

Aus dem CharitéCentrum 14 – Tumormedizin  
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und  
Tumorimmunologie  
Campus Virchow Klinikum  
Direktor: Prof. Dr. med. Lars Bullinger

## **Habilitationsschrift**

# **Molekulare Risikofaktoren beim Multiplen Myelom**

zur Erlangung der Lehrbefähigung für  
das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité  
- Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Martin Kaiser

aus Aachen

Eingereicht: Dezember 2018

Dekan: Herr Prof. Dr. med. A. Pries

1. Gutachter: Prof. Dr. Florian Bassermann, München

2. Gutachter: Prof. Dr. Florian Heidel, Jena

# INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abkürzungen.....	4
1 Einleitung.....	6
1.1 Multiples Myelom.....	6
1.2 Molekulare Veränderungen beim Multiplen Myelom.....	7
1.2.1 Genetische Prognosefaktoren beim Multiplen Myelom.....	8
1.2.2 Epigenetische Alterationen beim Multiplen Myelom.....	12
2 Fragestellung und Zielsetzung.....	15
3 Eigene Arbeiten.....	15
3.1 Molekulare Hochrisikomarker und Mutationsprozesse beim Myelom.....	15
3.1.1 Prognostische Praediktion beim neudiagnostizierten Multiplen Myelom: eine Meta-Analyse der molekularen Profile von 1905 Studienpatienten.....	16
3.1.2 APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma.....	27
3.1.3 Whole-genome sequencing of multiple myeloma reveals oncogenic pathways are targeted somatically through multiple mechanisms.....	39
3.2 Entstehung molekularer Veränderungen und Bedeutung für das Therapieansprechen	52
3.2.1.1 Neutrale Tumorevolution beim Multiplen Myelom ist mit einer schlechten Prognose assoziiert.....	52
3.3 Epigenetische Veränderungen beim MM.....	59
3.3.1.1 Globale Methylierungsanalyse identifiziert prognostisch wichtige epigenetisch inaktivierte Tumorsuppressorgene beim Multiplen Myelom.....	59
4 Diskussion.....	61
5 Zusammenfassung.....	75
6 Literatur.....	77
7 Danksagung.....	88

8 Erklärung.....89

## ABKÜRZUNGEN

5'-UTR	5' Untranslated Region
AID/AICDA	Activation induced cytidine deaminase (Gen)
APOBEC	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like (Gen)
CCND	Cyclin D (Gen)
chr()	Chromosom
cis	Genetik: auf demselben Chromosom
CNA	Copy number aberrations (genetische Kopienzahlaberration)
del()	(genetische) Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
gain()	Gain (genetische Duplikation)
GEP	Genexpressionsprofil
iFISH	Interphase Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
IGH	Immunoglobulin heavy chain region (Immunoglobulin Schwereketten-Lokus)
IMiD	Immunomodulatory drugs (Immunmodulatorische Therapie; andere Bezeichnung: Thalidomid und Derivate (Lenalidomid, Pomalidomid))
IMWG	International Myeloma Working Group
MAF/MAFB	MAF bZIP transcription factor (Gen)
MM	Multiples Myelom
MMSET	multiple myeloma SET domain (Gen)
MRC	Medical Research Council
MRD	Minimal residual disease (minimale Resterkrankung)
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NCRI	National Cancer Research Institute (Nationales Krebsforschungszentrum)
NGS	Next-generation sequencing (massiv parallele Sequenzierung)
PFS	Progression-free survival (progressionsfreies Überleben)
RT-qPCR	Reverse transcription-quantitative real-time polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure

RNA-seq	RNA sequencing (massive parallele Sequenzierung von RNA)
OS	Overall survival (Gesamtüberleben)
t()	Translokation
WES	Whole Exome Sequenzierung
WGS	Whole Genome Sequenzierung

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Multiples Myelom

Das Multiple Myelom (MM) entsteht durch maligne Entartung langlebiger Knochenmarksplasmazellen oder deren unmittelbarer Vorläuferzellen.<sup>1</sup> Jährlich erkranken etwa 6500 Menschen in Deutschland neu an einem MM, es ist die dritthäufigste hämatologische Neoplasie.<sup>2</sup> Die Hälfte der Patienten ist bei Diagnose über 75 Jahre alt, die Altersverteilung ist jedoch weit gestreut und steigt ab 45 Jahren deutlich an.

Fast allen symptomatischen Multiplen Myelomen geht eine asymptomatische Phase der sogenannten Monoklonalen Gammopathie Unklarer Signifikanz (MGUS) voraus, die in bis zu 5% der über 70-jährigen Bevölkerung vorliegt.<sup>3</sup> MGUS ist, analog zu anderen Tumorerkrankungen mit detektierbaren prä-malignen Vorläuferläsionen, konzeptionell die erste Stufe eines fortschreitenden, malignen Transformationsprozesses. Translokationen der Immunglobulin-Regionen (IGH) oder Duplikationen von Chromosomen (Hyperdiploidie) sind an der Primärtransformation beteiligt und stellen Prognosefaktoren sowie molekulare Subgruppen für zielgerichtete Therapien dar.<sup>4-6</sup> Es wird vermutet, dass eine schrittweise oder parallele Akquisition sekundärer Drivermutationen zur Progression von MGUS zum symptomatischen Myelom führt, mit einer Rate von 1%/Jahr. Im Stadium der symptomatischen Erkrankung weisen die durch Primärläsionen charakterisierten Subgruppen unterschiedliche Häufigkeiten und Kombinationen von Sekundärläsionen auf (Abbildung 1).<sup>7</sup> Das könnte darauf hinweisen, dass Biologie und zellulärer Kontext der Plasmazelle zum Zeitpunkt der Immortalisation bestimmte tumorevolutionäre Entwicklungen bedingen. Ein verbessertes Verständnis der zugrundeliegenden molekularen Prozesse könnte Möglichkeiten für longitudinale, stratifizierte Patientenversorgung eröffnen.<sup>8</sup>

Klinisch ist das symptomatische Myelom mit signifikanter Morbidität vergesellschaftet, die aktive und konsequente Krankheitskontrolle erfordern.<sup>9</sup> Eine Reihe an klinischen Risikofaktoren ( $\beta$ 2-Mikroglobulin, Albumin, LDH) die wahrscheinlich gemeinsame Endstrecken der Myelommorbidität reflektieren, sowie geriatrische Marker des Gebrechlichkeitssyndroms wurden zur klinischen Prognoseabschätzung entwickelt.<sup>10,11</sup> Da diese Marker nicht direkt biologische Eigenschaften des Tumors reflektieren sind sie nicht Gegenstand dieser Arbeit. Ihr Nutzen für prospektiv stratifizierte Patientenversorgung ist zur Zeit unklar.

Die Therapie des Multiplen Myeloms hat in den letzten 20 Jahren deutliche Fortschritte gemacht, dennoch bleibt die Erkrankung gegenwärtig unheilbar.<sup>12-14</sup> Heilung im Sinne von

kompletter Entfernung klonaler Myelomzellen ist ein anspruchsvolles Ziel nicht zuletzt da gesunde Knochenmarksplasmazellen (als physiologischer Gegenpart der Erkrankung) zu den widerstandsfähigsten und langlebigsten terminal differenzierten Zellen des Körpers gehören.<sup>15,16</sup> Dennoch haben moderne Therapiekonzepte zu erheblicher Morbiditätsreduktion geführt. Die Überlebenszeit mit aktiver Therapie ist jedoch hoch variabel und kann bei jungen Patienten mit aggressiver Erkrankung (=Hochrisiko-Myelom) nur Monate bis wenige Jahre betragen.<sup>17</sup> Dagegen überleben 30% der Patienten mit MM heute 10 Jahre und länger verglichen mit nur 10% Anfang der 90er Jahre.<sup>2,12</sup> Die heutige Standardtherapie ist systemisch; es steht eine Reihe verschiedener Wirkstoffklassen jenseits klassischer Alkylanzien und Steroide zur Verfügung, die sich in verschiedenen Zusammenstellungen kombinieren lassen. Hauptgruppen stellen Thalidomid und seine Derivate (Immunomodulatory Drugs (IMiDs)), Proteasominhibitoren und neuerdings monoklonale Antikörper dar.<sup>18-20</sup> Entscheidend zur Prognoseverbesserung beigetragen haben Therapiekonzepte die aus Induktions- und Konsolidierungstherapie, inklusive Hochdosistherapie und autologer Stammzelltransplantation (ASZT), sowie Erhaltungstherapie mit niedrigerer Behandlungsintensität bestehen. Optimale Therapieintensität in der Induktion und Therapiedauer in der Erhaltungsphase werden derzeit diskutiert, wobei unter anderem therapeutischer Mehrwert, Toxizität wie auch teils extreme Kosten der Kombinationstherapien Leitthemen sind.<sup>21</sup> Es ist zur Zeit unklar welche Patientengruppen bereits mit wenig komplexen, gering toxischen Therapien lange Überlebenszeiten erreichen.

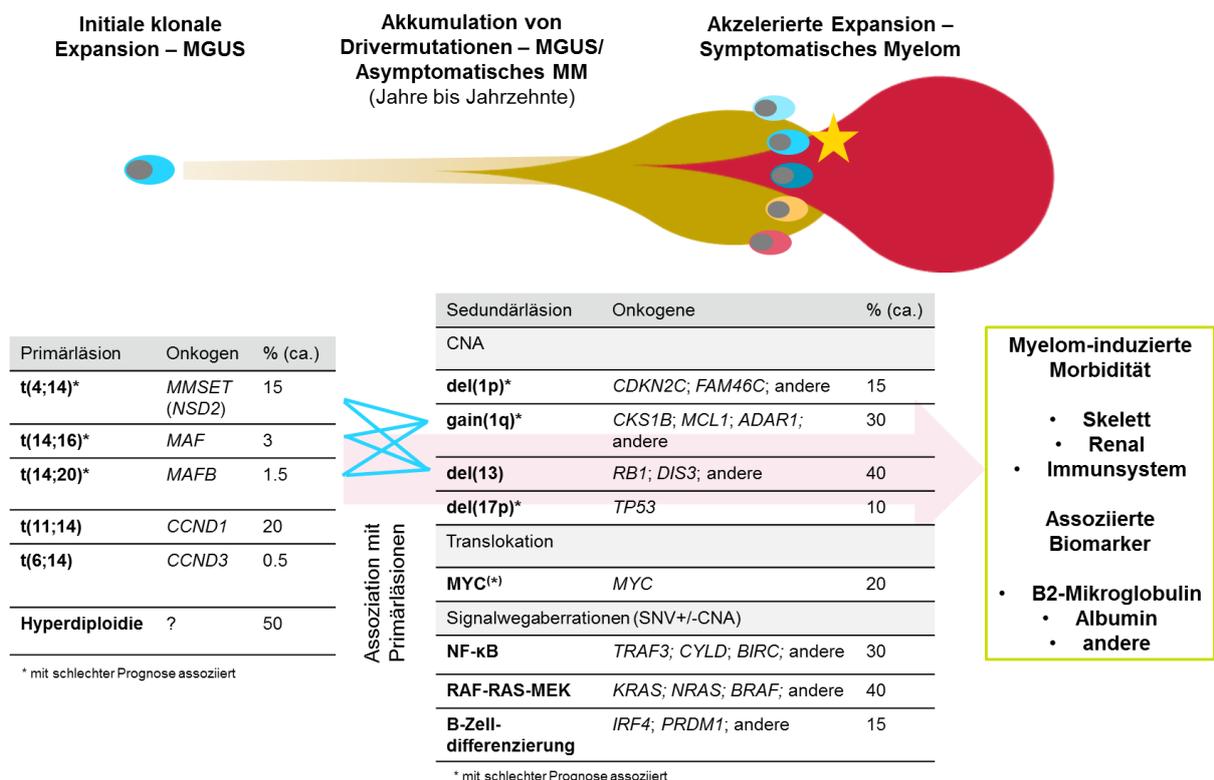
Um die Langzeitprognose des Myeloms zu verbessern, sind zwei Ansätze entscheidend. Erstens, die Identifikation prognostischer Marker für eine genauere Prognose- und Risikoeinschätzung des individuellen Patienten. Dies könnte helfen die nötige Therapieintensität und damit die Balance zwischen Effektivität und Toxizität zu optimieren sowie finanzielle Ressourcen besser zu nutzen. Zweitens, die Entwicklung neuer zielgerichteter Substanzen, die in effektive Kombinationstherapien eingefügt werden können und potentiell die Eradikation therapieresistenter Klone ermöglichen. Zusätzlich müssen klinisch anwendbare Biomarker entwickelt werden, um Zielpatientengruppen möglichst früh zu identifizieren und die Krankheitsmorbidity zu limitieren.

## **1.2 Molekulare Veränderungen beim Multiplen Myelom**

## 1.2.1 Genetische Prognosefaktoren beim Multiplen Myelom

Es gibt mehrere molekulare Veränderungen deren Assoziation mit kürzeren Remissionszeiten und Gesamtüberleben beim MM etabliert ist (Abbildung 1). Da mehrere dieser Aberrationen überlappend auftreten und, abgesehen von *TP53* Aberrationen, die prognostische Assoziation der einzelnen genetischen Marker variabel ist, wurde die unabhängige prognostische Bedeutung einiger Marker wie *gain(1q)* zeitweise in Frage gestellt, wodurch einige Klassifikationssysteme with das Revised-ISS (R-ISS) *gain(1q)* nicht beinhalten.<sup>22</sup> Es gab wenige größere Studiendatensätze die die Untersuchung kumulativer Effekte verschiedener Drivermutationen zuließen, um prognostische Modelle für risikostratifizierte Therapien zu entwickeln. Um molekulare Hochrisiko-Erkrankungen effektiv zu behandeln ist es erforderlich, die prognostische Bedeutung einzelner Läsionen und ihre Assoziationen untereinander zu beschreiben und die Grundlage für ein besseres Verständnis der Biologie der relevanten Mutationen und ihrer molekularen Interaktionen zu schaffen.

**Abbildung 1** (modifiziert aus Manier S, et al., Nat Rev Oncol 2017, Pawlyn C et al., Nat Rev Canc 2017 und eigene Arbeiten)<sup>7,23</sup>: Primär- und Sekundärläsionen beim Multiplen Myelom



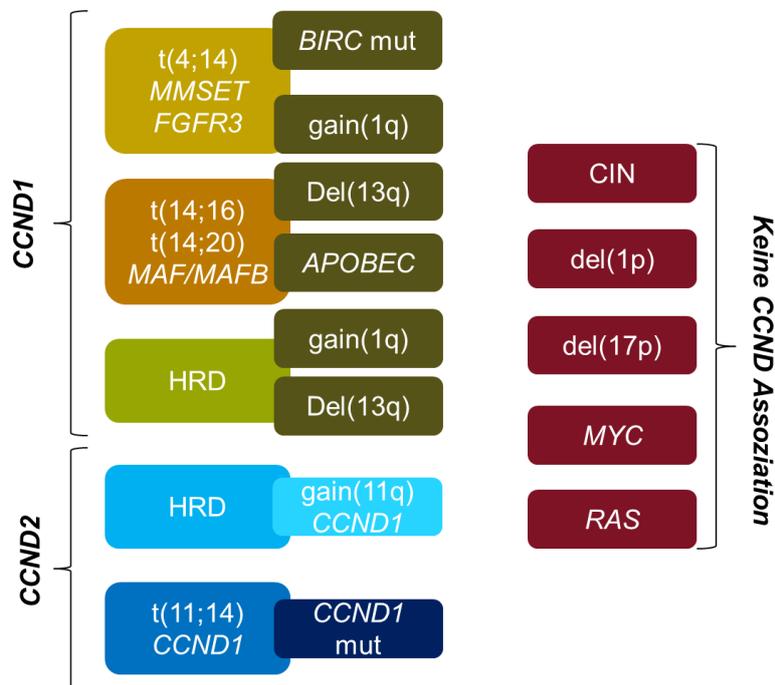
Die biologisch und klinisch relevantesten genetischen Veränderungen beim MM sind strukturelle Mutationen, also Translokationen, Duplikationen (*gain*) oder Deletionen (*del*) meist größerer chromosomaler Bereiche. Die primären Läsionen sind Translokationen der Immunglobulinregionen, meist der IGH Region auf Chromosom 14, aber auch der

Leichtkettenregionen IGK auf chr(2) oder IGL auf chr(22). In B-Zellen und Plasmazellen sind die Immunglobulinregionen physiologisch kontrollierten Mutationsprozessen unterworfen, welche die Antikörperdiversität durch V(D)J-Rekombination und somatische Hypermutation und das immunologische Gedächtnis durch Immunglobulinklassenwechsel ermöglichen.<sup>24</sup> Fehler in allen drei Prozessen könnten den Translokationen beim MGUS und Myelom zugrunde liegen. Daten von anderen, reifen B-Zelltumoren wie Lymphomen suggerieren, dass dem fehlerhaften Immunglobulinklassenwechsel durch Aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase (AICDA oder AID) wahrscheinlich besondere Bedeutung zukommt.<sup>25-27</sup>

Die Translokationen führen zur Juxtaposition der starken, nicht-kodierenden Enhancer des Immunglobulinlokus mit kodierenden Onkogenen auf den Translokationspartnerchromosomen die als Konsequenz pathologisch überexprimiert werden: *MMSET/NSD2* und *FGFR3* bei t(4;14), *CCND1* bei t(11;14), *MAF* bei t(14;16), *MAFB* bei t(14;20) und *CCND3* bei t(6;14).<sup>28-33</sup> Ca. 40% der Myelomtumore sind durch jeweils eine dieser IGH Translokationen charakterisiert. Von den Tumoren ohne IGH Translokationen (50-60%) zeigt die große Mehrzahl einen hyperdiploiden Karyotyp mit 48–74 Chromosomen. Typisch sind Duplikationen eines oder beider Allele mehrerer der Chromosomen mit ungeraden Nummern, d.h. 3, 5, 7, 9, 11, 15, 17, 19 vor.<sup>34</sup> Einige der ungerade nummerierten Chromosomen, speziell 1, 13, 17 sind von regionalen oder fokalen Copy Number Aberrationen (CNA) wie Deletionen betroffen. Chromosom 11, der Genlokus von *CCND1*, ist im Rahmen von Hyperdiploidie häufig dupliziert/amplifiziert, was die Bedeutung von CCND Proteinen für die Krankheitsentstehung generell unterstreicht.<sup>35</sup> Der der Hyperdiploidie zugrundeliegende Pathomechanismus ist unbekannt, es wird von einem einmaligen katastrophalen genetischen Ereignis ausgegangen da die chromosomalen Duplikationen meist in allen Subklonen der Erkrankung zu finden sind (Abbildung 1).<sup>36-38</sup>

Die Primärläsionen, IGH Translokationen und Hyperdiploidie, sind mit einer fundamentalen Veränderung des Zellzyklusverhaltens und Überexpression von Cyclinen assoziiert, entweder als direkte Konsequenz z.B. der t(11;14) oder als indirekte Veränderung bei t(4;14) oder t(14;16) die mit starker Überexpression von *CCND2* assoziiert sind ohne dass *CCND2* selbst von Mutationen betroffen ist (Abbildung 2). Von den Translokationen sind beim symptomatischen Myelom die mit *CCND2*-Überexpression vergesellschafteten t(4;14), t(14;16) und t(14;20) insgesamt mit einer schlechteren Prognose (kürzere Remissionszeit und kürzeres Gesamtüberleben) assoziiert. Das bei t(4;14) überexprimierte Onkogen *MMSET* ist eine epigenetisch aktive Histonmethyltransferase (H3K36-Dimethyltransferase) die wahrscheinlich zum aggressiven Verhalten dieser Subgruppe beiträgt und im folgenden Kapitel näher beschrieben wird.<sup>39,40</sup>

**Abbildung 2** (modifiziert aus Manier S, et al., Nat Rev Oncol 2017, Pawlyn C et al., Nat Rev Canc 2017 und eigene Arbeiten, inklusive hier präsentierte Arbeiten)<sup>7,23</sup>: Assoziationen zwischen *CCND1/2* Expression und Primär- und Sekundärläsionen.



Weitere häufige und prognostisch relevante strukturelle Aberrationen sind CNA die ganze Chromosomen, ganze Chromosomenarme oder interstitielle chromosomale Regionen betreffen.<sup>41</sup> Verlust von Chromosomenarmen ist oft mit Duplikation des anderen Arms und Isochromosomenbildung assoziiert, zudem sind unbalancierte, mit Verlust großer genetischer Regionen assoziierte „springende Translokationen“ beschrieben worden.<sup>42,43</sup> Es wird angenommen dass der kollektive Zugewinn oder Verlust von Genen einer ganzen Region zu einer veränderten „Gendosierung“ auf transkriptioneller Ebene führt, die positive Auswirkungen auf das Tumorzellüberleben hat.<sup>36</sup> Zudem könnten in größeren Aberrationen diskretere, cis-regulatorisch wirksame strukturelle Aberrationen einen Rolle spielen; die Untersuchung von Aberrationen der mit CNA assoziierten 3-dimensionalen DNA Topologie bei Tumoren ist Gegenstand aktueller Forschung.<sup>44,45</sup>

Es gibt einige rekurrente chromosomale und regionale CNA beim MM die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Dazu gehören Duplikationen des langen Armes von Chromosom 1 (gain(1q21)), regionale Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 1 (del(1p32)) oder Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 17 (del(17p)), das den Genlocus des klassischen Tumorsuppressors *TP53* betrifft.<sup>46,47</sup> Während *TP53* eine universelle Rolle in verschiedenen Tumoren spielt, scheinen Aberrationen von chr1 Myelom-spezifischer zu sein. Allerdings wurden kürzlich Aberrationen von Chr1 mit prognostischer Assoziation auch in soliden Tumoren beschrieben.<sup>48,49</sup> Ob sich diese weite Bereiche von chr1 betreffenden Veränderungen krankheitsspezifisch unterscheiden, werden detaillierte

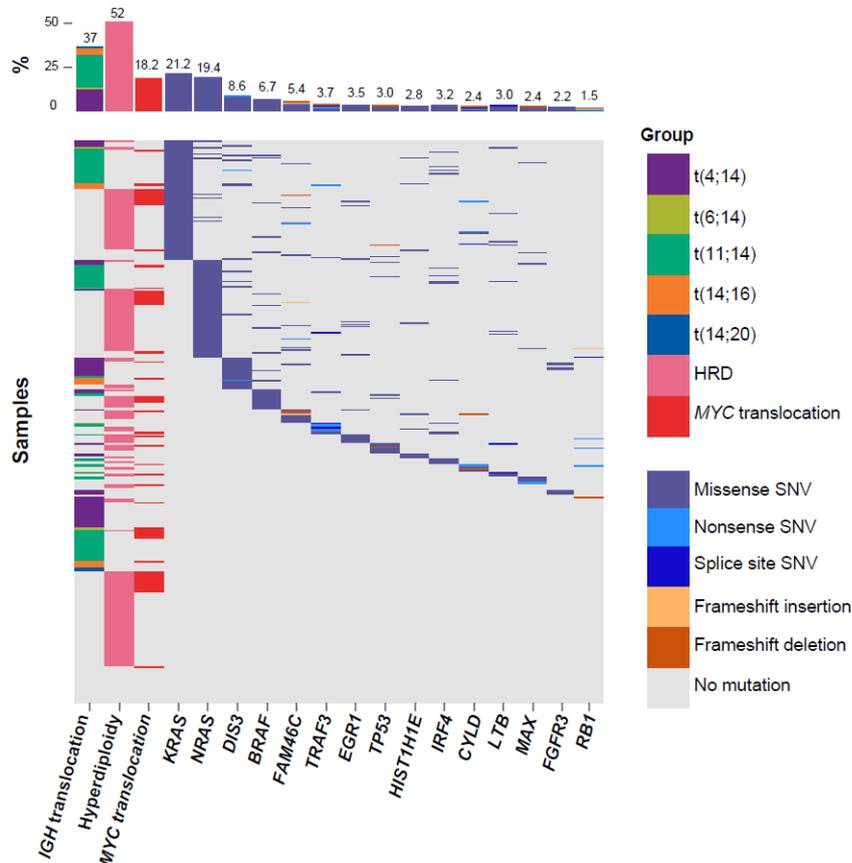
Analysen der mit den CNA assoziierten intra-chromosomalen strukturellen Veränderungen zeigen müssen. Gain(1q21) ist in 30% neudiagnostizierter MM präsent, in 10% der Fälle tritt eine Amplifikation (4 oder mehr Kopien; amp(1q21)) auf, wahrscheinlich als Resultat pericentromerischer chromosomaler Instabilität die zur Bildung dizentrischer Chromosomen führt.<sup>50</sup> Die transkriptionelle Einheit auf chr(1q21) umfasst mehrere potentiell relevante Gene wie CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B (*CKS1B*), Myeloid Cell Leukemia 1 (*MCL1*), das ein BCL-2 Proteinfamilienmitglied kodiert und Acidic Nuclear Phosphoprotein 32 Family Member E (*ANP32E*), sowie RNA Editase Adenosine Deaminase Acting on RNA 1 (*ADAR1*) und Interleukin Enhancer Binding Factor 2 (*ILF2*).<sup>51-55</sup> Es ist unwahrscheinlich dass nur ein einzelnes Gen zur aggressiveren Tumorbilogie bei Gain oder Amp(1q21) beiträgt, jedoch wird klassisch *CKS1B* wegen seiner zellzyklusregulatorischen Bedeutung als Referenzmarker verwendet.

Deletion von 1p32 ist ebenfalls mit dem Hochrisiko-Myelom assoziiert und *CDKN2C*, ein Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor ist das prominenteste Tumorsuppressorgen, das auch homozygot deletiert ist.<sup>56-58</sup> Weitere häufig deletierte Gene liegen auf anderen Teilen des kurzen Arms von Chromosom 1, sequence similarity 46 member C (*FAM46C* auf 1p12), ribosomal protein L5 (*RPL5*) und ecotropic viral integration site 5 (*EVI5*), beide auf 1p22.<sup>59,60</sup> Die häufigste Deletion beim Myelom betrifft den langen Arm des Chromosom 13, das in ca. 40% neudiagnostizierter Fälle heterozygot deletiert ist.<sup>46</sup> Die Del(13q) ist mit anderen prognostisch relevanten strukturellen Aberrationen wie t(4;14) assoziiert ohne selbst unabhängig mit Prognose assoziiert zu sein.<sup>46,61</sup> Dennoch scheint Del(13q) bei der Tumorprogression eine Rolle zu spielen, da die Deletionsfrequenz, inklusive homozygote Deletionen, beim Rezidiv zunehmen.<sup>62,63</sup> Gene auf 13q die potentiall an diesen Prozessen beteiligt sind, sind der Tumorsuppressor und Zellzyklusregulator *RB1*, und *DIS3*, eine Endonukleaseeinheit des RNA-Exosoms.<sup>64</sup>

Neuere NGS Analysen haben zudem ein breites Spektrum an Punktmutationen identifiziert, mit einer limitierten Anzahl an häufigen rekurrenten Mutationen und einer großen Zahl niederfrequent mutierter Gene (Abbildung 3).<sup>65,66</sup> Mit Ausnahme von relativ seltenen Mutationen von *TP53* die häufig mit del(17p) im Sinne bi-allelischer Inaktivierung auftreten und mit sehr schlechter Prognose assoziiert sind, scheint die prognostische Relevanz von Punktmutationen beim Myelom begrenzt zu sein.<sup>67</sup> Am häufigsten sind Gene des RAF-RAS-MEK Kinasesignalwegs von aktivierenden Mutationen betroffen was das Myelom vom Mutationsspektrum anderer reifer B-Zelltumoren abhebt. Rekurrente, wahrscheinlich zu bi-allelischem Funktionsverlust führende inaktivierende Mutationen betreffen einzelne Gene in Bereichen größerer CNA, insbesondere *DIS3* in Tumoren mit del(13q) oder *FAM46C* in Tumoren mit del(1p).<sup>68</sup> Einige aktivierende Mutationen betreffen den B-Zell-

Differenzierungssignalweg, z.B. *IRF4* was darauf hinweist dass dieser, in Analogie zu anderen reifen B-Zelltumoren, eventuell eine therapeutische Zielstruktur darstellen könnte.<sup>66</sup>

**Abbildung 3** (aus Walker BA et al., JCO 2015)<sup>67</sup>: Mutationsspektrum von 463 WES von Studienpatienten der NCRI Myeloma XI Studie.



### 1.2.2 Epigenetische Alterationen beim Multiplen Myelom

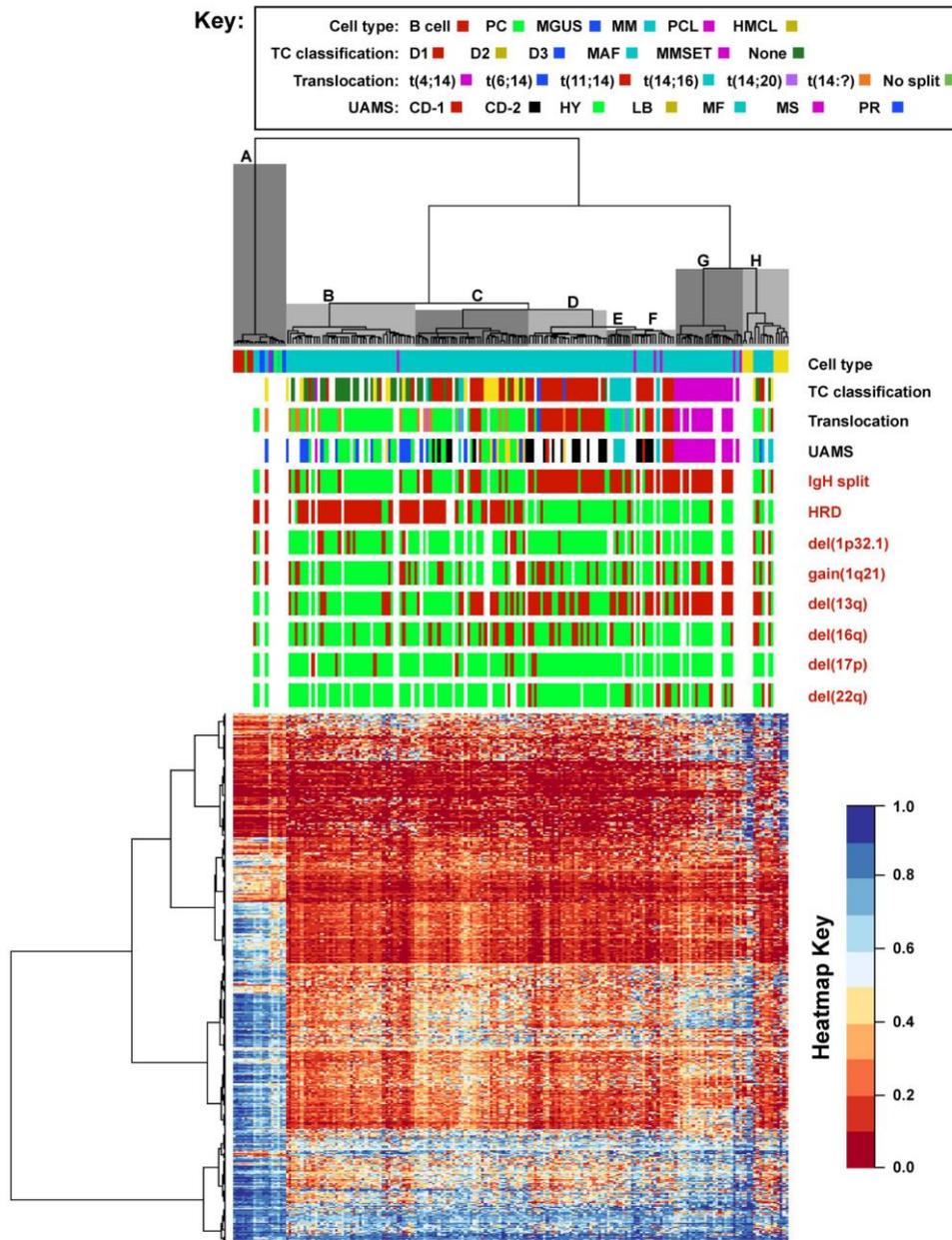
Das als Konsequenz der Primärtranslokation t(4;14) überexprimierte epigenetische Enzym *MMSET* (auch *WHSC1* oder *NSD2*) ist eine Histonlysinmethyltransferase und führt zur aberranten Dimethylierung (me2) des H3K36 Histonanhangs.<sup>39</sup> Diese Veränderungen betreffen weite Bereiche des Genoms und sind mit Verringerung des repressiven Markers H3K27me3 assoziiert, was global zu einer Genüberexpression im Vergleich zu nicht-t(4;14) Tumoren zu führen scheint.<sup>69,70</sup> Zusätzlich wurden *MMSET* Funktionen im Rahmen der DNA Reparaturmechanismen und Histonmodifikationen von H4K20 zugeschrieben.<sup>71</sup> Es ist zur Zeit unklar welche Regionen und Gene physiologisch von *MMSET* modifiziert werden; die Untersuchung ist insbesondere durch den Mangel an spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen humanes *MMSET* beschränkt. *MMSET* wird in Keimzentrums-B-Zellen exprimiert und

konditionelle *MMSET*-knockout-Tiermodelle zeigen fehlerhafte B-Zell-Differenzierung: *MMSET* Deletion in Maus-B-Zellen verringerte den Immunglobulinklassenwechsel durch reduzierte AID Rekrutierung, was eine relevante Rolle von *MMSET* im geregelten Ablauf der physiologischen B-Zellreifung suggeriert.<sup>72,73</sup>

Generell scheint die Rolle von *MMSET* paradigmatisch für die biologische und klinische Relevanz epigenetischer Veränderungen beim Myelom zu sein. Die t(4;14) ist mit aggressiver Tumorbilologie und schlechter Prognose sowie Zeichen chromosomaler Instabilität im Sinne kumulativer CNA assoziiert.<sup>67</sup> Zudem ist t(4;14) mit schnellerer Progression von asymptomatischer zu symptomatischer Erkrankung assoziiert.<sup>74</sup> Damit ist *MMSET* als aktives Enzym ein potentielles therapeutisches Ziel beim Myelom, aber trotz intensiver Forschung konnte bisher kein spezifischer ‚small molecule‘ *MMSET*-Inhibitor entwickelt werden.

Zudem haben genomweite DNA-Methylierungsanalysen gezeigt, dass es verschiedene, mit den IGH Translokationen t(4;14), t(11;14), t(14;16)+t(14;20) oder Hyperdiploidie assoziierte globale DNA Methylierungsmuster beim Myelom gibt.<sup>75</sup> Diese Muster sind wahrscheinlich Surrogat verschiedener epigenetischer Informationsschichten und reflektieren wahrscheinlich Unterschiede in den regulatorischen Netzwerken der genetischen Subgruppen (Abbildung 4). Dabei weist die t(4;14) ein genspezifisches Hypermethylierungsmuster auf, während die t(11;14) relativ zu den hyperdiploiden Tumoren genspezifisch hypomethyliert ist. Zudem ist die Entwicklung vom MGUS zu asymptomatischem und symptomatischem Myelom von globalen Methylierungsveränderungen begleitet.<sup>76</sup>

**Abbildung 4** (aus Walker BA et al., Blood 2011)<sup>75</sup>: Globale DNA-Methylierungsmuster sind mit Primärläsionen assoziiert.



Diese Veränderungen konnten teilweise B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktorbindungsstellen zugeordnet werden.<sup>77</sup> Es ist zur Zeit nur teilweise bekannt, welche epigenetischen Modifikationsenzyme beim Myelom außerhalb von *MMSET* eine Rolle spielen. Kürzlich haben mehrere Gruppen eine Assoziation zwischen hoher Expression von *EZH2*, einer H3K27me3 Methyltransferase und schlechter Prognose gezeigt, allerdings ist *EZH2* im Gegensatz zu anderen B-Zell-Tumoren beim Myelom nicht rekurrent mutiert.<sup>69,78,79</sup>

## **2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG**

Die Identifizierung molekularer Prognosefaktoren beim MM und ihre Einordnung in den Kontext von Pathogenese und Progression stehen im Mittelpunkt dieser Arbeit. Dies ist mit dem Ziel durch molekulare Charakterisierung der Erkrankung eine verbesserte Risikostratifizierung von Patienten zu erreichen um Therapien rational und unter optimaler Nutzung von Ressourcen zu gestalten und Toxizität zu vermindern.

Die folgenden Fragen wurden im Rahmen dieser Habilitation durchgeführten Arbeiten adressiert:

- Was ist die prognostische Relevanz rekurrenter molekularer Läsionen und wie sind sie untereinander korreliert?
- Können Kombinationen von unabhängigen molekularen Risikomarkern zur verbesserten Spezifität der Prognoseabschätzung beitragen und die prospektive Risikostratifizierung im Rahmen klinischer Studien ermöglichen?
- Bestehen Interaktionen zwischen rekurrenten Aberrationen die potentielle molekulare Abhängigkeiten und Vulnerabilitäten aufzeigen, welche für Ansätze der synthetischen Lethalität bei schwer direkt zu inhibierenden Onkogenen genutzt werden könnten?

Die Verfügbarkeit genomweiter Mutationsanalysen inklusive WES und Whole Genome Sequencing (WGS) ermöglichte zudem die Untersuchung von Fragen bezüglich onkogener Driverprozesse sowie der Tumorevolution und ihrer Assoziation mit Prognose:

- Sind spezifische Mutationsprozesse an der Entstehung der mit ungünstiger Prognose vergesellschafteten Primär- und Sekundäraberrationen beim Myelom beteiligt?
- Liegen, neben Mutationen des kodierenden Genoms, Driverläsionen des nicht-kodierenden Tumorgenoms beim Myelom vor, und welche Gene und Signalwege sind davon betroffen?
- Gibt es verschiedene Pfade der Tumorevolution beim Myelom und sind diese mit Prognose vergesellschaftet?

Das wachsende Verständnis bezüglich epigenetischer Enzyme und Regulatoren als Onkogene brachte zudem die Frage auf, ob mit Prognose vergesellschaftete epigenetische Veränderungen beim Myelom vorliegen.

## **3 EIGENE ARBEITEN**

### **3.1 Molekulare Hochrisikomarker und Mutationsprozesse beim Myelom**

In den letzten Jahren sind neben den länger bekannten Translokationen neue molekulare Veränderungen beim MM identifiziert worden. So haben genomweite Hochdurchsatz

Sequenziermethoden und SNP Arrays sowohl neue rekurrente somatische Mutationen als auch die Bedeutung von CNA im MM nachgewiesen.<sup>46,64-66,80</sup> Die Interaktion der einzelnen strukturellen Läsionen und deren jeweilige prognostische Relevanz ist jedoch weitgehend unklar. Dies gilt vor allem für seltene Alterationen, für deren genaue Analyse große Patientenkohorten und Datensätze klinischer Studien benötigt werden.<sup>81</sup>

Um die Assoziation von Myelom-spezifischen Translokationen mit CNA und Mutationen und deren prognostische Relevanz zu untersuchen, haben wir eine große homogene Patientengruppe der Myeloma XI Studie mittels molekularer MLPA CNA Analyse untersucht und gezeigt, dass die Risikostratifizierung durch Integration verschiedener Marker verbessert werden kann.<sup>82</sup> Diese wurde im Datensatz der Myeloma IX Studie validiert. Des Weiteren legt die Assoziation von CNA und Primärtranslokationen untereinander einen funktionellen Zusammenhang für die Biologie der Erkrankung nahe. Zudem wurden durch WES Analyse der Tumoren von 463 NCRI Myeloma XI Studienpatienten Mutationssignaturen identifiziert die mit Primärtranslokationen assoziiert sind umfassen potentiell pharmakologisch beeinflussbare enzymatische Mutationsprozesse.<sup>83</sup> Eine detaillierte Aufschlüsselung der molekularen Struktur des Myeloms ist eine wichtige Voraussetzung, um zielgerichtete Therapien für Hochrisikopatienten zu entwickeln.

### **3.1.1 Prognostische Prädiktion beim neudiagnostizierten Multiplen Myelom: eine Meta-Analyse der molekularen Profile von 1905 Studienpatienten**

Shah V, Sherborne AL, Walker BA, Johnson DC, Boyle EM, Ellis S, Begum DB, Proszek PZ, Jones JR, Pawlyn C, Savola S, Jenner MW, Drayson MT, Owen RG, Houlston RS, Cairns DA, Gregory WM, Cook G, Davies FE, Jackson GH, Morgan GJ, **Kaiser MF**. Prediction of outcome in newly diagnosed myeloma: a meta-analysis of the molecular profiles of 1905 trial patients. *Leukemia*. 2018 Jan;32(1):102-110. doi: 10.1038/leu.2017.179

Diese Studie untersuchte die Häufigkeit, Korrelation und prognostische Bedeutung molekularer Aberrationen in 1036 Patienten der UK NCRI Myeloma XI Studie und 869 Patienten der unabhängigen MRC Myeloma IX Studie. Knochenmarksmyleomzellen wurden aufgereinigt (CD138 immunmagnetische Selektion) und RNA und DNA für Myeloma XI Proben mittels RT-qPCR auf IGH Translokationen und mittels MLPA (MRC Holland; SALSA P425 und X095 Probemixes) auf CNA hin untersucht, für Myeloma IX wurden Translokationsstatus und CNA mittels iFISH ermittelt. Die Resultate der Meta-Analyse beider Studien zeigte nahezu identische Frequenz der mittels molekularer Methoden und iFISH bestimmten Aberrationen und bestätigte die Assoziation von t(4;14), t(14;16), t(14;20), del(17p) und gain(1q21) mit einer schlechten Prognose mit hazard ratios (HRs) für OS von jeweils 1.60 (Wald  $P=4.77 \times 10^{-7}$ ), 1.74 ( $P=0.0005$ ), 1.90 ( $P=0.0089$ ), 2.10 ( $P=8.86 \times 10^{-14}$ ) und 1.68 ( $P=2.18 \times 10^{-14}$ ). Die Gegenwart von 2 oder mehr prognostischen Läsionen wurde als

„double-hit“ definiert und war mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert mit einer hazard ratio für OS von 2.67 ( $P=8.13 \times 10^{-27}$ ). In beiden Studien wurden jüngere, fittere Patienten mit Hochdosis-Chemotherapie und ASZT behandelt, für die „double-hit“ mit einer hazard ratio für OS von 3.19 ( $P=1.23 \times 10^{-18}$ ) assoziiert war.

Die gegenüber iFISH detaillierte CNA Analyse mittels MLPA für Myeloma XI erlaubte eine Untersuchung der Korrelation von multiplen CNA und IGH Translokationen mittels Bayes-Inferenz, wobei ein inverser Bayes-Faktor  $0_1 < 0.01$  als signifikant betrachtet wurde. Die Assoziation zwischen kategorischen Variablen wurde mit Fishers Exakt Test bestimmt. Eine starke Korrelation zwischen  $t(4;14)$  und Deletionen des *BIRC2/BIRC3* Lokus (Fisher  $P=8.7 \times 10^{-15}$ ) wurde festgestellt. *BIRC2/BIRC3* ist eine der wenigen genetischen Regionen beim Myelom die von homozygoten Deletionen betroffen ist (2.2%) und mehr als die Hälfte dieser Deletionen traten in der  $t(4;14)$  Subgruppe auf. *BIRC2/BIRC3* Deletionen sind mit NIK Aktivierung assoziiert und spezifische NIK Inhibitoren sind gegenwärtig in Entwicklung. Innerhalb der hyperdiploiden Subgruppe wurde eine starke Korrelation zwischen  $\text{gain}(1q21)$  und Überexpression von *CCND2* ( $P=0.0001$ ) oder  $\text{gain}(11q25)$  und Überexpression von *CCND1* ( $P=0.0001$ ) festgestellt. Die Studie legt nahe dass molekulare Charakterisierung multipler struktureller Aberrationen zur besseren Risikostratifizierung und Identifizierung potentiell therapeutisch relevanter biologischer Subgruppen beim Myelom beitragen kann.

Link zum Artikel  
<https://doi.org/10.1038/leu.2017.179>

















### 3.1.2 APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma

Walker BA, Wardell CP, Murison A, Boyle EM, Begum DB, Dahir NM, Proszek PZ, Melchor L, Pawlyn C, **Kaiser MF**, Johnson DC, Qiang YW, Jones JR, Cairns DA, Gregory WM, Owen RG, Cook G, Drayson MT, Jackson GH, Davies FE, Morgan GJ. APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma. *Nat Commun.* 2015 Apr 23;6:6997. doi: 10.1038/ncomms7997.

In dieser Studie wurden Tumoren von 463 neudiagnostizierten Patienten mittels WES charakterisiert. Die Analyse wurde mit dem Ziel durchgeführt, Mutationsprozesse die mit den etablierten Primärläsionen, insbesondere den IGH Translokationen, assoziiert sind zu identifizieren. Dazu wurden bioinformatische Dekonvolutionsalgorithmen angewendet, die somatische Punktmutationen in der Tumor-DNA in Kontext zu benachbarten DNA-Basenabfolgen setzen um Mutationssignaturen die in rekurrenten Mustern erfolgen zu erkennen. Auf Partneronkogene der IGH Translokationen angewendet wurden Mutationsmuster erkannt die mit Activation-induced cytidine deaminase (AID; AICDA) assoziiert und mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet sind, zum Beispiel 5'-UTR Mutationen in *CCND1*. In 3.8% der Tumoren wurde eine APOBEC Mutationssignatur gesehen die mit t(14;16) oder t(14;20) Translokationen assoziiert waren. Diese pathogenetischen Translokationen sind mit Überexpression von *MAF* und *MAFB* vergesellschaftet und stellen negative Prognosefaktoren dar. Tumoren mit APOBEC Mutationssignatur wiesen deutlich höhere Mutationsraten als nicht-APOBEC Tumoren auf und waren mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert. *MAF* und *MAFB* positive Tumoren wiesen niedrigere Expression von *APOBEC3B* und *APOBEC4* auf, ein Hinweis auf potentielle transkriptionelle Kontrollmechanismen. Sekundärtranslokationen die das Onkogen *MYC* involvieren wiesen Katägis, eine lokal begrenzte Hypermutationssignatur auf die ebenfalls durch APOBEC Deaminasen induziert werden kann. Zusammengefasst scheint die APOBEC Mutationssignatur, die besonders in Tumoren mit *MAF* Überexpression vorliegt, an der Entstehung Myelom-spezifischer Sekundärtranslokationen beteiligt zu sein und ist mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet.

Link zum Artikel  
<https://doi.org/10.1038/ncomms7997>





















### 3.1.3 Whole-genome sequencing of multiple myeloma reveals oncogenic pathways are targeted somatically through multiple mechanisms

Hoang PH, Dobbins SE, Cornish AJ, Chubb D, Law PJ, **Kaiser M**, Houlston RS. Whole-genome sequencing of multiple myeloma reveals oncogenic pathways are targeted somatically through multiple mechanisms. *Leukemia*. 2018 Apr 9. doi: 10.1038/s41375-018-0103-3.

In dieser Studie wurden die molekularen Tumorprofile (WGS, WES, RNA-seq) von 765 neudiagnostizierten Patienten der Multiple Myeloma Research Foundation CoMMpass Studie analysiert um Mutationen nicht-kodierender DNA und potentiell zugrundeliegende Mutationsmechanismen zu identifizieren. Hierzu wurden Chromosomkonformationsdaten (Hi-C) der naiven B-Zelllinie GM12878 verwendet um mit Genpromotoren interagierende Regionen cis-regulatorischer Elemente (CRE) zu definieren. Die Analyse der sehr großen nicht-kodierenden genetischen Raums wurde auf diese CRE kondensiert um statistisch die Identifizierung rekurrenter Mutationen zu ermöglichen, die dann mit der Expression benachbarter Gene korreliert wurden. Auf diesem Weg identifizierten wir 114 rekurrent mutierte CREs die mit den Promotoren von 271 Genen interagierten. Das beim MM häufig translozierte und mit schlechter Prognose vergesellschaftete Onkogen *MYC* hat 69 up- und downstream CREs, von denen 24 CREs 500-kb downstream von *MYC* in 51 Tumoren amplifiziert und 5 Regionen 850-kb upstream von *MYC* in 10 Tumoren deletiert waren. Beide CNA waren mit erhöhter *MYC* Expression assoziiert ( $Q < 0.05$  und  $Q < 0.1$ ): die amplifizierten Regionen waren durch epigenetische Enhancer-Marker H3K4me1 und H3K27ac charakterisiert, während die deletierten Regionen H3K27me3 aufwiesen und wahrscheinlich funktionelle Silencer von *MYC* darstellen. Wir identifizierten außerdem 71 Punktmutationen in 55 Tumoren in einem CRE von *PAX5* die mit verminderter Expression assoziiert waren und auf eine Tumorsuppressorfunktion von *PAX5* beim MM hinweisen.

Eine kombinierte Analyse von kodierenden (WES, 40 rekurrent mutierte Gene) und nicht-kodierenden Mutationen führte zur Identifizierung von komplementären Mutationen zentraler onkogener MM Signalwege. *IRF4* und *PRDM1*, die rekurrente kodierende und *BCL6* und *PAX5*, die nicht-kodierende Mutationen aufweisen, sind von zentraler Bedeutung für die Plasmazelldifferenzierung und treten häufig nicht-überlappend auf, so dass der Signalweg durch verschiedene Mechanismen dereguliert sein kann. Zusammengefasst bietet diese Arbeit neue Einblicke in das Spektrum nicht-kodierender Mutationen beim MM sowie ein verbessertes Verständnis von onkogenen Signalwegen beim MM.

Link zum Artikel  
<https://doi.org/10.1038/s41375-018-0103-3>























## **3.2 Entstehung molekularer Veränderungen und Bedeutung für das Therapieansprechen**

Insbesondere im Kontext der genomweiten Mutationsanalyse durch Hochdurchsatz-Tumorresequenzierung ist die mutationelle Heterogenität vieler Tumoren in ihrer Komplexität erfasst worden und subklonale Veränderung im Verlauf der malignen Transformation und Tumorprogression als evolutionärer Prozess interpretiert worden. Eine potentielle prognostische Relevanz der subklonalen Struktur und tumorevolutionärer Prozesse ist naheliegend, wurde aber für das Myelom bisher nicht demonstriert. Um einen genaueren Einblick in die Entwicklungsgeschichte des Myeloms zu erlangen und deren Relevanz für Therapieansprechen zu untersuchen haben wir die WES Daten von 463 Myeloma XI Studienpatienten mittels eines kürzlich entwickelten Modells analysiert, welches berechnet ob sich Tumorsubklone in einem Patienten wahrscheinlich gleichmässig (neutral) oder in alternierender Dominanz (klassisch darwinistisch) entwickelt haben. Diese Methode erlaubt Klassifizierung der evolutionären Entwicklung eines Tumors basierend auf WES eines einzelnen Zeitpunktes.

### **3.2.1 Neutrale Tumorevolution beim Multiplen Myelom ist mit einer schlechten Prognose assoziiert**

Johnson DC, Lenive O, Mitchell J, Jackson G, Owen R, Drayson M, Cook G, Jones JR, Pawlyn C, Davies FE, Walker BA, Wardell C, Gregory WM, Cairns D, Morgan GJ, Houlston RS, **Kaiser MF**. Neutral tumor evolution in myeloma is associated with poor prognosis. *Blood*. 2017 Oct 5;130(14):1639-1643. doi: 10.1182/blood-2016-11-750612.

Ziel der Studie war, die Häufigkeit und prognostische Relevanz von neutraler Tumorevolution bei neudiagnostiziertem Multiplem Myelom zu untersuchen. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Entwicklungsgeschichte eines individuellen Tumors potentiell Aussagen über die klinische Prognose ermöglicht. Für diese Arbeit wurde die klonale Tumorstruktur zum Zeitpunkt der Diagnose (vor Therapie) in zwei unabhängigen Studien untersucht: (1) 333 Patientenproben der UK NCRI Myeloma XI Studie (2) 434 Proben der CoMMpass Studie. WES Analysen aufgereinigter Knochenmarkstumorzellen (CD138 immunomagnetische Selektion, Miltenyi Biotech) war für alle Patientenproben verfügbar. Für die Datenanalyse wurde ein kürzlich entwickelter Algorithmus angewendet der differenziert ob sich Tumorsubklone in einem Patienten gleichmäßig (neutral) oder in alternierender Dominanz (klassisch darwinistisch) vermehrt haben. Filterkriterien zum Ausschluss niedrigqualitativer Sequenzen wurden angewendet und der Algorithmus wurde modifiziert, um die häufigen, weite Teile des Genoms umfassenden CNA beim Myelom zu

berücksichtigen. Neutrale Tumorevolution wurde definiert als  $R^2 \geq 0.98$ , wie zuvor beschrieben. Neutrale Tumorevolution wurde bei 20% (65/333 Patientenproben) der Myeloma XI und bei 17% (74/434 Patientenproben) der CoMMpass Studie gefunden. In beiden Studien war neutrale Tumorevolution mit der Präsenz von IGH Translokationen assoziiert. Beide Studien hatten sowohl jüngere, fittere mit Hochdosis-Chemotherapie und ASZT behandelte Patienten, als auch ältere und/oder unfitte, nichtintensiv behandelte Patienten eingeschlossen. Die Patienten beider Studien hatten IMiD-basierte Therapie erhalten. Neutrale Tumorevolution war in beiden Studien mit kürzerem Progressionsfreien Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) in der Gruppe der nichtintensiv behandelten Patienten assoziiert (log-rank  $P < 0.05$ ). Die prognostische Assoziation war unabhängig von etablierten molekularen oder klinischen Risikomarkern (IGH Translokationen, gain(1q), del(17p), ISS) (Cox proportional hazards model Analyse). Dieses Resultat könnte auf eine verminderte Effektivität der indirekt, über das Knochenmarksmikromillieu wirkenden IMiDs gegen neutral wachsende Tumoren mit starken Drivermutationen hindeuten und der besseren Prognostizierung und Therapieplanung dienen.

Link zum Artikel  
<https://doi.org/10.1182/blood-2016-11-750612>









### 3.3 Epigenetische Veränderungen beim MM

Die pathologische Überexpression des Gens *MMSET* bei t(4;14) wurde bereits 1998 erkannt, aber die epigenetische Funktion dieser durch IGH Primärtranslokation aktivierten H3K36 Histon-Dimethyltransferase und ihre Relevanz für die Transformation beim Myelom wurde erst im Rahmen der Entdeckung anderer epigenetischer Modulatoren und ihrer Rolle in der Tumorentstehung erfasst.<sup>28,39,69,84</sup> Die prognostische Relevanz der t(4;14) legt zudem nahe dass epigenetische Veränderungen beim Myelom potentiell klinische Bedeutung haben und eventuell therapeutische Zielstrukturen darstellen.<sup>40,69,85</sup> Wie Vorarbeiten zeigten, sind beim Myelom, wie in vielen anderen Tumorentitäten, genetisch definierte Subgruppen mit spezifischen epigenetischen Mustern assoziiert. Vor allem die t(4;14) Subgruppe ist durch genspezifische DNA Hypermethylierung charakterisiert, die vermutlich ein Effekt der aberranten Überrepräsentation von H3K36me2 ist.<sup>39,75</sup> Dennoch gibt es genomweite Variabilität der epigenetischen Struktur die unabhängig von etablierten genetischen Markern ist. Um den Einfluss genspezifischer DNA Methylierung genomweit zu untersuchen und Subgruppen mit prognostischer Assoziation zu identifizieren, wurde Tumor-DNA Methylierung für 161 Myeloma IX Studienpatienten mittels Methylierungsarrays analysiert.

#### 3.3.1 Globale Methylierungsanalyse identifiziert prognostisch wichtige epigenetisch inaktivierte Tumorsuppressorgene beim Multiplen Myelom

**Kaiser MF**, Johnson DC, Wu P, Walker BA, Brioli A, Mirabella F, Wardell CP, Melchor L, Davies FE, Morgan G. Global methylation analysis identifies prognostically important epigenetically inactivated tumor suppressor genes in multiple myeloma. *Blood*. 2013 Jul 11;122(2):219-26. doi: 10.1182/blood-2013-03-487884.

Ziel dieser Arbeit war die epigenetische Struktur einer Gruppe von Studienpatienten mit neudiagnostiziertem Myelom mittels genomweiter DNA Methylierungsanalyse zu analysieren, mit Genexpression zu korrelieren und prognostisch relevante epigenetische Veränderungen zu identifizieren. DNA aufgereinigter Knochenmarkstumorzellen (CD138 immunomagnetische Selektion; Miltenyi Biotec) von 161 Patienten der UK MRC Myeloma IX Studie, sowie 5 MGUS Patienten und 31 Patienten mit primärer Plasmazellleukämie wurden mittels Illumina Infinium HumanMethylation27 Arrays auf DNA Methylierung untersucht. Affymetrix HG-U133plus2.0 Genexpressionsdaten waren für 115 der Myeloma IX Patienten vorhanden. Die DNA Methylierungsdaten zeigten größtenteils eine binäre Verteilung in der untersuchten Patientenpopulation und wurden für jede der 16268 differentiell methylierten Arraysonden im Genom mittels k-means Clustering in „hohe“ und „niedrige“ Methylierungsgruppen kategorisiert. Kaplan-Meier Analysen und logrank Tests

bezüglich OS wurden für die kategorisierten Gruppen zu jeder Arraysonde durchgeführt und die Resultate mittels Benjamini-Hochberg mit einer angenommenen Falschdetektionsrate von 5% für multiple Berechnungen korrigiert. Für insgesamt 207 CpG Arrayproben war differentielle Methylierung mit Unterschieden im OS assoziiert. Die absoluten und kategorischen DNA Methylierungswerte wurden mit Genexpressionswerten des jeweiligen Gens korreliert und 8 Gene mit einer Korrelation zwischen DNA Methylierung und Expression identifiziert. Die DNA Methylierung vier dieser Gene war in multivariabler Analyse (Cox Regressionsmodell) unabhängig von klassischen genetischen Risikomarkern mit OS assoziiert: *GPX3* (Wald  $P=0.021$ ; hazard ratio (HR) 3.1); *RBP1* ( $P=0.007$ ; HR 2.2); *SPARC* ( $P=0.001$ ; HR 2.7); *TGFBI* ( $P=0.003$ ; HR 2.6). Davon waren *SPARC* und *TGFBI* auch untereinander unabhängig mit kürzerem OS assoziiert. Alle Gene haben bekannte Tumorsuppressorfunktionen, wie Ansprechen auf Chemotherapie (*TGFBI*), Microenvironment-Interaktionen (*SPARC*), Retinoinsäuresignalwege (*RBP1*), und Reaktion auf oxidativen Stress (*GPX3*). Zusammenfassend könnte die Erfassung der epigenetischen Struktur zur molekularen Tumorcharakterisierung und stratifizierten Tumorthherapie beitragen.

Link zum Artikel  
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-487884>















## 4 DISKUSSION

Die hier beschriebene Analyse von 1,905 Patienten aus den prospektiv randomisierten Phase III Studien Myeloma IX and XI ist eine der größten existierenden Untersuchungen molekularer Risikofaktoren beim Myelom und umspannt einen Rekrutierungszeitraum 2003 bis 2016, in dem die Therapie für das Myelom deutliche Fortschritte gemacht hat. Der prognostische Effekt einzelner genetischer Hochrisikomarker konnte präzise bestimmt werden und ist erstaunlich konstant zwischen der älteren (MRC Myeloma IX) und der neueren Studie (NCRI Myeloma XI).<sup>82</sup> Die Größe der Studie erlaubte insbesondere die Untersuchung der unabhängigen prognostischen Assoziation von gain(1q), ein Marker der keinen Eingang in jüngere Konsensuspublikationen der International Myeloma Working Group bezüglich Hochrisikomarkern fand.<sup>22</sup> Zudem konnte die prognostische Relevanz von relativ seltenen (~15%) ‚double-hit‘ Ereignissen untersucht werden, also dem gleichzeitigen Auftreten von mehr als einer Hochrisikoläsion (gain(1q); del(17p); t(4;14); t(14;16); t(14;20)). Double-hit Alterationen waren konsistent mit besonders kurzem PFS und OS assoziiert und definieren eine Gruppe von Patienten mit erheblichem therapeutischem Bedarf.<sup>86</sup> Die Validierung dieser Resultate in zwei unabhängigen Studien hat zur molekularen Stratifikationsstrategie der gegenwärtig rekrutierenden Myeloma UK Nine Studie (EudraCT2016-002670-12) beigetragen, in der neudiagnostizierte MM Patienten prospektiv molekular stratifiziert werden und Patienten mit Hochrisiko ‚double-hit‘ Tumoren mit Fünffach-Kombinationstherapie behandelt werden.

Dank der umfassenden CNA Daten konnte zudem eine Gruppe von Patienten mit hyperdiploiden Tumoren und Abwesenheit weiterer genetischer Risikomarker identifiziert werden deren klinische Prognose relativ günstig ist. Diese Gruppe (~20% aller Patienten) war durch Expression von *CCND1* gekennzeichnet, das zusammen mit *CCND2* erstmals zur GEP Mikroarray-basierten Subklassifikation der hyperdiploiden Tumoren verwendet wurde.<sup>35,38</sup> Diese Tumoren können im Hochdurchsatzverfahren mittels MLPA identifiziert werden und könnten eine Zielgruppe für weniger aggressive Therapiekonzepte darstellen.

Die Größe der Studienkohorte erlaubte zudem die hypothesenfreie Analyse von Korrelationen seltener genetischer Aberrationen mittels Bayes'scher Statistik. Eine Assoziation homozygoter Deletionen der Gene *BIRC2/BIRC3*, die bei <5% aller Tumoren auftritt, mit t(4;14) wurde identifiziert; in über 20% der t(4;14) ist *BIRC2/BIRC3* homozygot oder heterozygot deletiert. Deletionen von *BIRC2/BIRC3* sind mit Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalwegs und der NIK Kinase assoziiert, die potentiell eine spezifische Vulnerabilität der aggressiven t(4;14) Myelome darstellen.<sup>87-89</sup> Spezifische ‚small molecule‘ NIK Inhibitoren wurden kürzlich dargestellt und sind in weiterer Entwicklung.<sup>90</sup> NF- $\kappa$ B Signalweginhibitoren

haben deutliche Anti-Myelomaktivität gezeigt, allerdings scheint einer indirekte Rolle über das Mikromilieu dabei eine bedeutende Rolle zuzukommen.<sup>91</sup>

Exom-weite Tumorsequenzierung von 463 Studienpatienten (Myeloma XI) ermöglichte mit Primär- und Sekundärtranslokationen assoziierte Mutationen und Mutationssignaturen zu identifizieren.<sup>83</sup> Die hier erstmals beschriebene Assoziation einer genomweiten APOBEC Hypermutationssignatur mit *MAF/MAFB* Überexpression in t(14;16) und t(14;20) und ungünstiger Prognose wurde seither in mehreren unabhängigen Kohorten bestätigt.<sup>92,93</sup>

APOBEC Mutationen sind relativ frühe Ereignisse, aber wahrscheinlich nicht an Entstehung der Primärläsionen beteiligt. Transkriptionelle Stimulation von APOBEC3B und APOBEC4 durch *MAF/MAFB* wurde hypothetisiert, aber Kausalität und Relevanz sind zurzeit unklar. Das Auftreten von Kataegis bei *MYC* Sekundärtranslokationen, die mit lokal um die Bruchpunkte detektierbaren APOBEC Mutationen assoziiert sind spricht für rekurrente Hypermutationsprozesse und potentielle Interventionsmöglichkeiten. Weitere funktionelle Arbeiten sind erforderlich um die globale und fokale Relevanz von APOBEC Aktivität für die MM Tumorigenese und Progression zu charakterisieren. Spezifische pharmakologische Inhibitoren von APOBEC Enzymen sind derzeit in Entwicklung und könnten potentiell zur Verzögerung der Progression genomisch instabiler Tumoren eingesetzt werden.<sup>94</sup>

Mutationssignaturen der an der B-Zell Keimzentrumsreaktion beteiligten Deaminase AID wurden bereits zuvor im Kontext von IGH Tumortranslokationen beschrieben, zum Beispiel bei Lymphomen.<sup>95-99</sup> Die in dieser Arbeit identifizierten AID Mutationssignaturen in Promotoren von MM spezifischen Translokationspartner-Onkogenen wie *CCND1* sind vergleichbar mit Prozessen bei Lymphomen und demonstrieren die Relevanz von AID für die Myelomentstehung.

Weitere MM Mutationen mit APOBEC oder AID Signatur und potentiellen Effekten auf Genexpression wurden in unserer jüngeren Arbeit identifiziert, in der wir WGS, WES und RNA-seq Daten der MMRF CoMMpass Kohorte analysiert haben. Kodierende Mutationen mit APOBEC Signature waren neben t(14;16) und t(14;20) auch mit t(4;14) assoziiert und betrafen unter anderem Mutationen in *TP53*. Es ist bekannt dass *MAF/MAFB* Myeloma und t(4;14) transkriptionelle Programme teilen, unter anderem ist die *MAF/MAFB* Expression in t(4;14) höher als in z.B. hyperdiploiden Tumoren, zudem sind beide Gruppen durch *CCND2* Überexpression charakterisiert. Inwiefern beide Subgruppen tumorevolutionäre Entwicklungsstufen teilen ist zur Zeit unklar. MMSET scheint physiologisch in aktivierten Keimzentrums-B-Zellen exprimiert und an physiologischen mutagenen Prozessen der Immunglobulinregion beteiligt zu sein.<sup>72,73,100</sup> Durch die Analyse nicht-kodierender, cis-regulatorischer Elemente (CRE) konnten wir auch weitere mit AID Aktivität assoziierte Mutationen, die vorwiegend im nicht-kodierenden Genom auftraten, identifizieren, z.B. in CRE von *PAX5*, in Übereinstimmung mit ähnlichen Mutationen bei B-Zelllymphomen.<sup>101</sup>

Diese Mutationen waren klonal und deuten darauf hin dass AID Aktivität ein wichtiger ätiologischer Faktor in der Tumorgenese des MM ist. Jüngste Arbeiten anderer Gruppen untermauern dies und bestätigen zudem eine potentielle Rolle von APOBEC Aktivität in pathogenetisch sekundären mutagenen Prozessen.<sup>93</sup>

Die kombinierte Analyse von WGS und WES Daten erlaubte zudem verbesserte Einblicke in Mutationsprozesse die zentrale Signal- oder Entwicklungspfade beim MM betreffen. Die identifizierten strukturellen Aberrationen von CRE die zur Deregulation von *MYC* beitragen, inklusive Duplikationen von Enhancern und Deletionen von Repressoren mehrere hundert kb up- oder downstream der kodierenden Sequenz, die unabhängig von *MYC* Translokationen auftreten, sind in Übereinstimmung mit jüngeren Befunden in hämatologischen und soliden Tumoren.<sup>102,103</sup> Sie verdeutlichen die Komplexität der diagnostischen Erfassung von *MYC* Aberrationen, inklusive der Definition ihrer prognostischen Relevanz. Die Bedeutung zentraler onkogener Signalwege wie NF- $\kappa$ B oder der B-Zelldifferenzierung wird durch die Identifizierung nicht-kodierender Mutationen der CRE von *COBLL1*, *BCL6* und *PAX5* oder strukturellen Aberrationen wie Translokation von *MAP3K14* (NIK) unterstrichen. Diese können komplementär zu kodierenden Mutationen auftreten und zeigen die vielfältigen Mechanismen auf, durch die Signalwege im Lauf der Tumorevolution moduliert und dereguliert werden können.

Die prognostische Relevanz der Art der Tumorevolution bis zum Zeitpunkt der diagnostischen Biopsie war Gegenstand einer weiteren Analyse von WES Daten von Myeloma XI Studienpatienten des CoMMpass Studiendatensatzes. Mehrere Arbeiten haben gezeigt, dass bei Diagnose des MM bereits mehrere Klone (Subklone) mit unterschiedlichen Mutationen vorliegen.<sup>65,66,80,104</sup> Im Sinne klassischer Darwin'scher Evolution ist die Annahme dass die Mutationen dieser Subklone unterschiedliche ‚Fitness‘ vermitteln und zu beständig wechselnder Dominanz der verschiedenen Klone beitragen.<sup>105</sup> Unsere Untersuchung deuten jedoch darauf hin, dass in bis zu 20% der Tumoren bei Diagnose die Proportion sub-klonaler Populationen über längere Zeiträume stabil und durch sogenannte „Neutrale Evolution“ gekennzeichnet ist, im Gegensatz zu wechselnder Dominanz im Sinne klassischer Darwin'scher Selektion. Neutrale Evolution war mit Präsenz von IGH Primärtranslokationen assoziiert und könnte auf ein oder mehrere zeitgleich am Transformationsprozess beteiligte stärkere Onkogene mit suffizienter Driverkapazität hinweisen, die die Tumor-Abhängigkeit von externen Faktoren wie dem Mikroenvironment und assoziierte klonale Competition minimieren. Im Kontext von IMiDs und nicht-intensiver Therapie (keine Hochdosistherapie) waren Tumoren mit Neutraler Evolution in Myeloma XI und der CoMMpass Studie unabhängig mit ungünstiger Prognose vergesellschaftet, was mit einer geringeren Tumor-Interaktion mit dem Mikroenvironment vereinbar ist. Diese Befunde sind präliminär und

müssen in größeren Studienkohorten validiert werden. Gegenwärtig werden mehrere Studien durchgeführt, die an der schrittweisen Progression beteiligte Tumorevolutionsprozesse beim Myelom untersuchen, wie zum Beispiel die iStopMM Studie in Island. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt dass einige der beim symptomatischen Myelom mit ungünstiger Prognose vergesellschafteten Translokationen und CNA auch mit einer schnelleren Entwicklung von Symptomen bei primär im asymptomatischen Stadium diagnostizierter Erkrankung vergesellschaftet sind.<sup>74,106,107</sup> Unsere Untersuchung deutet darauf hin, dass potentiell weitere Faktoren zur evolutionären Tumorentwicklung beitragen, die von klinischer Relevanz sein könnten.

Weiterhin haben kürzlich Studien die unter Therapie bei symptomatischem Myelom auftretenden Tumormutationen untersucht. Dabei wurden insbesondere Signalwege und Gene die direkt oder indirekt am Wirkmechanismus von Myelomtherapien beteiligt sind untersucht. In sequenziellen Untersuchungen mittels targeted NGS panels von Tumoren von multipel relabierten und mit IMiDs behandelten Patienten wurden Mutationen in Cereblon (CRBN), dem Bindungspartner der IMiDs, beschrieben.<sup>108-110</sup> Im Gegensatz dazu wurden in einer kürzlich veröffentlichte Studie neudiagnostizierter Patienten keine rekurrenten Mutationen in Genen der IMiD oder Proteasomwirkung identifiziert, wohingegen eine höhere Rate an großen, strukturellen Veränderungen wie gain(1q) beschrieben wurde.<sup>111</sup> Eine Fallstudie eines mit BRAF Inhibitor behandelten Patienten mit BRAF<sup>V600E</sup> mutiertem Tumor zeigte Evolution von resistenten Subklonen mit NRAS Mutation und resultierender, RAF-Inhibitor refraktärer RAS/MEK Signalwegaktivierung.<sup>112-114</sup> Insbesondere die letztere Studie zeigt die potentielle Relevanz intratumoraler Heterogenität bei Diagnose bei zielgerichteter Therapie. Durch häufig bereits bei Diagnose vorliegende räumliche Tumordiversität, die jüngst in soliden Tumoren detailliert charakterisiert wurde, kann diese in diagnostischen Knochenmarkbiopsien eventuell nur unzureichend reflektiert sein.<sup>115-117</sup> Die genetische Analyse zirkulierender Tumorzellen oder zellfreier Tumor-DNA, deren Machbarkeit kürzlich beim Myelom demonstriert wurde, kann eventuell die Tumordiversität innerhalb eines Patienten besser darstellen.<sup>118-121</sup> Diese Technologien könnten auch zur besseren Prognoseeinschätzung beitragen; insbesondere fokale MM Läsionen können Hochrisiko-Marker aufweisen, die in der Standardknochenmarkbiopsie nicht erfasst werden, aber eventuell in zirkulierenden Zellen oder DNA detektierbar sind. Umfassende Validierungsarbeiten sind notwendig um die Zuverlässigkeit für den Einsatz für diagnostische Zwecke zu bestimmen. Kürzlich wurde die klinische Effektivität des BCL2-Inhibitors Venetoclax in der t(11;14) Subgruppe beschrieben.<sup>4</sup> Der genaue Mechanismus der zur relativ spezifischen Aktivität bei t(11;14) führt ist zur Zeit unbekannt, eine erhöhte BCL2 zu BCL-XL Genexpressions-Ratio wurde suggeriert, scheint aber kein spezifischer Biomarker zu sein.<sup>4,122-125</sup> Zulassungsstudien insbesondere für die t(11;14) Gruppe laufen zur Zeit und

könnten t(11;14) zum ersten prädiktiven Biomarker für den klinischen Einsatz machen. Da es sich dabei um eine Primärläsion handelt die in allen Tumorzellen vorhanden ist sollte die subklonale Struktur zunächst eine untergeordnete Rolle spielen, könnte aber im Kontext von Resistenzentwicklung und therapiespezifischer Prognoseabschätzung Bedeutung erlangen.

Komplementär zu somatischen Mutationen wurden in den letzten Jahren in soliden Tumoren das Potenzial epigenetischer Veränderungen zur verbesserten Klassifikation und Diagnostik der Tumorbiologie erkannt.<sup>126</sup> Die Identifikation mit Prognose assoziierter differentieller Methylierung im Rahmen unseres Projektes basierte auf Vorarbeiten, die globale Unterschiede im Methylierungsmuster genetischer Subgruppen, insbesondere der t(4;14) und Hyperdiploidie gezeigt hatten. Die unabhängige prognostische Relevanz der durch genomweite Analyse identifizierten Methylierungsmarker in den Promotoren der Gene *GPX3*, *RBP1*, *SPARC* und *TGFBI* von prognostisch relevanten genetischen Markern, inklusive der Primärtranslokationen, wurde mittels multivariabler Cox Regressionsanalyse bestätigt. Mehrere dieser Gene sind an Interaktionen im Tumor-Mikroenvironment und Kontrolle der Zellplastizität beteiligt, was zur prognostischen Relevanz beitragen könnte. Es bestand ein Zusammenhang zwischen Genexpression dieser Marker und DNA Methylierung, allerdings war dieser nicht linear, sondern im Sinne eines „off“-switches im Bereich hoher Methylierungswerte. Dies ist mit dem Konzept „offenen“ oder „geschlossenen“ Chromatins vereinbar, in dem „offen“ den Zugang für aktivierende Transkriptionsfaktoren erlaubt aber nicht bestimmt, wohingegen in kondensierten Bereichen Transkription weitgehend unterdrückt ist. Die Analyse erfolgte auf Basis von Illumina 27k Mikroarrays die eine grobe Auflösung, meist auf einzelne Cytosine in Promotorregionen beschränkt, aufweisen. Weitere Arbeiten mit neueren 850K Arrays oder NGS basierten Methoden mit besserer Abdeckung nicht-kodierender Sequenzen werden zur Zeit durchgeführt. Die verbesserte integrierte Analyse von WGS und genomweiter epigenetischer Analyse wird schließlich zeigen, welche epigenetischen Biomarker letztlich durch kryptische DNA Mutationen bedingt sind und ob mutationsunabhängige Veränderungen eventuell onkogene regulatorische Programme darstellen die therapeutisch beeinflussbar sind. Zahlreiche epigenetische Inhibitoren sind in Entwicklung; der Histon-Deacetylaseinhibitor Panobinostat ist für die MM Standardtherapie zugelassen.<sup>127-129</sup> Zurzeit ist keine Assoziation zwischen epigenetischen Tumorcharakteristika und Ansprechen auf Panobinostat bekannt, allerdings hat Panobinostat Histondeacetylase-unabhängige Effekte die einen Wirkmechanismus über Epigenetik allein in Frage stellen.

## 4.1 Ausblick

Technologische Fortschritte werden in den nächsten Jahren zu einem verbesserten Einblick in die an der onkogenen Transformation und Progression beteiligten molekularen Prozesse führen. Neue molekulare Technologien die dazu beitragen sind unter Anderem die breitere Zugänglichkeit zu WGS, die im Zusammenspiel mit verbesserter Charakterisierung epigenetischer Strukturen durch z.B. hochaufgelöste Chromosomenkonformationsanalyse zur Identifizierung der Mutationen regulatorischer Einheiten des nicht-kodierenden Tumorgenoms beitragen werden.<sup>130-132</sup> Neue Sequenziermethoden wie z.B. das porenbasierte Sequenzieren scheinen zudem die Analyse höhermolekularer DNA und damit größerer struktureller Aberrationen zugänglich zu machen, die unter anderem mangels zuverlässiger Alignmentmöglichkeiten gegenwärtiger ‚short-read‘ Sequenziermethoden nur unzureichend charakterisiert werden können.<sup>133</sup> Für Tumoren wie das MM, deren molekulare Struktur vorwiegend durch größere strukturelle Aberrationen charakterisiert sind, wird dies neue Einblicke ermöglichen. Zudem werden die technischen Möglichkeiten der Einzelzellanalyse ständig erweitert, die bereits Transkription, Mutationsanalyse und Chromatinveränderungen umfassen.<sup>134</sup> Zusammen werden diese Datensätze netzwerkbiologische Analysen zur Identifikation von molekularen Driverprozessen und potentiellen neuen Zielstrukturen ermöglichen. Im Kontext der Hochrisikoerkrankung wird dies im Idealfall zur weiteren Subgruppierung und Identifizierung potentieller Mechanismen führen die auch spezifische Therapieansätze leiten könnten. Zurzeit herrscht jedoch ein Mangel an ausreichen großen, qualitativ hochwertigen Datensätzen klinischer Studien um solche Analysen mit maximaler Effizienz durchführen zu können. Insbesondere die hohe Morbidität der Erkrankung sowie das fortgeschrittene Alter der meisten Patienten erschweren klinisch korrelierte Analysen, da beschränkte Organfunktion und natürliche Lebenserwartung große Einflußfaktoren in biologischen Analysen darstellen, die häufig nur unzureichend in Analysen berücksichtigt werden oder werden können da z.B. Gebrechlichkeit (‚frailty‘) nur unzureichend quantifizierbar ist. In unserer Erfahrung sind daher Analysen von Kohorten jüngerer Patienten mit längerer natürlicher Lebenserwartung deutlich informativer bezüglich biologischer korrelativer Analysen, deren Verfügbarkeit ist jedoch beschränkt. Hier sollte idealerweise eine gesetzliche Verpflichtung der Industrie erfolgen, biologische und klinische Datensätze kommerziellere Studien insbesondere nach erfolgreicher Lizenzierung für wissenschaftliche Analysen öffentlich verfügbar zu machen.

Die gewonnenen molekularen Einsichten haben zudem das Potential das Patientenmanagement im Rahmen neuer Früherkennungsstrategien des MM zu verbessern. Rationale Früherkennungsstrategien haben beim MM wegen der signifikanten, komplexen Morbidität und eines relativ einfach detektierbaren Biomarkers im Blut, das Paraprotein, starkes Potential die Prognose der Erkrankung an sich deutlich zu verbessern.<sup>135</sup> Molekulare

Risikomarker der Progression von MGUS zum MM könnten dabei zielgruppenbasierte, frühe Interventionen ermöglichen. Mehrere Studien der Charakterisierung von MGUS wie zum Beispiel iStopMM in Island, die zudem von der umfassenden genetischen Charakterisierung der isländischen Bevölkerung profitiert (DECODE), laufen zur Zeit und werden wertvolle neue Einblicke liefern.<sup>136</sup>

Dem gegenüber steht ein Mangel an informativen MM Tiermodellen zur Modellierung der Tumorentstehung und -progression. Abgesehen vom Vk\*MYC Modell der Mayo Clinic, das jedoch eine Reihe von Phänotypen die teils aggressive Lymphomen ähneln generiert, ist bisher nur von ein transgenes, ektopes Modell berichtet worden, dass die erfolgreiche Transplantation von frühen MM ermöglicht; das Potential genetischer Manipulation in diesem System ist jedoch stark eingeschränkt.<sup>137-139</sup> Weitere Entwicklungen in diesem Bereich sind erforderlich um in Zukunft die mittels molekularer Analyse von Patientenproben gewonnenen Einblicke funktionell charakterisieren zu können und neue Interventionsoptionen effektiv präklinisch zu testen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziele der Identifizierung von molekularen Prognosefaktoren beim MM sind ihr Einsatz zur frühen Identifizierung von Patienten mit erhöhtem klinischem Bedarf und zur Definition und Optimierung von stratifizierten und, potentiell zukünftig personalisierten, Therapieansätzen. Obwohl von einzelnen Institutionen implementiert, gibt es zur Zeit keine international angewendeten Standards der Therapiestratifikation beim MM.<sup>17,140</sup> Dazu beigetragen haben der Mangel an großen Datensätzen klinischer Studienpatienten.

- Die Analyse von 1,905 Tumoren neudiagnostizierter MM der Myeloma IX und Myeloma XI Studien hat die unabhängige prognostische Relevanz der Translokationen t(4;14), t(14;16), t(14;20) und del(17p) sowie gain(1q) bestätigt. Das Vorliegen von zwei dieser Mutationen („double-hit“) ist mit einer besonders schlechten Prognose vergesellschaftet und definiert eine Gruppe von Patienten mit hohem klinischem Bedarf. Diese Resultate haben die prospektive molekulare Diagnosestrategie der risikostratifizierten MyelomaUKnine Studie für neudiagnostizierte Patienten, die zur Zeit Patienten rekrutiert, definiert.
- Korrelationsanalysen haben eine hohe Frequenz von Deletionen von *BIRC2/BIRC3*, die mit Aktivierung des NF-κB Signalwegs vergesellschaftet sind, beim t(4;14) Hochrisiko-MM gezeigt, die eine therapeutische Zielstruktur darstellen könnten.
- Die molekulare Charakterisierung mittels MLPA, die als ein diagnostischer Standard zugänglich ist, erlaubt zudem die Identifizierung von hyperdiploiden Tumoren ohne Hochrisikomarkern, die durch relativ langes Gesamtüberleben gekennzeichnet sind.

Verbesserte Einblicke in die mit molekularen Hochrisiko-Mutationen und genomischer Instabilität beim MM assoziierten molekularen Signaturen, sowie tumorevolutionärer Charakteristika könnte eventuell neue Therapieansätze aufzeigen.

- Die APOBEC Mutationssignatur ist beim MM stark mit MAF oder MAFB überexprimierenden Tumoren mit t(14;16) oder t(14;20) und schwächer mit t(4;14) assoziiert. Dabei sind APOBEC Mutationen mit Kataegis und Sekundärtranslokationen wie die von MYC assoziiert und könnten einen therapeutisch angehbaren Mechanismus genetischer Tumorprogression darstellen.
- Die AID Mutationssignatur beim MM ist ein pathogenetisch frühes Ereignis, betrifft Gene der B-Zelldifferenzierung sowie Translokationsonkogene wie *CCND1*, was darauf hinweist dass AID an der initialen Transformation und onkogenen chromosomalen Instabilität beim MM beteiligt sein könnte.
- Onkogene MM Signalwege wie NF- $\kappa$ B oder MYC sind durch Kombination von kodierenden und nicht-kodierenden Mutationen wie Punktmutationen oder strukturellen Aberrationen dereguliert.
- Etwa 20% neudiagnostizierter MM sind durch ‚neutrale Tumorevolution‘ gekennzeichnet, in der Tumorsubklone mit wahrscheinlich ähnlicher ‚Fitness‘ über längere Zeiträume koexistieren. Diese Tumoren könnten mit einer ungünstigen Prognose bei nicht-intensiv behandelten Patienten assoziiert sein.

Neben genetischen Veränderungen weisen Tumoren epigenetische Aberrationen auf, die Reflektion onkogen dysregulierter regulatorischer Netzwerke sein können und komplementär zu Mutationen mit Hochrisiko-Tumoren charakterisieren.

- Promotor DNA Methylierung der Gene *TGFBI* und *SPARC* ist, unabhängig von etablierten genetischen Risikofaktoren, mit ungünstiger Prognose beim MM assoziiert. Für beide Gene ist DNA Methylierung der Promotorregion mit transkriptionellem Silencing korreliert

Eine möglichst genaue Risikoeinschätzung und Subgruppencharakterisierung sind wichtige Schritte zur individualisierten Myelom-Therapie mit dem Ziel der langfristigen Krankheitskontrolle dieser zur Zeit immer noch unheilbaren Erkrankung.

## 6 LITERATUR

1. Morgan, G.J., Walker, B.A. & Davies, F.E. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature reviews. Cancer* **12**, 335-348 (2012).
2. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; <http://www.gekid.de/Atlas/CurrentVersion/atlas.html>; Letzter Zugriff am 01.09.2018.
3. Kyle, R.A., San-Miguel, J.F., Mateos, M.V. & Rajkumar, S.V. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Hematology/oncology clinics of North America* **28**, 775-790 (2014).
4. Touzeau, C., *et al.* The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **28**, 210-212 (2014).
5. Touzeau, C., Maciag, P., Amiot, M. & Moreau, P. Targeting Bcl-2 for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* (2018).
6. Morgan, G.J. & Kaiser, M.F. How to use new biology to guide therapy in multiple myeloma. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* **2012**, 342-349 (2012).
7. Pawlyn, C. & Morgan, G.J. Evolutionary biology of high-risk multiple myeloma. *Nature reviews. Cancer* **17**, 543-556 (2017).
8. Kyle, R.A., *et al.* Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *The New England journal of medicine* **378**, 241-249 (2018).
9. Terpos, E., *et al.* European Myeloma Network guidelines for the management of multiple myeloma-related complications. *Haematologica* **100**, 1254-1266 (2015).
10. Greipp, P.R., *et al.* International staging system for multiple myeloma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**, 3412-3420 (2005).
11. Larocca, A., *et al.* Patient-centered practice in elderly myeloma patients: an overview and consensus from the European Myeloma Network (EMN). *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* (2018).
12. Kumar, S.K., *et al.* Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **28**, 1122-1128 (2014).

13. Ravi, P., *et al.* Defining cure in multiple myeloma: a comparative study of outcomes of young individuals with myeloma and curable hematologic malignancies. *Blood cancer journal* **8**, 26 (2018).
14. Blimark, C.H., *et al.* Outcome and survival of myeloma patients diagnosed 2008-2015. Real-world data on 4904 patients from the Swedish Myeloma Registry. *Haematologica* **103**, 506-513 (2018).
15. Manz, R.A. & Radbruch, A. Plasma cells for a lifetime? *European journal of immunology* **32**, 923-927 (2002).
16. Radbruch, A., *et al.* Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature reviews. Immunology* **6**, 741-750 (2006).
17. Sonneveld, P., *et al.* Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood* **127**, 2955-2962 (2016).
18. Gay, F., *et al.* From transplant to novel cellular therapies in multiple myeloma: European Myeloma Network guidelines and future perspectives. *Haematologica* **103**, 197-211 (2018).
19. Ludwig, H. & Zojer, N. Fixed duration vs continuous therapy in multiple myeloma. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* **2017**, 212-222 (2017).
20. Mateos, M.V. & San Miguel, J.F. Management of multiple myeloma in the newly diagnosed patient. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* **2017**, 498-507 (2017).
21. Rajkumar, S.V. & Harousseau, J.L. Next-generation multiple myeloma treatment: a pharmaco-economic perspective. *Blood* **128**, 2757-2764 (2016).
22. Palumbo, A., *et al.* Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *Journal of Clinical Oncology* **33**, 2863-+ (2015).
23. Manier, S., *et al.* Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* **14**, 100-113 (2017).
24. Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M. & Corcoran, L.M. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews Immunology* **15**, 160-171 (2015).
25. Qian, J., *et al.* B cell super-enhancers and regulatory clusters recruit AID tumorigenic activity. *Cell* **159**, 1524-1537 (2014).
26. Daniel, J.A. & Nussenzweig, A. The AID-induced DNA damage response in chromatin. *Molecular cell* **50**, 309-321 (2013).

27. Pavri, R. & Nussenzweig, M.C. AID targeting in antibody diversity. *Advances in immunology* **110**, 1-26 (2011).
28. Chesi, M., *et al.* The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood* **92**, 3025-3034 (1998).
29. Boersma-Vreugdenhil, G.R., *et al.* The recurrent translocation t(14;20)(q32;q12) in multiple myeloma results in aberrant expression of MAFB: a molecular and genetic analysis of the chromosomal breakpoint. *British journal of haematology* **126**, 355-363 (2004).
30. Chesi, M., *et al.* Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* **91**, 4457-4463 (1998).
31. Fonseca R, B.E., Oken MM, *et al.* Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood* **99**, 3735-3741 (2002).
32. Gertz MA, L.M., Dispenzieri A, *et al.* Clinical implication of the t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32) and -17p13 in myeloma patients treated with high dose therapy. *Blood* **100**, 1417-1424 (2005).
33. Keats, J.J., *et al.* Overexpression of transcripts originating from the MMSET locus characterizes all t(4;14)(p16;q32)-positive multiple myeloma patients. *Blood* **105**, 4060-4069 (2005).
34. Smadja, N.V., *et al.* Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **12**, 960-969 (1998).
35. Bergsagel, P.L., *et al.* Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* **106**, 296-303 (2005).
36. Zack, T.I., *et al.* Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. *Nature genetics* **45**, 1134-U1257 (2013).
37. Beroukhi, R., *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **463**, 899-905 (2010).
38. Bergsagel, P.L. & Kuehl, W.M. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**, 6333-6338 (2005).
39. Kuo, A.J., *et al.* NSD2 links dimethylation of histone H3 at lysine 36 to oncogenic programming. *Molecular cell* **44**, 609-620 (2011).
40. Martinez-Garcia, E., *et al.* The MMSET histone methyl transferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells. *Blood* **117**, 211-220 (2011).

41. Jimenez-Zepeda, V.H., Braggio, E. & Fonseca, R. Dissecting Karyotypic Patterns in Non-Hyperdiploid Multiple Myeloma: An Overview on the Karyotypic Evolution. *Clinical Lymphoma Myeloma & Leukemia* **13**, 552-558 (2013).
42. Sawyer, J.R., Tricot, G., Mattox, S., Jagannath, S. & Barlogie, B. Jumping translocations of chromosome 1q in multiple myeloma: Evidence for a mechanism involving decondensation of pericentromeric heterochromatin. *Blood* **91**, 1732-1741 (1998).
43. Sawyer, J.R., *et al.* Evidence of an epigenetic origin for high-risk 1q21 copy number aberrations in multiple myeloma. *Blood* **125**, 3756-3759 (2015).
44. Wu, P., *et al.* 3D genome of multiple myeloma reveals spatial genome disorganization associated with copy number variations. *Nature communications* **8**, 1937 (2017).
45. Weischenfeldt, J., *et al.* Pan-cancer analysis of somatic copy-number alterations implicates IRS4 and IGF2 in enhancer hijacking. *Nature genetics* **49**, 65 (2016).
46. Walker, B.A., *et al.* A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood* **116**, E56-E65 (2010).
47. Fonseca, R., *et al.* Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent in situ hybridization and increase CKS1B expression in myeloma. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **20**, 2034-2040 (2006).
48. Chagtai, T., *et al.* Gain of 1q As a Prognostic Biomarker in Wilms Tumors (WTs) Treated With Preoperative Chemotherapy in the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) WT 2001 Trial: A SIOP Renal Tumours Biology Consortium Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **34**, 3195-3203 (2016).
49. Gratias, E.J., *et al.* Association of Chromosome 1q Gain With Inferior Survival in Favorable-Histology Wilms Tumor: A Report From the Children's Oncology Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **34**, 3189-3194 (2016).
50. Sawyer, J.R., *et al.* Evidence for a novel mechanism for gene amplification in multiple myeloma: 1q12 pericentromeric heterochromatin mediates breakage-fusion-bridge cycles of a 1q12 similar to 23 amplicon. *British journal of haematology* **147**, 484-494 (2009).
51. Shaughnessy, J. Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p27(Kip1) and an aggressive clinical course in multiple myeloma. *Hematology* **10**, 117-126 (2005).

52. Zhan, F., *et al.* CKS1B, overexpressed in aggressive disease, regulates multiple myeloma growth and survival through SKP2- and p27(Kip1)-dependent and -independent mechanisms. *Blood* **109**, 4995-5001 (2007).
53. Wang, M., Wu, D., Liu, P. & Deng, J. Silence of MCL-1 upstream signaling by shRNA abrogates multiple myeloma growth. *Exp Hematol Oncol* **3**, 27 (2014).
54. Marchesini, M., *et al.* ILF2 Is a Regulator of RNA Splicing and DNA Damage Response in 1q21-Amplified Multiple Myeloma. *Cancer cell* **32**, 88-+ (2017).
55. Lazzari, E., *et al.* Alu-dependent RNA editing of GLI1 promotes malignant regeneration in multiple myeloma. *Nature communications* **8**, 1922 (2017).
56. Boyd, K.D., *et al.* Mapping of Chromosome 1p Deletions in Myeloma Identifies FAM46C at 1p12 and CDKN2C at 1p32.3 as Being Genes in Regions Associated with Adverse Survival. *Clinical Cancer Research* **17**, 7776-7784 (2011).
57. Chang, H., Ning, Y., Qi, X., Yeung, J. & Xu, W. Chromosome 1p21 deletion is a novel prognostic marker in patients with multiple myeloma. *British journal of haematology* **139**, 51-54 (2007).
58. Hebraud, B., *et al.* Deletion of the 1p32 region is a major independent prognostic factor in young patients with myeloma: the IFM experience on 1195 patients. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **28**, 675-679 (2014).
59. Hofman, I.J.F., *et al.* Low frequency mutations in ribosomal proteins RPL10 and RPL5 in multiple myeloma. *Haematologica* **102**, e317-e320 (2017).
60. Barbieri, M., *et al.* Compendium of FAM46C gene mutations in plasma cell dyscrasias. *British journal of haematology* **174**, 642-645 (2016).
61. Chiecchio, L., *et al.* Deletion of chromosome 13 detected by conventional cytogenetics is a critical prognostic factor in myeloma. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **20**, 1610-1617 (2006).
62. Chavan, S.S., *et al.* Bi-allelic inactivation is more prevalent at relapse in multiple myeloma, identifying RB1 as an independent prognostic marker. *Blood cancer journal* **7**(2017).
63. Weinhold, N., *et al.* Clonal selection and double-hit events involving tumor suppressor genes underlie relapse in myeloma. *Blood* **128**, 1735-1744 (2016).
64. Chapman, M.A., *et al.* Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* **471**, 467-472 (2011).
65. Bolli, N., *et al.* Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nature communications* **5**(2014).

66. Lohr, J.G., *et al.* Widespread Genetic Heterogeneity in Multiple Myeloma: Implications for Targeted Therapy. *Cancer cell* **25**, 91-101 (2014).
67. 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* **33**, 3911-+ (2015).
68. Chapman, M.A., *et al.* Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* **471**, 467-472 (2011).
69. Popovic, R., *et al.* Histone Methyltransferase MMSET/NSD2 Alters EZH2 Binding and Reprograms the Myeloma Epigenome through Global and Focal Changes in H3K36 and H3K27 Methylation. *Plos Genetics* **10**(2014).
70. Martinez-Garcia, E., *et al.* The MMSET histone methyl transferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells. *Blood* **117**, 211-220 (2011).
71. Pei, H., *et al.* MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature* **470**, 124-128 (2011).
72. Nguyen, H.V., *et al.* Histone methyltransferase MMSET promotes AID-mediated DNA breaks at the donor switch region during class switch recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, E10560-e10567 (2017).
73. Hudlebusch, H.R., *et al.* The histone methyltransferase and putative oncoprotein MMSET is overexpressed in a large variety of human tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 2919-2933 (2011).
74. Neben, K., *et al.* Progression in Smoldering Myeloma Is Independently Determined by the Chromosomal Abnormalities del(17p), t(4;14), Gain 1q, Hyperdiploidy, and Tumor Load. *Journal of Clinical Oncology* **31**, 4325-U4359 (2013).
75. Walker, B.A., *et al.* Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood* **117**, 553-562 (2011).
76. Salhia, B., *et al.* DNA methylation analysis determines the high frequency of genic hypomethylation and low frequency of hypermethylation events in plasma cell tumors. *Cancer research* **70**, 6934-6944 (2010).
77. Agirre, X., *et al.* Whole-epigenome analysis in multiple myeloma reveals DNA hypermethylation of B cell-specific enhancers. *Genome Res* **25**, 478-487 (2015).
78. Pawlyn, C., *et al.* Overexpression of EZH2 in multiple myeloma is associated with poor prognosis and dysregulation of cell cycle control. *Blood cancer journal* **7**(2017).
79. Agarwal, P., *et al.* Genome-wide profiling of histone H3 lysine 27 and lysine 4 trimethylation in multiple myeloma reveals the importance of Polycomb gene targeting

- and highlights EZH2 as a potential therapeutic target. *Oncotarget* **7**, 6809-6823 (2016).
80. Walker, B.A., *et al.* Intraclonal heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **28**, 384-390 (2014).
  81. HARRELL, F.E., LEE, K.L. & MARK, D.B. MULTIVARIABLE PROGNOSTIC MODELS: ISSUES IN DEVELOPING MODELS, EVALUATING ASSUMPTIONS AND ADEQUACY, AND MEASURING AND REDUCING ERRORS. *Statistics in medicine* **15**, 361-387 (1996).
  82. Shah, V., *et al.* Prediction of outcome in newly diagnosed myeloma: a meta-analysis of the molecular profiles of 1905 trial patients. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **32**, 102-110 (2018).
  83. Walker, B.A., *et al.* APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma. *Nature communications* **6**(2015).
  84. Mirabella, F., *et al.* MMSET is the key molecular target in t(4;14) myeloma. *Blood cancer journal* **3**, e114 (2013).
  85. Yang, S., *et al.* Overexpression of multiple myeloma SET domain (MMSET) is associated with advanced tumor aggressiveness and poor prognosis in serous ovarian carcinoma. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* **18**, 257-263 (2013).
  86. Boyd, K.D., *et al.* A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **26**, 349-355 (2012).
  87. Keats, J.J., *et al.* Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer cell* **12**, 131-144 (2007).
  88. Annunziata, C.M., *et al.* Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer cell* **12**, 115-130 (2007).
  89. Demchenko, Y.N., *et al.* Novel inhibitors are cytotoxic for myeloma cells with NFkB inducing kinase-dependent activation of NFkB. *Oncotarget* **5**, 4554-4566 (2014).
  90. Castanedo, G.M., *et al.* Structure-Based Design of Tricyclic NF-kB Inducing Kinase (NIK) Inhibitors That Have High Selectivity over Phosphoinositide-3-kinase (PI3K). *Journal of medicinal chemistry* **60**, 627-640 (2017).
  91. Chesi, M., *et al.* IAP antagonists induce anti-tumor immunity in multiple myeloma. *Nature medicine* **22**, 1411-1420 (2016).

92. Maura, F., *et al.* Biological and prognostic impact of APOBEC-induced mutations in the spectrum of plasma cell dyscrasias and multiple myeloma cell lines. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **32**, 1044-1048 (2018).
93. Bolli, N., *et al.* Genomic patterns of progression in smoldering multiple myeloma. *Nature communications* **9**, 3363 (2018).
94. Swanton, C., McGranahan, N., Starrett, G.J. & Harris, R.S. APOBEC Enzymes: Mutagenic Fuel for Cancer Evolution and Heterogeneity. *Cancer discovery* **5**, 704-712 (2015).
95. Robbiani, D.F. & Nussenzweig, M.C. Chromosome translocation, B cell lymphoma, and activation-induced cytidine deaminase. *Annu Rev Pathol* **8**, 79-103 (2013).
96. Robbiani, D.F., *et al.* AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell* **135**, 1028-1038 (2008).
97. Perez-Duran, P., de Yébenes, V.G. & Ramiro, A.R. Oncogenic events triggered by AID, the adverse effect of antibody diversification. *Carcinogenesis* **28**, 2427-2433 (2007).
98. Jankovic, M., *et al.* Role of the translocation partner in protection against AID-dependent chromosomal translocations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 187-192 (2010).
99. Greisman, H.A., *et al.* IgH partner breakpoint sequences provide evidence that AID initiates t(11;14) and t(8;14) chromosomal breaks in mantle cell and Burkitt lymphomas. *Blood* **120**, 2864-2867 (2012).
100. Campos-Sanchez, E., *et al.* Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate 1 Is Necessary for Correct Hematopoietic and B Cell Development. *Cell Rep* **19**, 1586-1601 (2017).
101. Pasqualucci, L., *et al.* Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* **412**, 341-346 (2001).
102. Bahr, C., *et al.* A Myc enhancer cluster regulates normal and leukaemic haematopoietic stem cell hierarchies. *Nature* **553**, 515-520 (2018).
103. Viswanathan, S.R., *et al.* Structural Alterations Driving Castration-Resistant Prostate Cancer Revealed by Linked-Read Genome Sequencing. *Cell* **174**, 433-447.e419 (2018).
104. Melchor, L., *et al.* Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **28**, 1705-1715 (2014).
105. Greaves, M. & Maley, C.C. Clonal evolution in cancer. *Nature* **481**, 306-313 (2012).

106. Merz, M., *et al.* Cytogenetic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* (2018).
107. Lakshman, A., *et al.* Prognostic significance of interphase FISH in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **32**, 1811-1815 (2018).
108. Kortum, K.M., *et al.* Targeted sequencing of refractory myeloma reveals a high incidence of mutations in CRBN and Ras pathway genes. *Blood* **128**, 1226-1233 (2016).
109. Kortum, K.M., *et al.* Longitudinal analysis of 25 sequential sample-pairs using a custom multiple myeloma mutation sequencing panel (M(3)P). *Annals of hematology* **94**, 1205-1211 (2015).
110. Kortum, K.M., *et al.* Targeted sequencing using a 47 gene multiple myeloma mutation panel (M(3) P) in -17p high risk disease. *British journal of haematology* **168**, 507-510 (2015).
111. Corre, J., *et al.* Multiple myeloma clonal evolution in homogeneously treated patients. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* (2018).
112. Xu, J., *et al.* Molecular signaling in multiple myeloma: association of RAS/RAF mutations and MEK/ERK pathway activation. *Oncogenesis* **6**, e337 (2017).
113. Raab, M.S., *et al.* Spatially divergent clonal evolution in multiple myeloma: overcoming resistance to BRAF inhibition. *Blood* **127**, 2155-2157 (2016).
114. Andrulis, M., *et al.* Targeting the BRAF V600E mutation in multiple myeloma. *Cancer discovery* **3**, 862-869 (2013).
115. Turajlic, S., *et al.* Deterministic Evolutionary Trajectories Influence Primary Tumor Growth: TRACERx Renal. *Cell* **173**, 595-610.e511 (2018).
116. Turajlic, S., *et al.* Tracking Cancer Evolution Reveals Constrained Routes to Metastases: TRACERx Renal. *Cell* **173**, 581-594.e512 (2018).
117. Rasche, L., *et al.* Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. *Nature communications* **8**, 268 (2017).
118. Mishima, Y., *et al.* The Mutational Landscape of Circulating Tumor Cells in Multiple Myeloma. *Cell Rep* **19**, 218-224 (2017).
119. Lohr, J.G., *et al.* Genetic interrogation of circulating multiple myeloma cells at single-cell resolution. *Science translational medicine* **8**, 363ra147 (2016).
120. Kis, O., *et al.* Circulating tumour DNA sequence analysis as an alternative to multiple myeloma bone marrow aspirates. *Nature communications* **8**, 15086 (2017).

121. Manier, S., *et al.* Whole-exome sequencing of cell-free DNA and circulating tumor cells in multiple myeloma. *Nature communications* **9**, 1691 (2018).
122. Touzeau, C., *et al.* BH3 profiling identifies heterogeneous dependency on Bcl-2 family members in multiple myeloma and predicts sensitivity to BH3 mimetics. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **30**, 761-764 (2016).
123. Moreau, P., *et al.* Promising efficacy and acceptable safety of venetoclax plus bortezomib and dexamethasone in relapsed/refractory MM. *Blood* **130**, 2392-2400 (2017).
124. Dousset, C., *et al.* BH3 profiling as a tool to identify acquired resistance to venetoclax in multiple myeloma. *British journal of haematology* **179**, 684-688 (2017).
125. Kumar, S., *et al.* Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma. *Blood* **130**, 2401-2409 (2017).
126. Capper, D., *et al.* DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature* **555**, 469 (2018).
127. Popat, R., *et al.* Extended follow-up and the feasibility of Panobinostat maintenance for patients with Relapsed Multiple Myeloma treated with Bortezomib, Thalidomide, Dexamethasone plus Panobinostat (MUK six open label, multi-centre phase I/II Clinical Trial). *British journal of haematology* (2018).
128. Ding, H., *et al.* Histone deacetylase inhibitors interrupt HSP90\**RASGRP1* and HSP90\**CRAF* interactions to upregulate BIM and circumvent drug resistance in lymphoma cells. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **31**, 1593-1602 (2017).
129. Becher, I., *et al.* Thermal profiling reveals phenylalanine hydroxylase as an off-target of panobinostat. *Nature chemical biology* **12**, 908-910 (2016).
130. Orlando, G., Kinnersley, B. & Houlston, R.S. Capture Hi-C Library Generation and Analysis to Detect Chromatin Interactions. *Current Protocols in Human Genetics* **98**, e63 (2018).
131. Klintman, J., *et al.* Clinical-grade validation of whole genome sequencing reveals robust detection of low-frequency variants and copy number alterations in CLL. *British journal of haematology* **182**, 412-417 (2018).
132. Dixon, J.R., *et al.* Integrative detection and analysis of structural variation in cancer genomes. *Nature genetics* (2018).
133. Deamer, D., Akeson, M. & Branton, D. Three decades of nanopore sequencing. *Nature biotechnology* **34**, 518 (2016).
134. Kester, L. & van Oudenaarden, A. Single-Cell Transcriptomics Meets Lineage Tracing. *Cell Stem Cell* **23**, 166-179 (2018).

135. Landgren, O. Shall we treat smoldering multiple myeloma in the near future? *ASH Education Program Book* **2017**, 194-204 (2017).
136. Gudbjartsson, D.F., *et al.* Large-scale whole-genome sequencing of the Icelandic population. *Nature genetics* **47**, 435 (2015).
137. Chesi, M., *et al.* Drug response in a genetically engineered mouse model of multiple myeloma is predictive of clinical efficacy. *Blood* **120**, 376-385 (2012).
138. Chesi, M., *et al.* AID-dependent activation of a MYC transgene induces multiple myeloma in a conditional mouse model of post-germinal center malignancies. *Cancer cell* **13**, 167-180 (2008).
139. Das, R., *et al.* Microenvironment-dependent growth of preneoplastic and malignant plasma cells in humanized mice. *Nature medicine* **22**, 1351-1357 (2016).
140. 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 Clinic proceedings* **88**, 360-376 (2013).

## 7 DANKSAGUNG

Mein außerordentlicher Dank geht an Prof. Dr. Claudia Baldus, Prof. Dr. Wolf-Karsten Hofmann, Prof. Dr. Orhan Sezer und Prof. Dr. Lars Bullinger, die mir auf den unterschiedlichen Abschnitten meiner wissenschaftlichen Tätigkeit an der Charité und später als Gastwissenschaftler der Charité nach meinem Wechsel zum Institute of Cancer Research in London essentielle Unterstützung und damit die Voraussetzung für die Fertigstellung dieser Arbeit geschaffen haben.

Prof. Richard Houlston danke ich herzlichst für Unterstützung und Mentorenschaft während der Arbeit am Institute of Cancer Research in London, dem die Unterstützung von Prof. Gareth Morgan durch Aufnahme in seinem Labor für die Zeit meines DFG Forschungsstipendiums und die Anschubunterstützung zur Zeit seines Wechsels in die USA voranging.

Mein besonderer Dank geht auch an die herausragenden Kollegen in Labor und Klinik und Kooperationspartner ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Durch die verschiedenen Stationen ist die Liste etwas zu lang geworden um hier vollständig aufgelistet zu werden. Im Forschungslabor Charité Hämatologie Mitte hat Margit Facklam geduldig mit Rat und Tat zur Seite gestanden, was den Start in die praktische Laborarbeit in Berlin deutlich erleichtert hat.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, bei meinen Eltern und Schwiegereltern bedanken. Ohne deren unermüdlichen Einsatz, unter anderem bei der Kinderbetreuung, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## 8 ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,

- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.

- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Berlin, 26.12.2018

Martin Kaiser