimente könnten Aufschluss darüber geben, ob auch hier eine Reduktion der Aktivierung der Proteine stattfindet.

In den anderen HMZL kam es durch den IGF1R-Knockdown zu keiner optisch beurteilbaren Änderung in der MYC-Expression, was somit früheren und teilweise auch eigenen Untersuchungen widerspricht [99]. Diese Beobachtung unterstreicht die molekulare Heterogenität im MM, die man bei seinen Untersuchungen berücksichtigen sollte.

4.4 Der IGF1R-Knockdown führt im MM konstant zu einer reduzierten Aktivierung von PYK2

PYK2 ist im MM sowohl für das Überleben der Zelle als auch für das durch KM Stromazellen vermittelte Mikromilieu wichtig [109]. In dem hier untersuchten Kollektiv zeigten alle HMZL eine PYK2-Expression, wobei sich die Intensität der Expression zwischen den Linien deutlich unterschied. Am stärksten wurde PYK2 von den Linien L-363 und MM.1S exprimiert, welche, wie bereits oben erwähnt, von Patientinnen mit PCL und somit in weit fortgeschrittenem Krankheitsstadium stammen. Dies bestätigt frühere Beobachtungen, die gezeigt haben, dass PYK2 zur Tumorprogression beiträgt [99].

Die PYK2-Aktivierung nahm nach dem IGF1R-Knockdown in allen Zelllinien, mit Ausnahme von KMS-12-BM, in mindestens zwei der Versuche ab. Insbesondere zeigte sich dies bei JJN-3, KMS-11, L-363 und MM.1S deutlich.

Interessanterweise berichteten Zhang *et al.* und Shen *et al.* [99, 100], dass die Hemmung von PYK2 zur Abnahme der AKT-Aktivierung führte, was die Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Leich-Zbat auch in fünf weiteren HMZL bestätigen konnten. Somit scheint IGF1R in allen HMZL an der Aktivierung von PYK2 und AKT beteiligt zu sein. Für die RTK EGFR, die ebenfalls über diverse Signalwege wie z.B. Ras/Raf/MEK/ERK und PI3K/AKT in das Zellgeschehen eingreift, wurde in anderen Tumorentitäten bereits eine Regulation von PYK2 beschrieben [139]. Weitere Untersuchungen könnten somit Aufschluss darüber geben, ob PYK2 im

MM tatsächlich von IGF1R reguliert wird und welche weiteren Signaltransduktionswege durch einen Knockdown von IGF1R beeinflusst werden. Da die verschiedenen HMZL v.a. hinsichtlich der MEK/ERK-Signaltransduktionskaskade unterschiedlich auf einen Knockdown von IGF1R ansprechen, wäre es interessant noch weitere Signaltransduktionskaskaden vor und nach IGF1R-Knockdown in diesen Linien zu untersuchen.

4.5 Aktuelle Arbeiten und Ausblick

IGF1R ist neben anderen RTK und deren Effektoren im MM rekurrent mutiert und stellt somit ein interessantes therapeutische Ziel im MM dar [54]. In dieser Arbeit wurde der Effekt eines IGF1R-Knockdowns an verschiedenen HMZL auf die Expression und Aktivierung von klassischen RTK Effektoren sowie auch auf PYK2 auf Proteinebene untersucht.

Die Heterogenität des MM wurde berücksichtigt, indem verschiedene Zelllinien untersucht wurden. Leich *et al.* zeigten, dass in HMZL heterogene somatische Mutationen in Adhäsions- und RTK-Signalwegen vorliegen [54]. Insbesondere MM.1S scheint die genomische Landschaft von Primärtumoren des MM besser widerzuspiegeln als andere Zelllinien [140]. Weitere Untersuchungen zeigen, dass HMZL in Ko-Kultur mit IL-6 patientenähnlichere Phänotypen hervorrufen [140]. Daher wären vergleichende Untersuchungen mit IL-6 ko-kultivierten HMZL interessant.

In dieser Arbeit sind vor allem die HMZL L-363 und MM.1S aufgefallen, die aus den MM von Patientinnen mit PCL stammen. Der IGF1R-Knockdown hatte bei L-363 und MM.1S nicht nur einen Effekt auf den PI3K-AKT Signalweg, sondern auch den deutlichsten Effekt auf den Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg. Dies sollte genauer untersucht werden, da das mediane Gesamtüberleben von Patientinnen und Patienten mit primärer PCL und sekundärer PCL bei weniger als einem Jahr liegt und bisher wenige erfolgversprechende Therapieansätze vorhanden sind [130, 131].

Diskussion

Auch die Reduktion der PYK2-Aktivierung nach IGF1R-Knockdown bietet einen beachtenswerten Ansatzpunkt für weitere Untersuchung. Marlowe *et al.* konnten z.B. zeigen, dass die medikamenteninduzierte Inhibition von FAK durch RTK-Aktivierung aufgehoben werden konnte [141].

Bisher sind „targeted therapies“ am IGF1R für diverse Tumorentitäten trotz erfolgversprechender präklinischer Studien an Phase III Studien gescheitert [65]. Man vermutet, dass es vor allem an fehlenden prädiktiven Biomarkern liegen könnte [65]. Ein Ziel für weitere Untersuchungen wäre somit die Identifizierung von molekularen Subgruppen sowohl bei HMZL als auch MM Patientinnen und Patienten, die auf die Inhibition von IGF1R und seinen Effektoren ansprechen. Daher forscht die Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Leich-Zbat auch an der funktionellen Bedeutung von IGF1R und im Speziellen an der Bedeutung von IGF1R-Mutanten in verschiedenen HMZL. Ein Manuskript zu diesem Thema ist aktuell bei der Fachzeitschrift *Molecular Oncology* in Begutachtung. Dieses umfasst auch die Teile der vorliegenden Doktorarbeit und listet die Promovendin Julia Pickert als Koautorin.

5 Zusammenfassung

Das MM ist eine maligne Erkrankung, die von biologischer und klinischer Heterogenität geprägt ist. Sie ist durch die monoklonale Vermehrung von Plasmazellen charakterisiert. In vorangegangenen Studien wurde eine Häufung von Mutationen in RTK nachgewiesen. Diese gingen mit einem negativen Einfluss auf das Überleben von MM Patientinnen und Patienten einher.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des IGF1R an HMZL mittels siRNA-vermitteltem IGF1R-Knockdown untersucht und dessen Effekt auf das Signalnetzwerk mittels Western Blot Analysen ermittelt. Um die Heterogenität des MM besser abzubilden, wurden sechs verschiedenen HMZL ausgewählt.

Der IGF1R-Knockdown war in allen HMZL sowohl anhand der Reduktion der IGF1R-Expression als auch der IGF1R-Aktivierung deutlich nachweisbar. Stellvertretend für den PI3K/AKT Signalweg wurde die AKT-Aktivierung untersucht, welche nach IGF1R-Knockdown in allen Linien abnahm. Im Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg fiel eine deutliche Reduktion der ERK1/2- und MEK-Aktivierung in den von PCL stammenden HMZL L-363 und MM.1S, sowie in JJN-3 mit der Hochrisikotranslokation t(14;16) auf. Entsprechend der Beobachtungen für die AKT-Aktivierung, nahm die PYK2-Aktivierung in allen HMZL nach IGF1R-Knockdown ab, was auf ein Zusammenspiel von IGF1R, PYK2 und AKT in allen HMZL hindeutet.

Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob IGF1R Inhibitoren alleine oder in Kombination mit z.B. AKT, PYK2 oder Proteasomen-Inhibitoren in bestimmten molekularen MM Subgruppen ein effektives therapeutisches Ziel sind.

Summary

MM is a haematological malignancy of great biological and clinical heterogeneity. It is characterised by monoclonal proliferation of plasma cells. The accumulation of mutations in RTK has previously been reported and was associated with a negative impact on MM patient survival.

The IGF1R influence on its downstream signaling in HMCL was investigated using a siRNA mediated IGF1R-knockdown and Western Blot analysis. Six different HMCL were chosen to reflect this heterogenous disease.

The IGF1R-knockdown successfully reduced both expression and activation level of IGF1R in all HMCL. Furthermore, phosphorylation level of AKT, representing the PI3K/AKT pathway, decreased in all six HMCL following the IGF1R-knockdown. For the analysis of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway both ERK1/2 and MEK were selected. Following the IGF1R-knockdown phosphorylation level of ERK1/2 and MEK were reduced in HMCL L-363 and MM.1S, both derived from patients with plasma cell leukaemia and in JJN-3 which harbours t(14;16), a high risk translocation. In accordance with decreased activation level in AKT the IGF1R-knockdown resulted in reduced phosphorylation level of PYK2 in all six HMCL suggesting an interaction of IGF1R, PYK2 and AKT.

Future research will reveal whether IGF1R inhibition by itself or in combination with e.g. AKT, PYK2 or proteasome inhibitors will be an effective therapeutic target in selected molecular MM subgroups.

6 Literaturverzeichnis

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: a cancer journal for clinicians, 2018. **68**(6): p. 394-424.
2. Kazandjian, D., *Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy*. Semin Oncol, 2016. **43**(6): p. 676-681.
3. Rajkumar, S.V. and S. Kumar, *Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment*. Mayo Clinic proceedings, 2016. **91**(1): p. 101-119.
4. Kumar, S.K., et al., *Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients*. Leukemia, 2014. **28**(5): p. 1122-1128.
5. de la Puente, P., et al., *Molecularly targeted therapies in multiple myeloma*. Leukemia research and treatment, 2014. **2014**: p. 976567-976567.
6. Bonello, F., et al., *Therapeutic Monoclonal Antibodies and Antibody Products: Current Practices and Development in Multiple Myeloma*. Cancers, 2019. **12**(1): p. E15.
7. Abdallah, N. and S.K. Kumar, *Daratumumab in untreated newly diagnosed multiple myeloma*. Therapeutic advances in hematology, 2019. **10**: p. 2040620719894871-2040620719894871.
8. Moreau, P., et al., *Maintenance with daratumumab or observation following treatment with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab and autologous stem-cell transplant in patients with newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): an open-label, randomised, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2021. **22**(10): p. 1378-1390.
9. Martin, T. and C.A. Huff, *Multiple Myeloma: Current Advances and Future Directions*. Clinical lymphoma, myeloma & leukemia, 2019. **19**(5): p. 255-263.
10. Vaxman, I., M.H. Sidiqi, and M. Gertz, *Venetoclax for the treatment of multiple myeloma*. Expert review of hematology, 2018. **11**(12): p. 915-920.
11. Vogl, D.T., et al., *Selective Inhibition of Nuclear Export With Oral Selinexor for Treatment of Relapsed or Refractory Multiple Myeloma*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2018. **36**(9): p. 859-866.
12. Fan, F., et al., *Durable remissions with BCMA-specific chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells in patients with refractory/relapsed multiple myeloma*. Journal of Clinical Oncology, 2017. **35**(18_suppl): p. LBA3001-LBA3001.
13. Rajkumar, S.V., et al., *International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma*. The Lancet. Oncology, 2014. **15**(12): p. e538-e548.
14. Rajkumar, S.V., *Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma*. American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting, 2016. **35**: p. e418-e423.
15. Kyle, R.A., et al., *Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma*. Mayo Clinic proceedings, 2003. **78**(1): p. 21-33.

Literaturverzeichnis

16. Palumbo, A., et al., *Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2015. **33**(26): p. 2863-2869.
17. Hagen, P., et al., *Increasing genomic discovery in newly diagnosed multiple myeloma: defining disease biology and its correlation to risk*. Ann Hematol, 2022.
18. Landgren, O., et al., *Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study*. Blood, 2009. **113**(22): p. 5412-5417.
19. Weiss, B.M., et al., *A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients*. Blood, 2009. **113**(22): p. 5418-5422.
20. Kyle, R.A., et al., *A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance*. The New England journal of medicine, 2002. **346**(8): p. 564-569.
21. Kyle, R.A., et al., *Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma*. N Engl J Med, 2007. **356**(25): p. 2582-90.
22. van de Donk, N.W.C.J., et al., *Diagnosis, risk stratification and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma*. International journal of laboratory hematology, 2016. **38 Suppl 1**: p. 110-122.
23. Kilciksiz, S., et al., *Clinical and prognostic features of plasmacytomas: a multicenter study of Turkish Oncology Group-Sarcoma Working Party*. American journal of hematology, 2008. **83**(9): p. 702-707.
24. Fernández de Larrea, C., et al., *Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group*. Leukemia, 2013. **27**(4): p. 780-791.
25. Fernández de Larrea, C., et al., *Primary plasma cell leukemia: consensus definition by the International Myeloma Working Group according to peripheral blood plasma cell percentage*. Blood Cancer J, 2021. **11**(12): p. 192.
26. Noel, P. and R.A. Kyle, *Plasma cell leukemia: an evaluation of response to therapy*. Am J Med, 1987. **83**(6): p. 1062-8.
27. Tiedemann, R.E., et al., *Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia*. Leukemia, 2008. **22**(5): p. 1044-1052.
28. Musto, P., *Progress in the Treatment of Primary Plasma Cell Leukemia*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2016. **34**(18): p. 2082-2084.
29. Murphy, K. and C. Weaver, *Die Entwicklung der B- und T-Lymphocyten*, in *Janeway Immunologie*, K. Murphy and C. Weaver, Editors. 2018, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 377-440.
30. Pieper, K., B. Grimbacher, and H. Eibel, *B-cell biology and development*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2013. **131**(4): p. 959-971.
31. Tsujimoto, Y., et al., *The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining*. Science, 1985. **229**(4720): p. 1390-3.

Literaturverzeichnis

32. Eibel, H., et al., *B cell biology: an overview*. Current allergy and asthma reports, 2014. **14**(5): p. 434-434.
33. Küppers, R., *Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis*. Nature reviews. Cancer, 2005. **5**(4): p. 251-262.
34. Goossens, T., U. Klein, and R. Kuppers, *Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2463-8.
35. Manier, S., et al., *Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2017. **14**(2): p. 100-113.
36. Morgan, G.J., B.A. Walker, and F.E. Davies, *The genetic architecture of multiple myeloma*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(5): p. 335-48.
37. Barwick, B.G., et al., *Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma*. Frontiers in immunology, 2019. **10**: p. 1121-1121.
38. Chretien, M.-L., et al., *Understanding the role of hyperdiploidy in myeloma prognosis: which trisomies really matter?* Blood, 2015. **126**(25): p. 2713-2719.
39. Kuehl, W.M. and P.L. Bergsagel, *Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions*. Nature reviews. Cancer, 2002. **2**(3): p. 175-187.
40. Bergsagel, P.L. and W.M. Kuehl, *Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(26): p. 6333-8.
41. Fonseca, R., et al., *The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2562-7.
42. Avet-Loiseau, H., et al., *Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome*. Blood, 2007. **109**(8): p. 3489-95.
43. Fonseca, R., et al., *Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent in situ hybridization and increase CKS1B expression in myeloma*. Leukemia, 2006. **20**(11): p. 2034-40.
44. Walker, B.A., et al., *A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value*. Blood, 2010. **116**(15): p. e56-65.
45. Shou, Y., et al., *Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(1): p. 228-233.
46. Fonseca, R., et al., *International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review*. Leukemia, 2009. **23**(12): p. 2210-2221.
47. Walker, B.A., et al., *APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma*. Nature communications, 2015. **6**: p. 6997-6997.
48. Jovanović, K.K., et al., *Deregulation and Targeting of TP53 Pathway in Multiple Myeloma*. Frontiers in oncology, 2019. **8**: p. 665-665.
49. Keats, J.J., et al., *Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma*. Cancer Cell, 2007. **12**(2): p. 131-44.

Literaturverzeichnis

50. Walker, B.A., et al., *Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma*. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2015. **33**(33): p. 3911-3920.
51. Waks, A.G. and E.P. Winer, *Breast Cancer Treatment: A Review*. *JAMA*, 2019. **321**(3): p. 288-300.
52. Slamon, D., et al., *Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer*. *N Engl J Med*, 2011. **365**(14): p. 1273-83.
53. Chapman, M.A., et al., *Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma*. *Nature*, 2011. **471**(7339): p. 467-472.
54. Leich, E., et al., *Multiple myeloma is affected by multiple and heterogeneous somatic mutations in adhesion- and receptor tyrosine kinase signaling molecules*. *Blood Cancer J*, 2013. **3**: p. e102.
55. Leich, E., et al., *Novel molecular subgroups within the context of receptor tyrosine kinase and adhesion signalling in multiple myeloma*. *Blood Cancer J*, 2021. **11**(3): p. 51.
56. Robiou du Pont, S., et al., *Genomics of Multiple Myeloma*. *J Clin Oncol*, 2017. **35**(9): p. 963-967.
57. Hsu, J., et al., *The AKT kinase is activated in multiple myeloma tumor cells*. *Blood*, 2001. **98**(9): p. 2853-2855.
58. Zöllinger, A., et al., *Combined functional and molecular analysis of tumor cell signaling defines 2 distinct myeloma subgroups: Akt-dependent and Akt-independent multiple myeloma*. *Blood*, 2008. **112**(8): p. 3403-3411.
59. Annunziata, C.M., et al., *A mechanistic rationale for MEK inhibitor therapy in myeloma based on blockade of MAF oncogene expression*. *Blood*, 2011. **117**(8): p. 2396-404.
60. Heuck, C.J., et al., *Inhibiting MEK in MAPK pathway-activated myeloma*. *Leukemia*, 2016. **30**(4): p. 976-980.
61. Keppler, S., et al., *Rare SNPs in receptor tyrosine kinases are negative outcome predictors in multiple myeloma*. *Oncotarget*, 2016. **7**(25): p. 38762-38774.
62. Kuhn, D.J., et al., *Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome bortezomib resistance in preclinical models of multiple myeloma*. *Blood*, 2012. **120**(16): p. 3260-70.
63. Menu, E., et al., *The role of the insulin-like growth factor 1 receptor axis in multiple myeloma*. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2009. **115**(2): p. 49-57.
64. Sprynski, A.C., et al., *The role of IGF-1 as a major growth factor for myeloma cell lines and the prognostic relevance of the expression of its receptor*. *Blood*, 2009. **113**(19): p. 4614-4626.
65. Yamaoka, T., et al., *Receptor Tyrosine Kinase-Targeted Cancer Therapy*. *International journal of molecular sciences*, 2018. **19**(11): p. 3491.
66. Moreau, P., et al., *Phase I study of the anti insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) monoclonal antibody, AVE1642, as single agent and in combination with bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma*. *Leukemia*, 2011. **25**(5): p. 872-4.

Literaturverzeichnis

67. Ullrich, A., et al., *Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity*. The EMBO journal, 1986. **5**(10): p. 2503-2512.
68. Adams, T.E., et al., *Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2000. **57**(7): p. 1050-1093.
69. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1117-1134.
70. Cabail, M.Z., et al., *The insulin and IGF1 receptor kinase domains are functional dimers in the activated state*. Nature Communications, 2015. **6**(1): p. 6406.
71. Schlessinger, J., *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2000. **103**(2): p. 211-25.
72. Isaksson, O.G., et al., *Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth*. Endocrine reviews, 1987. **8**(4): p. 426-438.
73. Gluckman, P., et al., *A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury*. Biochemical and biophysical research communications, 1992. **182**(2): p. 593-599.
74. Rodriguez-Tarduchy, G., et al., *Insulin-like growth factor-I inhibits apoptosis in IL-3-dependent hemopoietic cells*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 1992. **149**(2): p. 535-540.
75. LeRoith, D. and C.T. Roberts, Jr., *The insulin-like growth factor system and cancer*. Cancer letters, 2003. **195**(2): p. 127-137.
76. Chitnis, M.M., et al., *The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2008. **14**(20): p. 6364-6370.
77. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-1274.
78. Hsu, J.-h., et al., *Role of the AKT kinase in expansion of multiple myeloma clones: effects on cytokine-dependent proliferative and survival responses*. Oncogene, 2002. **21**(9): p. 1391-1400.
79. Tu, Y., A. Gardner, and A. Lichtenstein, *The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses*. Cancer research, 2000. **60**(23): p. 6763-6770.
80. McCubrey, J.A., et al., *Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance*. Biochimica et biophysica acta, 2007. **1773**(8): p. 1263-1284.
81. Harmer, S.L. and A.L. DeFranco, *Shc contains two Grb2 binding sites needed for efficient formation of complexes with SOS in B lymphocytes*. Molecular and cellular biology, 1997. **17**(7): p. 4087-4095.
82. Asati, V., D.K. Mahapatra, and S.K. Bharti, *PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives*. European journal of medicinal chemistry, 2016. **109**: p. 314-341.
83. McKay, M.M. and D.K. Morrison, *Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3113-3121.

Literaturverzeichnis

84. Yoon, S. and R. Seger, *The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions*. Growth factors (Chur, Switzerland), 2006. **24**(1): p. 21-44.
85. Xu, J., et al., *Molecular signaling in multiple myeloma: association of RAS/RAF mutations and MEK/ERK pathway activation*. Oncogenesis, 2017. **6**(5): p. e337-e337.
86. Shah, S., et al., *Ras and Rap1: A tale of two GTPases*. Seminars in cancer biology, 2019. **54**: p. 29-39.
87. Chng, W.J., et al., *Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma*. Leukemia, 2011. **25**(6): p. 1026-35.
88. Koh, C.M., A. Sabo, and E. Guccione, *Targeting MYC in cancer therapy: RNA processing offers new opportunities*. Bioessays, 2016. **38**(3): p. 266-75.
89. Anguiano, A., et al., *Gene expression profiles of tumor biology provide a novel approach to prognosis and may guide the selection of therapeutic targets in multiple myeloma*. J Clin Oncol, 2009. **27**(25): p. 4197-203.
90. Tognon, C.E. and P.H. Sorensen, *Targeting the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) signaling pathway for cancer therapy*. Expert Opin Ther Targets, 2012. **16**(1): p. 33-48.
91. Avraham, S. and H. Avraham, *Characterization of the novel focal adhesion kinase RAFTK in hematopoietic cells*. Leuk Lymphoma, 1997. **27**(3-4): p. 247-56.
92. Pollak, M., *The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(3): p. 159-69.
93. Wang, P., V.C. Mak, and L.W. Cheung, *Drugging IGF-1R in cancer: New insights and emerging opportunities*. Genes Dis, 2023. **10**(1): p. 199-211.
94. Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer, *Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2005. **6**(1): p. 56-68.
95. Zhao, J. and J.-L. Guan, *Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer*. Cancer and Metastasis Reviews, 2009. **28**(1): p. 35-49.
96. Sieg, D.J., et al., *FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(5): p. 249-56.
97. Alanko, J. and J. Ivaska, *Endosomes: Emerging Platforms for Integrin-Mediated FAK Signalling*. Trends Cell Biol, 2016. **26**(6): p. 391-398.
98. Tai, Y.T., et al., *Insulin-like growth factor-1 induces adhesion and migration in human multiple myeloma cells via activation of beta1-integrin and phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5850-8.
99. Zhang, Y., et al., *Pyk2 promotes tumor progression in multiple myeloma*. Blood, 2014. **124**(17): p. 2675-2686.
100. Shen, T. and Q. Guo, *Role of Pyk2 in Human Cancers*. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research, 2018. **24**: p. 8172-8182.

Literaturverzeichnis

101. Schaller, M.D., *Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions*. Journal of cell science, 2010. **123**(Pt 7): p. 1007-1013.
102. Sulzmaier, F.J., C. Jean, and D.D. Schlaepfer, *FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications*. Nature Reviews Cancer, 2014. **14**(9): p. 598-610.
103. Cance, W.G. and V.M. Golubovskaya, *Focal adhesion kinase versus p53: apoptosis or survival?* Sci Signal, 2008. **1**(20): p. pe22.
104. Shibue, T., et al., *The outgrowth of micrometastases is enabled by the formation of filopodium-like protrusions*. Cancer Discov, 2012. **2**(8): p. 706-21.
105. Tai, Y.L., L.C. Chen, and T.L. Shen, *Emerging roles of focal adhesion kinase in cancer*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 690690.
106. Ivankovic-Dikic, I., et al., *Pyk2 and FAK regulate neurite outgrowth induced by growth factors and integrins*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(9): p. 574-81.
107. Fuortes, M., et al., *Role of the tyrosine kinase pyk2 in the integrin-dependent activation of human neutrophils by TNF*. The Journal of clinical investigation, 1999. **104**(3): p. 327-335.
108. Sun, C.K., et al., *Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) promotes proliferation and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells through c-Src/ERK activation*. Carcinogenesis, 2008. **29**(11): p. 2096-2105.
109. Meads, M.B., et al., *Targeting PYK2 mediates microenvironment-specific cell death in multiple myeloma*. Oncogene, 2016. **35**(21): p. 2723-2734.
110. Nefedova, Y., T.H. Landowski, and W.S. Dalton, *Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms*. Leukemia, 2003. **17**(6): p. 1175-82.
111. Moreaux, J., et al., *A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines*. Haematologica, 2011. **96**(4): p. 574-82.
112. Maïga, S., et al., *A simple flow cytometry-based barcode for routine authentication of multiple myeloma and mantle cell lymphoma cell lines*. Cytometry A, 2015. **87**(4): p. 285-8.
113. Rajkumar, S.V., *Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management*. Am J Hematol, 2022. **97**(8): p. 1086-1107.
114. Bataille, R., et al., *The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy*. Haematologica, 2006. **91**(9): p. 1234-40.
115. Steinbrunn, T., et al., *Efficient transient transfection of human multiple myeloma cells by electroporation--an appraisal*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e97443.
116. Landau, D.A., et al., *Clonal evolution in hematological malignancies and therapeutic implications*. Leukemia, 2014. **28**(1): p. 34-43.
117. Keats, J.J., et al., *Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma*. Blood, 2012. **120**(5): p. 1067-76.
118. Mikhael, J.R., et al., *Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013*. Mayo Clin Proc, 2013. **88**(4): p. 360-76.

Literaturverzeichnis

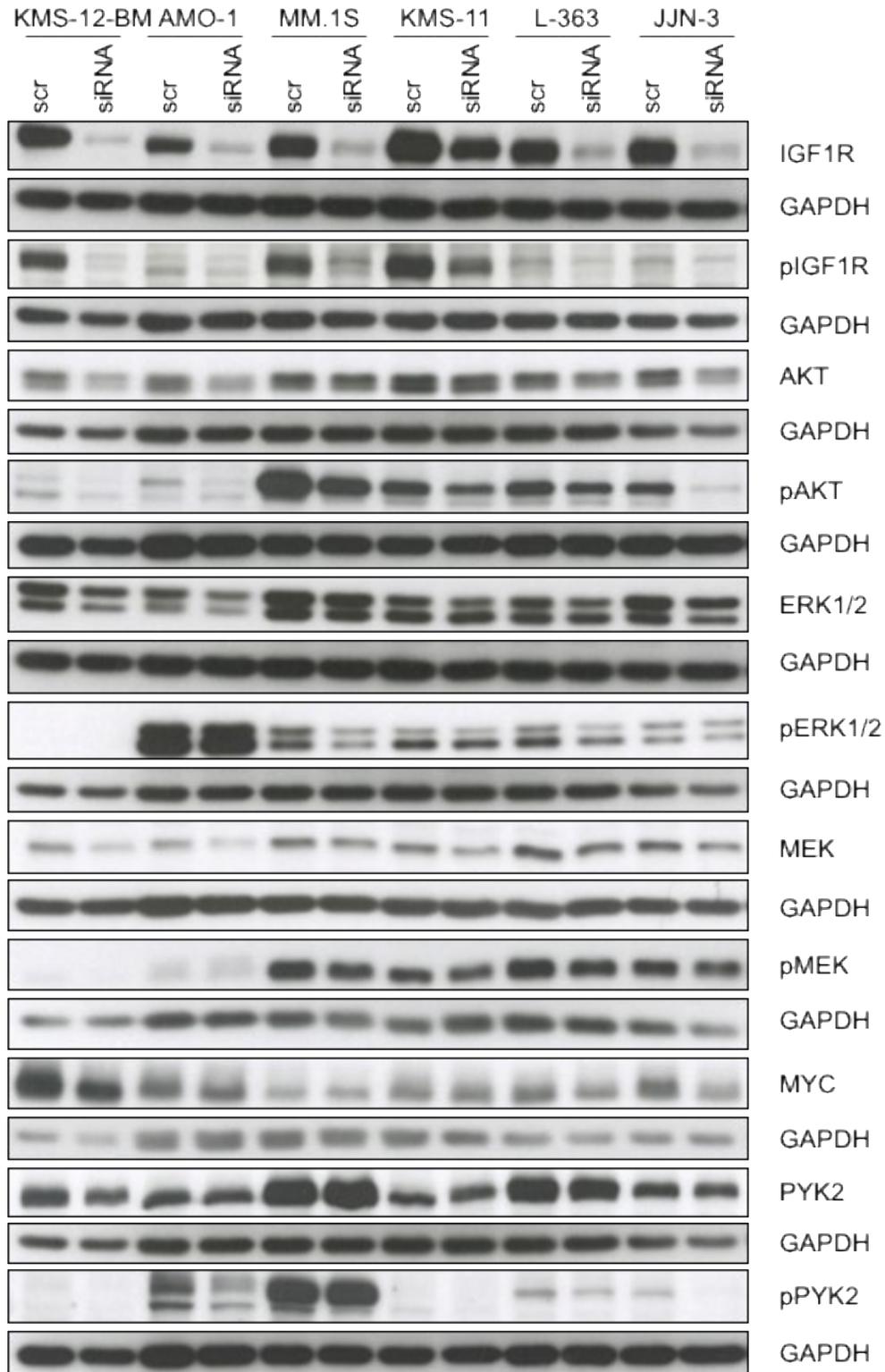
119. Kumar, S., et al., *Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics*. Blood, 2012. **119**(9): p. 2100-5.
120. Collette, M., et al., *Crucial role of phosphatase CD45 in determining signaling and proliferation of human myeloma cells*. Eur Cytokine Netw, 2007. **18**(3): p. 120-6.
121. Bieghs, L., et al., *The insulin-like growth factor system in multiple myeloma: diagnostic and therapeutic potential*. Oncotarget, 2016. **7**(30): p. 48732-48752.
122. Chng, W.J., A. Gualberto, and R. Fonseca, *IGF-1R is overexpressed in poor-prognostic subtypes of multiple myeloma*. Leukemia, 2006. **20**(1): p. 174-6.
123. Ge, N.L. and S. Rudikoff, *Insulin-like growth factor I is a dual effector of multiple myeloma cell growth*. Blood, 2000. **96**(8): p. 2856-61.
124. Pene, F., et al., *Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma*. Oncogene, 2002. **21**(43): p. 6587-6597.
125. Descamps, G., et al., *The Magnitude of Akt/Phosphatidylinositol 3'-Kinase Proliferating Signaling Is Related to CD45 Expression in Human Myeloma Cells*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(8): p. 4953.
126. Hu, J. and W.-X. Hu, *Targeting signaling pathways in multiple myeloma: Pathogenesis and implication for treatments*. Cancer letters, 2018. **414**: p. 214-221.
127. Lin, Y.T., et al., *Integrated phosphoproteomics and transcriptional classifiers reveal hidden RAS signaling dynamics in multiple myeloma*. Blood Adv, 2019. **3**(21): p. 3214-3227.
128. Weissbach, S., et al., *Exon-4 Mutations in KRAS Affect MEK/ERK and PI3K/AKT Signaling in Human Multiple Myeloma Cell Lines*. Cancers (Basel), 2020. **12**(2).
129. Xu, J., et al., *Molecular signaling in multiple myeloma: association of RAS/RAF mutations and MEK/ERK pathway activation*. Oncogenesis, 2017. **6**(5): p. e337.
130. Gonsalves, W.I., et al., *Trends in survival of patients with primary plasma cell leukemia: a population-based analysis*. Blood, 2014. **124**(6): p. 907-12.
131. Cha, C.H., et al., *Significantly better prognosis for patients with primary plasma cell leukemia than for patients with secondary plasma cell leukemia*. Acta Haematol, 2007. **118**(3): p. 178-82.
132. John, L., et al., *Pathway-Directed Therapy in Multiple Myeloma*. Cancers (Basel), 2021. **13**(7).
133. Jovanović, K.K., et al., *Targeting MYC in multiple myeloma*. Leukemia, 2018. **32**(6): p. 1295-1306.
134. Dominguez-Sola, D., et al., *Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 445-51.
135. Sabò, A., et al., *Selective transcriptional regulation by Myc in cellular growth control and lymphomagenesis*. Nature, 2014. **511**(7510): p. 488-492.
136. Barna, M., et al., *Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency*. Nature, 2008. **456**(7224): p. 971-5.
137. McMahan, S.B., *MYC and the control of apoptosis*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014. **4**(7): p. a014407.

Literaturverzeichnis

138. Jernberg-Wiklund, H., et al., *Expression of myc-family genes in established human multiple myeloma cell lines: L-myc but not c-myc gene expression in the U-266 myeloma cell line*. Int J Cancer, 1992. **51**(1): p. 116-23.
139. Shen, T. and Q. Guo, *EGFR signaling pathway occupies an important position in cancer-related downstream signaling pathways of Pyk2*. Cell Biol Int, 2019. **44**(1): p. 2-13.
140. Sarin, V., et al., *Evaluating the efficacy of multiple myeloma cell lines as models for patient tumors via transcriptomic correlation analysis*. Leukemia, 2020.
141. Marlowe, T.A., et al., *Oncogenic Receptor Tyrosine Kinases Directly Phosphorylate Focal Adhesion Kinase (FAK) as a Resistance Mechanism to FAK-Kinase Inhibitors*. Mol Cancer Ther, 2016. **15**(12): p. 3028-3039.

Appendix

Einfluss des siRNA vermittelten IGF1R-Knockdowns auf IGF1R und nachgeschaltete Effektoren im dritten Versuch



S_Abbildung 16: Effekt des IGF1R-Knockdowns auf das Downstream Signaling in sechs HMZL im dritten Versuch

Dritter Versuch der Western Blot Analyse der sechs HMZL in originaler, ungeschnittener Reihenfolge (AMO-1, JJN-3, KMS-11, KMS-12-BM, L-363 und MM.1S) nach IGF1R-Knockdown (siRNA) im Vergleich zur scrambled siRNA Kontrolle (scr). Die Membranen wurden über Nacht mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Erlaubnis der Verläge zur Verwendung modifizierter Abbildungen und Tabellen

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Apr 20, 2022

This Agreement between Ms. Julia Pickert ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5293051390715
License date	Apr 20, 2022
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Cell
Licensed Content Title	Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases
Licensed Content Author	Joseph Schlessinger
Licensed Content Date	Oct 13, 2000

**S_Abbildung17: Erlaubnis von Elsevier
Lizenznummer 5293051390715, für Abbildung 1 modifiziert nach Schlessinger *et al.* 2020
[71]**

AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jun 11, 2022

This Agreement between Ms. Julia Pickert ("You") and American Association for Cancer Research ("American Association for Cancer Research") consists of your license details and the terms and conditions provided by American Association for Cancer Research and Copyright Clearance Center.

The publisher has provided special terms related to this request that can be found at the end of the Publisher's Terms and Conditions.

License Number 5315790517670

License date May 25, 2022

Licensed Content Publisher American Association for Cancer Research

Licensed Content Publication Clinical Cancer Research

Licensed Content Title The Type 1 Insulin-Like Growth Factor Receptor Pathway

Licensed Content Author Chitnis, Meenali M.; Yuen, John S.P.

Licensed Content Date Oct 16, 2008

**S_Abbildung 18: Erlaubnis der American Association of Cancer Research
Lizenznummer 5315790517670, für Abbildung 2 modifiziert nach Chitnis *et al.* 2008 [76]**

Betreff: Re: Request permissions
Datum: 20. April 2022 um 16:24
An: Julia [REDACTED]

HJ

Dear Julia,

please use this mail as a permission granted to your needs.

To whom it may concern:

we herewith grant permission to download and re-use article, figure/table just for the use cited in your message below free of charge: this publication is intended for no-profit use. Any other use is discouraged and it will remain under copyright laws of the Ferrata Storti Foundation, Pavia, Italy. You are also obliged to correctly quote the original article reference.

Best regards

Simona Giri, PhD
Production & Marketing Manager

Haematologica Journal Office
via G. Belli, 4 - 27100 - Pavia | Italy
T. +39.0382.27129 | M. +39 3349401748
F. +39.0382.394705
www.haematologica.org

**S_Abbildung 19: Erlaubnis von der Ferrata Storti Foundation
für Tabelle 9 adaptiert nach Moreaux *et al.* 2012 [111]**

I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AKT	Proteinkinase B
BSA	Bovines Serumalbumin
dest. H₂O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
ERBB2	Human epidermal growth factor 2
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAK	Fokal adhesion kinase
FCS	Fötale Kälberserum
FDZ	Follikulär dendritische Zellen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HMZL	Humane Myelom Zelllinie
IGF	Insulin-like growth factor
IGF1R	Insulin-like growth factor I Rezeptor
IgH	Immunoglobulin heavy chain
IL-6	Interleukin-6
IRS	Insulinrezeptor Substrat
J – Segment	„Joining“ Segment
KM	Knochenmark
LDH	Laktatdehydrogenase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz

MM	Multiples Myelom
mTOR	Mammalian target of Rapamycin
n.a.	nicht anwendbar
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCL	Plasmazelleukämie
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PYK2	Proline rich tyrosine kinase 2, (PTK2B)
rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SMM	Smoldering Myeloma
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween

II. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES IGF1R	8
ABBILDUNG 2: SIGNALWEGE DES IGF1R	10
ABBILDUNG 3: IGF1R-EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN HMZL.....	29
ABBILDUNG 4: BESTIMMUNG DER EFFIZIENZ DES IGF1R-KNOCKDOWNS	30
ABBILDUNG 5: EINFLUSS DES SIRNA VERMITTELTEN IGF1R-KNOCKDOWNS AUF DIE EXPRESSION (A) UND AKTIVIERUNG (B) VON IGF1R.....	32
ABBILDUNG 6: VERGLEICH DER RELATIVEN VERÄNDERUNG DER PROTEINEXPRESSION- UND AKTIVIERUNG VON IGF1R IN VERSCHIEDENEN ZELLINIEN NACH IGF1R-KNOCKDOWN	33
ABBILDUNG 7: EINFLUSS DES SIRNA VERMITTELTEN IGF1R-KNOCKDOWNS AUF DIE EXPRESSION (A) UND AKTIVIERUNG (B) VON AKT	35
ABBILDUNG 8: VERGLEICH DER RELATIVEN VERÄNDERUNG DER PROTEINEXPRESSION- UND AKTIVIERUNG VON AKT IN VERSCHIEDENEN ZELLINIEN NACH IGF1R-KNOCKDOWN	36
ABBILDUNG 9: EINFLUSS DES SIRNA VERMITTELTEN IGF1R-KNOCKDOWNS AUF DIE EXPRESSION (A) UND AKTIVIERUNG (B) VON ERK1/2	38
ABBILDUNG 10: VERGLEICH DER RELATIVEN VERÄNDERUNG DER PROTEINEXPRESSION- UND AKTIVIERUNG VON ERK1/2 IN VERSCHIEDENEN ZELLINIEN NACH IGF1R-KNOCKDOWN	39
ABBILDUNG 11: EINFLUSS DES SIRNA VERMITTELTEN IGF1R-KNOCKDOWNS AUF DIE EXPRESSION (A) UND AKTIVIERUNG (B) VON MEK.....	41
ABBILDUNG 12: VERGLEICH DER RELATIVEN VERÄNDERUNG DER PROTEINEXPRESSION- UND AKTIVIERUNG VON MEK IN VERSCHIEDENEN ZELLINIEN NACH IGF1R-KNOCKDOWN	42
ABBILDUNG 13: EINFLUSS DES SIRNA VERMITTELTEN IGF1R-KNOCKDOWNS AUF DIE EXPRESSION VON MYC.....	44
ABBILDUNG 14: EINFLUSS DES SIRNA VERMITTELTEN IGF1R-KNOCKDOWNS AUF DIE EXPRESSION (A) UND AKTIVIERUNG (B) VON PYK2	47
ABBILDUNG 15: VERGLEICH DER RELATIVEN VERÄNDERUNG DER PROTEINEXPRESSION- UND AKTIVIERUNG VON PYK2 IN VERSCHIEDENEN ZELLINIEN NACH IGF1R-KNOCKDOWN	49
S_ABBILDUNG 16: EFFEKT DES IGF1R-KNOCKDOWNS AUF DAS DOWNSTREAM SIGNALING IN SECHS HMZL IM DRITTEN VERSUCH.....	70

III. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	14
TABELLE 2: LÖSUNGEN UND PUFFER	15
TABELLE 3: TECHNISCHES EQUIPMENT	16
TABELLE 4: VERBRAUCHSMATERIALIEN	18
TABELLE 5: SOFTWARE	19
TABELLE 6: KITS	19
TABELLE 7: GRÖßENMARKER	19
TABELLE 8: BESTANDTEILE DER ZELLKULTURMEDIEN	20
TABELLE 9: MOLEKULARE UND ZYTOGENETISCHE EIGENSCHAFTEN DER HMZL	21
TABELLE 10: ERSTANTIKÖRPER	22
TABELLE 11: ZWEITANTIKÖRPER	22
TABELLE 12: INHALTSSTOFFE DER SAMMEL- UND TRENNGELE	25
TABELLE 13: VERDÜNNUNG DER VERWENDETEN ERSTANTIKÖRPER	26
TABELLE 14: VERDÜNNUNG DER VERWENDETEN ZWEITANTIKÖRPER	26
TABELLE 15: ZELLINIENABHÄNGIGE SPANNUNG DES ELEKTROPORATIONSPULSES	27
TABELLE 16: EXPRESSION UND AKTIVIERUNG VON IGF1R NACH IGF1R-KNOCKDOWN	33
TABELLE 17 EXPRESSION UND AKTIVIERUNG VON AKT NACH IGF1R-KNOCKDOWN ...	36
TABELLE 18 EXPRESSION UND AKTIVIERUNG VON ERK1/2 NACH IGF1R-KNOCKDOWN	39
TABELLE 19: EXPRESSION UND AKTIVIERUNG VON MEK NACH IGF1R-KNOCKDOWN .	42
TABELLE 20: EXPRESSION UND AKTIVIERUNG VON PYK2 NACH IGF1R-KNOCKDOWN	48

IV. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Leich-Zbat für die Betreuung dieser Arbeit und der Überlassung des Themas, für die freundliche Hilfsbereitschaft während der experimentellen Phase und dem Verfassen dieser Arbeit, die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Übernahme des Erstgutachtens der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Bargou danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich bedanke mich bei den Arbeitsgruppen Leich und Rosenwald für ihre Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima. Insbesondere bedanke ich mich bei Dr. Sarah Keppler, Tina Grieb und Theodora Nedeva.

Und schließlich gebührt besonderer Dank meinen Eltern und Großeltern für die uneingeschränkte, bedingungslose und liebevolle Unterstützung während meines gesamten Studiums sowie der Fertigstellung dieser Arbeit. Hervorheben möchte ich außerdem die hilfreiche Begleitung von Anne Schüpferling, Anjana Heuer und Viola Pickert.