

**Aus dem Institut für Pathologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Sven Perner**

**Die prognostische Bedeutung von RAS-Mutationen beim Multiplen Myelom im
Kontext der Behandlung mit hochdosiertem Melphalan und autologer
Stammzelltransplantation**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von
Ann-Cathrin Czerwinska
aus Lüneburg

Lübeck 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Thorns

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Nils Homann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2018

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.04.2018

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	3
1.1 Definition.....	3
1.2 Epidemiologie.....	3
1.3 Pathogenese und genetische Faktoren.....	4
1.4 Klinische Symptome.....	6
1.5 Diagnose.....	7
1.6 Stadieneinteilung.....	8
1.6.1 Einteilung nach Durie und Salmon von 1975.....	8
1.6.2 Einteilung nach dem International Staging System (ISS) von 2005.....	9
1.7 Therapie.....	10
1.8 RAS-Protein und -Signalweg.....	12
1.9 Fragestellung.....	13
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Patientenproben.....	15
2.2 Bestimmung des Infiltrationsgrades.....	17
2.3 DNA-Isolation.....	17
2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	18
2.5 Sequenzierung nach Sanger.....	19
2.6 Auswertung.....	21
2.7 Liste der Materialien.....	22
3. Ergebnisse.....	24
3.1 Mikroskopische Sichtung des Probenmaterials.....	24
3.2 Auswertung der Mutationen.....	28
3.3 Korrelation mit klinischen Daten.....	30
4. Diskussion.....	35
5. Zusammenfassung.....	42
6. Abkürzungsverzeichnis.....	44
7. Literaturverzeichnis.....	47
8. Abbildungsverzeichnis.....	51
9. Tabellenverzeichnis.....	53

10. Danksagung.....	54
11. Tabellarischer Lebenslauf.....	55
11. Publikationen	56
12. Erklärung.....	57

1. Einleitung

1.1 Definition

Das Multiple Myelom wurde erstmals 1889 durch den österreichischen Pathologen Otto Kahler beschrieben. Demzufolge wird die Erkrankung auch als „Morbus Kahler“ bezeichnet (Wyklicky 1977).

Es handelt sich dabei formal um ein Non-Hodgkin Lymphom der B-Zell-Reihe, bei dem klonale, maligne entartete Plasmazellen das Knochenmark infiltrieren. Die maligne transformierten Zellen werden dabei als Myelomzellen bezeichnet. Diese exprimieren oftmals nicht die für B-Zellen typischen Oberflächenantigene CD19, CD20 und CD23, sondern CD38 sowie CD79d (Thomas 2006). Des Weiteren ist CD56 ein Marker, der auf neoplastischen Plasmazellen, und somit auch auf den Myelomzellen, verstärkt vorkommt (Barley und Chari 2016).

Die klonalen Plasmazellen des Multiplen Myeloms produzieren monoklonale Immunglobuline, anhand derer man die Erkrankung in verschiedene Subtypen einteilen kann. In über 50 % liegt ein IgG-Typ, in 21 % ein IgA-Typ und in 16 % ein Leichtketten-Myelom vor. Seltener kommen der IgD-, IgM- und IgE-Typ sowie das asekretorische Myelom vor (Pandey und Kyle 2013).

Vom Multiplen Myelom abzugrenzen sind das ossäre sowie das extraossäre Plasmozytom. Beim ossären Plasmozytom infiltrieren die monoklonalen Plasmazellen ausschließlich die Knochen, während andere Gewebe per Definition nicht befallen sind und keine Endorganschäden vorliegen. Im Falle eines extraossären Plasmozytoms hingegen ist das Weichgewebe betroffen, während die Knochen frei von den malignen Plasmazellen sind. Bei beiden Krankheitsbildern ist das Knochenmark, im Gegensatz zum Multiplen Myelom, nicht infiltriert. Allerdings können beide in ein Multiples Myelom übergehen (Weber 2005).

1.2 Epidemiologie

Das Multiple Myelom tritt mit einer Inzidenz von 4 pro 100.000 Menschen auf, wobei das durchschnittliche Alter bei der Diagnosestellung 65 Jahre beträgt (Rajkumar 2014). Insgesamt erkranken häufiger Afroamerikaner als Kaukasier und es ist mit einem Geschlechterverhältnis von 1,5:1 eher das männliche Geschlecht betroffen (Raab et al. 2009). Als Risikofaktoren für die Entwicklung der Erkrankung sind ionisierende Strahlen, Pestizide sowie chronische Infektionen beschrieben (Alexander et al. 2007).

Bezogen auf alle Krebserkrankungen hat das Multiple Myelom in den westlichen Industrienationen einen Anteil von etwa einem Prozent (Kortüm et al. 2013; Rajkumar 2014). Betrachtet man lediglich die hämatologischen Neoplasien, beträgt der Anteil der Multiplen Myelome hieran ungefähr zehn Prozent (Rajkumar 2014).

1.3 Pathogenese und genetische Faktoren

Ein Großteil der Myelome geht aus einer Vorstufe hervor, die als „monoclonal gammopathy of undetermined significance“ (MGUS) bezeichnet wird. Diese MGUS liegt bei ca. drei Prozent der über 50-Jährigen vor und das Progressionsrisiko zum Multiplen Myelom liegt jährlich bei etwa einem Prozent (Rajkumar 2014).

Die Interaktion zwischen den Myelomzellen und dem Mikromillieu des Knochenmarks spielt bezüglich des Wachstums und Überlebens sowie der Migration eine entscheidende pathogenetische Rolle. Die Wechselwirkungen werden über Oberflächenrezeptoren aus den Gruppen der Integrine, Cadherine sowie Syndecane vermittelt. Insbesondere die Integrine tragen zur Entwicklung des Multiplen Myeloms bei, indem sie die Adhäsion von Myelom- an Knochenmarkzellen vermitteln. Daraus resultieren sowohl eine vermehrte Expression von anti-apoptischen Proteinen wie BCL2 und Zellzyklusproteinen als auch eine vermehrte Telomerase-Aktivität. Diese Mechanismen führen zu einer verlängerten Überlebenszeit der Myelomzellen. Die Adhäsion bewirkt außerdem eine Steigerung der NFkappaB-abhängigen Transkription von IL-6. Dieses wiederum stellt den potentesten Wachstumsfaktor für Multiple Myelome dar und stimuliert die Sekretion von VEGF. Die gesteigerte VEGF-Konzentration führt zu einer erhöhten Gefäßdichte im Knochenmark, die ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium mit schlechter Prognose anzeigt (Raab et al. 2009).

Auf genetischer Ebene kann man zwei Subtypen des Multiplen Myeloms unterscheiden. Zum einen das hyperdiploide Multiple Myelom, bei dem eine Trisomie besteht. Diese betrifft hauptsächlich die Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21. Zum anderen das nicht-hyperdiploide Multiple Myelom, in dessen Rahmen Translokationen vorliegen, die häufig das Immunglobulin-Gen auf Chromosom 14 miteinbeziehen. Für einige genetische Veränderungen ist beschrieben, dass sie mit einer ungünstigen Prognose einhergehen. Dazu zählen die Translokationen t(4;14) und t(14;16) sowie die Deletionen del13 und del17p (Raab et al. 2009; Chesi und Bergsagel 2013)

Es ist bekannt, dass mit fortschreitendem Verlauf der Erkrankung Folge-Mutationen vorkommen können. Mit einer Rate von jeweils ca. 20 % liegen aktivierende Mutationen in den Genen von NRAS und KRAS vor (Mulligan et al. 2014). Ebenfalls treten

Mutationen in p53, RB1, FGFR3 (Raab et al. 2009), BRAF und dem NFkappaB-Signalweg auf (Chesi und Bergsagel 2015). Auch Cyclin D1 ist bei ca. 50 % der Myelompatienten überexprimiert (Bustany et al. 2015).

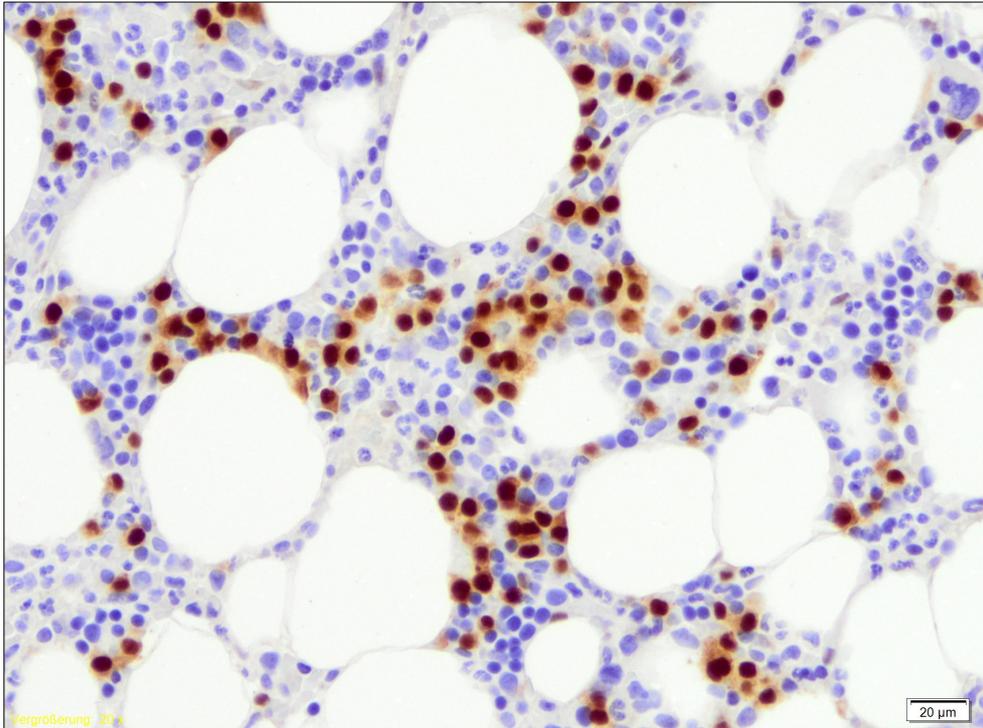


Abbildung 1: Cyclin D1-positives Myelom. Immunhistochemisch nukleäre Anfärbung mit einem Infiltrationsgrad von ca. 20 %. Beckenkammtrepanat. Original-Objektvergrößerung 20-fach.

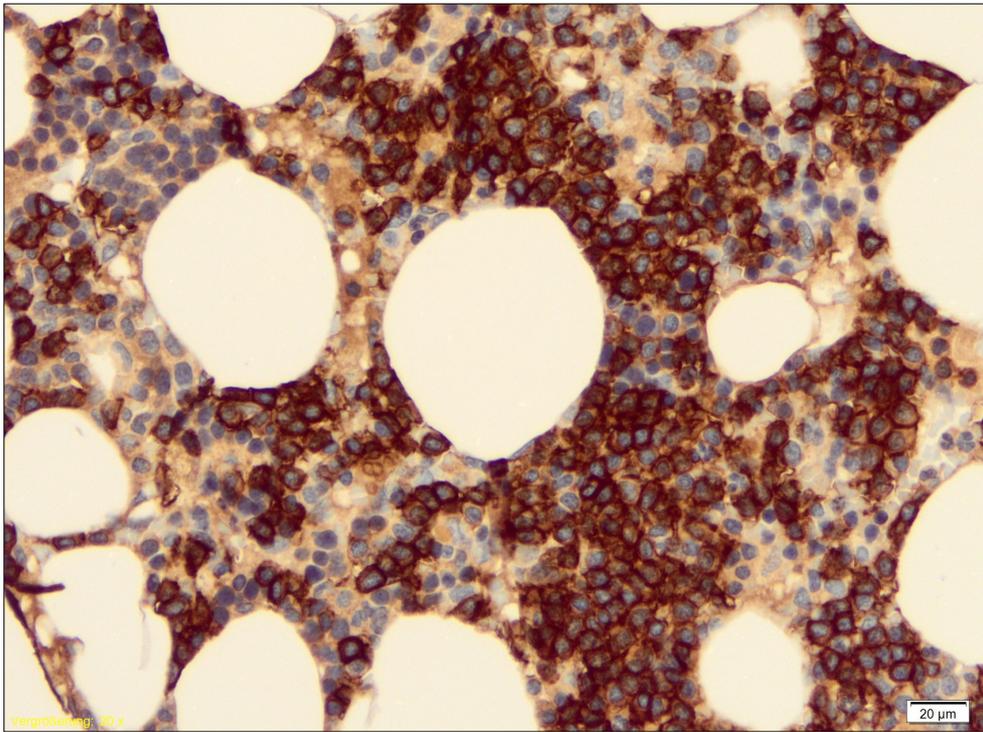


Abbildung 2: CD56-positives Myelom. Immunhistochemisch nukleäre Anfärbung mit einem Infiltrationsgrad von ca. 80 %. Beckenkammtrepanat. Original-Objektvergrößerung 20-fach.

1.4 Klinische Symptome

Als klinische Zeichen manifestieren sich zunächst unspezifische Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit und eventuell Gewichtsverlust. Allerdings zeigen viele Patienten keine Frühsymptome und fallen erst in fortgeschrittenen Stadien durch Komplikationen auf.

Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu Infektanfälligkeit infolge eines Antikörpermangelsyndroms, da zwar mehr, aber nicht funktionstüchtige Immunglobuline produziert werden. Außerdem stimulieren Myelomzellen die Osteoklasten und hemmen die Osteoblasten, wodurch es häufig zu schmerzenden Knochen und Frakturen kommt (Terpos et al. 2013). Durch diesen Abbau der Knochenmatrix ist ein starker Anstieg des Kalziumspiegels möglich. Dieser kann sich in Polyurie, Erbrechen, Somnolenz und Herzrhythmusstörungen äußern (Sternlicht und Glezerman 2015). Bei vielen Patienten lagern sich zudem die Leichtketten der Immunglobuline in der glomerulären Basalmembran der Niere ab (Dimopoulos et al. 2016). Dieses wiederum bedingt, dass etwa die Hälfte der Patienten eine Niereninsuffizienz erleidet und ca. 10 % sogar dialysepflichtig werden (Falco et al. 2007). Die monoklonalen Immunglobuline können sich ebenso an den Nerven ablagern und auf diesem Weg eine Polyneuropathie verursachen (Rajkumar et al. 2014). Des Weiteren ist eine Polymerbildung der Immunglobuline möglich, wodurch die Fließeigenschaft des Blutes erniedrigt wird. Dieses

kann in einem Hyperviskositätssyndrom resultieren, welches Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, aber auch Herzinsuffizienz und Sehstörungen hervorruft (Barosi et al. 2004).

Viele dieser Symptome stellen als sogenannte „CRAB-Kriterien“ (Vgl. Kap. 1.5) wichtige diagnostische Marker des Multiplen Myeloms dar.

Eine seltene, aber prognostisch ungünstige Komplikation ist der Übergang eines Multiplen Myeloms in eine Plasmazell-Leukämie (Chesi und Bergsagel 2013). Diese liegt vor, wenn der Anteil von Plasmazellen an den Leukozyten im peripheren Blut mindestens 20 % beträgt oder bei nachgewiesener monoklonaler Gammopathie die absolute Anzahl der zirkulierenden Plasmazellen wenigstens $2 \times 10^9/l$ erreicht (Todoerti et al. 2013).

1.5 Diagnose

Zur Sicherung der Diagnose eines Multiplen Myeloms wurden Kriterien durch die International Myeloma Working Group festgelegt, die zuletzt im Jahr 2014 aktualisiert wurden. Nach diesen Kriterien liegt ein Multiples Myelom vor, wenn die folgenden drei Voraussetzungen erfüllt sind:

- 1) In einer Knochenmark-Aspirationszytologie liegen mehr als zehn Prozent klonale Plasmazellen vor oder es wurde mittels Biopsie ein Plasmozytom gesichert.
- 2) Es trifft mindestens einer der folgenden Punkte zu:
 - Der Anteil der Myelomzellen im Knochenmark beträgt über 60%
 - Das Verhältnis der freien Leichtketten zueinander beträgt ≥ 100
 - Im MRT stellt sich mehr als eine Läsion dar
- 3) Es liegt ein Endorganschaden nach „CRAB-Kriterien“ vor (Rajkumar et al. 2014).

Tabelle 1: CRAB-Kriterien (Raab et al. 2009; Rajkumar et al. 2014)

Calcium	Hyperkalzämie mit einem Serum-Kalziumwert $> 2,75$ mmol/l
Renal disease	Kreatininwert > 2 mg/dl oder abgeschätzte GFR < 40 ml/min.
Anemia	Hb < 10 g/dl oder > 2 g/dl unter der Norm (normochrom, normozytär)
Bone lesions	Knochenläsionen, schwere Osteopenie oder pathologische Frakturen

Neben dem erhöhtem Kalziumwert und der Anämie sind auch andere Laborparameter ein wichtiger Bestandteil der Diagnosestellung. Am auffälligsten ist in vielen Fällen eine stark beschleunigte Blutsenkungsgeschwindigkeit (Alexandrakis et al. 2003). In der Immunfixation des Urins findet sich bei einem Großteil der Patienten eine Proteinurie,

insbesondere mit Kappa- oder Lambda-Leichtketten der Immunglobuline, welche dann als „Bence-Jones-Proteine“ bezeichnet werden. Im Serum sind neben einem erhöhten Wert des Gesamtproteins oft ebenfalls freie Leichtketten nachweisbar. In der Serumelektrophorese der Patienten stellt sich als Ausdruck dessen ein M-Gradient dar (Barley und Chari 2016).

Für die Diagnose von Knochenläsionen dienen bildgebende Verfahren. Dabei lassen sich mit Hilfe einer kontrastmittelfreien low-dose CT Aussagen über den Zustand der Knochen machen. Außerdem kommt zur Prüfung auf Myelokompressionen und der Suche nach extramedullären Infiltrationen das MRT zum Einsatz. Auch lassen sich solche extramedullären Lokalisationen mittels FDG-PET nachweisen (Barley und Chari 2016).

1.6 Stadieneinteilung

Derzeit existieren nebeneinander zwei Systeme, die das Multiple Myelom in Stadien einteilen.

1.6.1 Einteilung nach Durie und Salmon von 1975

Hierbei ergibt sich das Stadium aus der Betrachtung verschiedener Laborparameter sowie bildgebenden Verfahren.

Tabelle 2: Stadieneinteilung nach Durie und Salmon (aus Kortüm et al. 2013)

<p>Stadium 1</p>	<p><u>Alle vier Kriterien müssen erfüllt sein:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Hb > 10 g/dl 2) Normales Serumkalzium 3) Im Röntgen entweder kein auffälliger Skelettbefund oder lediglich eine solitäre Osteolyse 4) Niedrige Konzentration monoklonaler Immunglobuline: -IgG im Serum < 50 g/l -IgA im Serum < 30 g/l -Leichtketten im Urin < 4 g/24 h
<p>Stadium 2</p>	<p>Weder die Kriterien des Stadiums 1, noch des Stadiums 3 treffen zu.</p>
<p>Stadium 3</p>	<p><u>Mindestens ein Kriterium muss erfüllt sein:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Hb < 8,5 g/dl 2) Erhöhtes Serumkalzium 3) Fortgeschrittene Knochenläsionen 4) Hohe Konzentration monoklonaler Immunglobuline: -IgG im Serum > 70 g/l -IgA im Serum > 50 g/l -Leichtketten im Urin > 12 g/24h
<p>Weitere Unterteilung in Abhängigkeit von der Nierenfunktion:</p> <p>Stadium A</p> <p>Stadium B</p>	<p>-Kreatinin im Serum ≤ 2 mg/dl</p> <p>-Kreatinin im Serum > 2 mg/dl</p>

1.6.2 Einteilung nach dem International Staging System (ISS) von 2005

Diese Einteilung orientiert sich an den β_2 -Mikroglobulin- und Albuminwerten im Serum der Patienten.

Tabelle 3: Stadieneinteilung nach International Staging System (aus Raab et al. 2009)

Stadium 1	- β_2 -Mikroglobulin \leq 3,5 mg/l und -Albumin \geq 3,5 g/dl
Stadium 2	- β_2 -Mikroglobulin \leq 3,5 mg/l und -Albumin \leq 3,5 g/dl oder - β_2 -Mikroglobulin 3,5 – 5,5 mg/l
Stadium 3	- β_2 -Mikroglobulin \geq 5,5 mg/l

1.7 Therapie

Durch die International Myeloma Working Group wurden Kriterien ausgearbeitet, die festlegen, bei welchen Bedingungen therapeutisch interveniert werden muss. Demnach sollten generell nur symptomatische Patienten eine Therapie erhalten, wobei die Hauptindikation das Vorliegen von Endorganschäden ist (Kyle et al. 2003).

Die Erstlinientherapie gestaltet sich abhängig davon, in welchem Allgemeinzustand sich der Patient befindet und ob eine Stammzelltransplantation im Bereich des Möglichen liegt (Rajkumar 2014).

Bei einem Patienten ohne signifikante Komorbiditäten und einem Alter unter 75 Jahren wird nach dem Hochdosiskonzept verfahren (Knop 2013). Dabei beginnt die Therapie mit der Phase der „Induktion“, in der dem Patienten zwei bis vier Zyklen einer Kombination aus mehreren Medikamenten verabreicht werden, um die Tumorzellmasse zu reduzieren (Falco et al. 2007; Rajkumar 2014). Eine mögliche Kombination bei neu diagnostiziertem Multiplen Myelom ist das Rd-Schema, bestehend aus Lenalidomid und niedrig dosiertem Dexamethason. Zudem haben sich, auch bei Patienten mit ungünstiger genetischer Konstellation, wie einer Translokation t(4;14), Therapieregime etabliert, die den Proteasomen-Inhibitor Bortezomib beinhalten. Geläufige Kombinationen sind das VCD-Schema aus Bortezomib, Cyclophosphamid und Dexamethason, das VTD-Schema mit Bortezomib, Thalidomid und Dexamethason sowie das VRD-Regime aus Bortezomib, Lenalidomid und Dexamethason. Auch kann das Verabreichen einer noch größeren Zahl an Substanzen indiziert sein, zum Beispiel im Rahmen des VDT-PACE-Regimes mit Bortezomib, Dexamethason, Thalidomid, Cisplatin, Doxorubicin, Cyclophosphamid und Etoposid. Dieses findet bei aggressiven Krankheitsformen wie der Plasmazell-Leukämie Anwendung (Rajkumar 2014). An die Induktion schließt sich die Phase der „zytotoxischen Mobilisation“ an, in der zum Beispiel Cyclophosphamid mit G-CSF kombiniert werden kann. Letzteres regt die Produktion von Stammzellen und deren Übergang ins periphere

Blut an (Tay et al. 2017), um eine anschließende autologe Stammzellapherese zu ermöglichen.

Auf die Gewinnung der Stammzellen folgt eine hochdosierte Chemotherapie. Diese besteht üblicherweise aus hochdosiertem Melphalan. Dieses ist ein bifunktionelles Alkylanz, welches über die Herbeiführung von inter- und intrastrang-Quervernetzungen der DNA zytotoxisch wirkt. Bei Patienten im Alter unter 65 Jahren wird es in einer Dosis von 200 mg/m² verabreicht. Liegt das Alter des Patienten darüber, wird die Dosis entsprechend verringert (Falco et al. 2007).

Nach Beendigung der Chemotherapie erfolgt die autologe Stammzelltransplantation (ASZT), bei der die gewonnenen Blutstammzellen dem Patienten wieder infundiert werden.

Die Phase der anschließenden Erhaltungstherapie erfolgt derzeit noch im Rahmen klinischer Studien mit dem Ziel, das Outcome nach der ASZT noch zu verbessern (Falco et al. 2007). Unter anderem finden dabei die Substanzen Bortezomib und Lenalidomid Anwendung (Rajkumar 2014).

Liegen Komorbiditäten vor oder das Patientenalter über 75 Jahren und wird eine Stammzelltransplantation als nicht möglich erachtet, erfolgt eine Bortezomib basierte Therapie. Alternativ ist auch das Rd-Regime möglich. (Rajkumar 2014).

Insgesamt stellt sich die Situation so dar, dass es eine Vielzahl von Medikamenten gibt, deren Kombination, Einsatzdauer und zum Teil auch Indikation verschieden gehandhabt wird und immer noch Gegenstand der Forschung sind. Als derzeitiger Standard gilt der Versuch einer Kombination aus hochdosiertem Melphalan und anschließender ASZT, wann immer es möglich ist.

Trotz der Therapie erleidet der Großteil der Patienten ein Rezidiv (Rajkumar 2014), für dessen Behandlung ebenfalls mehrere Therapieregime zur Verfügung stehen. Diese orientieren sich an individuellen Wirkungen und Nebenwirkungen vorheriger Therapien sowie dem Allgemeinzustand des Patienten (Kortüm et al. 2013). Ungefähr ein Drittel der Patienten im Rezidiv spricht auf Bortezomib an, was durch die zusätzliche Gabe von Doxorubicin oder Dexamethason noch erhöht werden kann. Auch Kombinationen mit Lenalidomid sind möglich. Bei refraktärem Verlauf stellt das Lenalidomid-Analogon Pomalidomid eine Therapieoption dar, vor allem in Kombination mit niedrig dosiertem Dexamethason (Rajkumar 2014). Außerdem befinden sich weitere Substanzen in der Erprobung. Diese sind zum Beispiel der Histondeacetylase-Inhibitor Panobinostat sowie

die anti-CD38-Antikörper Daratumumab und SAR650984. Diesen Regimen kann dann bei geeigneten Patienten wieder eine autologe Stammzelltransplantation folgen (Rajkumar 2014).

Zusätzlich sollte eine symptomatische Therapie erfolgen. Bisphosphonate können bei Patienten mit Osteopenie oder Osteoporose durch eine Hemmung der Osteoklasten Schmerzen und Frakturhäufigkeiten senken. Kommt es dennoch zu Wirbelsäulenfrakturen, ist meist eine operative Versorgung indiziert. Zur Infektionsprophylaxe empfehlen sich Impfungen, zum Beispiel gegen Pneumokokken und Influenza sowie bei wiederholtem Auftreten von Infekten die intravenöse Gabe von IgG (Sánchez-Ramón et al. 2016).

Trotz der Therapiervielfalt ist die Prognose der Patienten auf Dauer schlecht und das Multiple Myelom gilt weithin als „unheilbar“. Die fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt im Durchschnitt 28-43 %, bei jungen Patienten und wenigen Risikofaktoren konnte hingegen eine zehn-Jahres-Überlebensrate von 75 % gezeigt werden (Chesi und Bergsagel 2013). Das mediane Überleben beläuft sich auf drei bis vier Jahre ohne Stammzelltransplantation und auf fünf bis sieben Jahre nach einer solchen (Raab et al. 2009).

1.8 RAS-Protein und -Signalweg

Das RAS-Protein gehört zur Familie der kleinen monomeren G-Proteine und existiert in den drei Isoformen HRAS, NRAS und KRAS. Dieser Typ von G-Proteinen bindet unterschiedliche Guaninnukleotide, wodurch nachfolgende Signalkaskaden in Gang gesetzt werden. Die aktive Form des G-Proteins liegt vor, wenn es an Guanosintriphosphat (GTP) gebunden ist. Durch die ihm eigene GTPase-Aktivität wird das gebundene GTP in GDP überführt, wodurch das Protein dann im inaktiven Zustand vorliegt. Der Zustandswechsel erlaubt es den RAS-Proteinen, als molekularer Schalter regulatorisch auf Wachstum und Differenzierung einer Zelle sowie die Genexpression zu wirken.

Die Gruppe der RAS-Proteine stellt demnach ein molekulares On-Off-Schaltsystem für mehrere Signaltransduktionskaskaden der eukaryotischen Zelle dar. Für die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskade (MAPK-Kaskade) binden Wachstumsfaktoren oder Zytokine an ihre jeweiligen Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität in der Zellmembran. Nach der Autophosphorylierung der Rezeptoren assoziieren die phosphorylierten Tyrosinreste an einen Komplex, der aus dem Adapterprotein Grb2 und SOS besteht. Das RAS-Protein, welches über einen Lipidanker an die Zellmembran gebunden ist, wird daraufhin durch das nun in räumlicher Nähe befindliche SOS in seine GTP-bindende Form überführt. In dieser Form kann RAS die Serin-/Threoninkinase Raf-1

aktivieren, die dann ihrerseits die Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase (MKK) aktiviert. Die MKK überführt anschließend durch Phosphorylierung die Kinasen ERK1 und ERK2 in ihre aktive Form. Die intrazellulären Signalmoleküle ERK1 und ERK2 sind Regulatoren von Meiose und Mitose in differenzierten Zellen und somit an Zellteilung und zunehmender Differenzierung der Zelle beteiligt (Heinrich et al. 2007).

In ca. 30 % aller humanen Neoplasien (Heinrich et al. 2007) und auch in ca. 20 bis 45 % der Multiplen Myelome (Smith et al. 2015) liegen Mutationen der RAS-Proteine vor, die einen Verlust der GTPase-Aktivität bewirken. GTP kann aufgrund dessen nicht mehr in GDP überführt werden, wodurch ein konstitutiv aktives RAS-Protein für die beschriebene Kaskade entsteht. Eine dauerhaft aktive MAPK-Kaskade resultiert in fortlaufender DNA-Replikation, Zellwachstum und schließlich Zellteilung. Aufgrund dieses Einflusses auf die Tumorentstehung wird das mutierte RAS-Protein auch als RAS-Onkogen bezeichnet (Petrides 2007). Im Umkehrschluss bedeutet dies für die Entwicklung von Therapien, dass durch die gezielte Inhibierung eines durch somatische Mutation aktiven RAS-Signalweges auch das Tumorstadium und -überleben sowie die -ausbreitung inhibiert werden können.

1.9 Fragestellung

Da das Multiple Myelom mit zehn Prozent aller hämatologischen Neoplasien eine häufige Erkrankung mit immer noch schlechter Prognose darstellt, wird aktuell intensiv auf diesem Gebiet geforscht. Durch ein genaueres Aufdecken der Pathogenese erhofft man sich die Identifikation neuer potenzieller Angriffspunkte (Raab et al. 2009). Diese sollen die Entwicklung neuer Medikamente möglich machen, die gezielt in die Entstehung und weitere, das Fortschreiten der Erkrankung begünstigende, Faktoren eines Myeloms eingreifen können. Einen wichtigen Teil dieser Zielstrukturen stellen auch die im Rahmen der Erkrankung auftretenden Mutationen dar. Es wird angenommen, dass bestimmte Medikamente beim Vorliegen definierter Mutationen im Myelom eine bessere oder auch eine schlechtere Wirksamkeit zeigen. Bezüglich dieser Annahme wurde eine Studie zur Wirksamkeit von Bortezomib bei NRAS- und KRAS-Mutationen durchgeführt. In dieser zeigte sich, dass Patienten mit einer NRAS-Mutation deutlich seltener auf die Bortezomib-Therapie ansprachen (7 % bei mutiertem NRAS vs. 53 % beim Wildtyp) und auch die Zeit zum Progress im Vergleich zum Wildtyp verkürzt war. Diese Unterschiede in der Wirksamkeit konnten für Dexamethason nicht festgestellt werden (Mulligan et al. 2014). Die Art der Mutation ist also relevant für die Auswahl der Therapie. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Zusammenhang zwischen Mutationen und Therapieansprechen daher näher beleuchtet werden.

In Anbetracht der Tatsache, dass die Therapie mit hochdosiertem Melphalan und anschließender autologer Stammzelltransplantation als Standard gilt, wurden in diese Arbeit nur Patienten eingeschlossen, die diese Therapie erhalten hatten. Da die NRAS- und KRAS-Mutationen mit jeweils ca. 20 % ein häufiges Phänomen bei Patienten mit Multiplem Myelom darstellen (Mulligan et al. 2014), wurde hier der Fokus auf diese beiden Gene gelegt und folgende Fragestellungen untersucht:

- 1) Wie stellt sich der Mutationsstatus in den Genen für NRAS und KRAS im Patientenkollektiv dar?
- 2) Welches Outcome hatten die Patienten mit Mutationen in den Genen für NRAS und KRAS nach Therapie mit hochdosiertem Melphalan und anschließender autologer Stammzelltransplantation im Vergleich zu Patienten ohne diese Mutationen?
- 3) Stellt das Vorhandensein von RAS-Mutationen im Kontext dieser Therapie einen prognostischen Einfluss dar?

2. Material und Methoden

2.1 Patientenproben

Die Proben wurden aus dem Patientenkollektiv des Instituts für Pathologie der Universität zu Lübeck zur Verfügung gestellt. Ausgewählt wurden Patienten, die in den Jahren 1997 bis 2014 die Diagnose eines Multiplen Myeloms erhielten und mit hochdosiertem Melphalan und anschließender autologer Stammzelltransplantation behandelt wurden.

Als Probenmaterial dienten in Formalin fixierte, in Paraffin gebettete (FFPE) Gewebeproben, die an verschiedenen Körperregionen entnommen wurden (siehe Tab. 4).

Tabelle 4: Entnahmeorte des Probenmaterials

Entnahmeort	Anzahl
Beckenkamm	54
Wirbelsäule	7
Unterkiefer	2
Rippe	2
Femur	2
Corpus sterni	1
Clavicula	1
Orbitaknochen	1

Insgesamt wurden zunächst 90 Patienten ausgewählt, von denen schließlich 70 in diese Arbeit mit einbezogen werden konnten (siehe Abb. 3). Darunter befanden sich 43 männliche und 27 weibliche Patienten, womit das Geschlechterverhältnis m:w 1,6:1 betrug. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 55,36 Jahre.

Die Diagnose des Multiplen Myeloms wurde nach den aktuellen Kriterien der International Myeloma Working Group durch den Hämatopathologen Prof. Dr. med. C. Thorns gestellt. Durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck wurde ein positives Votum erteilt (Aktenzeichen 14-149A).

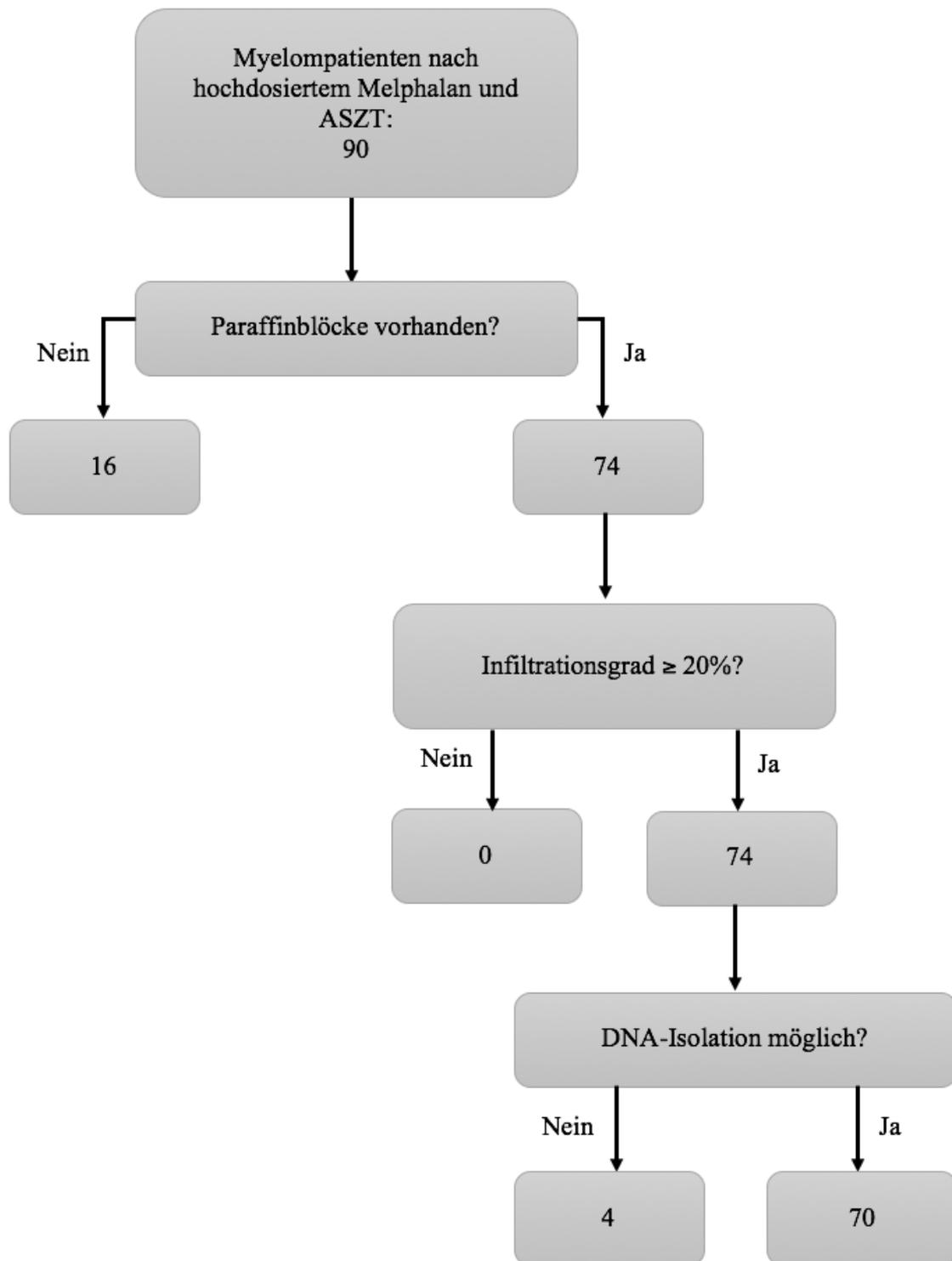


Abbildung 3: Flussschema zum Patientenkollektiv. Dargestellt sind die Faktoren, anhand derer Patienten in diese Arbeit aufgenommen bzw. ausgeschlossen wurden.

2.2 Bestimmung des Infiltrationsgrades

Zunächst wurden die, bereits von jedem Patienten vorhandenen, Objektträger erneut unter dem Mikroskop gesichtet. Anhand derer wurde der Infiltrationsgrad im Präparat bestimmt und somit eingeschätzt, welche Patientenproben sich für die DNA-Extraktion eignen. Als Cut-off zum Einschluss in die Studie wurde dabei eine Infiltration von mindestens 20 % gewählt.

2.3 DNA-Isolation

Die genomische Patienten-DNA wurde aus dem FFPE-Material extrahiert. Dafür wurden mit einem Rotationsmikrotom drei bis vier 10 µm dicke sogenannte „Röllchen“ von den Blöcken geschnitten und in ein Eppendorfgesäß überführt.

Für die DNA-Extraktion wurde das QiaAmp Mini Kit 250 eingesetzt. Zunächst erfolgte die Entparaffinierung des Probenmaterials. Dafür wurden zu jeder Probe 1000 µl Xylol hinzugefügt und die jeweilige Probe in den nächsten 20 Minuten mehrfach mit Hilfe des Vortexers durchmischt. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation mit 13.000 rpm, an deren Ende der Xylol-Überstand abgenommen und in einem gesonderten Abfallbehälter entsorgt wurde. Anschließend wurden 1000 µl 100 %-iges Ethanol hinzugegeben, die Proben daraufhin gründlich durchmischt und fünf Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde erneut der Überstand abpipettiert und verworfen.

Befand sich eine große Menge Material im Eppendorfgesäß, wurde der gesamte Vorgang noch einmal vorgenommen, um eine vollständige Entparaffinierung zu gewährleisten.

Das nun entparaffinierte Gewebe in den Eppendorfgesäßen wurde danach bei 56°C in Abhängigkeit von der Materialmenge mindestens 15 Minuten, jedoch höchstens eine Stunde lang trocknen gelassen. Nach der Trocknung wurden je 180 µl des ATL-Puffers und 30 µl Proteinase K hinzugegeben. Die Proben wurden dann für 48 Stunden auf dem Thermoschüttler bei 56°C und 1.000 rpm inkubiert.

Nach der ersten Inkubation wurde zu allen Proben je 200 µl Lysis Puffer AL hinzugegeben und bei 70°C und 1.000 rpm auf dem Thermoschüttler für eine Stunde erneut inkubiert. Im Anschluss an die Lyse wurden jeweils 200 µl Ethanol p.a. hinzugefügt und die Proben auf Elutionssäulen überführt, um bei 13.000 rpm eine Minute lang zentrifugiert zu werden. Die Elutionssäulen wurden dann in ein neues 2 ml Tube überführt, 500 µl Puffer AW1 zugefügt und erneut eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 500 µl Puffer AW2 wiederholt. Die Säulen wurden dann in ein zuvor beschriftetes 1,5 ml Eppendorfgesäß gesteckt und 100 µl AE Puffer auf die Säulen gegeben. Nach 25 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 8.000 rpm zentrifugiert. Von der eluierten

DNA wurde anschließend mittels Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) der DNA-Gehalt ermittelt.

2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde genutzt, um die vorhandene DNA zu vervielfältigen und so später in der Sanger-Sequenzierung einsetzen zu können.

In der Polymerasekettenreaktion wurden für jede Reaktion 100 ng DNA bei einem Gesamtreaktionsvolumen von 25 µl verwendet. Diese setzten sich wie folgt zusammen: 22 µl PyroMark PCR MasterMix, 1 µl Forward-Primer, 1 µl Reverse-Primer und 1 µl der vorverdünnten DNA.

Folgende Primer wurden für die Polymerasekettenreaktion verwendet:

Tabelle 5: Liste der Primer

Primer	Primer-Sequenz
NRAS Exon 2 forward	5' – AGAACCAAATGGAAGGTCACAC
NRAS Exon 2 reverse	5' – CGACAAGTGAGAGACAGGATC
NRAS Exon 3 forward	5' – CTCCTCCCTGCCCCCTTACC
NRAS Exon 3 reverse	5' – CTTCCCTAGTGTGGTAACCTC
NRAS Exon 4 forward	5' – CATGTTGCCCAGGCTAATCTC
NRAS Exon 4 reverse	5' – CAACTGATGCAAACCTTGCAC
KRAS Exon 2 forward	5' – CTTTATGTGTGACATGTTC
KRAS Exon 2 reverse	5' – TGGTCAGAGAAACCTTTATC
KRAS Exon 3 forward	5' – CCGTCATCTTTGGAGCAGGAAC
KRAS Exon 3 reverse	5' – CTATAATTACTCCTTAATGTCAGC
KRAS Exon 4 forward	5' – TTGTGGACAGGTTTTGAAAGA
KRAS Exon 4 reverse	5' –AGAAGCAATGCCCTCTCAAG

Die Polymerasekettenreaktion lief dann im Thermocycler wie folgt ab:

Tabelle 6: Ablauf der PCR

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
Denaturierung	94°C	15 min	1
Denaturierung	94°C	30 sek	↑
Annealing	57°C	30 sek	44
Elongation	72°C	45 sek	↓
Elongation	72°C	4 min	1
Abkühlen	4°C	-	-

Um zu überprüfen, ob genug PCR-Produkt entstanden ist, wurde anschließend eine Agarose (1,5 %)-Gelelektrophorese mit einer Laufzeit von 35 Minuten bei 100 Volt durchgeführt. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid zum Agarosegel konnten anschließend die Banden des PCR-Produktes unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht werden.

2.5 Sequenzierung nach Sanger

Die Sanger-Sequenzierung wurde in dieser Arbeit verwendet, um molekularpathologische Sequenzveränderungen der Exone 2, 3 und 4 sowie der durch die Primer bestimmten angrenzenden Intronbereiche des NRAS- und des KRAS-Gens zu untersuchen. Zur Durchführung diente der Kapillarsequenzierer CEQ 8800 der Firma Beckmann Coulter mit der Software CEQ Genome Lab.

Um die PCR-Produkte in der Sequenzierung einsetzen zu können, wurden diese zuerst mit Hilfe der Agencourt AMPure CleanSEQ-Beads aufgereinigt.

Zunächst wurden die kühl gelagerten AMPure CleanSEQ-Beads auf dem Vortex-Rüttler durchmischt und anschließend jeder Probe 30 µl davon hinzugefügt. Nach 10-maligem Durchmischen mittels einer Pipette wurden die Proben in ein 96-well-plate überführt und so erst fünf Minuten bei Raumtemperatur und daraufhin weitere fünf Minuten auf einem Magneten stehen gelassen. Nach Ablauf der Zeit wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das verbliebene Produkt wurde nun mit Ethanol gewaschen und der Überstand jeweils wieder verworfen. Dieser Schritt wurde einmal mit 100 µl und danach zweimal mit je 150 µl 70 %-igem Ethanol, je 30 Sekunden lang, vorgenommen. Nach dem letzten Waschschritt wurde die Platte schnell vom Magneten entfernt und das Produkt rasch mit 50 µl H₂O resuspendiert, um anschließend wieder für fünf Minuten auf dem Magneten zu

verweilen. Daraufhin wurden aus jedem Reaktionsgefäß mit einer Pipette 30 µl des nun aufgereinigten PCR-Produktes entnommen und in ein neues 96-well-plate übertragen.

Für die eigentliche Sequenzierungs-Reaktion wurden im Anschluss daran zu jeder Probe in der Platte je 4 µl DTCS, 2,5 µl H₂O, 1 µl Forward-Primer, 1 µl Reverse-Primer sowie 2,5 µl des PCR-Produktes hinzugefügt und das 96-well-plate mit einer Schutzfolie abgedeckt. Es wurden die gleichen Primer wie bei der PCR verwendet. Daraufhin wurde die Sequenzierung im Cyclyer gestartet und lief wie folgt ab:

Tabelle 7: Ablauf der Sanger-Sequenzierung

	Temperatur	Dauer	Zyklenanzahl
1.	96 °C	20 sek	↑
2.	50 °C	20 sek	30
3.	60 °C	4 min	↓
4.	4 °C	-	

Um das Ergebnis der Sequenzierungs-Reaktion auslesen zu können, mussten auch diese Produkte unter Verwendung der Agencourt AMPure CleanSEQ-Beads zunächst aufgereinigt werden. Zu Beginn wurden die im Kühlschrank gelagerten Agencourt AMPure CleanSEQ-Beads gevortext und dann jeweils 10 µl davon zu jeder Probe hinzugefügt. Danach wurden je 45 µl 85 %-iges Ethanol, gefolgt von 10-maligem Mischen mit einer Pipette, hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben erst fünf Minuten bei Raumtemperatur und dann fünf Minuten auf einem 96R Ring-Magneten ruhen gelassen. Im Folgenden wurde der Überstand abgenommen und die Waschschrirte vorgenommen. Diese erfolgten einmal mit 100 µl und danach zweimal mit 150 µl 85 %-igem Ethanol für je 30 Sekunden, wobei nach jedem Waschschrirrt der Überstand abgenommen und verworfen wurde. Nach Entnahme aus der Magnetplatte wurden die Produkte rasch in SLS resuspendiert und erneut für fünf Minuten auf dem Magneten gelagert. Im Anschluss daran wurden aus jedem Reaktionsgefäß 40 µl in ein neues 96-well-plate überführt und mit je einem Tropfen Öl überschichtet. Die leeren Wells auf der Platte wurden mit je 50 µl Wasser gefüllt und ebenfalls mit einem Tropfen Öl überschichtet. Des Weiteren wurden die Wells einer Pufferplatte mit je 200 µl Separation Puffer gefüllt. Beide Platten wurden für die Analyse der Sequenzierung im CEQ 8800 Beckmann Coulter-Gerät eingebaut und das Gerät gestartet.

2.6 Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software CEQ Genome Lab. Dabei wurde zunächst in den Exons 2, 3 und 4 sowie den angrenzenden Introns von NRAS und KRAS durch Vergleich der Wildtyp-Basensequenzen mit denen eines jeden Patienten festgestellt, ob es bei den Patienten zu einem Basenaustausch gekommen war. Lag ein solcher vor, wurde ermittelt, ob in Folge des Basenaustausches auch eine andere Aminosäure entstanden war. Anschließend wurden unter Anwendung der internetbasierten Datenbank „Ensembl Genome“ die genauen Positionen der Mutationen auf der cDNA- sowie der Proteinebene herausgearbeitet und diese mit einer entsprechenden Literaturrecherche verbunden.

Darauf folgte die Analyse der klinischen Daten der Patienten, die freundlicherweise von Dr. Niklas Gebauer aus der Klinik für Hämatologie/Onkologie des UKSH, Campus Lübeck, zur Verfügung gestellt wurden. Zunächst wurden dabei die drei Gruppen „Wildtyp“ (WT), „NRAS-Mutation“ (NRAS-MUT) sowie „KRAS-Mutation“ (KRAS-MUT) erstellt, die daraufhin einander anhand verschiedener klinischer und therapeutischer Parameter gegenübergestellt wurden (siehe Tab. 10). Als primäre Endpunkte für das Outcome der Patienten wurden das Gesamtüberleben, das progressionsfreie Überleben sowie das Überleben nach einem Rückfall betrachtet. Die Ergebnisse wurden als Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und anhand des Mantel-Cox-Testes verglichen. Der exakte Fisher-Test diente der weiteren Subgruppenanalyse. Ermittelte p-Werte von $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angenommen. Für die ebenfalls ermittelten Hazard Ratios (HR) wurde ein Konfidenzintervall (KI) von 95 % festgelegt. Die Durchführung der genannten statistischen Tests und ihre graphische Aufbereitung erfolgte mit Microsoft Excel Version 14.0.0 und GraphPad Prism 6.

2.7 Liste der Materialien

Tabelle 8: Material- und Geräteliste

Anfertigung der Schnitte:
- Rotationsmikrotom (Leica / DSC1)
DNA-Extraktion:
- QiaAmp Mini Kit 250 - ATL-Puffer - Lysis-Puffer AL - Puffer AW1 - Puffer AW 2 - AE-Puffer - Xylol (Merck) - QUIAGEN Proteinase K - Thermoschüttler - Ethanol p.a. (Merck) - Nanodrop 2000 (Thermo Scientific)
PCR:
- PyroMark PCR Kit (QUIAGEN) - Forward-Primer (TibMdBid) - Reverse-Primer (TibMdBid) - T1-Thermocycler (Biometra)
Gelelektrophorese:
- 3:1 Agarose (1,5%) (Biozym Sieve) - Einfacher TAE-Puffer - 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen) - Ethidiumbromid (Serva) - Elektrophoresekammer (Compact Multi-Wide, Biometra)
Sanger-Sequenzierung:
- Kapillarsequenzierer CEQ 8800 (Beckmann Coulter) - Software CEQ Genome Lab - Agentcourt AMPure CleanSEQ-Beads (Beckmann Coulter) - 96-well plates - Ethanol (Merck) - H ₂ O HPLC (Carl Roth GmbH) - GenomeLab Quickstart Mix DTCS (Beckmann Coulter)

- Forward-Primer (TibMdBid)

- Reverse-Primer (TibMdBid)

Aufreinigung des Sequenzierungs-Ergebnisses:

- Agentcourt CleanSEQ-Beads (Beckmann Coulter)

- Ethanol (Merck)

- 96R Ring-Magnet (Alpaqua)

- GenomeLab Sample Loading Solution (Beckmann Coulter)

- 96-well plate

- H₂O HPLC (Carl Roth GmbH)

- Mineral Oil (Beckmann Coulter)

- GenomeLab Separation Buffer (Beckmann Coulter)

3. Ergebnisse

3.1 Mikroskopische Sichtung des Probenmaterials

Es lag bereits Probenmaterial jedes Patienten vor (zu den verschiedenen Entnahmeorten siehe Tab. 4). Dieses wurde im Rahmen der Diagnostik gewonnen und nach verschiedenen Methoden gefärbt. Die Objektträger wurden zunächst unter dem Mikroskop gesichtet, um den Infiltrationsgrad abzuschätzen. Dieser lag bei allen vorhandenen Paraffinblöcken über der gesetzten Grenze von 20 %.

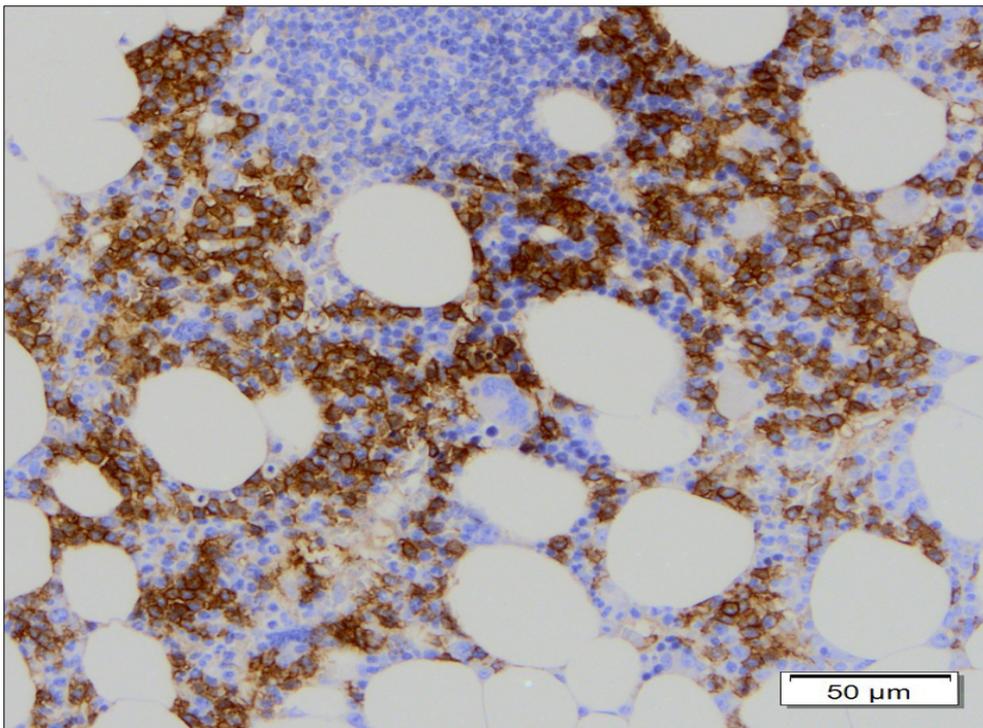


Abbildung 4: CD138-positives Myelom. Immunhistochemisch nukleäre Anfärbung mit einem Infiltrationsgrad von ca. 60 %. Beckenkammtrepanat. Original-Objektvergrößerung 10-fach.

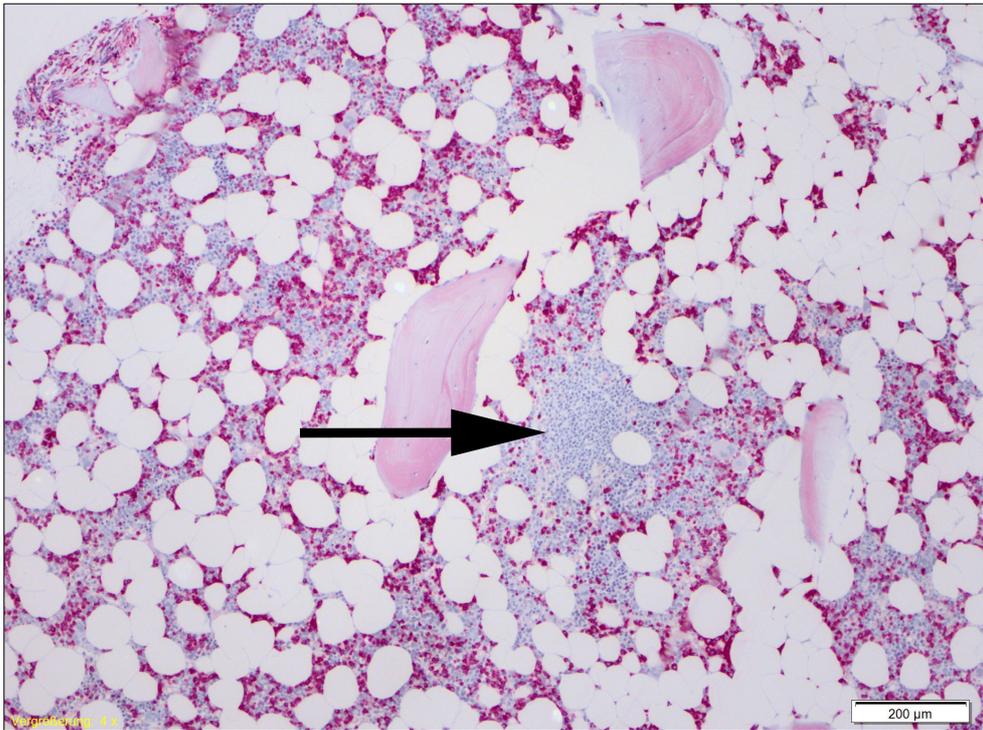


Abbildung 5: Myelom in ASD-Färbung. Die Plasmazellen stellen sich ASD-negativ (blau) dar. Der Pfeil deutet auf einen solchen Herd von Plasmazellen. Beckenkamltrepanat. Original-Objektvergrößerung 4-fach.

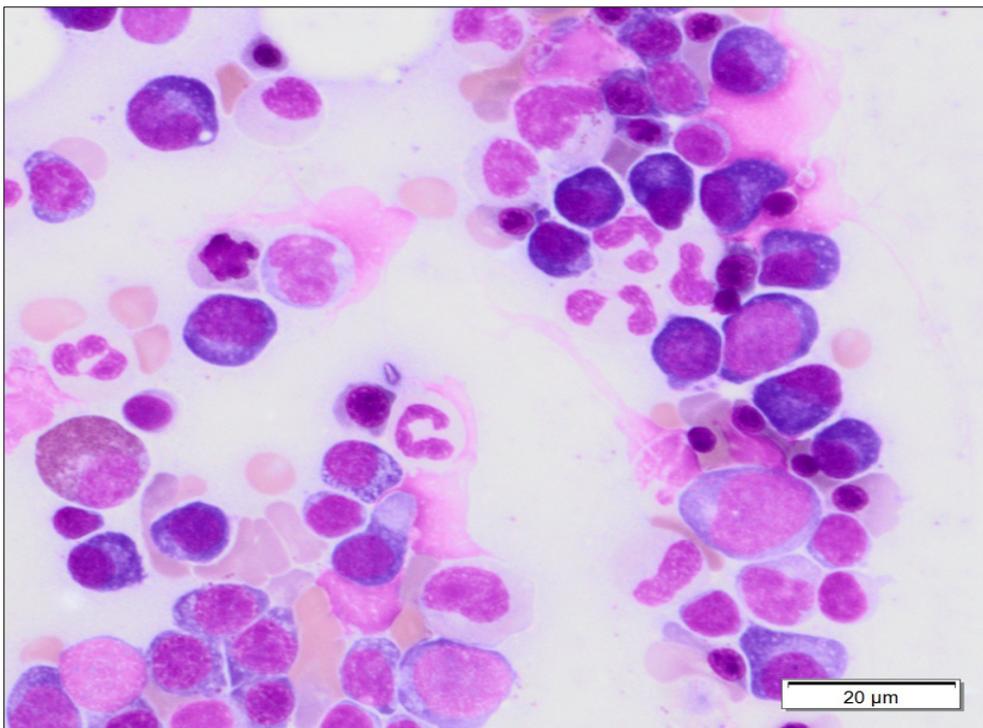


Abbildung 6: Myelom im Knochenmarksausstrich. Zytologisch vermehrte Infiltration durch Plasmazellen. Original-Objektvergrößerung 40-fach.

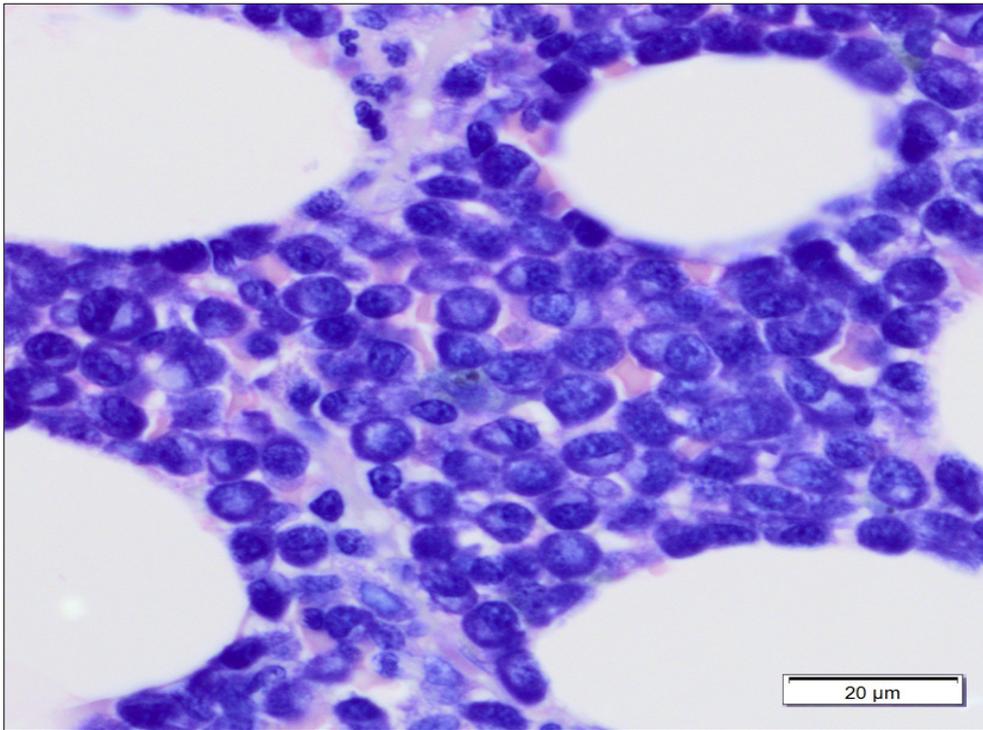
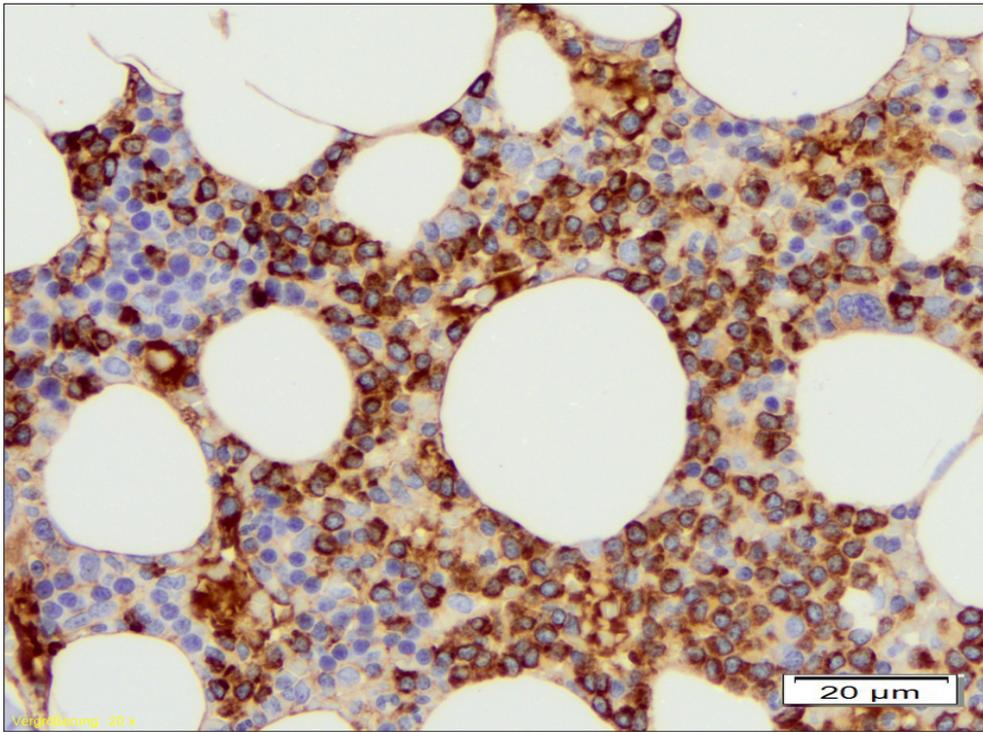
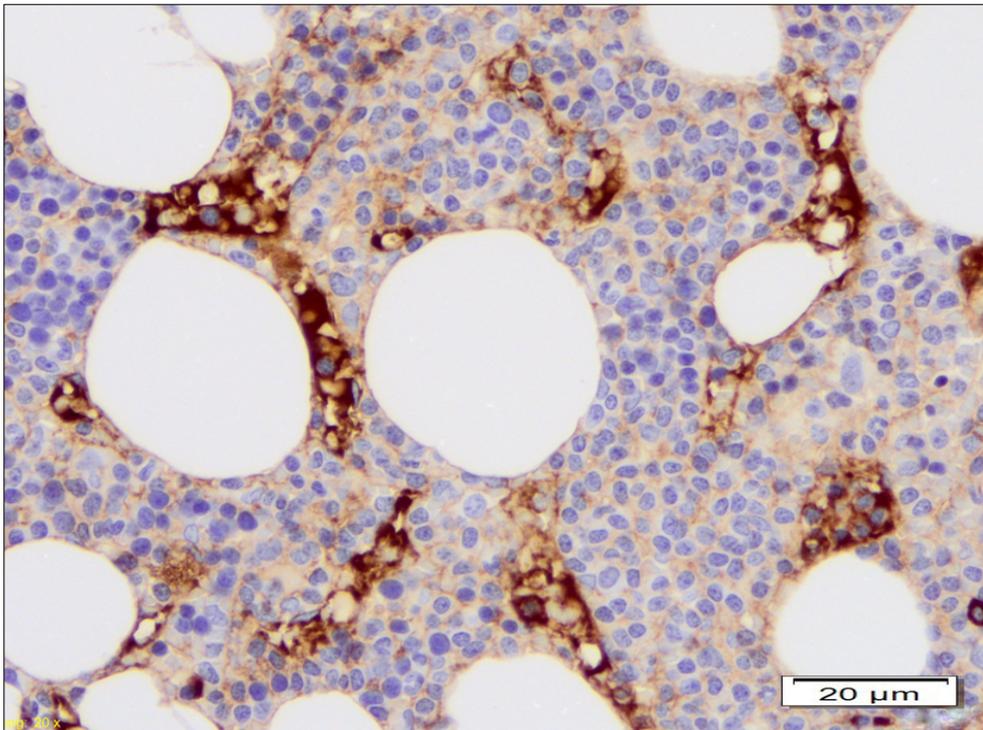


Abbildung 7: Myelom in Giemsa-Färbung. Histologisch herdförmige Infiltration durch Plasmazellen. Beckenkammtrepanat. Original-Objektvergrößerung 40-fach.



A



B

Abbildung 8: Myelom mit Expression von Kappa-Leichtketten (A) bei gleichzeitigem Fehlen von Lambda-Leichtketten (B). Immunhistochemisch nukleäre Anfärbung der Kappa-Leichtketten mit einem Infiltrationsgrad von ca. 70 % (A). Beim gleichen Patienten fehlt als Folge der Monoklonalität die Expression von Lamba-Leichtketten (B). Beckenkammtranseptat. Original-Objektvergrößerung 20-fach.

3.2 Auswertung der Mutationen

Unter Anwendung der Software CEQ Genome Lab wurden die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung ausgewertet.

Zunächst wurde, wie in Abb. 9 beispielhaft dargestellt, ermittelt, ob ein Basenaustausch vorliegt. Dabei wurden die Basensequenzen der Exons 2, 3 und 4 sowie die angrenzenden Intronsequenzen von NRAS und KRAS jeder einzelnen Patientenprobe mit der Wildtyp-Sequenz verglichen.

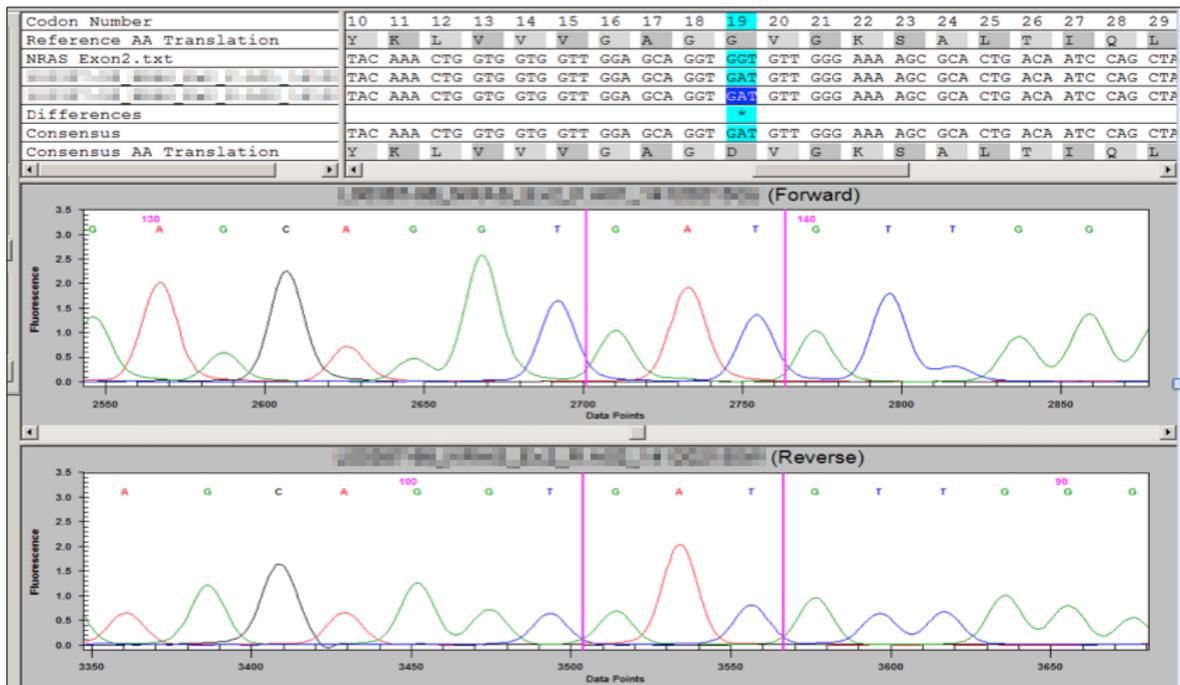


Abbildung 9: Auswertung der Sanger-Sequenzierung mittels der Software CEQ Genome Lab. Bestätigung einer Mutation in NRAS Exon 2. In diesem Fall konnte mit der Sanger-Sequenzierung eine Mutation in NRAS Exon 2 an Position 19 festgestellt werden, die die zweite Position dieses Basentriplets betrifft. An dieser Stelle wurde die Base Guanin gegen Adenin ausgetauscht.

Die Proben, in denen eine Mutation vorlag, wurden in einer Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Exon-Mutationen

	Basenaustausch	Aminosäure-austausch	cDNA-Ebene	Protein-Ebene	COSM-Nummer
NRAS Exon 2					
	GGT → GCT	Ja	c.35G>C	p.G12A	#565
	GGT → GAT	Ja	c.38G>A	p.G13D	#573
	GGT → GTT	Ja	c.35G>T	p.G12V	#566
NRAS Exon 3					
	TAC → GAC	Ja	c.190T>G	p.Y64D	#1666991
	CAA → CAC	Ja	c.183A>C	p.Q61H	#586
	CAA → CAC	Ja	c.183A>C	p.Q61H	#586
	CAA → CGA	Ja	c.182A>G	p.Q61R	#584
NRAS Exon 4					
	CTG → CTA	Nein	c.399G>A	p.L133L	Nicht beschrieben
	AAG → AAT	Ja	c.303G>T	p.K101N	Nicht beschrieben
KRAS Exon 2					
	GGT → TGT	Ja	c.34G>T	p.G12C	#516
	GGC → GAC	Ja	c.38G>A	p.G13D	#532
KRAS Exon 3					
	GAG → AAG	Ja	c.184G>A	p.E62K	#3459505
	CAA → CAC	Ja	c.183A>C	p.Q61H	#1135364
	CAA → CGA	Ja	c.182A>G	p.Q61R	#552
KRAS Exon 4					
	AGA → AAA	Ja	c.404G>A	p.R135K	Nicht beschrieben
	AAG → AGG	Ja	c.440A>G	p.K147R	Nicht beschrieben

Insgesamt ergaben sich in der Auswertung 22 Mutationen bei 21 Patienten, davon neun im NRAS- und 13 im KRAS-Gen. Dieses bedeutet, dass 30 % der Patienten im vorliegenden Kollektiv eine Mutation trugen. Ein Patient wies zwei Mutationen auf.

Bezüglich der Verteilung auf Exons und Introns befanden sich 16 Mutationen in den Exons und sechs in Introns. Unter den Exon-Mutationen zeigten sich neun in NRAS sowie sieben in KRAS.

Die sechs Intron-Mutationen betrafen ausschließlich KRAS Intron 4 und traten dort auch immer an der gleichen Position auf.

5'-

```
GTAAGTAACACTGAAATAAATACAGATCTGTTTTCTGCAAAATCATAACTGTTATGTC  
ATTTAATATATCAGTTTTTCTCTCAATTATGCTA TACTAGGAAATAAAACAATATTTAG  
TAA-3'
```

Abbildung 10: Beginn der Wildtyp-Sequenz von KRAS Intron 4. Gelb unterlegt ist die Position, an der der Basenaustausch auftrat.

Bei den 16 Exon-Mutationen handelt es sich um 15 verschiedene, da eine Mutation im Kollektiv zwei Mal vorkam. Dieses betraf den Austausch von Adenin gegen Cytosin im NRAS Exon 3 an Position 183 auf cDNA-Ebene, was im Protein zur Aminosäure Histidin statt Glutamin führte.

In einem Fall, bei dem sich in NRAS Exon 4 an Position 399 der cDNA Adenin anstatt Guanin befand, kodierte das Basentriplet weiterhin für die Aminosäure Leucin. Somit führte diese Mutation nicht zu der Entstehung einer anderen Aminosäure. Bei allen anderen Mutationen resultierten durch den Basenaustausch andere Aminosäuren und somit im Verlauf auch ein verändertes Protein.

Im Hinblick auf die COSM-Nummern der Exon-Mutationen konnten in diesem Patientenkollektiv vier verschiedene Mutationen detektiert werden, für die noch keine COSM-Nummer vergeben ist. Zwei davon betreffen NRAS Exon 4 und die anderen beiden KRAS Exon 4 (Stand: 08.01.2016).

Die übrigen Mutationen wurden schon in verschiedenen Kontexten beschrieben und mit einer COSM-Nummer versehen.

3.3 Korrelation mit klinischen Daten

Der erhobene Mutationsstatus in den Genen für NRAS und KRAS wurde anschließend mit den klinischen Daten der Patienten in Zusammenhang gebracht.

Ziel war dabei, die prognostische Bedeutung der RAS-Mutationen bei Myelompatienten herauszustellen, die mit hochdosiertem Melphalan, anschließender autologer Stammzell-Transplantation und einer Erhaltungstherapie mit den sogenannten „neuen Substanzen“ Thalidomid, Lenalidomid, Pomalidomid oder Bortezomib behandelt wurden.

In Tab. 10 sind die Basisdaten der 70 in die Studie einbezogenen Patienten aufgeführt. Diese beinhalten neben dem Alter und dem Geschlecht das Krankheitsstadium bei Diagnose sowie das Therapieansprechen nach autologer Stammzelltransplantation entsprechend der Kriterien der International Myeloma Working Group (Durie et al. 2006)

und die Art der Erhaltungstherapie. Die Daten wurden nach Erhebung des Mutationsstatus in NRAS und KRAS gegliedert, sodass sich die drei Gruppen „Wildtyp“, „NRAS-Mutation“ und „KRAS-Mutation“ ergaben. Dabei zeigten sich zwischen den Wildtyp-Patienten und den Mutations-Gruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Geschlechts, des Alters oder des Krankheitsstadiums bei Diagnosestellung.

Tabelle 10: Basis- und Therapiedaten der in die Studie einbezogenen Patienten

Charakteristika	Wildtyp (n = 49), n (%)	NRAS-Mutation (n = 9), n (%)	KRAS-Mutation (n = 13), n (%)
Männlich/weiblich	31 / 18	5 / 4	7 / 6
Durchschnittsalter (Range) in Jahren	57,50 (36-71)	53,44 (36-67)	55,15 (45-67)
Stadium nach Durie und Salmon bei Diagnose			
I und II	12 (24,5 %)	1 (11,1 %)	4 (30,8 %)
III	37 (75,5 %)	8 (88,9 %)	9 (69,2 %)
Stadium nach ISS bei Diagnose			
I	24 (49,0 %)	6 (66,6 %)	6 (46,2 %)
II	10 (20,4 %)	1 (11,1 %)	4 (30,8 %)
III	14 (28,6 %)	1 (11,1 %)	2 (15,4 %)
Keine Angabe	1 (2,0 %)	1 (11,1 %)	1 (7,6 %)
Monoklonale Komponente			
IgG	32 (65,3 %)	4 (44,4 %)	8 (61,6 %)
IgA	10 (20,4 %)	3 (33,3 %)	3 (23,0 %)
Leichtketten	7 (14,3 %)	2 (22,2 %)	2 (15,4 %)
Hochrisiko Zytogenetik	14 (28,6 %)	1 (11,1 %)	4 (30,8 %)
Durchschnittliche Zeit von Diagnose bis ASZT (Range) in Monaten	15,10 (1-146)	6,78 (3-16)	19,23 (3-79)

Bestes Ansprechen nach ASZT (nach IMWG)			
CR	24 (49,0 %)	5 (55,5 %)	11 (84,8 %)
VGPR	16 (32,7 %)	2 (22,2 %)	1 (7,6 %)
PR	8 (16,3 %)	2 (22,2 %)	1 (7,6 %)
SD	1 (2,0 %)	-	-
POD	-	-	-
Erhaltungstherapie (neue Substanzen)			
Thalidomid	18 (36,7 %)	1 (11,1 %)	3 (23,0 %)
Lenalidomid	22 (44,9 %)	2 (22,2 %)	4 (30,8 %)
Pomalidomid	1 (2,0 %)	-	1 (7,6 %)
Borteztomib	30 (61,2 %)	4 (44,4 %)	3 (23,0 %)

Anschließend wurden alle Patienten hinsichtlich des Gesamtüberlebens, der Zeit bis zum Progress der Erkrankung nach Therapie mit hochdosiertem Melphalan und anschließender ASZT und des Überlebens nach einem Rückfall betrachtet. Dabei wurde das Gesamtüberleben retrospektiv vom Zeitpunkt der Diagnosestellung bis zum Tod des Patienten berechnet. Die Zeit bis zum Progress der Erkrankung wurde als Zeitraum von der ersten Melphalan-Gabe bis zum Rezidiv definiert.

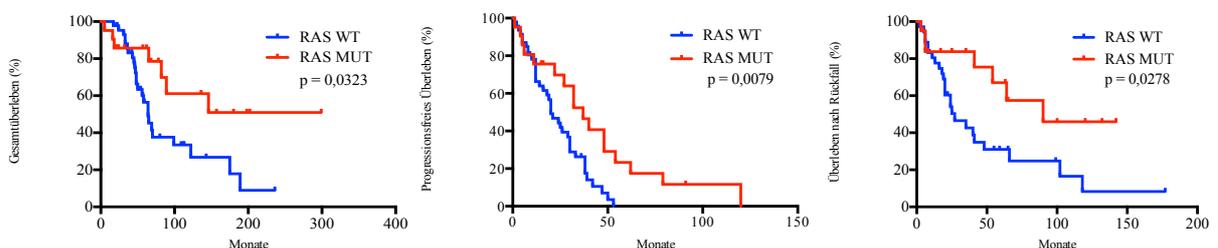


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurven mit p-Werten (Mantel-Cox-Test). Vergleich des Gesamtüberlebens, progressionsfreien Überlebens sowie des Überlebens nach Rückfall von RAS-Wildtyp (RAS-WT) gegenüber allen RAS-Mutationen (RAS-MUT).

Es stellte sich heraus, dass das durchschnittliche Gesamtüberleben bei Patienten mit RAS-Wildtyp 64 Monate betrug, während in der Gruppe der RAS-Mutationen noch kein Endpunkt erreicht wurde (HR 2,216; 95 % KI 1,069 bis 4,590). Das mittlere

progressionsfreie Überleben nach Therapie betrug bei RAS-Wildtyp-Patienten 20 Monate gegenüber 37 Monaten bei RAS-Mutation (HR 2,210; 95 % KI 1,231 bis 3,967). Auch das durchschnittliche Überleben nach Rückfall war in der Gruppe mit RAS-Mutation mit 90 Monaten länger als in der der RAS-Wildtyp mit 27 Monaten (HR 2,257; 95 % KI 1,093 bis 4,659). Hieraus wird ein deutlich positiver Einfluss von RAS-Mutationen (NRAS- und KRAS zusammengenommen) auf die Prognose des Multiplen Myeloms ersichtlich.

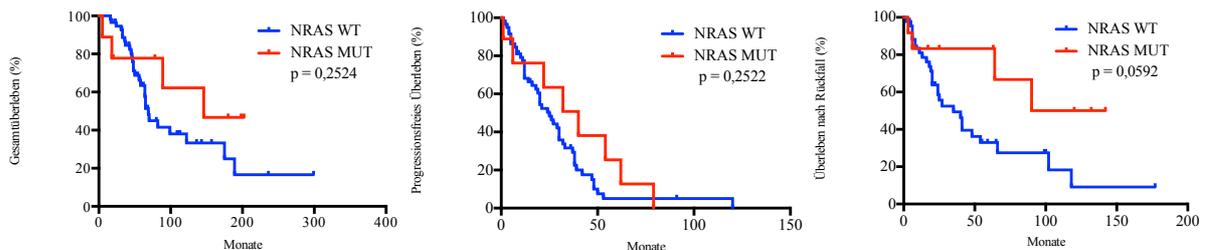


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurven mit p-Werten (Mantel-Cox-Test). Vergleich des Gesamtüberlebens, progressionsfreien Überlebens sowie des Überlebens nach Rückfall von NRAS-Wildtyp (NRAS-WT) gegenüber NRAS-Mutation (NRAS-MUT).

Bezüglich des Vergleichs von NRAS-Wildtyp mit NRAS-Mutation zeigt das Überleben nach Rückfall für Patienten mit NRAS-Mutation mit einem p-Wert von 0,0592 einen positiven Trend (HR 2,183; 95 % KI 0,9700 bis 4,911), ebenso wie das Gesamtüberleben ($p = 0,2524$) und das progressionsfreie Überleben ($p = 0,2522$).

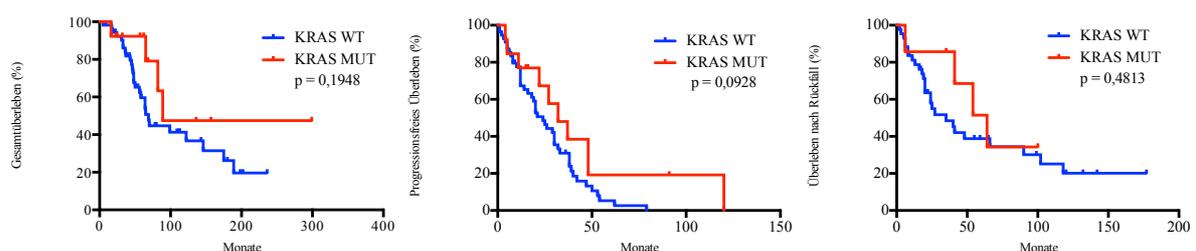


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurven mit p-Werten (Mantel-Cox-Test). Vergleich des Gesamtüberlebens, progressionsfreien Überlebens sowie des Überlebens nach Rückfall von KRAS-Wildtyp (KRAS-WT) gegenüber KRAS-Mutation (KRAS-MUT).

Wenn auch ohne Signifikanz zu erreichen, scheinen die Patienten mit einer KRAS-Mutation angesichts eines längeren Gesamt- sowie progressionsfreien Überlebens im Vergleich mit KRAS-Wildtyp-Patienten besser von der Therapie zu profitieren. Dieses hatte jedoch keinen Einfluss auf das Überleben nach Rückfall zur Folge. Allerdings

erreichten Patienten mit einer KRAS-Mutation nach ASZT mit einem Anteil von 84,8 % eher als Patienten mit RAS-Wildtyp (49,0 %) ein komplettes Therapieansprechen (Complete response, CR; $p = 0,0282$. Vgl. Tab. 10). In der Gruppe mit NRAS-Mutation hingegen erreichten 55,5 % der Patienten eine CR, was keinen signifikanten Unterschied zur Wildtyp-Gruppe darstellt.

4. Diskussion

Mutationen in NRAS und KRAS sind ein häufiges Phänomen bei Multiplen Myelomen

Die Mutationen in den Genen der RAS-Proteine zählen zu den ersten genetischen Aberrationen überhaupt, die beim Multiplen Myelom festgestellt wurden (Neri et al. 1989). In der Literatur sind die Angaben zur Häufigkeit von Mutationen in NRAS und KRAS recht heterogen. Meist wird jedoch von einem Auftreten in ca. 20 % bis 45 % der Multiplen Myelome berichtet (Mulligan et al. 2014; Smith et al. 2015). In dieser Studie konnte dieses bestätigt werden. Von den 70 einbezogenen Patienten zeigten 21 Patienten eine RAS-Mutation, was einem Anteil von 30 % entspricht. Davon lagen neun Mutationen in NRAS und 13 in KRAS vor. Ein Patient im Kollektiv zeigte in beiden Genen je eine Mutation. Damit überwiegen hier die Mutationen in KRAS, während andere Studien zumeist ein häufigeres Auftreten von Mutationen in NRAS proklamiert hatten (Neri et al. 1989; Chng et al. 2008).

Chng et al. konnten auch zeigen, dass die Rate der RAS-Mutationen beim Multiplen Myelom höher ist als bei seiner Vorstufe, dem MGUS (Chng et al. 2008). Eine andere Studie ergab darüber hinaus, dass beim MGUS im Vergleich zum Multiplen Myelom noch keine KRAS-Mutationen vorhanden sind (Chesi und Bergsagel 2015). Eine vorhandene Mutation, vor allen Dingen in KRAS, zeigt demzufolge eine fortschreitende maligne Transformation an und betont damit die Wichtigkeit des MAPK-Signalweges beim Multiplen Myelom. Aufgrund dieser Rolle des Signalweges und der Häufigkeit, mit der Mutationen in den Genen für NRAS und KRAS beim Multiplen Myelom auftreten, scheint es also erstrebenswert, Patienten auf diese Aberrationen hin zu untersuchen und auf eine angepasste Therapie hinzuarbeiten.

Neue RAS-Mutationen beim Multiplen Myelom

Die Recherche bezüglich Vorbeschreibungen der hier identifizierten Mutationen ergab, dass zwölf der 16 Exon-Mutationen in anderen Studien ebenfalls ausgemacht werden konnten (siehe Tab. 9).

So wurde die mit der COSM-Nummer 584 benannte Mutation bereits in einer der ersten Arbeiten über RAS-Mutationen beim Multiplen Myelom im Jahre 1989 beschrieben (Neri et al. 1989).

Die mit der Nummer 565 bezeichnete Mutation wurde bisher vor allem bei Multiplen Myelomen und anderen hämatopoetischen und lymphatischen Neoplasien wie der AML

(Neubauer et al. 1994; Gröschel et al. 2015), CML und dem MDS mit Inversion inv(3) oder Translokation t(3;3) (Gröschel et al. 2015) gefunden. Daneben taucht sie aber auch in Tumoren der Haut und seltener der Brust, des Hodens sowie der Lunge auf.

Ebenso wurde die Mutation mit der COSM-Nummer 573 vor allem in hämatopoetischen und lymphatischen Neoplasien, aber auch in Tumoren der Haut (Yang et al. 2012), des Dickdarms (Ogura et al. 2014) und des oberen Respirationstraktes (Zhang et al. 2014) beschrieben. Ähnliches gilt für den, mit der COSM-Nummer 566 betitelten, Austausch von Guanin zu Thymin an Position 35 der cDNA im NRAS Exon 2. Im Unterschied zur Nummer 573 ist sie aber nicht im oberen Respirationstrakt, sondern, neben den genannten Lokalisationen, auch in der Prostata (Konishi et al. 1997) beschrieben.

Die Mutation mit der COSM-Nummer 586 trat im Kollektiv bei zwei Patienten auf und wurde auch unter anderem von Huchtagowder et al. beim Multiplen Myelom identifiziert. In der gleichen Studie konnte die Mutation mit der COSM-Nummer 516 nachgewiesen werden (Huchtagowder et al. 2012), die sich auch im hiesigen Kollektiv fand.

In einer von Kortüm et al. durchgeführten Studie wurde die DNA von Myelompatienten anhand eines Gen-Panels untersucht. Im KRAS-Gen fanden sich dabei die meisten Mutationen, wobei auch die hier aufgetretenen COSM-Nummern 532 sowie 1135364 gezeigt werden konnten (Kortüm et al. 2015).

Betrachtet man die COSM-Nummer 552, wurde diese vorrangig bei Neoplasien des Dickdarms beschrieben. Ihr Vorkommen in Multiplen Myelomen wurde zuletzt besonders bei solchen mit der Translokation t(4;14) gezeigt (Walker et al. 2012).

Die mit der COSM-Nummer 1666991 versehene Mutation wurde bis jetzt lediglich in einem Fall, im Kontext der Juvenilen myelomonozytischen Leukämie (Sakaguchi et al. 2013), beschrieben. Bezüglich des Multiplen Myeloms findet sie in diesem Patientenkollektiv also ihre Erstbeschreibung. Des Weiteren ist die Mutation mit der COSM-Nummer 3459505 bisher nur beim malignen Melanom identifiziert worden. Somit ist auch diese hier das erste Mal beim Multiplen Myelom identifiziert.

Allen genannten Mutationen ist gemeinsam, dass sie den RAS-MAPK-Signalweg betreffen und zu einer dauerhaften Aktivierung dieser Kaskade führen. Dieses mündet in ständiger DNA-Replikation, Zellwachstum sowie Zellteilung und trägt somit zum Wachstum und zur Ausbreitung der Tumoren bei.

Betrachtet man dabei die Art und Lokalisation der Neoplasien fällt auf, dass die meisten dieser Mutationen deutlich häufiger in hämatopoetischen und lymphatischen Neoplasien als in anderen Geweben auftraten. Obwohl Mutationen in den Genen für NRAS und KRAS bei einer Vielzahl von Tumoren vorkommen, bestätigt die Häufung bestimmter Mutationen

speziell bei hämatopoetischen und lymphatischen Neoplasien, dass die RAS-Proteine dort einen großen Einfluss haben und sogar ein gewisses Charakteristikum darstellen. Um dieses genauer zu bestimmen, werden allerdings weitere Studien nötig sein. Die im hiesigen Kollektiv aufgefundenen vier, bisher in der Literatur noch nicht beschriebenen, Mutationen leisten im Zuge dessen einen weiteren Beitrag zur genaueren „Kartierung“ des Multiplen Myeloms. Gleiches gilt für die zwei Mutationen, die zwar schon in anderen Zusammenhängen, bisher aber noch nicht beim Multiplen Myelom vorbeschrieben waren.

Prognostische Implikationen der RAS-Mutationen bei Myelompatienten

Einhergehend mit den oben beschriebenen Ergebnissen über eine Begünstigung des Fortschreitens der Erkrankung durch die RAS-Mutationen, wurde in der Literatur oft ein schlechteres Therapieansprechen und Outcome für Myelompatienten mit diesen Mutationen proklamiert. Schon in einer der ersten Studien zu diesem Themenkomplex zeigten Neri et al. ein schlechtes Therapieansprechen der Patienten mit RAS-Mutation. (Neri et al. 1989). In einer anderen Studie wurde hingegen ein ähnliches Therapieansprechen festgestellt, dennoch wiesen die Patienten mit einer RAS-Mutation (NRAS und KRAS zusammengenommen) dabei ein kürzeres PFS sowie OS auf. Bei separater Betrachtung der beiden Gene war dieses Ergebnis allerdings nur bei einer Mutation in KRAS signifikant (Chng et al. 2008). Auch Liu et al. zeigten zuvor, dass besonders KRAS-Mutationen mit einer schlechten Prognose assoziiert seien (Liu et al. 1996). Smith et al. veröffentlichten ähnliche Ergebnisse. Auch in ihrer Arbeit war das Therapieansprechen zwischen Patienten mit und ohne RAS-Mutation vergleichbar und das OS bei KRAS-Mutation kürzer, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen (Smith et al. 2015). Leich et al. führten 2013 eine Studie durch, deren Ergebnis darauf hindeutete, dass RAS-Mutationen beim Multiplen Myelom nicht mit einer bestimmten Prognose assoziiert seien. Diese Studie bezog sich allerdings nur auf Patienten mit einer Translokation t(11;14) (Leich et al. 2013). In Zusammenschau dieser Untersuchungen herrscht also Uneinigkeit darüber, ob Mutationen in den Genen für NRAS und KRAS therapeutisch und prognostisch eher ungünstig oder gleichwertig gegenüber dem Vorliegen des Wildtyp-Gens sind. Deutlich wird jedoch, dass bisher noch keine Studie einen positiven Effekt der Mutationen ergab. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde somit das erste Mal ein Kontext aufgezeigt, in dem die Mutationen unter bestimmten Umständen einen begünstigenden Trend und teils auch einen signifikant positiven prognostischen Einfluss auf die Erkrankung des Multiplen Myeloms haben.

Bezüglich des Outcomes nach Therapie mit hochdosiertem Melphalan und anschließender ASZT wurde in der Gruppe der RAS-Mutationen (alle Mutationen in KRAS und NRAS zusammengefasst) für alle drei untersuchten Parameter (Gesamtüberleben, progressionsfreies Überleben, Überleben nach Rückfall) ein signifikanter Vorteil gegenüber der Wildtyp-Gruppe deutlich. In der Subgruppe der NRAS-Mutationen zeigte sich hingegen kein Unterschied im Gesamt- und progressionsfreien Überleben, während das Überleben nach Rückfall knapp nicht statistisch signifikant war. Bei der Patientengruppe mit KRAS-Mutationen stellte sich ebenfalls keine signifikante Verbesserung der drei Parameter im Vergleich zu der Wildtyp-Gruppe heraus. Allerdings bestand ein Trend zu längerem Gesamtüberleben sowie progressionsfreiem Überleben. Außerdem zeigten die Patienten mit einer KRAS-Mutation eine höhere Rate an CR nach ASZT als die KRAS-Wildtyp-Patienten. Letzteres stellt eine wichtige Beobachtung dar, denn in vielen Studien wurde eine starke Korrelation zwischen der Qualität des Therapieansprechens und der Prognose für Myelompatienten festgestellt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass Patienten, die eine CR erreichten, ein längeres OS sowie PFS aufwiesen (Harousseau 2007; Palumbo und Cavallo 2013). In Anbetracht der höheren CR-Rate bei vorhandener KRAS-Mutation scheinen diese Patienten daher besonders von der Therapie mit Melphalan und ASZT sowie der Erhaltung mit neuen Substanzen profitieren zu können. Dieses ist ein wichtiges Ergebnis und sollte bei der Behandlung dieser Patienten Berücksichtigung finden, um ihre Prognose zu verbessern.

Keine Assoziation von RAS-Mutationen mit anderen Risikofaktoren

Ebenso wurde von Chng et al. für die RAS-Mutationen ein gemeinsames Auftreten mit aggressiveren Krankheitsmerkmalen des Multiplen Myeloms festgestellt. So befanden sich unter den Patienten ihres Kollektivs mehrere Patienten mit RAS-Mutation als Wildtyp-Patienten in den fortgeschritteneren ISS-Stadien zwei und drei. Auch fanden sich bei vorhandener RAS-Mutation ein höherer Anteil von Plasmazellen im Knochenmark, eine erhöhte Rate von Patienten mit einem β_2 -Mikroglobulin-Wert von $> 3,5$ g/l sowie eine stärkere Sekretion von Kappa-Leichtketten (Chng et al. 2008). Im hiesigen Kollektiv zeigten sich andere Ergebnisse. In jedem ISS-Stadium befand sich ein ähnlicher Anteil von Patienten mit und ohne RAS-Mutation. Auch die Sekretion von Leichtketten war bei Patienten mit einer Mutation in NRAS oder KRAS nicht signifikant höher. Auch Liu et al. konnten keine Assoziation von RAS-Mutationen mit Markern einer fortgeschrittenen Erkrankung feststellen (Liu et al. 1996). Die anderen Parameter wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

Trotz der von Chng et al. festgestellten aggressiveren Krankheitsmerkmale konnte eine Assoziation von RAS-Mutationen mit dem gleichzeitigen Vorhandensein genetischer Risiko-Konstellationen wie der Translokation t(4;14) sowie der Deletion del17p13 nicht festgestellt werden (Chng et al. 2008). Auch Smith et al. hatten solche Zusammenhänge nicht aufzeigen können (Smith et al. 2015). Dieses ließ sich im hiesigen Patientenkollektiv bestätigen.

Zusammenfassend stellt sich also auch die übrige genetische Konstellation bei RAS-mutierten Myelompatienten nicht so negativ dar, wie lange angenommen wurde. Darüber hinaus sind die RAS-Gene beim Multiplen Myelom diejenigen, die am häufigsten ohne paralleles Auftreten anderer Mutationen verändert sind (Chng et al. 2008). Dieses rechtfertigt erneut, den RAS-Mutationsstatus zu erheben und in die Therapieplanung mit einzubeziehen, was wiederum die Chance birgt, bei betroffenen Patienten die Prognose zu optimieren.

Bedeutung der Therapie mit hochdosiertem Melphalan und ASZT bei Myelompatienten mit RAS-Mutation

Eine Vielzahl der bisherigen Studien beschäftigte sich zunächst mit dem allgemeinen Vergleich von konventioneller Chemotherapie mit Hochdosistherapie und anschließender ASZT beim Multiplen Myelom.

Im Jahre 1996 wurde die erste randomisierte kontrollierte Studie zum Vergleich von konventioneller Chemotherapie einerseits und Hochdosistherapie mit Melphalan und nachfolgender ASZT andererseits bei Patienten unter 65 Jahren veröffentlicht. Für letztere Therapie ergaben sich sowohl eine erhöhte Rate von Patienten, die auf die Therapie ansprachen, als auch längeres EFS und OS (Attal et al. 1996). Diese Ergebnisse konnten auch in anderen Studien bestätigt werden (Child et al. 2003). In der Folge etablierte sich die Kombination aus Hochdosistherapie und ASZT als Standard für unter 65-jährige Myelompatienten (Palumbo und Cavallo 2013), der auch für die Therapie dieses Studienkollektivs zutrifft.

Die Effektivität der Therapie unter Berücksichtigung des Mutationsstatus in NRAS und KRAS wurde dabei noch nicht beleuchtet und fand daher in dieser Arbeit ihre Erstuntersuchung. Aus diesem Grund ist ein direkter und vollständiger Vergleich mit anderen Studien nicht möglich. Allerdings stellten einige Studien eine Melphalan-Resistenz bei vorliegender RAS-Mutation fest (Hoang et al. 2006). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit mit signifikant besseren Werten für Gesamt- und progressionsfreies Überleben sowie Überleben nach Rückfall in der RAS-Mutation-Gruppe im Vergleich zu

RAS-Wildtyp widersprechen dieser Annahme deutlich. Auch in den Subgruppen NRAS-Mutation und KRAS-Mutation zeigt sich ein, wenn auch nicht signifikanter, positiver Trend der Prognose nach Therapie mit HD-Melphalan und ASZT. Ebenso spricht das höhere Erreichen einer CR bei KRAS-Mutation dafür, dass eine Melphalan-Resistenz bei vorhandener RAS-Mutation eher unwahrscheinlich ist.

Das Multiple Myelom ist eine heterogene Erkrankung und erfordert möglichst individuelle Therapie

Neben den hier betrachteten Mutationen in den RAS-Genen wurde beim Multiplen Myelom noch ein weites Spektrum anderer Mutationen beschrieben. Diese betreffen zusätzlich zu Komponenten der Rezeptor-Tyrosinkinase-Wege auch Ädhäsionsmoleküle, welche die Interaktion mit dem Knochenmark vermitteln (Leich et al. 2013). Durch die Vielzahl der genetischen Veränderungen ergibt sich für jeden Patienten ein individuelles Krankheitsbild, das eine möglichst ebenso individuell abgestimmte Therapie erforderlich macht. Auch Chesi und Bergsagel betonten in einer Arbeit von 2015 die Wichtigkeit der Therapieauswahl. Sie beschrieben, dass die heterogenen Subklone der Tumorzellen in Konkurrenz zueinander stehen und eine suboptimale Therapie zu einer Selektion der besonders resistenten Zellen führt (Chesi und Bergsagel 2015).

Wie oben beschrieben, konnte mit der ASZT das Therapieergebnis für Myelompatienten verbessert werden. Mit der Einführung der sogenannten „neuen Substanzen“ wie Bortezomib, Thalidomid und Lenalidomid in Kombination mit der ASZT zeigten sich noch größere Therapieerfolge (Leich et al. 2013). Außerdem lassen sich diese Substanzen vielfältig, sowohl zur Induktion, als auch bei einem Rückfall oder nicht transplantierbaren Patienten, einsetzen (Vgl. Kap. 1.7). Die intensive Diskussion dieser Substanzen geht über den Rahmen dieser Arbeit hinaus, sodass darauf verzichtet wurde.

Um eine passgenauere Therapie zu gewährleisten, muss diese auf mehr als eine genetische Veränderung ausgerichtet sein. Es sind daher weitere Studien zur detaillierteren Aufdeckung der molekulargenetischen Aberrationen des Myeloms nötig. Die Erstellung eines individuellen Mutationsprofils ist derzeit noch kein Standard (Kortüm et al. 2015), könnte es somit aber in Zukunft werden.

Diskussion der Methodik

Die DNA der Patienten wurde zuvor nicht durch CD138-Positivität selektiert. Dieses könnte potenziell den Nachteil bieten, dass Zellen mit nur geringer Mutationslast nicht als solche identifiziert wurden. Allerdings wurden nur Patienten einbezogen, bei denen vorher

mikroskopisch eine Knochenmarkinfiltration von mindestens 20 % gesichert wurde. Darüber hinaus kann das Verfahren der Sanger-Sequenzierung Mutationen schon ab einer Mutationslast von 10 % nachweisen. Es wurde sich außerdem bewusst für die Methode der Sanger-Sequenzierung entschieden, da nicht nach bestimmten Punktmutationen gesucht wurde, sondern ganze Exons und Introns betrachtet werden sollten.

Hinzu kommt, dass sich die Therapieregime seit Beginn der Rekrutierung dieses Patientenkollektives im Jahre 1997 verändert haben. Derzeit werden für die Induktionsphase hauptsächlich Bortezomib basierte Regime verwendet, welches hier bei ungefähr der Hälfte Patienten der Fall war. Die Bedeutung der RAS-Mutationen bei Patienten, die einheitlich entweder nur mit Bortezomib basierten Regimen oder ausschließlich mit einem anderen Regime vor ASZT behandelt wurden, konnte hier daher nicht geklärt werden.

Die hiesigen Ergebnisse treffen für die Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 55,36 Jahren zu, so dass noch weitere Untersuchungen zur Klärung der Frage nötig sein werden, ob die Ergebnisse auch auf ältere Patienten übertragbar sind. Dieser Umstand betrifft allerdings nicht nur diese Studie. Generell bezieht sich die Mehrzahl der Myelom-Studien auf Patienten mit einem Alter unter 65 Jahren. Angesichts des demographischen Wandels sollte sich um mehr Studien an älteren Patientenkollektiven bemüht werden.

Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der RAS-Mutationsstatus als prognostischer Marker dazu dienen kann, Patienten herauszufiltern, die heutzutage besonders von einer ASZT profitieren.

In Zukunft könnte der nächste Schritt sein, die Patienten mit einer RAS-Mutation nicht nur bestmöglich in bereits bestehende Therapieregime einzubetten, sondern tatsächlich unmittelbar an der genetischen Veränderung einzugreifen. Bisher ist es allerdings noch nicht gelungen, RAS-Proteine direkt zu inhibieren (Steckel et al. 2012). Für dieses Ziel werden weitere Forschungsbemühungen und Studien nötig sein. Diese wären dann nicht nur für die Therapie des Multiplen Myeloms, sondern auch für die Behandlung der vielen anderen Tumoren, bei denen RAS-Mutationen gehäuft auftreten, von essenzieller Bedeutung.

In Anbetracht der Heterogenität des Multiplen Myeloms wird die gezielte Therapie gegen ein bestimmtes Molekül allerdings wahrscheinlich nicht ausreichend sein. Das Ziel wäre, eine möglichst genaue „Signatur“ des individuellen Myeloms und damit eine Möglichkeit, ein auf den Patienten abgestimmtes Therapiekonzept zu schaffen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden 70 Patienten untersucht, bei denen in den Jahren 1997 bis 2014 im Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck, die Diagnose eines Multiplen Myeloms gestellt wurde und die eine Therapie mit Melphalan, anschließender ASZT sowie eine Erhaltungstherapie mit neuen Substanzen erhielten.

Nach erneuter mikroskopischer Sichtung wurde an diesem Kollektiv eine Analyse des Mutationsstatus in den Genen für NRAS und KRAS durchgeführt. Diese erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung der jeweiligen Exons 2, 3 und 4 sowie der angrenzenden Introns der beiden Gene. Die dabei identifizierten Mutationen wurden unter Anwendung der Datenbank „Ensembl Genome“ auf cDNA- sowie Proteinebene genau beschrieben. In einer darauf folgenden entsprechenden Literaturrecherche wurde herausgearbeitet, ob und in welchen Zusammenhängen die Mutationen aus dem untersuchten Kollektiv bereits Erwähnung gefunden haben. Anschließend wurde das Outcome der Patienten, die eine Mutation trugen mit denen ohne Mutation verglichen. Dabei wurden das Gesamtüberleben, das progressionsfreie Überleben sowie das Überleben nach Rückfall betrachtet.

Ziel war, herauszustellen, wie häufig Mutationen in NRAS und KRAS im untersuchten Kollektiv sind und ob das Vorhandensein von Mutationen in diesen Genen unter Standardtherapie mit Melphalan und anschließender ASZT einen prognostischen Einfluss gegenüber Wildtyp-Patienten darstellt. Durch diesen Vergleich sollte sich erschließen, welche Patienten besonders von einer derartigen Therapie profitieren.

Die Häufigkeit der Mutationen im Kollektiv geht mit der Literatur konform. Bei näherer Auswertung der Mutationen ergab sich dann, dass sechs der hier aufgezeigten Mutationen bisher noch nicht bei Myelompatienten verzeichnet waren.

Die Ergebnisse zeigen des Weiteren, dass nach Therapie mit hochdosiertem Melphalan und anschließender ASZT in der Gruppe der RAS-Mutationen (alle Mutationen in KRAS und NRAS zusammengefasst) für die drei untersuchten Parameter ein signifikanter Vorteil gegenüber der Wildtyp-Gruppe bestand. Bei Betrachtung der Subgruppen zeigte sich bei den NRAS-Mutationen hingegen kein Unterschied im Gesamt- und progressionsfreiem Überleben, während das Überleben nach Rückfall knapp nicht statistisch signifikant war. Bei der Patientengruppe mit KRAS-Mutation stellte sich ebenfalls keine signifikante Verbesserung der drei Parameter im Vergleich zu der Wildtyp-Gruppe heraus. Allerdings bestand ein Trend zu längerem Gesamt- sowie progressionsfreiem Überleben. Außerdem erreichten im Vergleich zum Wildtyp mehr Patienten mit KRAS-Mutation ein komplettes Therapieansprechen (CR), was einen positiven Einfluss auf die Prognose bedeutet.

Insgesamt zeigt die Arbeit auf, dass Patienten mit einer RAS-Mutation von der Therapie mit hochdosiertem Melphalan und anschließender ASZT profitieren. Das RAS-Protein kann demnach als prognostischer Marker für Myelompatienten dienen und mit in die Therapieentscheidung einbezogen werden.

6. Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloische Leukämie
ASD	Chloracetat-Esterase
ASZT	Autologe Stammzelltransplantation
BCL2	B-cell lymphoma 2 - Protein
BRAF	B-rapidly accelerated (rat) fibrosarcoma
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CML	Chronische myeloische Leukämie
COSM-Nummer	COSMIC-Nummer, Catalogue of somatic mutations in cancer
CR	Complete response
CT	Computertomographie
del	Deletion
DNA	Desoxyribonucleinacid
EFS	Event free survival
ERK1	Extracellular signal-regulated kinase 1
ERK2	Extracellular signal-regulated kinase 2
FDG-PET	Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GDP	Guanosindiphosphat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
Hb	Hämoglobin-Wert
HR	Hazard Ratio
HRAS	Harvey rapidly accelerated (rat) sarcoma
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10

IMWG	International Myeloma Working Group
ISS	International Staging System
KI	Konfidenzintervall
KRAS	Kirsten rapidly accelerated (rat) sarcoma
MAPK-Kaskade	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MGUS	Monoclonal gammopathy of undetermined significance
MKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MRT	Magnetresonanztomographie
MUT	Mutation
NFkappaB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NRAS	Neuroblastoma rapidly accelerated (rat) sarcoma
OS	Overall survival
p53	Tumorsuppressor p53
p.a.	pro analysi
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFS	Progression free survival
POD	Progression of disease
PR	Partial response
Raf-1	Rapidly accelerated fibrosarcoma-1
RAS	rapidly accelerated (rat) sarcoma
RB1	Retinoblastom-associated protein 1
Rd	Lenalidomid und niedrig dosiertes Dexamethason
rpm	rotations per minute
SD	Stable disease
SOS	Son of sevenless protein
t	Translokation
TTP	Time To Progression
UKSH	Universitäts-Klinikum Schleswig-Holstein
VCD	Bortezomib, Cyclophosphamid und Dexamethason
VDT-PACE	Bortezomib, Dexamethason, Thalidomid, Cisplatin, Doxorubicin, Cyclophosphamid und Etoposid
VGPR	Very good partial response
VRD	Bortezomib, Lenalidomid und Dexamethason
VTD	Bortezomib, Thalidomid und Dexamethason

VEGF

Vascular endothelial growth factor

WT

Wildtyp

7. Literaturverzeichnis

- Alexander DD, Mink PJ, Adami H-O, Cole P, Mandel JS, Oken MM, Trichopoulos D (2007): Multiple myeloma: A review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer* 120, 40–61
- Alexandrakis MG, Passam FH, Ganotakis ES, Sfiridaki K, Xilouri I, Perisinakis K, Kyriakou DS (2003): The clinical and prognostic significance of erythrocyte sedimentation rate (ESR), serum interleukin-6 (IL-6) and acute phase protein levels in multiple myeloma. *Clin Lab Haematol* 25, 41–46
- Attal M, Harousseau J-L, Stoppa A-M, Sotto J-J, Fuzibet J-G, Rossi J-F, Casassus P, Maisonneuve H, Facon T, Ifrah N, et al. (1996): A Prospective, Randomized Trial of Autologous Bone Marrow Transplantation and Chemotherapy in Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 335, 91–97
- Barley K, Chari A (2016): Diagnostic Advances in Multiple Myeloma. *Curr Hematol Malig Rep* 11, 111–117
- Barosi G, Boccadoro M, Cavo M, Corradini P, Marchetti M, Massaia M, Merlini G, Tosi P, Tura S et al. (2004): Management of multiple myeloma and related-disorders: guidelines from the Italian Society of Hematology (SIE), Italian Society of Experimental Hematology (SIES) and Italian Group for Bone Marrow Transplantation (GITMO). *Haematologica* 89, 717–741
- Bustany S, Cahu J, Guardiola P, Sola B (2015): Cyclin D1 sensitizes myeloma cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis by activating the unfolded protein response pathway. *BMC Cancer* 15, 262
- Chesi M, Bergsagel PL (2013): Molecular pathogenesis of multiple myeloma: Basic and clinical updates. *Int J Hematol* 97, 313–323
- Chesi M, Bergsagel PL (2015): Advances in the pathogenesis and diagnosis of multiple myeloma. *Int J Lab Hematol* 37, 108–114
- Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, Brown J, Drayson MT, Selby PJ (2003): High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 348, 1875–1883
- Chng WJ, Gonzalez-Paz N, Price-Troska T, Jacobus S, Rajkumar S V, Oken MM, Kyle R a, Henderson KJ, Van Wier S, Greipp P, et al. (2008): Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia* 22, 2280–4
- Dimopoulos MA, Sonneveld P, Leung N, Merlini G, Ludwig H, Kastritis E, Goldschmidt H, Joshua D, Orłowski RZ, Powles R, et al. (2016): International Myeloma Working Group Recommendations for the Diagnosis and Management of Myeloma-Related Renal Impairment. *Journal of clinical oncology* 34, 1544-1557
- Durie BGM, Harousseau J-L, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Dimopoulos M, Westin J, Sonneveld P, et al. (2006): International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 20, 1467–1473

- Falco P, Bringhen S, Avonto I, Gay F, Morabito F, Boccadoro M, Palumbo A (2007): Melphalan and its role in the management of patients with multiple myeloma. *Expert Rev Anticancer Ther* 7, 945–957
- Gröschel S, Sanders MA, Hoogenboezem R, Zeilemaker A, Havermans M, Erpelinck C, Bindels EMJ, Beverloo HB, Döhner H, Löwenberg B, et al. (2015): Mutational spectrum of myeloid malignancies with *inv(3)/t(3;3)* reveals a predominant involvement of RAS/RTK signaling pathways. *Blood* 125, 133–139
- Harousseau J-L (2007): Hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* 13, 877–885
- Hoang B, Zhu L, Shi Y, Frost P, Yan H, Sharma S, Sharma S, Goodglick L, Dubinett S, Lichtenstein A (2006): Oncogenic RAS mutations in myeloma cells selectively induce cox-2 expression, which participates in enhanced adhesion to fibronectin and chemoresistance. *Blood* 107, 4484–4490
- Huchtagowder V, Meyer R, Mullins C, Nagarajan R, DiPersio JF, Vij R, Tomasson MH, Kulkarni S (2012): Resequencing analysis of the candidate tyrosine kinase and RAS pathway gene families in multiple myeloma. *Cancer Genet* 205, 474–478
- Konishi N, Hiasa Y, Tsuzuki T, Tao M, Enomoto T, Miller GJ (1997): Comparison of ras activation in prostate carcinoma in Japanese and American men. *The Prostate* 30, 53–57
- Kortüm K, Langer C, Monge J, Bruins L, Zhu Y, Shi C, Jedlowski P, Egan J, Ojha J, Bullinger L, et al. (2015): Longitudinal analysis of 25 sequential sample-pairs using a custom multiple myeloma mutation sequencing panel (M3P). *Ann Hematol* 94, 1205–1211
- Kyle RA, Child JA, Anderson K, Barlogie B, Bataille R, Bensinger W, Blade J, Boccadoro M, Dalton W, Dimopoulos M, et al. (2003): Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 121, 749–757
- Leich E, Weißbach S, Klein H-U, Grieb T, Pischmarov J, Stühmer T, Chatterjee M, Steinbrunn T, Langer C, Eilers M, et al. (2013): Multiple myeloma is affected by multiple and heterogeneous somatic mutations in adhesion- and receptor tyrosine kinase signaling molecules. *Blood Cancer J* 3, e102
- Liu P, Leong T, Quam L, Billadeau D, Kay NE, Greipp P, Kyle RA, Oken MM, Ness BV (1996): Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Trial. *Blood* 88, 2699–2706
- Mulligan G, Lichter DI, Bacco A Di, Blakemore SJ, Berger A, Koenig E, Bernard H, Trepicchio W, Li B, Neuwirth R, et al. (2014): Mutation of NRAS but not KRAS significantly reduces myeloma sensitivity to single-agent bortezomib therapy. *Blood* 123, 632–639
- Neri A, Murphy JP, Cro L, Ferrero D, Tarella C, Baldini L, Dalla-Favera R (1989): Ras oncogene mutation in multiple myeloma. *J Exp Med* 170, 1715–1725

- Neubauer A, Dodge RK, George SL, Davey FR, Silver RT, Schiffer CA, Mayer RJ, Ball ED, Wurster-Hill D, Bloomfield CD (1994): Prognostic importance of mutations in the ras proto-oncogenes in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 83, 1603–1611
- Ogura T, Kakuta M, Yatsuoka T, Nishimura Y, Sakamoto H, Yamaguchi K, Tanabe M, Tanaka Y, Akagi K (2014): Clinicopathological characteristics and prognostic impact of colorectal cancers with NRAS mutations. *Oncol Rep* 32, 50–56
- Palumbo A, Cavallo F (2013): Have drug combinations supplanted stem cell transplantation in myeloma? *Blood* 120, 335–341
- Pandey S, Kyle RA (2013): Unusual myelomas: a review of IgD and IgE variants. *Oncol Williston Park N* 27, 798–803
- Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC (2009): Multiple myeloma. *The Lancet* 374, 324–339
- Rajkumar SV (2014): Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk- stratification, and management. *Am J Hematol* 89, 999–1009
- Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, Kumar S, Hillengass J, Kastritis E, Richardson P, et al. (2014): International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 15, e538–e548
- Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, et al. (2013): Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet* 45, 937–941
- Sánchez-Ramón S, Dhalla F, Chapel H (2016): Challenges in the Role of Gammaglobulin Replacement Therapy and Vaccination Strategies for Hematological Malignancy. *Front Immunol* 7, 1-11
- Smith D, Armenteros E, Percy L, Kumar M, Lach A, Herledan G, Stubbs M, Downward J, Yong K (2015): RAS mutation status and bortezomib therapy for relapsed multiple myeloma. *Br J Haematol* 169, 905–908
- Steckel M, Molina-Arcas M, Weigelt B, Marani M, Warne PH, Kuznetsov H, Kelly G, Saunders B, Howell M, Downward J, Hancock DC (2012): Determination of synthetic lethal interactions in KRAS oncogene-dependent cancer cells reveals novel therapeutic targeting strategies. *Cell Res* 22, 1227–1245
- Sternlicht H, Glezerman IG (2015): Hypercalcemia of malignancy and new treatment options. *Ther Clin Risk Manag* 11, 1779–1788
- Tay J, Levesque J-P, Winkler IG (2017): Cellular players of hematopoietic stem cell mobilization in the bone marrow niche. *Int J Hematol* 105, 129–140
- Terpos E, Morgan G, Dimopoulos MA, Drake MT, Lentzsch S, Raje N, Sezer O, García-Sanz R, Shimizu K, Turesson I, et al. (2013): International Myeloma Working Group recommendations for the treatment of multiple myeloma-related bone disease. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 31, 2347–2357

- Todoerti K, Agnelli L, Fabris S, Lionetti M, Tuana G, Mosca L, Lombardi L, Grieco V, Bianchino G, D'Auria F, et al. (2013): Transcriptional characterization of a prospective series of primary plasma cell leukemia revealed signatures associated with tumor progression and poorer outcome. *Clin Cancer Res* 19, 3247–3258
- Walker BA, Wardell CP, Melchor L, Hulkki S, Potter NE, Johnson DC, Fenwick K, Kozarewa I, Gonzalez D, Lord CJ, et al. (2012): Intraclonal heterogeneity and distinct molecular mechanisms characterize the development of t(4;14) and t(11;14) myeloma. *Blood* 120, 1077–1086
- Weber DM (2005): Solitary Bone and Extramedullary Plasmacytoma. *ASH Educ Program Book* 2005, 373–376
- Yang L, Chen Y, Cui T, Knösel T, Zhang Q, Geier C, Katenkamp D, Petersen I (2012): Identification of biomarkers to distinguish clear cell sarcoma from malignant melanoma. *Hum Pathol* 43, 1463–1470
- Zhang Z-C, Fu S, Wang F, Wang H-Y, Zeng Y-X, Shao J-Y (2014): Oncogene mutational profile in nasopharyngeal carcinoma. *OncoTargets Ther* 7, 457–467

Bücher:

- Heinrich PC, Haan S, Herrmanns HM, Löffler G, Müller-Newen G, Schaper (2007). Kommunikation zwischen Zellen: Extrazelluläre Signalmoleküle, Rezeptoren und Signaltransduktion. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (Hrsg.): *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Aufl., 772-787, Springer, Heidelberg.
- Petrides PE (2007). Tumorgewebe. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (Hrsg.): *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Aufl., 1143-1144, Springer, Heidelberg.
- Thomas C, Alexandrakis E, Foß HD, Hagedorn M, Moll R, Müller KM, Pankow W, Ramaswamy A, Rüschoff J, Salfelder K (2006). Hämolympopoetisches System. In: Thomas C (Hrsg.): *Histopathologie*. 14. Aufl., 334, Schattauer, Stuttgart.

Webseiten:

- <http://www.ensembl.org/index.html> (Tag des Zugriffs: 08.01.2016)
- <http://www.lymphome.de/InfoLymphome/MultipleMyelome/Therapie/AutoSZT.jsp> (Tag des Zugriffs: 25.04.2016).
- <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/multiples-myelom/@@view/html/index.html> (Tag des Zugriffs: 01.01.2017)
- <https://www.deutsche-biographie.de/sfz39496.html#ndbcontent> (Tag des Zugriffs: 18.11.2016)

8. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Cyclin D1-positives Myelom.** Immunhistochemisch nukleäre Anfärbung mit einem Infiltrationsgrad von ca. 20 %. Beckenkammtrepanat. Original-Objektvergrößerung 20-fach. 5
- Abbildung 2: CD56-positives Myelom.** Immunhistochemisch nukleäre Anfärbung mit einem Infiltrationsgrad von ca. 80 %. Beckenkammtrepanat. Original-Objektvergrößerung 20-fach. 6
- Abbildung 3: Flussschema zum Patientenkollektiv.** Dargestellt sind die Faktoren, anhand derer Patienten in diese Arbeit aufgenommen bzw. ausgeschlossen wurden. 16
- Abbildung 4: CD138-positives Myelom.** Immunhistochemisch nukleäre Anfärbung mit einem Infiltrationsgrad von ca. 60 %. Beckenkammtrepanat. Original-Objektvergrößerung 10-fach. 24
- Abbildung 5: Myelom in ASD-Färbung.** Die Plasmazellen stellen sich ASD-negativ (blau) dar. Der Pfeil deutet auf einen solchen Herd von Plasmazellen. Beckenkammtrepanat. Original-Objektvergrößerung 4-fach. 25
- Abbildung 6: Myelom im Knochenmarkausstrich.** Zytologisch vermehrte Infiltration durch Plasmazellen. Original-Objektvergrößerung 40-fach. 25
- Abbildung 7: Myelom in Giemsa-Färbung.** Histologisch herdförmige Infiltration durch Plasmazellen. Beckenkammtrepanat. Original-Objektvergrößerung 40-fach. 26
- Abbildung 8: Myelom mit Expression von Kappa-Leichtketten (A) bei gleichzeitigem Fehlen von Lambda-Leichtketten (B).** Immunhistochemisch nukleäre Anfärbung der Kappa-Leichtketten mit einem Infiltrationsgrad von ca. 70 % (A). Beim gleichen Patienten fehlt als Folge der Monoklonalität die Expression von Lambda-Leichtketten (B). Beckenkammtrepanat. Original-Objektvergrößerung 20-fach. 27
- Abbildung 9: Auswertung der Sanger-Sequenzierung mittels der Software CEQ Genome Lab. Bestätigung einer Mutation in NRAS Exon 2.** In diesem Fall konnte mit der Sanger-Sequenzierung eine Mutation in NRAS Exon 2 an Position 19 festgestellt werden, die die zweite Position dieses Basentriplets betrifft. An dieser Stelle wurde die Base Guanin gegen Adenin ausgetauscht. 28
- Abbildung 10: Beginn der Wildtyp-Sequenz von KRAS Intron 4.** Gelb unterlegt ist die Position, an der der Basenaustausch auftrat. 30

Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurven mit p-Werten (Mantel-Cox-Test). Vergleich des Gesamtüberlebens, progressionsfreien Überlebens sowie des Überlebens nach Rückfall von RAS-Wildtyp (RAS-WT) gegenüber allen RAS-Mutationen (RAS-MUT). 32

Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurven mit p-Werten (Mantel-Cox-Test). Vergleich des Gesamtüberlebens, progressionsfreien Überlebens sowie des Überlebens nach Rückfall von NRAS-Wildtyp (NRAS-WT) gegenüber NRAS-Mutation (NRAS-MUT). 33

Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurven mit p-Werten (Mantel-Cox-Test). Vergleich des Gesamtüberlebens, progressionsfreien Überlebens sowie des Überlebens nach Rückfall von KRAS-Wildtyp (KRAS-WT) gegenüber KRAS-Mutation (KRAS-MUT). 33

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: CRAB-Kriterien (Raab et al. 2009; Rajkumar et al. 2014)	7
Tabelle 2: Stadieneinteilung nach Durie und Salmon (aus Kortüm et al. 2013)	9
Tabelle 3: Stadieneinteilung nach International Staging System (aus Raab et al. 2009)	10
Tabelle 4: Entnahmeorte des Probenmaterials	15
Tabelle 5: Liste der Primer	18
Tabelle 6: Ablauf der PCR	19
Tabelle 7: Ablauf der Sanger-Sequenzierung	20
Tabelle 8: Material- und Geräteliste	22
Tabelle 9: Zusammenfassung der Exon-Mutationen	29
Tabelle 10: Basis- und Therapiedaten der in die Studie einbezogenen Patienten	31

10. Danksagung

„Es ist ein lobenswerter Brauch: Wer was Gutes bekommt, der bedankt sich auch.“

Wilhelm Busch

In diesem Sinne möchte ich allen danken, die mich während der Arbeit an dieser Dissertation mit ihrer Unterstützung begleitet haben.

Danke an meine wunderbare Familie, in der ich das Glück hatte, aufzuwachsen. Besonders danke ich meinen Eltern und meinem Bruder, die mich stets in all' meinen Entscheidungen unterstützt haben und an meiner Seite standen.

Danke an Professor Dr. med. Christoph Thorns für die Bereitstellung des Themas sowie die fachliche und persönliche Betreuung. Ich habe das stets offene Ohr und den oft mitschwingenden Humor sehr geschätzt. Ebenfalls danke ich der Leitung und den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Universität zu Lübeck für die Überlassung des Arbeitsplatzes und des Materials.

Danke an Diplom Biologin Janina Schwarte für die Hilfe bei der molekulargenetischen Arbeit, die Geduld und die vielen lieben Worte.

Danke an Dr. med. Niklas Gebauer für die Bereitstellung der klinischen Daten und die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Auch danke ich meinem Partner und meinen Freunden, die sowohl meine Freude als auch meine Sorgen mit mir teilen und immer für mich da sind.

Danke!

11. Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ann-Cathrin Czerwinska
Geburtsdatum / -ort: 23. Juni 1993 in Lüneburg



Schulabschluss

06 / 2011 Abitur am Lessing-Gymnasium Uelzen, Durchschnittsnote 1,3

Hochschulstudium

Seit 10 / 2011 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
09 / 2013 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: gut
08 / 2014 – 08 / 2017 Dissertation am Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck
10 / 2016 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: gut
11-12 / 2017 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Wahlfächer
Notarzwagenpraktikum (ca. 100 Einsätze auf dem Notarzteinsatzfahrzeug)
Abdominal- und Beckenbodenchirurgie
Medical English
Geschichte, Theorie und Ethik der Medizin

Klinische Erfahrungen

02 / 2014 Praxis für Innere Medizin und Allgemeinmedizin Dr. Stern in Ebstorf
09 / 2014 Praxis für Innere Medizin / Kardiologie / Angiologie Dr. Weckmüller in Lübeck
09 - 10 / 2014 Klinik für Kardiologie und Internistische Intensivmedizin am Klinikum Lüneburg
03 / 2015 Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde am UKSH Lübeck
09 / 2015 Klinik für Neurochirurgie am Kantonsspital St. Gallen (Schweiz)
02 - 03 / 2016 Poliklinik für Rheumatologie am UKSH Lübeck
11 / 2016 – 10 / 2017 Praktisches Jahr in den Kliniken für Chirurgie und Anästhesie des UKSH, Campus Lübeck und der Klinik für Innere Medizin der Schön Klinik Neustadt

11. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Gebauer N, Biersack H, Czerwinska A-C, Schemme J, Hardel TT, Bernard V, Rades D, Lehnert H, Luley KB, Thorns C (2016): Favorable prognostic impact of RAS mutation status in multiple myeloma treated with high-dose melphalan and autologous stem cell support in the era of novel agents: a single center perspective. *Leuk Lymphoma* 57, 226–229

Gebauer N, Biersack H, Czerwinska A-C, Schemme J, Hardel TT, Bernard V, Rades D, Lehnert H, Luley KB, Thorns C (2016): Single nucleotide polymorphisms in TP53 but not KRAS or MDM2 are predictive of clinical outcome in multiple myeloma treated with high-dose melphalan and autologous stem cell support. *Leuk Lymphoma* 57, 1482–1486

12. Erklärung

Gemäß §9 Abs. 1 der Promotionsordnung.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe im Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck unter Betreuung durch Herrn Prof. Dr. med. Christoph Thorns, Frau Diplom Biologin Janina Schwarte und Herrn Dr. med. Niklas Gebauer angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit genannten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Ann-Cathrin Czerwinska

Lübeck, den 09.08.2017