

Innovative Therapiekonzepte in mesenchymalen Neoplasien

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

Michaela A. Ihle, geb. Kleine

aus

Wilhelmshaven

Bonn, April 2015

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn am Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Köln unter Leitung von Prof. Dr. Reinhard Büttner.

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Büttner
2. Gutachter: Prof. Dr. Walter Witke

Tag der Promotion: 09. September 2015
Erscheinungsjahr: 2015

Meiner Familie

*„Nichts kann den Menschen mehr stärken,
als das Vertrauen, dass man ihm entgegen bringt“*

Adolf von Harnach

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	I
2. Einleitung	1
2.1. Sarkome	1
2.1.1. Prognose und aktuelle Therapiekonzepte	2
2.2. Gastrointestinale Stromatumoren	2
2.2.1. Pathogenese, Diagnose und Molekularpathologie	2
2.2.2. Aktuelle Therapiekonzepte.....	5
2.3. Histone	8
2.3.1. Histon-Deacetylasen	9
2.3.2. Histon-Deacetylase Inhibitoren.....	10
2.3.3. Prognostische und prädiktive Biomarker	12
2.3.4. Physiologische Funktionen von HR23b	13
2.3.5. HR23b als prädiktiver Biomarker	14
2.4. MiRNA	15
2.4.1. Biogenese von miRNA.....	15
2.4.2. Zielgenerkennung.....	17
2.4.3. Funktionelle Rolle von miRNAs bei der Tumorentstehung	17
2.4.4. miR-221 und miR-222 in gastrointestinalen Stromatumoren	18
2.5. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	20
3. Material	21
3.1. Laborgeräte	21
3.2. Verbrauchsmaterialien	23
3.3. Chemikalien und Reagenzien	24
3.4. Reaktionskits	27
3.5. Medien und Zusätze für die Zellkultur	27
3.6. Puffer und Lösungen	28
3.7. Größenstandards	30
3.8. Oligonukleotide	30
3.9. Sonden für die Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	31
3.10. Zelllinien	31
3.11. Antikörper	32
3.12. MiRNAs	33
3.13. Histon-Deacetylase Inhibitoren	33
3.14. Software und Datenbanken	33
3.15. Patientenkollektiv	34
4. Methoden	36

4.1. Molekularbiologische Methoden	36
4.1.1. Extraktion von Nukleinsäuren	36
4.1.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
4.1.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
4.1.4. Analyse von PCR-Produkten	38
4.1.5. DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode	38
4.1.6. Massive Parallelsequenzierung (NGS)	39
4.2. Zellbiologische Methoden	45
4.2.1. Allgemeine Kulturbedingungen	45
4.2.2. Trypsinieren und Passagieren von Zelllinien	45
4.2.3. Einfrieren und Auftauen von Zelllinien	46
4.2.4. Bestimmung der Zellzahl	46
4.2.5. Transiente Transfektion	47
4.2.6. Behandlung mit Histon-Deacetylase Inhibitoren	47
4.2.7. MTT-Proliferationsassay	48
4.2.8. ApoTox-Glo™ Triplex Assay	49
4.3. Histologische Methoden.....	50
4.3.1. Fixierung von Zellpellets mit Formaldehyd und Einbettung in Paraffin	50
4.3.2. Herstellung von Zytospins	50
4.3.3. Herstellung von Tissue Microarrays	50
4.3.4. Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	50
4.4. Immunhistochemische Methoden	51
4.4.1. Immunhistochemische Färbungen	51
4.5. Proteinbiochemische Methoden.....	53
4.5.1. Proteinisolation aus kultivierten Zellen	53
4.5.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	53
4.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
4.5.4. Westernblot Analyse	54
5. Ergebnisse	56
5.1. HR23b als prädiktiver Biomarker in Sarkomen.....	56
5.1.1. Kollektivzusammenstellung der Zelllinien von Sarkomen und gastrointestinalen Stromatumoren	57
5.1.2. HR23b Expressionsanalysen im Zellkulturmodell	59
5.1.3. Effekte von Histon-Deacetylase Inhibitoren auf die zelluläre Proliferation und Apoptose	60
5.1.4. Korrelation der HR23b Expression mit dem Ansprechen auf Histon-Deacetylase Inhibitoren	66
5.1.5. HR23b Expression unter Histon-Deacetylase Inhibitor Behandlung	68
5.1.6. HR23b Expression in humanen Gewebeproben	69
5.2. Funktionelle Rolle von miR-221 und miR-222 in gastrointestinalen Stromatumoren	73
5.2.1. Charakterisierung der gastrointestinalen Stromatumor-Zelllinien	73
5.2.2. Einfluss von miR-221 und miR-222 auf die zelluläre Proliferation	76
5.2.3. Einfluss von miR-221 und miR-222 auf die Apoptose	80
5.2.4. miR-221 und miR-222 induzieren Apoptose über den KIT/AKT Signalweg in gastrointestinalen Stromatumoren	82
6. Diskussion	87
6.1. HR23b als prädiktiver Biomarker für die Sensitivität gegenüber HDACi in Sarkomen	88
6.1.1. HR23b Expressionsanalysen im Zellkulturmodell	89

6.1.2.	Effekte von Histon-Deacetylase Inhibitoren auf die zelluläre Proliferation und Apoptose.....	90
6.1.3.	Korrelation der HR23b Expression mit dem Ansprechen auf Histon-Deacetylase Inhibitoren	91
6.1.4.	HR23b Expression unter Histon-Deacetylase Inhibitor Behandlung	92
6.1.5.	HR23b Expression in humanen Gewebeproben	93
6.2.	Funktionelle Rolle von miR-221 und miR-222 in gastrointestinalen Stromatumoren	95
6.2.1.	Charakterisierung der gastrointestinalen Stromatumor-Zelllinien	96
6.2.2.	Einfluss von miR-221 und miR-222 auf die zelluläre Proliferation und Apoptose.....	98
6.2.3.	miR-221 und miR-222 induzieren Apoptose über den KIT/AKT Signalweg in gastrointestinalen Stromatumoren	100
6.2.4.	Ausblick	103
7.	Zusammenfassung	105
8.	Abkürzungsverzeichnis	107
9.	Abbildungsverzeichnis	110
10.	Tabellenverzeichnis	112
11.	Literaturverzeichnis	113
12.	Anhang	130
13.	Danksagung.....	159
14.	Aktive Konferenzbeiträge	161
15.	Publikationen	162

Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden vorab an folgender Stelle publiziert:

Ihle M.A., Merkelbach-Bruse S., Hartmann W., Bauer S., Ratner N., Sonobe H., Nishio J., Larsson O., Åman P., Pedeutour F., Taguchi T., Wardelmann E., Buettner R., Schildhaus H.U., **HR23b expression is a potential predictive biomarker for HDAC inhibitor treatment in mesenchymal tumors and is associated with response to vorinostat.** *J Pathol Clin Res*, CJP-2015-07-0016, Acceptable, subject to major revision.

Ihle M.A., Trautmann M., Künstlinger H., Huss S., Heydt C., Fassunke J., Wardelmann E., Bauer S., Schildhaus H.U., Buettner R., Merkelbach-Bruse S., **miRNA-221 and miRNA-222 induce apoptosis via the KIT/AKT signalling pathway in gastrointestinal stromal tumours.** *Mol Oncol.* (Impact factor 2014: 5.331), 2015 Aug;9(7):1421-33.

Diese Vorabveröffentlichungen beziehen sich auf Teilergebnisse aus Abschnitt 5 und betreffen folgende Abbildungen und Tabellen:

- Abbildung 10: HR23b Expression in Sarkom- und gastrointestinalen Stromatumorzelllinien.
- Abbildung 11: Histon-Deacetylase Inhibitor vermittelte Effekte auf die zelluläre Proliferation und Apoptose.
- Abbildung 12: Einfluss der HDACi auf die zelluläre Proliferation in Abhängigkeit der Zeit.
- Abbildung 13: Einfluss der HDACi auf die Apoptose in Abhängigkeit der Zeit.
- Abbildung 14: Korrelation der HR23b Expression mit der Sensitivität gegenüber Histon-Deacetylase Inhibitoren.
- Abbildung 15: HR23b Expression unter Histon-Deacetylase Inhibitorbehandlung.
- Abbildung 16: Immunhistochemische HR23b Färbung in klinisch relevanten Sarkom- und gastrointestinalen Stromatumoren.
- Abbildung 18: miR-221 und miR-222 vermittelte morphologische und proliferative Veränderungen in GISTs.
- Abbildung 19: Verifizierung der antiproliferativen Effekte der miR-221 und miR-222 durch den ApoTox-Glo™ Triplex Assay.
- Abbildung 20: miR-221 und miR-222 vermittelte Induktion von Apoptose.
- Abbildung 22: miR-221 und miR-222 vermittelte Signaltransduktion in der Zelllinie GIST882.

Abbildung 23: miR-221 und miR-222 vermittelte Signaltransduktion in der Zelllinie GIST-T1.

Abbildung 24: miR-221 und miR-222 vermittelte Signaltransduktion in der Zelllinie GIST48

Tabelle 28: HR23b Expression in klinisch relevanten Sarkom- und GIST-Entitäten.

Tabelle 27: IC₅₀-Werte der Histon-Deacetylase Inhibitoren Vorinostat, Belinostat, Mocetinostat und Entinostat in den untersuchten Sarkom- und GIST-Zelllinien.

2. *Einleitung*

2.1. **Sarkome**

Sarkome sind seltene, bösartige mesenchymale Tumore, die nach ihrem Ursprungsgewebe unterteilt werden. Sie können aus Fett- (Adipocyten), Bindegewebs- (Fibroblasten), Knochen- (Osteoblasten), Muskel- (Myozyten) oder Blutgefäß- (Angioblasten) Zellen entstehen. Weichgewebssarkome machen etwa 0,7-1% aller Krebserkrankungen bei Erwachsenen und 4-8% bei Kindern aus, während Knochentumoren etwa jeweils 0,2 und 5% ausmachen [1].

Sarkome wachsen lokal verdrängend und bilden eine Pseudokapsel, die aber meist von Tumorzellen durchbrochen wird. Erstsymptome sind häufig schmerzfreie Schwellungen, die an den äußeren Extremitäten und im Kopf-Hals-Bereich schneller entdeckt werden und damit früher als Tumore diagnostiziert werden können als Sarkome, die im Oberschenkel oder Retroperitoneum entstehen. Bei 10% der Patienten liegen bei Erstdiagnose bereits Metastasen vor [2].

Sarkome sind sehr heterogen mit mehr als 50 Untergruppen. Die häufigsten mesenchymalen Neoplasien sind gastrointestinale Stromatumore (GIST), Leiomyosarkome, Liposarkome und Dermatofibrosarkoma protuberans. Molekularbiologisch werden Sarkome in zwei Gruppen unterteilt. Einerseits gibt es Tumore mit komplexen genomischen Aberrationen, wie z.B. pleomorphe undifferenzierte Sarkome, Leiomyosarkome, *high-grade* Liposarkome und maligne periphere Nervenscheidewandtumore. Diese sind genetisch instabil und weisen zahlreiche Veränderungen auf wie inaktivierende Mutationen in *TP53* (*tumour protein 53*), Deletionen von *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) oder Amplifikationen von *MDM2* (*mouse double minute 2 homolog*). Sarkome mit komplexem Karyotyp können sowohl *de novo* als auch aus weniger aggressiven Sarkomen entstehen [3-7].

Tumore mit einfachen genomischen Veränderungen sind myxoide Liposarkome, Synovialsarkome oder GIST. Diese Sarkome weisen Translokationen oder Mutationen auf, die *de novo* entstehen und während der klonalen Evolution erhalten bleiben [8].

Spezifische genetische Veränderungen unterstützen die Diagnose. Beispielsweise ist für dedifferenzierte Liposarkome eine *MDM2* Amplifikation charakteristisch [8]. Bei Synovialsarkomen ist eine Translokation zwischen *SS18* und *SSX1*, -2, oder -4 charakteristisch $t(x;18)(p11.2;q11.2)$ und der Nachweis dieser Aberration ist grundlegend für die Diagnose [9].

2.1.1. Prognose und aktuelle Therapiekonzepte

Die Prognose von Sarkomen ist abhängig vom Differenzierungsgrad, der Lokalisation, der Mitosezahl, der Anzahl von Nekrosen und der Größe des Tumors [10]. Die Fünf-Jahres Überlebensrate liegt bei 90, 70, 50 und 10-20% bei Sarkomen des Stadiums I, II, III und IV [2]. Trotz großer Fortschritte in der Identifikation diverser genetischer Aberrationen, die zur Entstehung von Sarkomen beitragen, ist die chirurgische Resektion mit oder ohne anschließender Strahlentherapie derzeit die Standardtherapie. Chemotherapie mit Doxorubicin und Gemcitabin in Kombination mit Docetaxel zeigt nur eine Ansprechrate von 25%. Das mediane Gesamtüberleben (OS, *overall survival*) vom Zeitpunkt der Diagnose bis zum Zeitpunkt der Metastasierung mit Chemotherapie beträgt nur 12-18 Monate [11]. Auf Grund der molekularen Diversität der Sarkome ist eine gemeinsame, zielgerichtete Therapie derzeit unmöglich. Dennoch gibt es einige Untergruppen, die Zielstrukturen für eine solche spezifische Therapie aufweisen. Federführend hierbei war die Einführung des Rezeptortyrosinkinaseinhibitors Imatinib (Glivec[®], Gleevec[®], STI 571, Novartis Pharmaceutical Cooperation) zur Therapie des fortgeschrittenen oder metastasierten GISTs (Ansprechrate von 80% [12]). Ansprechen auf *MET* (*MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*) Inhibitoren konnte in alveolären Weichgewebssarkomen und in Klarzellsarkomen mit ASPSCR1-TFE3 (*alveolar soft part sarcoma chromosome region, candidate 1-transcription factor binding to IGHM enhancer 3*) und -ATF1 (*activating transcription factor 1*) Fusionsproteinen gezeigt werden [13-15]. ALK-Inhibitoren und Immuntherapien mit IGF1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*) Antikörpern sind in inflammatorischen myofibroblastischen Tumoren mit *ALK*-Fusionen bzw. in Ewing-Sarkomen mit EWS-FLI1-Translokationen vielversprechende Strategien [16-18].

2.2. Gastrointestinale Stromatumoren

2.2.1. Pathogenese, Diagnose und Molekularpathologie

Die Inzidenz gastrointestinaler Stromatumore liegt bei 10-20 Erkrankungen/1.000.000 Einwohnern/Jahr und das mediane Alter bei Krankheitsbeginn liegt bei 55 bis 65 Jahren [19]. Es gibt allerdings auch GISTs, die im Kindesalter auftreten (pädiatrische GISTs, <1%) oder familiär vererbt werden [20, 21].

Die meisten Primärtumoren sind im Magen (50-60%) und im Dünndarm (20-30%) lokalisiert. Wesentlich seltener treten GISTs auch im Duodenum, Kolon, Rektum oder Ösophagus auf [22]. Auf Grund fehlender Symptomatik bei kleineren und asymptomatischen GISTs wird ein großer Anteil als Nebenbefund diagnostiziert. Dadurch weisen etwa 50% der GISTs zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Fernmetastasen auf. Diese sind vor allem in der Leber (65% der Fälle) und im

Peritoneum (20%) lokalisiert, während Lunge, Knochen und Lymphknoten eher selten betroffen sind. Morphologisch werden GISTs in drei Subgruppen klassifiziert: spindelzellig (ca. 70%), epitheloid (ca. 10%) und gemischt spindelzellig-epitheloid (ca. 20%, Abbildung 1).

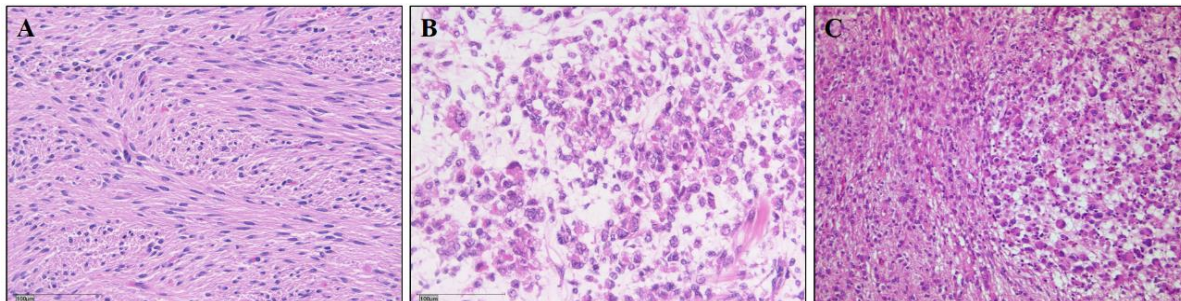


Abbildung 1: Hämatoxylin-Eosin Färbungen morphologischer Subtypen gastrointestinaler Stromatumoren. Gastrointestinale Stromatumoren werden in drei morphologische Subtypen klassifiziert: spindelzellig (A), epitheloid (B) und gemischt spindelzellig-epitheloid (C).

Das Hauptkriterium für die Diagnose eines GISTs ist eine positive immunhistochemische KIT Färbung (KIT = CD117; *cluster of differentiation*), die in 95% der GISTs auftritt. Weitere wichtige Marker sind CD34, ACAT2 (*smooth muscle actin*), S100, DES (*desmin*) und DOG1 [23, 19, 24]. DOG1 ist ein Oberflächenprotein, das zur Familie der kalziumabhängigen Chloridkanalproteine gezählt wird, dessen genaue Funktion jedoch nicht bekannt ist [25].

Das *KIT* Gen, lokalisiert auf Chromosom 4q11-21, kodiert für eine 145 kDa große Typ-III-Rezeptortyrosinkinase. Aufgebaut ist der Rezeptor extrazellulär aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Schleifen, die für die Ligandenbindung (Stammzellfaktor, SCF), die Dimerisierung und Proteolyse verantwortlich sind. Verankert wird der Rezeptor mit der Membran durch eine Transmembrandomäne, an die sich intrazellulär die Juxtamembrandomäne anschließt. Diese Domäne ist mit einer physiologischen autoinhibitorischen Funktion ausgestattet. Hieran schließen sich zwei Kinasedomänen an, deren Phosphorylierung die Voraussetzung für die vollständige Aktivität des Rezeptors ist und die die ATP-Bindetasche enthalten [26]. Nach erfolgter Aktivierung werden nachgeschaltete Signalwege wie der RAS/RAF/MAPK, der JAK/STAT sowie der PI3K/AKT Signalweg aktiviert [27, 28].

Für die Pathogenese von GISTs sind in 75-80% der Fälle aktivierende Mutationen (*gain of function* Mutationen) im *KIT* Gen verantwortlich [29]. Diese treten vor allem in der Juxtamembrandomäne (Exon 11) in Form von Punktmutationen, Deletionen, Duplikationen oder einer Kombination aus Veränderungen auf. Hierdurch kommt es zu einer konstitutiven, ligandenunabhängigen Kinaseaktivität [30]. Mutationen können aber auch extrazellulär in Exon 9 von *KIT* auftreten (5-13%) [31]. Hierbei handelt es sich meistens um Duplikation von zwei

Aminosäuren, Alanin an Position 502 und Tyrosin an Position 503 (p.A502_Y503dup), die vor allem in GISTs des intestinalen Traktes auftritt. Seltener sind Mutationen in der Kinase I Domäne in Exon 13 von *KIT* mit einer Häufigkeit von 1-2% [32]. Hier liegt die Mehrheit der Mutationen in Codon 642, wo es zu einem Austausch von Lysin zu Glutamin (p.K642E) kommt. Mutationen in der Kinase II Domäne, der Aktivierungsschleife (*KIT* Exon 17), kommen nur in 0.4% der Fälle vor [30] und Mutationen in Exon 8 von *KIT* sind nur in einer ganz geringen Fallzahl beschrieben [33].

20-25% der GISTs, die keine Mutation im *KIT*-Gen aufweisen, sind durch Mutationen in der homologen Rezeptortyrosinkinase *PDGFRA* (*platelet-derived growth factor receptor alpha*) charakterisiert. In dieser Kinase sind homologe Regionen mutiert, jedoch sind die Häufigkeiten anders verteilt: hier ist vor allem Exon 18 mutiert (97% der Mutationen), welches Exon 17 von *KIT* entspricht. GISTs, die keine Mutation in *KIT* oder *PDGFRA* aufweisen, werden als Wildtyp-GISTs bezeichnet, obwohl aktuelle Studien gezeigt haben, dass diese Tumoren Mutationen im *SDH*- (Succinat-Dehydrogenase), *BRAF*- (*rapidly accelerated fibrosarcoma B*), *NF1*- (Neurofibromatose Typ 1) oder *KRAS*-(*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) Gen aufweisen können [34, 30, 35]. Zusätzlich kann eine Überexpression von IGF1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*) und IGF1/2 auftreten [36].

Die Prognose von GISTs wird nach Miettinen und Lasota (2006) aufgrund von drei pathomorphologischen Parametern beurteilt: 1. die Anzahl der Mitosen/50 HPFs (*high power fields*, Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung im Mikroskop), 2. der maximale Tumordurchmesser und 3. die Tumorlokalisation. Die Einteilung wird wie in Tabelle 1 dargestellt, vorgenommen und das Rezidivrisiko eines malignen Verlaufs nach den Einstufungskriterien als kein/sehr niedrig/niedrig/moderat oder hoch jeweils als Prozentsatz angegeben [37]. Unabhängig von diesen drei Kriterien muss die Tumorruptur als ein schlechter prognostischer Marker berücksichtigt werden [38]. Bei fortgeschrittenem GIST muss weiterhin das Vorhandensein von Lokalrezidiven und Metastasen bei der Prognose berücksichtigt werden.

Tabelle 1: Risikoklassifikation von gastrointestinalen Stromatumoren nach Miettinen und Lasota, 2006 [37].

Tumorparameter		Risiko für Krankheitsprogression [%]			
Mitoserate	Durchmesser [cm]	Magen	Jejunum/ Ileum	Duodenum	Rektum
$\leq 5/50$ HPF	≤ 2	kein [0]	kein [0]	kein [0]	kein [0]
	$>2 \leq 5$	sehr niedrig [1.9]	niedrig [4.3]	niedrig [8.3]	niedrig [8.5]
	$>5 \leq 10$	niedrig [3.6]	hoch [52]	hoch [34]+	hoch [57]+
	> 10	moderat [12]	hoch [50]		
$> 5/50$ HPF	≤ 2	kein [0]*	hoch [50]*	#	hoch [54]
	$>2 \leq 5$	moderat [16]	hoch [73]	hoch [50]	hoch [52]
	$>5 \leq 10$	hoch [55]	hoch [85]	hoch [86]	hoch [57]+
	> 10	hoch [86]	hoch [90]		

* sehr geringe Fallzahl, # keine Fallzahl in dieser Studie, + diese Gruppen wurden in der Studie kombiniert, Prozentzahlen sind in eckigen Klammern angegeben.

Seit 2010 gibt es eine zusätzliche Risikoklassifikation, die auf der TNM-Klassifikation basiert. Hierbei bezeichnet T die Tumorgröße, N die Anzahl der Lymphknotenmetastasen und M die Anzahl der Fernmetastasen. Die Anzahl der Lymphknotenmetastasen ist bei GISTs nahezu immer null, da GISTs nicht in die Lymphknoten, sondern eher in die Leber metastasieren. Zusätzlich wird der Differenzierungsgrad berücksichtigt [39]. Diese Risikoklassifikation stellt eine Anpassung an den Standard bei soliden Tumoren und Melanomen dar, um die Risikoklassifikation bei unterschiedlichen Tumorentitäten zu vereinheitlichen [40].

Aber auch der Mutationsstatus spielt eine Rolle bei der Prognoseeinschätzung. So sind Deletionen von Codon 557 und 558 in Exon 11 von *KIT* unabhängige Prognosefaktoren für das Metastasierungspotential bei Patienten mit GISTs. GISTs des Ileum/Jejunum mit Mutationen in Exon 9 von *KIT* sind aggressiver als GISTs mit Mutationen in Exon 11, die eher im Magen lokalisiert sind. Magentumoren mit Mutationen in Exon 13 von *KIT* sind wiederum aggressiver als Magentumoren mit Mutationen in anderen Exons [41-43].

2.2.2. Aktuelle Therapiekonzepte

Lange Zeit galt die chirurgische Resektion als die einzige Therapieoption für GISTs, da Chemo- und Radiotherapie nur in ca. 5% der Fälle zu einem Therapieerfolg führten [44]. 15% der Tumoren können auf Grund von Größe und Lokalisation nicht reseziert werden [45, 46]. Bei 40-90% der Fälle treten trotz erfolgreicher Resektion Rezidive auf.

Der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib, ein selektiver, *small molecule* Inhibitor, der die intrazellulären Kinasen ABL und BCR-ABL in der chronisch myeloischen Leukämie [47], aber

auch die Rezeptortyrosinkinasen PDGFRA und KIT in GISTs inhibiert [48], verbesserte deutlich die Therapieoptionen für GISTs. In der Zelle bindet das Molekül kompetitiv in der ATP-Bindetasche des Rezeptors und verhindert damit die konstitutive Aktivierung des Signalweges. Imatinib ist für die Therapie von nicht resezierbaren oder metastasierten GISTs zugelassen und etwa 80% der behandelten GIST Patienten sprechen auf diese Therapie an [12]. Das mediane progressionsfreie Überleben (PFS, *progression free survival*) liegt bei 20-24 Monaten, während eine Chemotherapie mit Doxorubicin als Erstlinien-Therapie nur zu einem PFS von neun Monaten führt [19]. GISTs mit einer Mutation in Exon 11 von *KIT* sprechen am besten auf diese Therapie an. Da GISTs mit einer Mutation in Exon 9 des *KIT* Gens aggressiver sind, profitieren diese Patienten von einer erhöhten Imatinib- Dosis von 800 mg/Tag statt 400 mg/Tag [31]. Um das Progressionsrisiko weiter zu minimieren, empfehlen Experten eine adjuvante Imatinib Therapie über einen Zeitraum von 3 Jahren [36]. Auch neoadjuvant wird Imatinib eingesetzt, um die Größe der Tumore so zu verringern, dass eine Operation ermöglicht wird. 10% der GISTs mit Mutationen in den Tyrosinkinasedomänen weisen jedoch eine primäre Resistenz auf [34]. Sie zeigen kein Ansprechen auf eine Therapie innerhalb der ersten sechs Monate. Zu primärer Resistenz führt die Mutation p.D842V in Exon 18 von *PDGFRA*, die die Kinasedomäne in ihrer aktivierten Form stabilisiert. Aber auch Wildtyp-GISTs zeigen ein schlechtes Ansprechen auf Imatinib, da sie ein KIT unabhängiges Wachstum aufweisen [49]. Desweiteren können unter Therapie sekundäre Resistenzen in Form von Mutation (70-80%) oder Amplifikationen des *KIT*-Gens (<10%) [50, 27, 51] auftreten. Die meisten resistenten GISTs weisen eine sekundäre Mutation in der ATP-Bindedomäne (Exon 13 und 14 von *KIT*; Tyrosinkinasedomäne I) oder in der Aktivierungsschleife auf (Exon 15 und 16 von *KIT*; Kinasedomäne oder in Exon 17; Tyrosinkinasedomäne II, Abbildung 2). Auch die Aktivierung einer alternativen Rezeptortyrosinkinase [27], die Aktivierung einer nachgeschalteten Kinase im gleichen Signalweg [34], die Internalisierung von Rezeptormolekülen [52] oder der Aktivierung von Transmembranproteinpumpen [53] sind als Resistenzmechanismen beschrieben. Von sekundärer Resistenz spricht man bei Tumoren, die progredient sind, nachdem sie innerhalb der ersten sechs Monate einen stabilen Krankheitsverlauf oder ein teilweises bzw. vollständiges Ansprechen auf die Therapie aufwiesen [54].

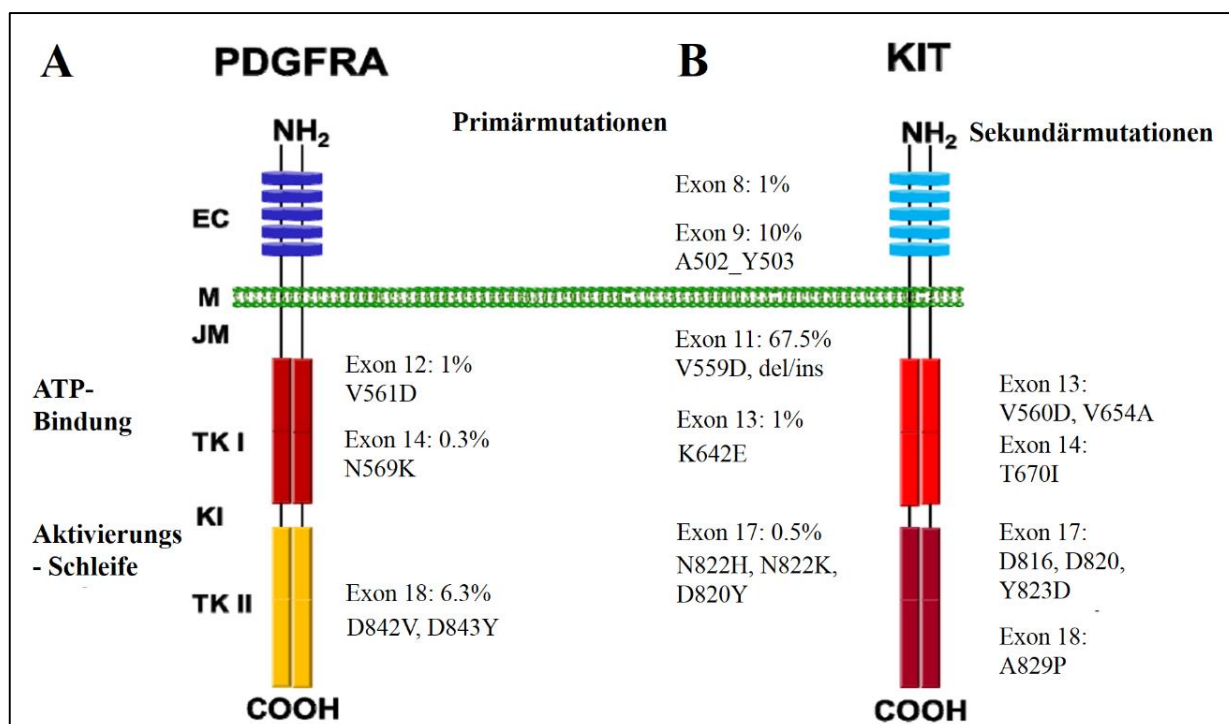


Abbildung 2: Primär- und Sekundärmutationen in den homologen Rezeptortyrosinkinasen *KIT* und *PDGFRA*. Dargestellt sind die Lokalisation und die Häufigkeiten der Primär- bzw. Sekundärmutationen in dem schematischen Aufbau der Rezeptortyrosinkinasen *PDGFRA* (A) und *KIT* (B). Für die häufigsten Mutationen ist der Austausch der Aminosäuren auf Proteinebene angegeben (modifiziert nach [55]).

Sekundäre Mutationen und die damit verbundenen Resistenzen führten zur Entwicklung sogenannter Zweitlinien-Therapien mit alternativen Kinaseinhibitoren. Sunitinib (Sutent, SU11248, Pfizer Pharma GmbH) ist ein solcher Inhibitor, der zur Behandlung Erwachsener mit metastasiertem/nicht operablen GISTs seit 2006 zugelassen ist, wenn eine Erstlinientherapie mit Imatinib zu Resistenzen geführt hat oder wegen Unverträglichkeit abgebrochen werden musste. In einer Phase III Studie konnte gezeigt werden, dass das mediane PFS mit Sunitinib bei 6,3 Monaten gegenüber 1,5 Monaten mit Placebo Therapie deutlich verbessert werden konnte [56]. Molekularpathologisch sprechen GISTs mit einer Mutation in Exon 9 von *KIT* oder Wildtyp-GISTs besser auf Sunitinib an, als solche mit einer Exon 11 Mutation von *KIT*, wodurch die molekulare Analyse der GISTs den Therapieerfolg verbessert. Für erwachsene Patienten, die einen inoperablen oder metastasierten GIST aufweisen und bei denen es unter Therapie mit Imatinib und Sunitinib dennoch zur Progression gekommen ist, steht mit Regorafenib (Stivarga[®], Bayer) seit 2014 eine weitere Therapieoption zur Verfügung. Regorafenib ist ein oraler Multikinaseinhibitor, der KIT, VEGFRs, PDGFRs, TIE2, FGFR, RET, RAF-1 und BRAF inhibiert [54]. In der Phase III Studie GRID führte Regorafenib zu einem medianen PFS von 4,8 Monaten im Vergleich zu 0,9 Monaten bei Placebo Therapie in GISTs [57-61].

Jedoch zeigte sich auch bei diesen Zweit- und Drittlinieninhibitoren ein unterschiedliches Ansprechen in Abhängigkeit der nachgewiesenen Mutation und einige GIST-Subtypen waren primär resistent [62, 63]. Daher wurden alternative Therapiestrategien entwickelt. Eine Möglichkeit sind Kombinationstherapien: Imatinib kombiniert mit dem BCL2- (*B cell lymphoma 2*) Inhibitor ABT-737 zeigte *in vitro* eine wesentlich höhere Zytotoxizität und Induktion der Apoptose als Imatinib alleine [64]. Desweiteren zeigten Studien, dass das *heat-shock* Protein (HSP) 90 eine wichtige Zielstruktur für zukünftige Therapien sein könnte. HSP90 ist ein Chaperon, das an der dreidimensionalen Proteinfaltung beteiligt ist und unter physiologischen Bedingungen KIT stabilisiert und vor Degradierung schützt. Eine *in vitro* Studie zeigte, dass die Inhibierung von HSP90 zur Degradierung von KIT und zu einer Induktion der Apoptose in GISTs führte [65]. Weitere Ansätze sind transkriptionelle Inhibitoren wie Flavopiridol [66] oder die Verwendung von Antikörper basierten Therapien [67]. Auch die photodynamische Therapie mit Glukose konjugiertem Chlorin zeigte *in vitro* erste Erfolge [68]. Aber auch Histon-Deacetylase Inhibitoren (HDACi) sind potentielle neue Therapieoptionen in GISTs bzw. Sarkomen. In GISTs konnte gezeigt werden, dass Vorinostat den onkogenen KIT-Signalweg inhibiert und Apoptose induziert [69]. Studien zeigten, dass der HDACi Vorinostat das Wachstum von Uterussarkomen *in vivo* und *in vitro* inhibiert [70, 71]. Der HDACi PCI-24781 in Kombination mit Chemotherapie erhöht die Apoptoseinduktion auch in multiresistenten Sarkomzelllinien [72].

Eine weitere alternative Therapieoption stellt der Einsatz von miRNAs dar. Die Expression von miRNAs spielt eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung und Progression von GISTs [73-75]. In GISTs inhibiert miR-494 die zelluläre Proliferation durch eine Inhibition von KIT *in vitro* [76]. Auch miR-218 inhibiert *in vitro* die Zellinvasion und -viabilität durch die Regulation von KIT [77]. Im Folgenden wird daher detailliert auf die beiden zuletzt genannten Therapieoptionen (HDACi und miRNA) eingegangen.

2.3. Histone

Histone sind basische Proteine, die durch ihre positive Ladung mit der negativen Ladung der DNA interagieren können und die Kondensierung des Chromatins ermöglichen. Sie bestehen aus einem Oktamer, das aus jeweils zwei Untereinheiten H2A, H2B, H3 und H4 gebildet wird. Hierum winden sich 147 bp der DNA [78]. Diese sogenannten Nukleosomen sind ein wesentlicher Bestandteil des Chromatins (Abbildung 3).

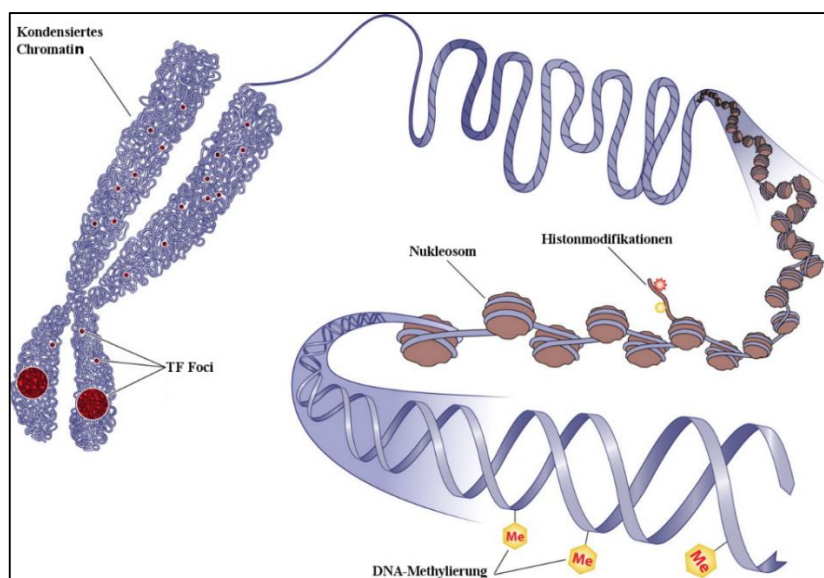


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Chromatins (modifiziert nach [79]).

Das N-terminale Ende der Histone ragt aus den Nucleosomen heraus und ist Ziel zahlreicher post-transkriptioneller, reversibler Modifikationen, wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, und Ubiquitinierung. Durch die Veränderung des N-terminalen Endes der Histone wird einerseits die Kondensation des Chromatins verändert, andererseits werden Nicht-histonproteine rekrutiert. Dadurch werden der Zugang zur DNA und damit essentielle Prozesse wie die Transkription, DNA-Reparatur und DNA-Replikation beeinflusst [80]. Diese Modifikationen werden auch als „Histon-Code“ bezeichnet [81].

2.3.1. Histon-Deacetylasen

Die Acetylierung von Lysinen an den Histonenden ist ein reversibler, post-transkriptioneller Regulationsmechanismus, der 1968 erstmals beschrieben wurde [82]. Die Enzyme, die Acetylgruppen an Histone binden (Histon-Acetyltransferasen, HAT) oder entfernen (Histon-Deacetyltransferasen, HDAC), wurden jedoch erst 1995 von Kleff et al. entdeckt [83]. HATs werden abhängig von der Lokalisation und dem Katalysemechanismus in zwei Gruppen unterteilt. HAT A Enzyme sind im Nucleus lokalisiert und transferieren Acetylgruppen von Acetyl-CoA auf die ϵ -NH₂-Gruppe der N-terminalen Enden von Histonen nach dem Prozessieren im Nucleosom. Die HAT B Enzyme dagegen sind im Zytoplasma lokalisiert und transferieren Acetylgruppen von Acetyl-CoA auf die ϵ -NH₂-Gruppe von freien Histonen, bevor sie an die DNA gebunden werden. Die Acetylierung von Lysinresten neutralisiert die positive Ladung der basischen Lysinreste. Hierdurch wird die Interaktion mit der negativ geladenen DNA verringert und das Chromatin

entfaltet. Durch die Öffnung des Chromatins kann die Transkription aktiviert werden. Durch die Entfernung der Acetylreste durch HDACs wird dieser Prozess reversibel.

HDACs können in Abhängigkeit von phylogenetischer Konservierung und Kofaktor in zwei Familien und vier Subgruppen klassifiziert werden. Die klassische Familie weist eine hohe phylogenetische Konservierung auf und benötigt Zn^{2+} als Kofaktor. Diese Familie wird unterteilt in Klasse I (HDAC1, -2, -3 und -8), Klasse II (HDAC4, -5, -6, -7, -9 und -10) und Klasse IV (HDAC11). Die zweite Familie sind die *silent information regulator 2 (SIR2) related protein* (Sirtuin-) Enzyme. Diese Familie umfasst sieben HDACs (SIRT1-7), die keine Sequenzhomologien mit den anderen HDACs aufweisen und NAD^+ als Kofaktor benötigen.

HATs und HDACs können die Genregulation auch indirekt beeinflussen, indem sie Nichthistonproteine wie DNA-Bindeproteine, Transkriptionsfaktoren, Chaperone und DNA-Reparaturproteine modifizieren [84]. Dadurch können HDACs auch regulatorischen Einfluss auf Genexpression, mRNA- und Proteinstabilität und Proteinaktivität nehmen [85].

2.3.2. Histon-Deacetylase Inhibitoren

In gesunden Zellen besteht eine Balance aus HATs und HDACs. Aktuelle Studien zeigen, dass eine Deregulation, Überexpression oder Mutation der HATs und HDACs diese Balance zerstören und zur Entstehung und Progression von vielen Erkrankungen, inklusive Tumoren, führen [86-88]. HDAC Inhibitoren (HDACi) sind natürlich vorkommende oder synthetisch erzeugte Substanzen, die als neue, vielversprechende Hemmstoffe in der Tumorthherapie eingesetzt werden. HDACi führen zu einer Akkumulation acetylierter Histone und somit zu einer geöffneten Chromatinstruktur. Hierdurch werden vor allem Gene, die an der Differenzierung und der Proliferation (CDKN1A und B) beteiligt sind, verstärkt transkribiert [89]. Zusätzlich können HDACi die Apoptose beeinflussen, indem sie die Expression von BCL2, BCL2L1 und XIAP reduzieren [90, 91].

HDACi werden auf Grund ihrer chemischen Struktur in Hydroxamsäuren, kurzkettige Fettsäuren, Benzamide und zyklische Peptide unterteilt (Tabelle 2 [92]).

Tabelle 2: Klassifikation von Histon-Deacetylase Inhibitoren (HDACi) basierend auf der chemischen Struktur (modifiziert nach [92]).

Klassifikation der chemischen Struktur	HDACi	HDAC Spezifität
Hydroxamsäuren	SAHA (Vorinostat)	Pan-Inhibitor
	PXD101 (Belinostat)	Pan-Inhibitor
	LBH589 (Panobinostat)	Klasse I und IIb
	ITF2357 (Givinostat)	Pan-Inhibitor
	4SC-201 (Resminostat)	Pan-Inhibitor
	PCI 24781 (Abexinostat)	Klasse I und IIb
Zyklische Peptide	Depsipeptid/FK228 (Romidepsin)	Klasse I
Benzamide	MS-275 (Entinostat)	Klasse I
	MGCD0103 (Mocetinostat)	Klasse I
kurzkettige Fettsäuren	Valproinsäure	Klasse I und IIb
	Butyrat	Klasse I und IIb

Viele HDACi werden in klinischen Studien analysiert, jedoch sind bisher nur drei Inhibitoren seitens der FDA (*US Food and Drug Administration*), jedoch nicht seitens der EMA (*European Medicines Agency*), zugelassen. Vorinostat (Zolinza[®], *suberoylanilidehydroxamic acid*, SAHA) war der erste HDACi, der 2006 für die Drittlinietherapie des fortgeschrittenen, kutanen T-Zell Lymphoms seitens der FDA zugelassen wurde. Aktuell wird Vorinostat in klinischen Studien zur Therapie solider Tumoren wie Mesotheliome, Medulloblastome, Prostata- und Schilddrüsentumore getestet [93, 94]. Vorinostat ist ein pan- HDACi, der keine Spezifität für eine einzelne HDAC hat.

Belinostat (Beleodaq[®], PXD101) ist eine weitere Hydroxamsäure, die 2014 die FDA- Zulassung für die Therapie von refraktären oder progredienten peripheren T-Zell Lymphomen bekommen hat [95]. Klinische Phase II Studien werden derzeit mit Belinostat in hämatologischen und soliden Tumoren durchgeführt [96-98]. Dieser HDACi inhibiert ebenfalls alle HDAC Klassen.

Romidepsin (Istodax[®], FK228), ein zyklischer Peptidinhibitor, ist seit 2009 für die Therapie des kutanen T-Zell Lymphoms und seit 2011 für die Therapie von rezidierten oder refraktären peripheren T-Zell Lymphomen zugelassen [99]. Romidepsin wird derzeit in klinischen Phase I und II Studien auch für die Behandlung von kolorektalen, Nieren- und Mammakarzinomen untersucht [100]. Romedepsin inhibiert spezifisch Klasse I HDACs.

Mocetinostat ((MGCD0103), ein Benzamid-Derivat, wird zur Therapie von Mammakarzinomen in Phase I Studien und in Hodgkin-Lymphomen, Nicht-Hodgkin-Lymphomen und der akuten myeloischen Leukämie in Phase II Studien untersucht [101, 99, 102]. Dieser Inhibitor inhibiert spezifisch HDAC1. Jedoch konnte auch eine geringe inhibitorische Wirkung auf HDAC2, -3, und -11 nachgewiesen werden [103].

Entinostat (MS2750), ein weiteres Bezamid-Derivat, wird als Monotherapie oder in Kombination mit 5-Azacytidin (5-AZA) in klinischen Studien zur Therapie von nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC), Mammakarzinomen und hämatologischen Tumoren untersucht [104, 105]. Entinostat ist wie Mocetinostat ein selektiver Klasse I HDAC Inhibitor.

Bei allen Histon-Deacetylase Inhibitoren ist die spezifische Selektion von Patienten, die von einer solchen Behandlung profitieren, essentiell. Die Identifikation und Anwendung prognostischer und prädiktiver Biomarker ist hierbei eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg der Therapie.

2.3.3. Prognostische und prädiktive Biomarker

Entsprechend der amerikanischen Gesundheitsbehörde (*National Institute of Health*, NIH) sind Biomarker Eigenschaften, die objektiv gemessen und evaluiert werden können und als Indikator für normale oder pathogene biologische Prozesse oder für das Ansprechen therapeutischer Interventionen dienen [106]. In der Medizin werden drei verschiedene Arten von Biomarkern unterschieden. Der diagnostische Biomarker ermöglicht es, eine Erkrankung in einer Gruppe von anderen Erkrankungen genauer zu definieren. Ein Beispiel hierfür ist der Nachweis der *MDM2* Amplifikation bei dedifferenzierten Liposarkomen. Der prognostische Biomarker erlaubt eine Aussage über die Heilungschancen bzw. den Verlauf der Erkrankung. Hierzu zählt die Anzahl der detektierten Mitosen/50 HPFs in GIST. Je höher die Mitosezahl ist, die im Tumor nachgewiesen werden konnte, desto schlechter die Prognose. Der prädiktive Biomarker ist ein Maß für das wahrscheinliche Ansprechen auf eine bestimmte Therapie oder für die Wahrscheinlichkeit, an einem bestimmten Leiden zu erkranken. GISTs mit einer Mutation in Exon 9 von *KIT* oder Wildtyp Status sprechen besser auf eine Therapie mit Sunitinib an, als solche mit einer Mutation in Exon 11. Ziel der Biomarkeranalysen ist es, eine sichere Diagnostik durchführen zu können, Risikogruppen zu identifizieren, das Ansprechen auf eine bestimmte Medikation vorherzusagen, um den Therapieerfolg zu erhöhen. Gleichzeitig werden die Nebenwirkungen so gering wie möglich gehalten und eventuelle Resistenzen frühzeitig erkannt.

Eine große Herausforderung der HDACi basierten Therapie ist es, Patienten zu selektionieren, die einen Vorteil von dieser zielgerichteten Therapie haben können. Hierzu ist die Etablierung eines stabilen und gut nachweisbaren Biomarkers essentiell. Aktuelle Studien haben gezeigt, dass HR23b ein solcher Biomarker für die Sensitivität von HDACi ist.

2.3.4. Physiologische Funktionen von HR23b

HR23b, das humane Homologe des UV Exzisionsreparaturmechanismusproteins RAD23 Homolog B, ist ein 43 kDa großes Protein. Eine Funktion von HR23b ist die Beteiligung am Nukleotid-Exzisionsreparaturmechanismus (NER, [107]). NER ist ein hoch konservierter physiologischer Prozess, der UV-induzierte Doppelstrangschäden in der DNA detektiert und repariert [108]. Beim NER-Mechanismus unterscheidet man die transkriptionsgekoppelte Reparatur (TC-NER, effiziente Korrektur von Mutationen im transkribierten DNA-Strang) und die globale genomische Reparatur (GG-NER, die Korrektur von Mutationen im nicht transkribierten DNA-Strang entlang des gesamten Genoms). Ungefähr 30 verschiedene Proteine sind an diesem Reparaturmechanismus beteiligt [109]. GG-NER wird vor allem durch das Protein Xeroderma pigmentosum der Komplementationsgruppe C (XPC) kontrolliert. Innerhalb der Zelle kommt dieses Protein in einem Komplex mit HR23b und Centrin-2 (CEN-2) vor. HR23b stabilisiert diesen Komplex, schützt ihn vor der proteasomalen Degradierung und stimuliert die DNA-Bindungsaktivität von XPC [110, 107]. HR23b ist außerdem in Kombination mit XPC und CEN-2 für die Erkennung der defekten DNA zuständig.

Neben dieser wichtigen Funktion ist HR23b jedoch auch an dem Ubiquitin/Proteasom System beteiligt, welches für die zeitlich regulierte Degradierung von Proteinen zuständig ist. HR23b erkennt polyubiquitinierte Proteine und transportiert diese zum Proteasom, wo die Proteine dann degradiert werden (Abbildung 4). Dadurch trägt HR23b zur Qualitätskontrolle von Proteinen innerhalb der Zelle bei, da vor allem falsch gefaltete und aberrante Proteine über diesen Prozess degradiert werden [111].

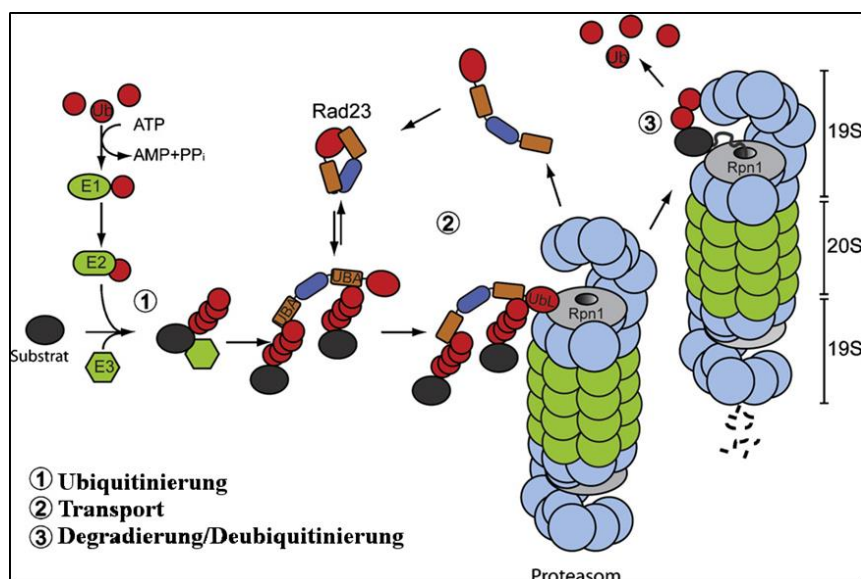


Abbildung 4: Die Rolle von HR23b (RAD23) in der proteasomalen Degradierung von Proteinen. Proteine, die degradiert werden sollen, werden ubiquitiniert durch eine Kette von Enzymen, bestehend aus dem Ubiquitin aktivierenden Enzym (E1), dem Ubiquitin konjugierenden Enzym (E2), einer Ligase (E3) und einem Ubiquitin Elongationsfaktor. Die ubiquitinierten Proteine werden von HR23b (RAD23) gebunden und zum Proteasom transportiert. Während HR23b vom Proteasom dissoziiert, werden die ubiquitinierten Proteine degradiert (modifiziert nach [111]).

2.3.5. HR23b als prädiktiver Biomarker

Aktuelle Studien haben gezeigt, dass HR23b ein potentieller neuer Biomarker für die Sensitivität von hepatozellulären Karzinomen und kutanen T-Zell Lymphomen gegenüber HDACi ist [112, 113]. In nicht resezierbaren hepatozellulären Karzinomen ist die Expression von HR23b mit einer Stabilisierung der Erkrankung unter Therapie mit dem HDACi Belinostat assoziiert [113]. In einer Phase II Studie mit Vorinostat hatten Patienten mit einem kutanen T-Zell Lymphom und einer hohen HR23b Expression eine Ansprechrate 69%. Daher scheint HR23b eine große Rolle in der Prädiktion des Therapieansprechens in diesen Lymphomen zu spielen [112]. Durch den Einsatz einer shRNA Bibliothek gegen eine Vielzahl an Genen, die mit der Tumorentstehung und Progression assoziiert sind, konnten Fotheringham et al. HR23b als ein wichtiges Protein identifizieren, dass die Sensitivität gegenüber HDACi beeinflusst. Weiterführende Analysen zeigten, dass unter HDACi Behandlung eine vermehrte Bindung von HR23b an das Proteasom stattfindet. Dies führte zu einer Inhibition des Proteasomes und nachfolgend zur Apoptose [114], die durch siRNA *knock down* wieder aufgehoben werden konnte. Liang et al. konnten zeigen, dass eine Phosphorylierung von HR23b zur Akkumulation von HR23b und damit zur Inhibition des Proteasomes führt [115]. Khan et al. konnten ebenfalls zeigen, dass eine erhöhte HR23b Expression mit einer Inhibition des Proteasomes assoziiert ist. Daher ist davon auszugehen, dass

die Funktion von HR23b als sensitiver Biomarker für das Ansprechen auf eine HDACi basierte Therapie eher auf der Assoziation zum Proteasom als auf der Funktion bei der DNA-Reparatur basiert.

2.4. MiRNA

Neben HDACi spielen miRNAs eine wichtige Rolle in der Etablierung alternativer Therapien in der Onkologie. miRNAs wurden 1993 erstmals in *Caenorhabditis elegans* beschrieben. Die Entdeckung von lin-4 und kurze Zeit später let-7 führten zu einer neuen Definition von kleinen, nicht kodierenden Ribonukleinsäuren (RNAs) [116, 117]. miRNAs sind ungefähr 22 Nukleotide lang. Sie sind an vielen physiologischen Prozessen wie Entwicklung, Differenzierung, Apoptose, Proliferation, Hämatopoese und Tumorentstehung beteiligt [118-121]. Evolutionär liegen sie hochkonserviert in vielen Organismen vor. Derzeit sind >25141 reife miRNAs in >193 verschiedenen Spezies annotiert [122].

2.4.1. Biogenese von miRNA

miRNAs können als einzelnes Gen oder als Gencluster (mehrere miRNAs einer Familie) im Genom vorkommen. Zusätzlich können sie auch als Transkriptionsprodukt entstehen, wenn sie in Introns anderer Gene lokalisiert sind. Die meisten miRNAs werden von einer RNA Polymerase Typ II oder III zu 500–1000 Nukleotiden langen, doppelsträngigen RNAs (*primary miRNAs*, *pri-miRNAs*) transkribiert [123, 124]. Diese pri-miRNAs sind charakterisiert durch einen 33-35 Basenpaare langen Stamm, eine terminale Haarschleifenstruktur und einen Poly-A-Schwanz am 3`Ende und eine 7-Methylguanotin-Kappe am 5`Ende [125]. In Metazoen bilden die Ribonuklease III Drosha und das Doppelstrang-Bindemolekül *DiGeorge critical region 8* Protein (DGCR8) einen Mikroprozessor-Komplex, der diese pri-miRNAs in 60 Nukleotid lange *precursor-* (pre-) miRNAs spaltet [123, 126-128]. Aus einer pri-miRNA können so mehrere pre-miRNAs entstehen. Exportin-5 transportiert die pre-miRNAs in das Zytoplasma [129].

Im Zytoplasma spaltet Dicer, ein zweites RNase III Enzym, die pre-miRNA in 22 Nukleotid lange miRNA-miRNA* Duplexe [123, 126, 130, 127, 131-133]. Die RNA-Stränge werden entwunden und die Basenpaarung zwischen ihnen aufgelöst. Hierbei wird immer an dem Ende angefangen, welches die geringere thermodynamische Stabilität aufweist. Der Strang, der hier sein 5`Ende besitzt, wird als der führende Strang (*guide*) bezeichnet (z.B. miR-221-5p), während der andere als der folgende Strang (*passenger*) bezeichnet wird (miR-221-3p). Dieser wird mit einem Stern annotiert [134-137].

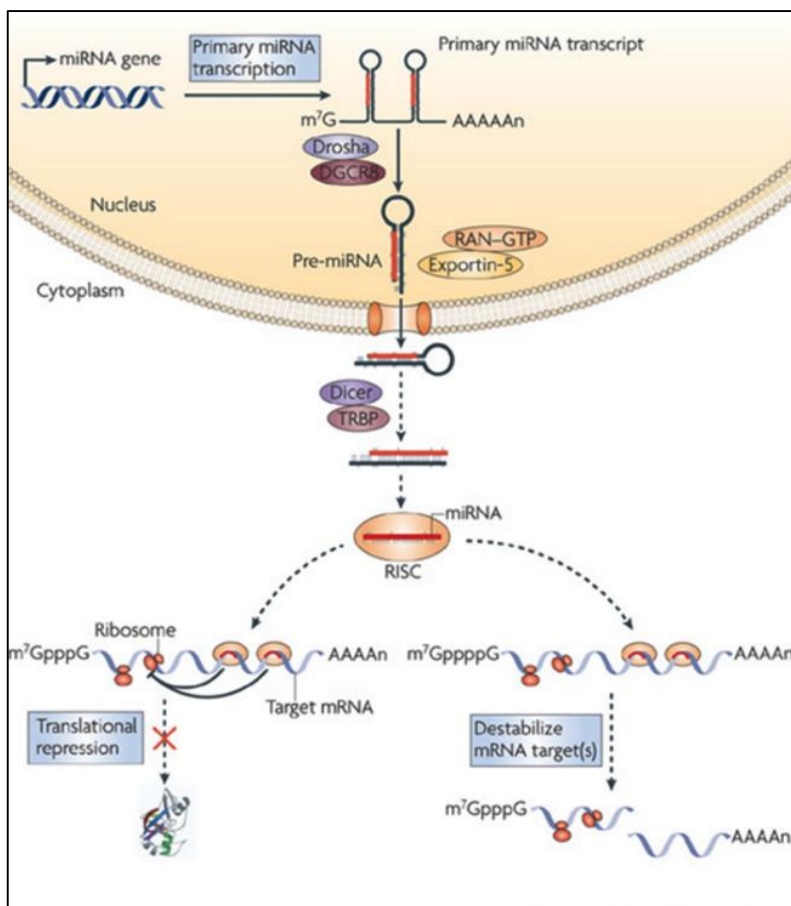


Abbildung 5: Die Biogenese der miRNAs [138].

Die reife miRNA inkorporiert in den Ribonukleoproteinkomplex, der auch als *RNA induces silencing complex* (RISC) bezeichnet wird. Nach Inkorporation des Duplex wird der *passenger* Strang durch eine Endonuklease entfernt und degradiert. Die miRNA führt die Argonaut-Proteine des RISC-Komplexes zur komplementären Ziel-mRNA. Bei hoher Komplementarität wird die mRNA gespalten, bei unvollständiger Komplementarität wird die Translation unterdrückt. Durch die Bindung des AGO-miRNA Komplexes an die Ziel-mRNA wird gleichzeitig ein Adenosin oder Uracil an die miRNA (*tailing*) gebunden und die 3`-5` exonukleäre Spaltung am 3`Ende der miRNA (*trimming*) eingeleitet [139, 140]. Die miRNA wird degradiert.

Die Biogenese der miRNAs kann sowohl transkriptionell als auch post-transkriptionell in Form von RNA Editing und Methylierung reguliert werden [122, 125]. Diese Regulationen können sich auf die Stabilität der miRNAs, die subzelluläre Lokalisation und auf die Spezifität auswirken [141].

2.4.2. Zielgenerkennung

Um eine hohe Komplementarität zu erreichen, muss eine perfekte Basenpaarung von sechs oder sieben aufeinander folgenden Basenpaaren in der Ziel-mRNA und der Seed-Region der miRNA (Nukleotid zwei bis acht des miRNA Stranges vom 5`Ende) vorliegen. In Metazoa inhibieren miRNAs die Translation der Ziel-mRNA durch unvollständige Komplementarität (Abbildung 6). Zwei Seed-Regionen, die nur 10–40 Nukleotide weit auseinander liegen, zeigen einen additiven Effekt [142, 143]. Ein Adenin gegenüber der Position eins der miRNA und ein Adenin oder Uracil gegenüber Position neun verstärken ebenfalls die transkriptionelle Repression der mRNA Translation. Guanin- Uracil- und Fehlpaarungen innerhalb der Seed-Region führen dagegen zu einer verminderten Repression der mRNA Translation. Wichtig ist außerdem eine Fehlpaarung in der zentralen Region des miRNA-mRNA Duplex und eine ausreichende Komplementarität am 3`Ende der miRNA.

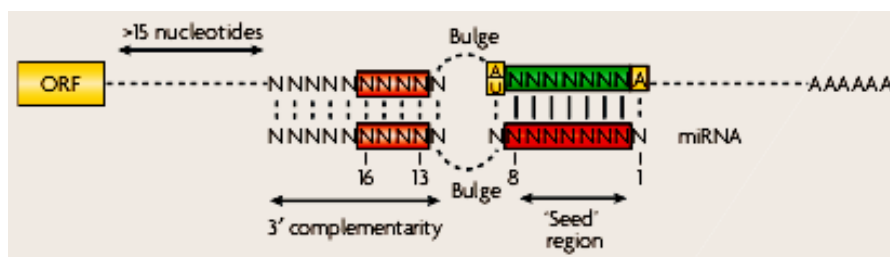


Abbildung 6: Prinzipien der miRNA-mRNA Bindung. Wichtige Basenpaarungen der miRNA-mRNA Interaktion, die für die Bindung und Spaltung der mRNA in Metazoa wichtig sind [144]. In rot ist die Seed-Region der miRNA, in grün die komplementäre Region der mRNA dargestellt. Die gelben Nukleotide sind additiv für die regulatorische Funktion notwendig, während die orange farbenen Nukleotide wichtig werden, wenn keine hohe Komplementarität in der Seed-Region vorliegt.

2.4.3. Funktionelle Rolle von miRNAs bei der Tumorentstehung

Bis zu 50% der Gene der miRNAs sind in instabilen und tumorassoziierten Regionen lokalisiert [145]. Je nach Expression der miRNAs können sie sowohl als Tumorsuppressor dienen, wenn ihr Funktionsverlust zur malignen Transformation einer Tumorzelle beiträgt oder auch als Onkogene (OncomiR), indem sie die Aktivität von Tumorsuppressoren inhibieren [146].

Spezifische miRNA Expressionsprofile sind charakteristisch für verschiedene Tumorentitäten [147]. Das Expressionsprofil von miRNAs im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe oder zu anderen Tumorentitäten kann genutzt werden, um Subentitäten voneinander zu unterscheiden und um die Rolle der miRNAs in der Tumorentstehung zu analysieren.

Desweiteren kann das Expressionsprofil zur Etablierung von Biomarkern angewandt werden. In Lungentumoren ist die reduzierte Expression der miRNA let-7 assoziiert mit einer verkürzten Überlebenszeit [148]. In Brusttumoren ist eine Deregulation der miRNAs miR-145 und miR-121 assoziiert mit einer Progression, während die reduzierte let-7 Expression assoziiert ist mit einer erhöhten Lymphknoten- Metastasierung [118]. In gastrointestinalen Stromatumoren ist eine Überexpression der miRNAs miR-125a-5p und miR-107 mit einer Resistenz gegenüber Imatinib assoziiert [149].

Der Einsatz von miRNAs im Rahmen innovativer zielgerichteter Therapiekonzepte stellt jedoch eine große Herausforderung dar. Die geringe Stabilität, die hohe Anzahl an Zielgenen für eine einzelne miRNA, Zytotoxizität und die spezifische Administration einer miRNA ins gewünschte Gewebe machen die zielgerichtete, miRNA basierte Therapie schwierig. Jedoch konnte dieser Therapieansatz durch den Einsatz von LNAs (*locked nucleic acid*), kationischen Liposomen und polymerbasierten Nanopartikeln verbessert werden. Modifikationen wie Phosphorothioat (Ersatz eines nicht überbrückenden Sauerstoff-Atoms der Phosphodiester-Gruppe durch ein Schwefel-Atom), 2-O-Methyl oder 2'-O-Methoxyethyl-Addition und Fluoridderivate erhöhen die Stabilität von miRNAs [150-153]. Ein neu entwickelter RNA poly L-Lysin (PLL) Komplex wiederum ermöglichte die langsame, wochenlange Administration von anti-miR-10b Molekülen ins Gewebe, was bei Brusttumoren mit einer sehr hohen Effizienz und geringer Toxizität gezeigt werden konnte [154]. Effiziente Administration von anti-miR-29b wurde auch durch den Einsatz von Gold-Nanopartikeln (AuNPs) gezeigt [155]. Zusätzlich führte die Verwendung von adeno-assoziierten viralen Vektoren (AVV: *adeno-associated virus*) in hepatozellulären Karzinomen zu einer miR-26a vermittelten Inhibierung der Proliferation und Induktion von Apoptose *in vivo* [118].

2.4.4. miR-221 und miR-222 in gastrointestinalen Stromatumoren

miR-221 und miR-222 haben laut der Datenbank TargetScan human release 6.2 aktuell (Stand Januar 2015) 446 Zielgene mit 465 hoch konservierten und 154 schwach konservierten Seed-Regionen im Menschen [156]. Die Funktion dieser miRNAs ist jedoch je nach Tumorart unterschiedlich. In Brusttumoren regulieren miR-221 und miR-222 die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) über den RAS-RAF-MEK Signalweg [157]. In Prostatumoren, in denen eine reduzierte Expression von miR-221 nachgewiesen werden konnte, reguliert miR-221 die Proliferation, Invasion und Apoptose über den JAK/STAT- Signalweg und sensibilisiert diese Tumore für IFN- γ -Therapie *in vitro* [158]. In Glioblastomen regulierte die Überexpression von miR-221 und miR-222 die Expression von BBC3 (auch bekannt als PUMA; *p53 upregulated*

modulator of apoptosis), einem pro-apoptotischen Protein, wodurch *in vitro* und *in vivo* Apoptose induziert werden konnte [159].

Auch in GISTs liegt ein spezifisches miRNA Expressionsprofil im Vergleich zu anderen Sarkomentitäten [75] und im Vergleich zum peripheren, nicht tumorassoziierten Normalgewebe vor [74]. Hierbei ist vor allem die Expression von miR-221 und miR-222 signifikant reduziert [74, 160]. Felli et al. konnten 2005 erstmals die genregulatorische Funktion dieser beiden miRNAs auf die Reduktion der Rezeptortyrosinkinase KIT nachweisen [161]. Vor allem GISTs, die immunhistochemisch stark positiv für KIT sind, weisen eine reduzierte Expression der miR-221 und miR-222 auf [162, 74]. Während Koelz et al. eine signifikante Korrelation der Expression von miR-221 und miR-222 mit dem Mutationsstatus detektieren konnten [74], demonstrierte die Studie von Haller et al. eine signifikant höhere Expression dieser beiden miRNAs in Wildtyp-GISTs im Vergleich zu GISTs mit Mutationen in *KIT* oder *PDGFRA* [73]. Analysen in der Zelllinie GIST-T1 zeigten, dass miR-222 direkt mit dem KIT Rezeptor interagiert und dass diese Interaktion zu einer Reduktion der Proliferation *in vitro* führte [163].

2.5. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Sarkome sind eine Gruppe heterogener Tumore, deren Therapieoptionen überwiegend in konventioneller Chemo- oder Strahlentherapie bestehen. Ansätze einer personalisierten Medizin sind nur bei wenigen Subentitäten etabliert (Dermatofibrosarkom protuberans, inflammatorische myofibroblastische Tumore, alveoläre Sarkome und GISTs). Jedoch besteht ein hoher Bedarf an alternativen Therapieoptionen für klinisch aggressive Sarkomen sowie für Tumore, die unter Therapie progredient sind. Ansätze dafür sind miRNAs, HSP90 Inhibitoren, Inhibitoren epigenetischer Schlüsselfaktoren wie Histon-Deacetylasen, Histon-Acetyltransferasen und DNA-Methyltransferasen, aber auch Inhibitoren der Zellzykluskontrolle (CDK4 und CDK6 Inhibitoren) sind in Entwicklung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wird HR23b als prädiktiver Biomarker für eine Therapie mit HDACi in Weichgewebssarkomen und GISTs analysiert. Hierfür wird der Effekt der vier HDACi Vorinostat, Belinostat, Entinostat und Mocetinostat in einem gut charakterisierten Kollektiv von Sarkomzelllinien bezüglich der zellulären Proliferation und Apoptoseinduktion zeit- und konzentrationsabhängig analysiert. Die detektierten Effekte werden mit der Expression von HR23b korreliert, um eine Assoziation von HR23b und HDACi Sensitivität in Sarkomen herstellen zu können. Außerdem wird die HR23b Expression in einem umfassenden Kollektiv von Sarkomen immunhistochemisch analysiert. Diese Untersuchungen können dazu beitragen, HR23b in Sarkomen als prädiktiven Biomarker für die Sensitivität gegenüber HDACi zu etablieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird der regulatorische Einfluss von miR-221 und miR-222 auf gastrointestinale Stromatumoren untersucht. miR-221 und miR-222 können an die 3'UTR von *KIT* binden und so die Expression des KIT-Rezeptors auf Proteinebene reduzieren. Desweiteren vermittelt miR-221 eine Reduktion der zellulären Proliferation und eine Induktion der Apoptose in der GIST-T1 Zelle. Um die Effekte von miR-221 und miR-222 in GISTs zu analysieren, wird ein funktioneller *in vitro* Assay mit drei verschiedenen GIST-Zelllinien (GIST882, GIST-T1 und GIST48) etabliert. Hierbei wird der Einfluss von miR-221 und miR-222 auf die zelluläre Proliferation, Zytotoxizität und Apoptose untersucht. In Westernblot Analysen werden die Effekte auf die nachgeschalteten Signalwege überprüft. Hierbei wird vor allem der Einfluss der beiden miRNAs auf die Proteine KIT, AKT und MTOR analysiert. Diese Ergebnisse tragen dazu bei, die Rolle verschiedener Proteine unter Einfluss von miR-221 und miR-222 in der Entstehung und Progression von GISTs zu charakterisieren. Die gewonnenen Ergebnisse können zukünftig die Prognoseabschätzung der GISTs verbessern und zur Etablierung neuer, zielgerichteter Therapien beitragen.

3. *Material*

3.1. Laborgeräte

Tabelle 3: Laborgeräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	Laboklav	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle, DE
Brutschrank	Galaxy 170S	Eppendorf, Hamburg, DE
Eismaschine	RF 0385 A	Manitowoc ICE Inc., Manitowoc, US
	ZBE 70-35	Ziegra, Isernhagen, DE
Einbettstation	tissue block system TBS 88 thermal unit	Medite GmbH, Burgdorf, DE
	tissue block system TBS 88 dispenser unit	Medite GmbH, Burgdorf, DE
Eindeckautomat	Promounter RCM 2000	Medite GmbH, Burgdorf, DE
Extraktionsautomat	M48	Qiagen, Hilden, DE
Färbeautomat	Dako TechMate™ 500	Agilent Technologies, Santa Clara, US
	Bond-MAX	Leica biostystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE
FISH Vorbereitungssystem	VP 2000 Processor	Abbott Laboratories, Wiesbaden, DE
Fluorimeter	FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Ortenberg, DE
Folienschweißgerät	FS 3602	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, DE
Geldokumentationssystem	ChemiDoc™ XRS+	BIO-RAD laboratories GmbH, München, DE
Hybridisierungssystem	HyBrite™ VYSIS	Abbott Laboratories, Wiesbaden, DE
Inkubationsschüttler	Rocking Platform	VWR International LLC, Radnor, PA
Kapillarelektrophorese	3500 Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Kapillarelektrophorese	QIAXcel	Qiagen, Hilden, DE
Kühlplatte	EG 1150C	Leica biostystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE
	TES99	Medite GmbH, Burgdorf, DE
Luminometer	Centro LB 960	Bertold Technologies, Pforzheim, DE
Magnetplatte	96 Well magnetic ring stand	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Magnetrührer	RH basic 2	IKA®-Werke GmbH & CO.KG, Staufen, DE
Mehrfachdispenser	Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg, DE
Mikroskop	DM5500B	Leica microsystems, Wetzlar, DE
Mikroskop, invers	DMIL	Leica microsystems, Wetzlar, DE
Mikroplattenlesegerät	Infinite F50	Tecan, Männedorf, CH

Gerät	Modell	Hersteller
Mikrotom	SM 2400	Leica biostystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE
	SM 2000R	Leica biostystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE
Neubauer-Zählkammer	Fast-Read 102	Biosigma S.r.l. a Dominique Dutscher Company, Cona, IT
Parallelsequenzierer	MiSeq® System	Illumina Inc., San Diego, US
PCR-Cycler, rot	T3000 Thermocycler	Analytik Jena AG, Jena, DE
PCR-Cycler	C1000™ Thermal Cycler	BIO-RAD laboratories GmbH, München, DE
PCR-Cycler für Platten	TProfessional	Analytik Jena AG, Jena, DE
pH-Meter	Five easy plus	Mettler Toledo, Ohio, US
Pipettierhilfe	EasyPet	Eppendorf, Hamburg, DE
Produktschutzwerkbank	NuAire NU-126	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, DE
Reinstwasseranlage	Purelab Classic	VWS Deutschland GmbH, Celle, DE
SDS-PAGE Gelelektrophorese- Kammer	Xcell SureLock™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Spannungsgerät	EV243	Consort bvba, Turnhout, BE
Spektrophotometer	Qubit® 2.0	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Spektrophotometer	ND-2000c	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Sterilbank	Mars Safety Class 2	LaboGene ApS, Lyngø, DK
Stickstofftank	CryoCE 24K	TechLab GmbH, Idstein, DE
Thermoschüttler	Thermomixer comfort 5355	Eppendorf, Hamburg, DE
Thermoschüttler	BioShake iQ	Analytik Jena AG, Jena, DE
Transfer-/ Blotkammer	Mini-Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell	BIO-RAD laboratories GmbH, München, DE
Vortexer	VortexGenie 2	Scientific Industries Inc., New York, US
Waage, fein	EMB 200-2	Kern & Sohn GmbH, Balingen, DE
Waage, grob	SE1501	VWR International LLC, Radnor, PA
Wasserbad	W12	Labortechnik Medingen GmbH, Arnsdorf, DE
Wasserbad	SubAqua 12 Plus	Grant Instruments, Cambridgeshire, UK
	TFB45	Medite GmbH, Burgdorf, DE
Zentrifuge, groß	Fresco 17	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Zentrifuge, klein	Pico 17	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Zentrifuge, Platten	Centrifuge 5430R	Eppendorf, Hamburg, DE

3.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Abdeckfolien	qPCR Adhesive Clear Seals	4Titude, Surrey, UK
	AB-0558	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Combitips	advanced 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
	advanced 1 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
	advanced 2,5 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
	advanced 10 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Deckgläser	15 x 15 mm ²	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Filterpaper	10 cm x 100 m	GE Healthcare GmbH, Solingen, DE
Gefrierbehälter	Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Handschuhe	Nitra-Tex, DermaClean	Ansell, Red Bank, US
	Handschuhe Latex steril puderfrei	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden, DE
Kanüle	Surecan® Portkanüle gerade 0,9 mm x 40 mm	Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Kosmetiktücher	Präzisionswischtücher 213 x 114 mm	Kimberly-Clark Professional, Roswell, US
Kryoröhrchen	CryoPure Gefäß 1,6 ml weiß	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, DE
Mikrotiterplatten	Quali-PCR Platten ohne Rahmen	Kisker Biotech GmbH & Co.KG, Steinfurt, DE
	FrameStar 384	4Titude, Surrey, UK
	MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
	96-Well Platten, U-Form	SIGMA Aldrich, München, DE
	LIA-Platte, weiß, TC, F-Form	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AT
Mikrotom-Klingen	S35	Feather, Osaka, J
Objekträger	76 x 26 mm, geputzt, 20 mm Mattrand	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Edermünde, DE
	ChemMate™ Capillary Gap Microscope Slides	Agilent Technologies, Santa Clara, US
	Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Organkassetten	Verschiedene Größen	Sakura, Zoeterwoude, NL
Parafilm	M roll size 4 in x 125 ft	SIGMA Aldrich, München, DE
Pasteurpipetten	230 mm	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Pipettenspitzen	Biosphere Filtertips	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, DE
	epTIPS Lo Retention Dualfilter 0,1 - 10 µl	Eppendorf, Hamburg, DE

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Pipettenspitzen	epTIPS Lo Retention Dualfilter 2 - 100 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
	epTIPS Lo Retention Dualfilter 50 - 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
	Corning® Gel loading tips, 1 - 200 µl	SIGMA Aldrich, München, DE
	T- 300 0,5 -10 µl	Axygen, Union City, US
Reaktionsgefäße	DNA LoBind Tube 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
	Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
	0,2 ml, 0,5 ml	Axygen, Union City, US
	2 ml, 5 ml	Eppendorf, Hamburg, GE
	15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Roti PVDF™ Membran	0,45 µm	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Skalpell	Nr. 11	Feather, Osaka, J
Spritzen	Injekt®, steil, 2-teilig, 5 ml	Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Stripetten	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning, New York, US
Verschlusskleber	Fixogum	Marabu, Tamm, DE
Zellkulturflaschen	25 cm ² , 75 cm ²	Corning, New York, US
Zellkulturplatten	6 well, 24 well, 96 well	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Zellschaber	25 cm	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, DE

3.3. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien.

Substanz	Hersteller
6 x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Acrylamid-Bisacrylamid/ Rotiphorese-Gel 30™	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Agar	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Agarose	Biozym Biotech Trading GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Agencourt® AMPure® XP Beads	Beckman Coulter, GmbH, Krefeld, DE
Ammoniumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ammoniumpersulfat	SIGMA Aldrich, München, DE
Anodenpuffer, 3500 Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Aprotinin	SIGMA Aldrich, München, DE
Aquatex	Merck KGaA, Darmstadt, DE
ATL-Puffer	Qiagen, Hilden, DE
β-Mercaptoethanol	SIGMA Aldrich, München, DE
Borsäure, zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE

Substanz	Hersteller
Camptothecin	SIGMA Aldrich, München, DE
Citronensäure	Merck KGaA, Darmstadt, DE
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, DE
Conditioning Reagenz, 3500 System	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Desoxynukleosidtriphosphat-Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Desoxycholat	SIGMA Aldrich, München, DE
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	SIGMA Aldrich, München, DE, Illinois Tool Works Inc., Glenview, US
Digitonin	Applichem, Darmstadt, DE
Dimethylformamid	SIGMA Aldrich, München, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA Aldrich, München, DE
DNA Exitus™ Plus IF	Applichem, Darmstadt, DE
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Essigsäure, zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethanol absolut, zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethidiumbromid	SIGMA Aldrich, München, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Ficoll® PM 400	SIGMA Aldrich, München, DE
Formaldehyd, 4%, gepuffert	Merck KGaA, Darmstadt, DE
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Glycin	SIGMA Aldrich, München, DE
Hefeextrakt	Merck KGaA, Darmstadt, DE
HiMark™ Pre-stained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Ionomycin	SIGMA Aldrich, München, DE
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kalziumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kaliumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kapillararray, 3500 Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Kathodenpuffer, 3500 Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Lipofectamine® 2000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Lipofectamine® RNAiMAX	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Magermilchpulver	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Magnesiumchlorid	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE
2-Methylaminoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	SIGMA Aldrich, München, DE
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumchlorid	SIGMA Aldrich, München, DE
Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natrium-Deoxycholate	SIGMA Aldrich, München, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt, DE

Substanz	Hersteller
Natriumfluorid	SIGMA Aldrich, München, DE
Natriumhydroxyd	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Natrium-Molybdat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Natrium-Pyrophosphat	SIGMA Aldrich, München, DE
Natrium-Vanadate	SIGMA Aldrich, München, DE
NP-40 TM	Abbott Laboratories, Wiesbaden, DE
NuPAGE [®] MOPS SDS Running Buffer (20X)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
NuPAGE [®] Novex [®] 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.5 mm, 15 well	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
NuPAGE [®] Sample Reducing Agent	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Paraffin, TissueWax [®]	Medite GmbH, Burgdorf, DE
PCR-Puffer (10x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Pertex 3000	Medite GmbH, Burgdorf, DE
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	SIGMA Aldrich, München, DE
Polyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat/Tween 20 TM	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Polyethylenglycol 8000/PEG 8000 TM	SIGMA Aldrich, München, DE
Ponceau S	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
POP-7 TM Polymer für 3500/3500xL Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Post-Hybridisierungspuffer	Abbott Laboratories, Wiesbaden, DE
Propidiumiodid	SIGMA Aldrich, München, DE
Protease-Inhibitoren	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, DE
Qiazol	Qiagen, Hilden, DE
QX Alignment Marker 15 bp/1 kbp	Qiagen, Hilden, DE
REAL TM Antibody diluent	Agilent Technologies, Santa Clara, US
Rinder-Serumalbumin (BSA)	PAA, Pasching, DE
RNase away TM	Molecular Bioproducts, San Diego, US
Salzsäure, 1M	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Stickstoff, flüssig	Linde AG, Pullach, DE
TRIS Buffered Saline	SIGMA Aldrich, München, DE
TRIS-HCl	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Triton X-100 TM	SIGMA Aldrich, München, DE
Trypton	Merck KGaA, Darmstadt, DE
TWEEN [®] 20	SIGMA Aldrich, München, DE
Wasser, HPLC-aufgereinigt	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Wasser, RNase-frei	Qiagen, Hilden, DE
Vy DAPI I CNTST 2x	Abbott, Wiesbaden, DE
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, DE

3.4. Reaktionskits

Tabelle 6: Reaktionskits.

Kit	Hersteller
ApoTox-Glo™ Triplex Assay	Promega, Madison, US
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
BigDye X- Terminator Purification Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
MagAttract DNA Mini M48 Kit (192)	Qiagen, Hilden, DE
MiSeq®v2 Reagent Kit	Illumina, San Diego, US
NEXTflex™ Adenylation Mix	BIOO Scientific, Austin, US
NEXTflex™ DNA Barcodes - 48	BIOO Scientific, Austin, US
NEXTflex™ Primer Mix	BIOO Scientific, Austin, US
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE
QIAxcel DNA Screening Kit	Qiagen, Hilden, DE

3.5. Medien und Zusätze für die Zellkultur

Tabelle 7: Medien und Zusätze für die Zellkultur.

Substanz	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO), zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), + High Glucose (4,5 g) / L-Glutamin, -Pyruvat (DMEM + Glutamax)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), + Glucose/ L-Glutamin, -Pyruvat	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
F-10 nutrient mixture	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
F-12 nutrient mixture	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Fötales Kälberserum	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
L- Glutamin n(200 mM)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
McCoy's 5A Medium	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Minimal Essential Medium α (MEM α)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Opti-MEM® I reduced Medium	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Penicillin / Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Phosphate Buffered Saline, mit Ca ²⁺ & Mg ²⁺	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
RPMI 1640, Phenolrot mit L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Trypanblau-Lösung (0.4 %)	SIGMA Aldrich, München, DE
Trypsin / EDTA (0.05 %)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US

3.6. Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit doppelt deionisiertem Wasser angesetzt.

Puffer für die DNA-Extraktion

10 mM TRIS-HCl (pH 7,6)

TRIS-HCl 1,21 g

Ad 1 l aqua dest.

Puffer für die Gelelektrophorese

TBE Puffer

TRIS 108 g

Borsäure 55 g

0,5 M EDTA (pH 8.0) 40 ml

Ad 100 ml Aqua dest.

1%iges Agarosegel

Agarose 5 g

Ad 500 ml 1x TBE Puffer

Lösungen für die Zellkultur

MTT-Stocklösung

MTT 50 mg

PBS 10 ml

Sterilfiltriert, 0,2 µm Filter

MTT-Solvent

SDS 10 g

1 M HCl 1 ml

Ad 100 ml Aqua dest.

Lösungen für die Immunhistochemie

Citratpuffer

Stammlösung A

Zitronensäure 21,01 g

Ad 1 l Aqua dest.

Stammlösung B

Natriumcitrat-Dihydrat 21,41 g

Ad 1 l Aqua dest.

Agar

Agar 2 g

Ad 100 ml Aqua dest.

Puffer für die Westernblot AnalyseElektrophoresepuffer

NuPAGE® MOPS SDS 50 ml

Running Buffer (20X)

Ad 1 l Aqua dest.

Transferpuffer (10 x, nach Towbin)

TRIS-Base 30,3 g

Glycin 144,1 g

Ad 1 l Aqua dest.

Transferpuffer (1x)

10 x Blottingpuffer 100 ml

Methanol 200 ml

Ad 1 l Aqua dest.

TBS-T (10 x) pH 8,0

TRIS-HCl 24 g

NaCl 80 g

Tween 1 ml

Ad 1 l Aqua dest.

Blockierungslösung

Magermilchpulver 5 g

Ad 100 ml TBS-T

Antikörperverdünnungspuffer

Rinderserumalbumin (BSA) 5 g

Ad 100 ml TBS-T

Stripping Puffer

10% SDS 2 ml

1 M TRIS-HCl (pH 6.8) 0,625 ml

β- Mercapthoethanol 0,16 ml

Ad 20 ml Aqua dest.

RIPA-Puffer

1 M NaCl 15 ml

1 M TRIS (pH 7,2) 1 ml

10% SDS 1 ml

100% TritonX-100 1 ml

100% Na-Deoxycholat 1 g

0,5 M EDTA 1 ml

Ad 100 ml Aqua dest. (4 °C)

10 ml RIPA-Puffer + 1 Tablette

Proteaseinhibitor

3.7. Größenstandards

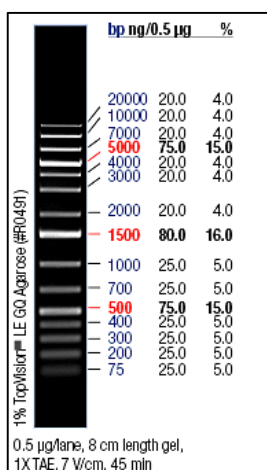


Abbildung 7: Größenstandard für die Agarosegelelektrophorese (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US).

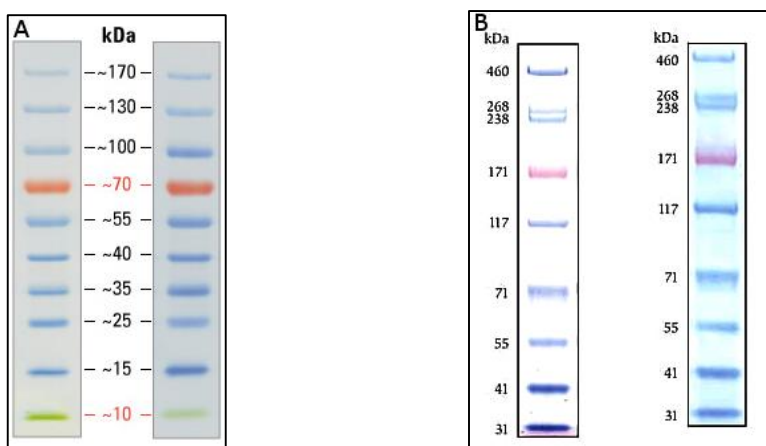


Abbildung 8: Größenstandards für die SDS-PAGE. A) PageRuler Prestained Protein Ladder für Proteine bis 170 kDa (Thermo Fisher Scientific Inc.) und B) HiMark™ Pre-stained Protein Standard für Proteine bis 460 kDa (Thermo Fisher Scientific Inc.). Links ist jeweils der Standard auf einem Gel dargestellt, rechts auf einer Membran nach dem Blot.

3.8. Oligonukleotide

Tabelle 8: Primer für die Polymerasekettenreaktion (PCR).

Gen	Forward-Sequenz [5`-3`]	Reverse-Sequenz [5`-3`]
<i>KIT</i> Exon 11	GTGCTCTAATGACTGAGAC	TACCCAAAAAGGTGACATGG
<i>KIT</i> Exon 11	CATCAGTTTGCCAGTTGTGC	AATCTAGCATTGCCAAAATCA
<i>KIT</i> Exon 11	AAAAAGTTAGTTTTCACTCTTACAA	TCACAGGAAACAATTTTTATCGAA

Zur Parallelsequenzierung der GIST-Zelllinien wurden zwei verschiedene Primerpanel verwendet (Tabelle 31 und Tabelle 32 im Anhang). Zum einen wurde ein Primerpanel eingesetzt, mit dem Gene analysiert werden, die in GIST häufig mutiert sind. Dieses Panel umfasst 132 Amplikons

aufgeteilt in Pool 1 mit 69 Amplikons und Pool 2 mit 63 Amplikons. Der zweite Primerpanel umfasst auch Gene, für die keine Mutationen in GISTs beschrieben sind und enthält 632 Amplikons. Diese sind aufgeteilt in Pool 1 mit 319 Amplikons und Pool 2 mit 313 Amplikons.

3.9. Sonden für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Tabelle 9: Sonden für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung.

Sonde	Hersteller
ZytoLight® SPEC MDM2/CEN 12 Dual Color Probe	ZytoVision GmbH, Bremerhaven, DE
ZytoLight® SPEC SYT Dual Color Break Apart Probe	ZytoVision GmbH, Bremerhaven, DE
ZytoLight® SPEC EWSR1 Dual Color Break Apart Probe	ZytoVision GmbH, Bremerhaven, DE
ZytoLight® SPEC CHOP Dual Color Break Apart Probe	ZytoVision GmbH, Bremerhaven, DE

3.10. Zelllinien

Tabelle 10: Kultivierte Zelllinien.

Entität	Zelllinie	genetische Treiberaberration	Referenz
Kutanes T-Zell Lymphom	HUT78	komplex	[164]
gastrointestinaler Stromatumor	GIST882	<i>KIT</i> Exon 13 Punktmutation (p.K642E)	[165]
gastrointestinaler Stromatumor	GIST-T1	<i>KIT</i> Exon 11 Deletion (p.V560_Y578del)	[166]
gastrointestinaler Stromatumor	GIST48	<i>KIT</i> Exon 11 (p.V560D) und Exon 17 (p.D820A) Punktmutation	[65]
gut differenziertes Liposarkom	T778	<i>MDM2</i> Amplifikation	[167]
gut differenziertes Liposarkom	T449	<i>MDM2</i> Amplifikation	[168]
dedifferenziertes Liposarkom	Fu-DDLS-1	<i>MDM2</i> Amplifikation	[169]
myxoides Liposarkom	MLS1765	<i>FUS-DDIT3</i> Translokation	[170]
myxoides Liposarkom	MLS402	<i>FUS-DDIT3</i> Translokation	[171]
Leiomyosarkom	SK-LMS-1	komplex	[172]
Leiomyosarkom	SK-UT-1	komplex	[173]
Synovialsarkom	HS-SY-II	<i>SS18-SSX</i> Translokation	[174]
Synovialsarkom	1273/99	<i>SS18-SSX</i> Translokation	[175]
Synovialsarkom	SW982	<i>SS18-SSX</i> Translokation	[176]
maligner peripherer Nervenscheidewandtumor	T265	komplex	[177]
maligner peripherer Nervenscheidewandtumor	STS26T	komplex	[178]
maligner peripherer Nervenscheidewandtumor	ST88-14	komplex	[179]

Entität	Zelllinie	genetische Treiberaberration	Referenz
Ewingsarkom	SK-ES-1	<i>EWS-FLII</i> Translokation	[180]
Ewingsarkom	SK-N-MC	<i>EWS-FLII</i> Translokation	[181]

3.11. Antikörper

Tabelle 11: Primäre, nicht markierte Antikörper.

Antigen	Spezies	Klonalität	Verd.	Hersteller	Katalog Nr.
p-MTOR (Ser2448)	Kaninchen	polyklonal	1:250	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, US	#2971
MTOR	Kaninchen	polyklonal	1:500	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, US	#2972
p-AKT (Ser473)	Kaninchen	monoklonal	1:250	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, US	#4060S
AKT	Kaninchen	polyklonal	1:250	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, US	#9272
p-MTOR (Ser2448)	Kaninchen	polyklonal	1:251	BioWorld, Atlanta, US	BS5026
ACTB	Maus	monoklonal	1:1000	SIGMA Aldrich, München, DE	A5441
HH3	Kaninchen	polyklonal	1: 1000	Abcam plc, Cambridge, UK	ab61251
HR23b	Maus	polyklonal	1: 500	Abcam plc, Cambridge, UK	ab88503
STAT1 p84/p91 (E-23)	Kaninchen	polyklonal	1:250	Santa Cruz Biotechnologies, Inc., Dallas, US	sc-346
p-STAT1 (Tyr 701)	Kaninchen	monoklonal	1:100	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, US	#9167
p-KIT (Tyr 719)	Kaninchen	polyklonal	1:250	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, US	#3391
BIM	Kaninchen	polyklonal	1:500	Acris Antibodies GmbH, Herford, DE	AP17900PU -N
hHR23b	Maus	polyklonal	1:400 (IHC)	Abcam plc, Cambridge, UK	ab88503
MTOR (7C10)	Kaninchen	monoklonal	1:250	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, US	#2983
MTOR	Kaninchen	polyklonal	1:250	Acris	APO6628PU -N
BCL2	Kaninchen	polyklonal	1:250	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, US	#2876
HPRT	Kaninchen	polyklonal	1:1000	Abcam plc, Cambridge, UK	ab10479

Verd.: Verdünnung, Nr.: Nummer, kDa: Kilodalton

Tabelle 12: sekundäre Antikörper.

Antigen	Spezies	Verd.	Hersteller
Anti-Kaninchen-IgG-HRP	Ziege	1: 1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Anti-Maus-IgG-HRP	Ziege	1: 1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, US
Anti-Maus-Ig-Biotin	Ziege	unverdünnt	Agilent Technologies, Santa Clara, US
Anti-Kaninchen-Ig-Biotin	Ziege	unverdünnt	Agilent Technologies, Santa Clara, US

Verd.: Verdünnung, Ig: Immunglobulin, HRP: *horse radish peroxidase*

3.12. MiRNAs

Tabelle 13: siRNAs und miRNAs.

miRNA/siRNA	Sequenz [5`-3`]	Hersteller
AllStars Hs Cell Death siRNA		Qiagen, Hilden, DE
AllStars Hs Negative Control siRNA		Qiagen, Hilden, DE
Hs_KIT-5 FlexiTube siRNA		Qiagen, Hilden, DE
Syn-hsa-miR-221-5q miScript miRNA Mimic	AGCUACAUUGUCUGCGGGUUC	Qiagen, Hilden, DE
Syn-hsa-miR-222-5q miScript miRNA Mimic	AGCUACAUCUGGCUAC UGGGU	Qiagen, Hilden, DE

3.13. Histon-Deacetylase Inhibitoren

Tabelle 14: Histon-Deacetylase Inhibitoren.

Inhibitor	Synonyme	Hersteller
Vorinostat	Zolinza®, SAHA	Selleck Chemicals LLC, Houston, US
Belinostat	Beleodaq®, PXD101	Selleck Chemicals LLC, Houston, US
Mocetinostat	MGCD0103	Selleck Chemicals LLC, Houston, US
Entinostat	MS-275	Selleck Chemicals LLC, Houston, US

3.14. Software und Datenbanken

Tabelle 15: Software und Datenbanken.

Software/Datenbank	Version	Bezugsquelle
3500 Data Collection Software	V 1.0	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
BioEdit Sequence Alignment Editor	7.0.5, 7.2.5	Ibis Therapeutics, Calsbad, US
Bio-Rad CFX Manager 2.1	2.1.1022.052 3	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
BLAST		http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
COSMIC (<i>catalogue of somatic mutations in cancer</i>)		http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/
DISCUS	32	Carl H. Hilgers Technisches Büro, Königswinter, DE
EndNote	X5	Thomson Reuters, New York, US

Software/Datenbank	Version	Bezugsquelle
Ensembl Genome Browser	Release 55, 56	http://www.ensembl.org
FileMaker 12.0	4	FileMaker GmbH, Unterschleißheim, DE
GIMP- GNU Image Manipulation Program	2.8.10	http://www.gimp.org/
GraphPad Prism 5	5.01	GraphPad Software, Ja Jolla, US
Human Genome Variation Society (HGVS) Guidelines		http://www.hgvs.org/
ImageJ	1.42	http://imagej.nih.gov/ij/
Image Lab™	3.0.1 (Beta 2)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Integrative Genomics Viewer	2.3.5 (6)	Broad Institute, Cambridge, US
Ion AmpliSeq™ Designer	2.1.1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Magellan™	V6.6	Tecan Group Ltd, Männedorf, CH
MARS	2.10 R3	BMG Labtech GmbH, Ortenberg, DE
MikroWin 2010	V50	Berthold Technologies GmbH & Co KG, Bad Wildbad, DE
MiRanda	September 2008, August 2010	http://www.microrna.org
NanoDrop 2000c	1.4.2	VWR International GmbH, Radnor, US
NCBI / Pubmed		http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Office Softwarepaket	2007, 2013	Microsoft, Unterschleißheim
OPTIMA	V5.01	BMG Labtech GmbH, Ortenberg, DE
Primer3	4.0.0	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
REST	2008 V2.0.7	http://www.gene-quantification.net/rest.html
Sequence Analysis Software	V54	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
SPSS Statistics	22	IBM Corp., New York, US
TargetScan	5.1, 6.2	http://www.targetscan.org

3.15. Patientenkollektiv

Zur immunhistochemischen Analyse der HR23b Expression wurde ein Kollektiv aus 523 klinischen Proben (312 Sarkome und 211 gastrointestinale Stromatumoren) zusammengestellt. Folgende Entitäten wurden analysiert: Gastrointestinale Stromatumoren (GIST), gut differenzierte Liposarkome (WDLS), dedifferenzierte Liposarkome (DDLs), pleomorphe Liposarkome (PLS), myxoide Liposarkome (MLS), Leiomyosarkome (LMS), Angiosarkome (ASA), synoviale Sarkome (SS), maligne periphere Nervenscheidewandtumore (MPNST) und nicht differenzierte pleomorphe Sarkome (vorherige Bezeichnung: maligne fibröse Histiozytome, MFH). Diagnostiziert wurden diese Tumore von erfahrenen, auf Sarkome spezialisierten Pathologen (Prof. Dr. med. Hans-Ulrich Schildhaus, Universitätsklinikum Göttingen; PD Dr. med. Wolfgang Hartmann, Universitätsklinikum Münster); Prof. Dr. med. Eva

Wardelmann, Universitätsklinikum Münster und Prof. Dr. med. Reinhard Büttner, Universitätsklinikum Köln). Die GISTs wurden nach Miettinen und Lasota klassifiziert [37]. Molekularpathologische Diagnostik (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zur Detektion der *MDM2*-Translokation und *MYC*-Amplifikation sowie Mutationsanalysen) wurden den Tumorentitäten entsprechend durchgeführt. Die patientenspezifischen Informationen sind am Universitätsklinikum Köln, im Institut für Pathologie in Patientendatensystem hinterlegt.

4. Methoden

4.1. Molekularbiologische Methoden

4.1.1. Extraktion von Nukleinsäuren

Die genomische DNA aus kultivierten Zellen wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, DE) extrahiert. Hierfür wurden die 80-90% konfluenten Zellen einer 75 cm² großen Zellkulturflasche pelletiert (Abschnitt 4.2.2). Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert. 100 µl dieser Suspension wurden mit je 100 µl AL-Puffer und 10 µl Proteinase K (20 ng/µl) gemischt. Nach Inkubation (10 Min., 56 °C) wurden die lysierten Zellen zentrifugiert (1 Min., 13000 rpm, 21 °C). Die weitere Aufreinigung erfolgte automatisiert mit dem BioRobot M48 (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die DNA wurde in 150 µl TRIS-HCl (pH 7,6) eluiert.

4.1.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration einer DNA- oder RNA-Probe wurde spektrophotometrisch mit dem Nanodrop ND-2000c (VWR International GmbH, Radnor, US) bestimmt. Dazu wurde die Absorption von 1 µl der zu untersuchenden Nukleinsäure bei 260 nm gemessen und mit einer Leerkontrolle (Medium, in dem die DNA gelöst ist) abgeglichen. Die Extinktion ist direkt proportional zur Nukleinsäurekonzentration. Eine optische Dichte von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA bzw. 40 µg/ml für einzelsträngige RNA. Parallel hierzu wurde bei einer Absorption von 230 nm und 280 nm der Reinheitsgrad der Nukleinsäure bestimmt. Der Quotient aus OD_{260/280} gibt die Verunreinigung der Nukleinsäurelösung mit Proteinen an, da Proteine ihr maximales Absorptionsspektrum bei 280 nm haben. Dieser Wert sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Organische Lösungsmittel haben ihre maximale Absorption bei 230 nm. Daher kann durch den Quotienten OD_{260/230} die Verunreinigung mit Lösungsmitteln bestimmt werden. Dieser Wert sollte bei >1.8 liegen.

Fluoreszenzbasierte Konzentrationsbestimmung

Bei der fluoreszenzbasierten Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren bindet ein Fluoreszenzfarbstoff mit einer hohen Affinität an die Nukleinsäure. Hierbei ist die Art des eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffes spezifisch für die Nukleinsäure (dsDNA, ssDNA, RNA), die detektiert werden soll. Nach Bindung des Farbstoffmoleküls an die DNA wird der Fluoreszenzfarbstoff mit einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt und es entsteht ein Fluoreszenzsignal, das direkt proportional zur Konzentration der DNA ist. Diese Messung ist sensitiver als die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung und wurde in der

vorliegenden Arbeit zur Konzentrationsbestimmung im Rahmen der Parallelsequenzierung verwendet. Für die Quantifizierung wurde jeweils 1 µl DNA eingesetzt und die Messung mit dem Quant-iT™ dsDNA HS Assay im Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific inc.) nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.1.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) werden kleinste Mengen DNA selektiv und exponentiell amplifiziert. Diese Methode basiert auf der enzymatischen Vermehrung eines spezifischen, bekannten Genabschnitts zwischen zwei Oligonukleotiden (Primern), die gegenläufig an die komplementäre DNA binden. Die PCR läuft in drei wesentlichen, zyklisch sich wiederholenden Schritten ab: Trennung der komplementären Doppelstränge durch kurzzeitiges Erhitzen bei 94 °C (Denaturierung), komplementäre Primeranbindung an die DNA bei 40–60 °C (Annealing) und Neusynthese der komplementären Stränge bei 72 °C (Elongation). Durch die zyklische Wiederholung dieser Schritte wird der spezifische DNA-Abschnitt nach dem dritten Zyklus exponentiell vermehrt.

Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer (0.05 µmol, entsalzt, SIGMA Aldrich, München, DE) wurden über die Primer 3 Software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, v. 4) entworfen. Hierbei ist zu beachten, dass die Primer für eine gute Stabilität, Spezifität und Funktion 18 bis 24 Nukleotide lang sein sollten und keine repetitiven oder gegenseitig komplementäre Sequenzen aufweisen. Außerdem ist zu beachten, dass keine Pseudogene amplifiziert werden.

Bei der Durchführung der PCR wurden jeweils eine Positivkontrolle (humane genomische DNA aus Zelllinien, 1 µl) und eine Leerkontrolle (H₂O, 1 µl) mitgeführt. Die Reaktionen wurden mit dem T3000 Thermocycler durchgeführt (Analytik Jena AG, Jena, DE). Die Protokolle für die verschiedenen PCR-Ansätze sind nachfolgend aufgeführt.

Tabelle 16: PCR-Bedingungen für die Amplifikation von *KIT*.

Volumen [μ l]	Komponenten	PCR-Programm	
5	10x Puffer (Invitrogen)	94 °C	3`
1.5/2.5	MgCl ₂ (Invitrogen, 50 mM)		
1	dNTP Mix (Fermentas, 10 mM)	94 °C	40 sec
1	F-Primer (10 pmol/ μ l)	57 °C	40 sec 40 Zyklen
1	R-Primer (10 pmol/ μ l)	72 °C	35 sec
0.2	Platinum-Taq (Invitrogen, 5 U/ μ l)		
X	Template		
X	H ₂ O (ad 50 μ l)	72 °C	5`

KIT Exon 11 und 13, *KIT* Exon 17, F: Forward, R: Reverse

4.1.4. Analyse von PCR-Produkten

Nach erfolgter PCR wurden alle Proben auf der QIAxcel[®] Kapillarelektrophorese (Qiagen) nach Herstellerangaben analysiert. Hiermit wurde überprüft, ob die Amplifikate die gewünschte Größe aufweisen (*KIT* Exon 11: 232 bp, Exon 13: 246 bp und Exon 17: 272 bp). Außerdem wurde die Qualität der Amplifikation überprüft. Die Kontrollen wurden ebenfalls elektrophoretisch auf Amplifikate überprüft.

4.1.5. DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode

Im Anschluss an die PCR wurden die PCR-Amplifikate zur Abtrennung überschüssiger Salze, Puffer und Oligonukleotide mit Exonuclease I und FastAP[™] thermosensitiver alkalischer Phosphatase (Thermo Fisher Scientific Inc.) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Die Bestimmung der Basenabfolge wurde mit Hilfe der Kettenabbruchmethode durchgeführt [182]. Sie beruht auf der enzymatischen Synthese von DNA-Strängen, die an einem modifizierten Nukleotid abbrechen. Diese modifizierten Nukleotide sind jeweils unterschiedlich fluoreszenzmarkierte 2', 3'-Dideoxynukleosidtriphosphate (ddNTP), denen an der 3' Position ihrer Desoxyribose die Hydroxylgruppe für die Verlängerung des neu zu synthetisierenden Stranges fehlt. Da der Abbruch an jeder Stelle der Sequenz stattfinden kann und pro Ansatz nur ein Primer hinzugefügt wird, entstehen Amplifikate unterschiedlicher Länge, die anschließend in einer hochauflösenden Kapillarelektrophorese der Größe nach sortiert und mittels Fluoreszenzsignal detektiert werden können. Diese Abfolge der Fluoreszenzsignale wird in eine Basenabfolge umgesetzt und als Chromatogramm ausgegeben.

Für die Sequenzierung wurde das BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) nach Herstellerangaben verwendet. Die PCR-Bedingungen sind nachfolgend

aufgeführt und die Amplifikation wurde mit dem T3000 Thermocycler (Analytik Jena AG) durchgeführt.

Tabelle 17: Bedingungen für die Sequenzierungs-PCR.

Volumen [μ l]	Komponenten	PCR-Programm	
2	5 x Sequenzierungspuffer	96 °C	5 Min.
0,5	BigDye Terminator Ready Reaction Mix		
1	Primer (10 pmol/ μ l) F oder R	96 °C	15 Sek.
X	DNA (3 bis 10 ng)	55 °C	15 Sek. 25 Zyklen
X	Wasser (ad 20 μ l)	72 °C	40 Sek.
		60 °C	4 Min.
		10 °C	∞

F: *Forward*, R: *Reverse*

Nach erfolgter Amplifikation wurde der Sequenzieransatz erneut aufgereinigt, um überschüssige Salze, Puffer und Oligonukleotide zu entfernen. Dies erfolgte mit dem BigDye XTerminator[®] Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) nach Herstellerangaben. Die Auftrennung erfolgte mit dem 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc.) nach Herstellerangaben. Die generierten Sequenzen wurden mit einer Referenzsequenz (ENST00000288135, <http://www.ensembl.org/index.html>) verglichen und Mutationen nach der HGVS-Datenbank (<http://www.hgvs.org/>) beschrieben.

4.1.6. Massive Parallelsequenzierung (NGS)

Die massive Parallelsequenzierung ermöglicht die parallele Analyse vieler verschiedener Gene bei einer hohen Anzahl von Proben simultan in einem Sequenzierlauf. Sie zeichnet sich durch eine höhere Sensitivität gegenüber der traditionellen Kettenabbruchmethode aus und ist wesentlich schneller, wenn man eine Vielzahl an Genen analysiert.

Die Parallelsequenzierung (*next generation sequencing*, *NGS*) wird in vier wesentliche Schritte unterteilt:

1. Herstellung der Fragmentbibliothek (Library)
2. Amplifikation der Bibliothek
3. Klonale Amplifikation und Sequenzierung der Proben
4. Datenanalyse.

1. Herstellung der Fragmentbibliothek

Die DNA wurde zunächst wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, quantifiziert. Für die Multiplex-PCR wurden zwei verschiedene Oligonukleotidpanel (Ion AmpliSeq™ Custom DNA Panel) verwendet (Thermo Fisher Scientific Inc.). Das Design erfolgte mit Hilfe des Ion AmpliSeq™ Designer (Thermo Fisher Scientific Inc.). Das erste Panel sollte spezifisch Mutationen detektieren, die in GISTs beschrieben sind und umfasst 132 Amplikons, die aufgeteilt wurden in zwei Primerpools (Pool 1: 69 Amplikons und Pool 2: 63 Amplikons). Das zweite Primerpanel umfasste mehr Gene, so dass auch bisher bei GISTs unbekannte Mutationen in verschiedenen Genen detektiert werden konnten. Dieses Panel umfasste 632 Amplikons (Pool 1: 319 Amplikons und Pool 2: 313). Jedes Oligonukleotid lag in einer Endkonzentration von 400 nM vor. Die Sequenzen können Tabelle 31 und Tabelle 32 im Anhang entnommen werden.

Für die Multiplex-PCR wurde die DNA auf eine Konzentration von 21 ng mit TRIS-HCl (pH 7.6) verdünnt und mit dem Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 nach Herstellerangaben amplifiziert (Thermo Fisher Scientific Inc.). Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 18 aufgeführt. Die Amplifikation wurde im C1000™ Thermal Cycler (BIO-RAD laboratories GmbH, München, DE) durchgeführt.

Tabelle 18: PCR-Bedingungen für die Ion AmpliSeq™ Multiplex PCR. Das Volumen war abhängig von der Konzentration der DNA. Bei ausreichender DNA-Konzentration wurde der kleine Ansatz durchgeführt, bei unzureichender DNA-Konzentration der große.

Volumen [µl]	Komponenten	PCR-Programm		
2 oder 4	Ion AmpliSeq™ Custom DNA Panel Pool ½ (je 400 nM)	99 °C	2`	
5 oder 10	5 X Ion AmpliSeq™ HiFi Master Mix			
X	DNA (21 ng)	99 °C	15 sec	29 Zyklen
X	Wasser (ad 10 µl / ad 20 µl)	60 °C	40`	
		10 °C	∞	

Anschließend wurden die Fragmentgrößen mit dem QIAxcel (Qiagen) bestimmt. Diese sollten bei 125-175 bp liegen.

Für die weiteren Schritte wurde das Herstellerprotokoll modifiziert. Die Bibliotheksvorbereitung erfolgte mit dem Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) und NEXTflex™ Produkten (DNA Adenylation Module, DNA Barcodes - 48 und Primer Mix, BIOO Scientific, Austin, US).

Nach erfolgter Multiplex-PCR wurden glatte Enden (*blunt ends*) durch die Zugabe von 2 bzw. 4 μl FuPa-Enzym (je nach Volumen des ursprünglichen PCR-Ansatzes) nach dem Temperaturprofil in Tabelle 19 hergestellt.

Tabelle 19: Bedingungen für den FuPa-Verdau.

Thermoprofil	
50 °C	10`
55 °C	10`
60 °C	20`
10 °C	∞ (max. 1 h)

Hiernach erfolgte eine Aufreinigung. Die PCR-Produkte aus beiden Primerpools wurden zusammen pipettiert und mit 22 μl bzw. 35.5 μl Agencourt® AMPure® XP Beads gemischt (je nach Volumen der ursprünglichen PCR, Beckman Coulter, GmbH, Krefeld, DE). Nach 5 Min. Inkubation bei RT wurden die Proben auf eine Magnetplatte gestellt und weitere 5 Min. inkubiert bis der Überstand klar wurde. Die Amplifikate waren an die Beads gebunden und der Überstand wurde entfernt. Nach zwei Waschschrinen mit je 200 μl 80%igem Ethanol wurden die Proben 5 Min. bei RT getrocknet, um die letzten Ethanolreste verdampfen zu lassen. Anschließend wurden die PCR-Produkte in 17 μl H₂O eluiert.

Im nächsten Schritt wurden die Amplifikatenden adenyliert. Dies erfolgte nach den in Tabelle 20 aufgeführten Bedingungen.

Tabelle 20: Bedingungen für die Adenylierung.

Volumen [μl]	Komponente
4	NEXTflex™ Adenylation Mix
17	eluierte DNA

Thermobedingungen	
37 °C	30`

Anschließend wurden Adapter mit verschiedenen, 6-8 bp langen Identifikationsoligonukleotiden an die DNA-Fragmente ligiert (Tabelle 21). Diese Identifikationsoligonukleotide werden auch als Barcode bezeichnet und dienen der Probenrückverfolgung der einzelnen Probe nach erfolgter Parallelsequenzierung in einem Probenpool. Die Adapter enthalten zusätzlich eine universelle Sequenz, an die Primer für die abschließende Amplifikation der aufgereinigten Fragment-Bibliothek binden können. Über die Adaptoren werden die fertigen Bibliotheken bei der Sequenzierung an die *flow cell* gebunden (3. Sequenzierung der Proben).

Tabelle 21: Bedingungen für die Adapter-Ligation.

Volumen [µl]	Komponente
4	Switch Solution
2	BIOO BC Adapter
2	DNA-Ligase
20	Adenylierungsprodukt
2	H ₂ O

Thermoprofil	
22 °C	30`
72 °C	10`
10 °C	∞

Die durch den Barcode markierten Fragmente wurden erneut mit 54 µl Agencourt® AMPure® XP Beads aufgereinigt und in 42 µl H₂O eluiert.

Um eine Bibliothek mit den spezifischen Amplifikationsprodukten inklusive Barcode und Adapter zu erhalten, erfolgte eine Größenselektion der PCR-Produkte. Hierfür wurden 32 µl Agencourt® AMPure® XP Beads mit dem aufgereinigten PCR-Produkt gemischt und nach 5 Min. Inkubation auf eine Magnetplatte gestellt. Die Proben wurden weitere 5 Min. inkubiert, bis der Überstand klar wurde. Die gewünschten PCR-Produkte befanden sich nun im Überstand, der in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde.

2. Amplifikation der Bibliothek

Die aufgereinigten Fragmente dieser Bibliothek wurden für die massive Parallelsequenzierung erneut amplifiziert. Die Bedingungen können der Tabelle 22 entnommen werden. Hierbei wurden Primer verwendet, die universell an die Adapter binden, so dass nur Fragmente amplifiziert werden, an die ein Barcode inklusive Adapter gebunden ist.

Tabelle 22: Bedingungen für die Amplifikation der Bibliothek.

Volumen [µl]	Komponente
25	Platinum® PCR SuperMix High Fidelity
2	NEXTflex™ Primer Mix
23	PCR Produkt

PCR-Programm		
98 °C	2`	
98 °C	15 sec	10 Zyklen
60 °C	1`	
10°C	∞	

Anschließend wurden die Proben erneut mit je 50 µl Agencourt® AMPure® XP Beads aufgereinigt.

Die fertige DNA-Bibliothek wurde quantifiziert (Abschnitt 4.1.2) und die Fragmentgröße (ca. 300 bp) mittels QIAxcel überprüft. Für die massive Parallelsequenzierung wurden die Proben gepoolt und äquimolar auf 3 nM mit Elutionspuffer (Qiagen) verdünnt. Die Bibliothek wurde

durch Zugabe von 10 µl 0,2 N Natriumhydroxyd denaturiert und auf 1,5 nM verdünnt. Nach 5 Min. Inkubation bei RT wurde die Bibliothek mit 980 µl HT1-Puffer auf eine Konzentration von 30 pM verdünnt. Dieser sowie alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. 500 µl dieser 30 pM Verdünnung wurden mit 500 µl HT1-Puffer auf 15 pM verdünnt. 30 µl dieser Verdünnung wurden durch 30 µl 15 nM PhiX Kontrolle ersetzt.

3. Sequenzierung der Proben

Für die massive Parallelsequenzierung wurden 600 µl dieses äquimolaren Bibliothekspools in eine 300 Zyklen MiSeq® v2 Kartusche überführt. Die Sequenzierung erfolgte auf dem MiSeq™ nach Herstellerangaben (Illumina Inc., San Diego, US).

Die ssDNA Bibliothek wird hier *paired-end*, d.h. vom 3`- und vom 5`-Ende sequenziert. Dies findet an einer Glasoberfläche, der *flow cell*, statt. Auf der Oberfläche der *flow cell* befindet sich eine Vielzahl aus kovalent gebundenen, einzelsträngigen Oligonukleotiden. An diese Oligonukleotide binden die Adaptoren der ssDNA der hergestellten Bibliothek. Es folgt die sogenannte Brückenamplifikation (*bridge amplification*). Hierbei werden die gebundenen Moleküle über eine Polymerase verlängert. Die dsDNA wird denaturiert und das Original-Oligonukleotid wird durch einen Waschschrift entfernt. Die neu synthetisierten ssDNA-Stränge binden kovalent an benachbarte, komplementäre Oligonukleotide auf der *flow cell* und bilden so eine Brücke. Durch Zugabe einer Polymerase wird der komplementäre DNA-Strang neu synthetisiert. Die doppelsträngige Brücke wird erneut denaturiert und es entstehen zwei einzelsträngige Kopien des Original-Fragmentes. Dieser Zyklus aus Denaturierung und Elongation wird solange wiederholt, bis zufällig verteilte, klonal amplifizierte Cluster der Fragmente auf der *flow cell* entstanden sind.

Diese Cluster werden anschließend sequenziert. Dazu hybridisiert zunächst ein Sequenzieroligonukleotid an die Adaptersequenz, das die schrittweise Sequenzierung (*Sequencing by synthesis*) initiiert. In jedem Zyklus werden vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierte NTPs, die ein Terminierungsmolekül tragen, auf die *flow cell* gegeben. Durch eine Polymerase werden reversibel die NTPs eingebaut. Das Fluoreszenzsignal wird mit Hilfe einer Kamera festgehalten. Anschließend werden das Terminierungsmolekül sowie das Fluoreszenzmolekül abgespalten und ein neues NTP kann eingebaut werden.

4. Datenanalyse

Eine Zuordnung der einzelnen Cluster zu den einzelnen Proben erfolgte über die Barcodes. Die Fluoreszenzaufnahmen der Cluster wurden im TIFF Format gespeichert. Die Abfolge der aufgenommenen Fluoreszenzsignale wurde für jedes Cluster in eine Basenabfolge übersetzt (*Read*) und als FASTQ-Dateien exportiert. Die Auswertung erfolgte mit einer hauseigenen Software. Grundsätzlich wird das Sequenzierprodukt über verschiedene Algorithmen mit dem humanen Referenzgenom hg19 verglichen (*aligned*). Das Ergebnis des Alignments wird in einer BAM Datei ausgegeben und kann in die Software *Integrated Genomics Viewer* geladen werden, wo jede einzelne Probe visualisiert und ausgewertet werden kann [183]. Abweichungen von der Referenzsequenz werden als Varianten im Tabellenformat ausgegeben (*variant calling*) ebenso die Abdeckung der einzelnen Bereiche (*Coverage*). Die Auswertung der Daten wurde durch die Einbindung der Ergebnistabellen in das Datenbankprogramm FileMaker erleichtert.

4.2. Zellbiologische Methoden

4.2.1. Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden steril in 75 cm² Kulturflaschen mit Filterschraubverschluss und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre und 96%iger relativer Luftfeuchtigkeit bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 23: Kultivierungsbedingungen und Zellzahl für die *in vitro* Versuche.

Zelllinie	Kulturmedium	Split- verhältnis	Zellzahl pro Well einer 96-Well Platte
HUT78	RPMI + 10% FBS + 1% L-Glutamin	1: 30	5 x 10 ³
GIST882	RPMI + 20% FBS + 1% L-Glutamin	1: 4	2 x 10 ⁴
GIST-T1	DMEM + high Glucose + 10% FBS + 1% L-Glutamin	1: 20	4 x 10 ³
GIST48	IMDM + 10% FBS + 1% L-Glutamin	1: 5	7 x 10 ³
T778	RPMI + 10% FBS + 1% L-Glutamin	1: 40	1 x 10 ³
T449	RPMI + 10% FBS + 1% L-Glutamin	1: 30	5 x 10 ³
Fu-DDLS-1	RPMI + 10% FBS + 1% L-Glutamin	1: 20	5 x 10 ³
MLS1765	RPMI + 10% FBS + 1% L-Glutamin	1: 20	6 x 10 ³
MLS402	RPMI + 10% FBS + 1% L-Glutamin	1: 30	5 x 10 ³
SK-LMS-1	DMEM + 10% FBS + 1% L-Glutamin	1: 30	4 x 10 ³
SK-UT-1	MEM + 10% FBS + 1% L-Glutamin	1: 30	3 x 10 ³
HS-SY-II	DMEM + 10% FBS + 1% L-Glutamin	1: 20	5 x 10 ³
1273/99	F12 + 10% FBS + 1% L-Glutamin	1: 10	6 x 10 ³
SW982	DMEM + 10% FBS + 1% L-Glutamin	1: 20	6 x 10 ³
T265	DMEM + 10% FBS + 1% L-Glutamin	1: 20	3 x 10 ³
STS26T	DMEM + 10% FBS + 1% L-Glutamin	1: 20	3 x 10 ³
ST88-14	DMEM + 10% FBS + 1% L-Glutamin	1: 20	3 x 10 ³
SK-ES-1	McCoy's 5A + 10% FBS + 1% L-Glutamin	1: 10	6 x 10 ³
SK-N-MC	DMEM + 10% FBS + 1% L-Glutamin	1: 20	1 x 10 ³

4.2.2. Trypsinieren und Passagieren von Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wachsen alle adhären, mit Ausnahme von HUT78, die in Suspension wächst. Bei 80-90%iger Konfluenz der adhären Zellkultur wurden die Zellen nach Abnahme des Zellkulturüberstandes einmal mit 5 ml PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (Thermo Fisher Scientific Inc.) gewaschen. Zelltrümmer und restliches Medium wurden somit herausgewaschen. Dies ist für das anschließende Ablösen der Zellen von der Kulturoberfläche mit 2 ml Trypsin-EDTA (0.05%, Thermo Fisher Scientific Inc.) besonders wichtig, da Serumbestandteile des Mediums diesen Vorgang behindern. Trypsin ist eine Serinprotease, die Arginin und Lysin spaltet und so Zell-Zell-Kontakte und Fokalkontakte zerstört. EDTA komplexiert zweiwertige Kationen, die die

Membranproteine stabilisieren. Nach zwei- bis achtminütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen in 5 ml Medium suspendiert und für 3 Min. bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Suspensionszellen wurden durch Zentrifugation (3 Min., 3000 rpm) pelletiert und einmal mit 5 ml PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in frischem Medium resuspendiert. Je nach Zelllinie wurde unterschiedliches Volumen eingesetzt, um die optimale Verdünnung zu erreichen. Dieser Vorgang wurde je nach Zelllinie alle vier bis zehn Tage durchgeführt.

4.2.3. Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Zur dauerhaften Lagerung der Zelllinien wurden die Zellen als Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurden die Zellen wie unter 4.2.2 beschrieben trypsiniert und pelletiert. Die Zellen einer 75 cm² Zellkulturflasche wurden in 3 ml des entsprechenden Mediums + 10% FBS (Thermo Fisher Scientific Inc.) resuspendiert und auf drei Aliquots aufgeteilt. Das Einfrieren der Zellen erfolgt zunächst über Nacht im Gefrierbehälter Mr. Frosty™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) im -20 °C Gefrierschrank, wodurch Kühlraten von -1 °C/Min. ermöglicht wurden. Anschließend wurden die Aliquots in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Zellaliquots möglichst schnell erwärmt, um mögliche Zellschädigung zu vermeiden. Das aufgetaute Aliquot wurde in 2 ml vorgewärmten Vollmedium aufgenommen. Nach Zentrifugation (3 Min., 3000 rpm) wurde das Einfrieremedium entfernt und das Zellpellet in 2 ml Medium resuspendiert und in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt.

4.2.4. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl für die verschiedenen *in vitro* Versuche wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. 50 µl Suspension wurden mit 50 µl Trypanblau (Verdünnung 1:2) gemischt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der selektiv in Zellen mit geschädigter Membran eindringt. Dadurch wurden tote von lebenden Zellen unterschieden. Die gefärbte Zellsuspension wurde in die Zählkammer pipettiert. Die ungefärbten Zellen wurden unter einem Mikroskop mäanderförmig in fünf Großquadraten ausgezählt und der Mittelwert pro Großquadrat bestimmt. Unter Einbeziehung der Kammerkonstanten und der Verdünnung mit Trypanblau ergibt sich folgende Formel zur Berechnung der Zellzahl/Milliliter:

$$(\text{Anzahl der Zellen/Großquadrat}) \times 2 \times 10000 = \text{Anzahl der Zellen/ml}$$

4.2.5. Transiente Transfektion

Die Transfektion bezeichnet ein Verfahren, um fremde Nukleinsäuren in Zellen einzubringen. Dabei kann die Nukleinsäure nur vorübergehend in die Zelle eingebracht werden (transient) oder dauerhaft in das Genom der Zelle integriert werden (stabil).

Die in dieser Arbeit durchgeführte transiente Transfektion erfolgte mittels Lipofectamine[®] 2000 (GIST-T1 Zelllinie) bzw. Lipofectamine[®] RNAiMAX (alle anderen Zelllinien, Thermo Fisher Scientific Inc.). Hierbei kommt es zur Komplexierung der DNA mit kationischen Lipidvesikel, die mit der Zellmembran fusionieren und so die Nukleinsäure ins Zellinnere bringen. Lipofectamine[®] 2000 wurde für die GIST-T1 Zelllinie verwendet, da Lipofectamine[®] RNAiMAX, das eine höhere Transfektionseffizienz aufweist, für diese Zelllinie zu zytotoxisch war.

Für die Transfektion wurden Zellen in geeigneter Zellzahl pro Transfektionsansatz ausgesät (Tabelle 23). Nach 24 h erfolgte die Transfektion der miRNA bzw. siRNA mit einer Endkonzentration von 100 nM. Für die funktionellen Analysen der miR-221 und miR-222 in GISTs wurden jeweils eine unspezifische Negativkontrolle (AllStars Hs Negative Control siRNA; N.C.), eine Apoptose induzierende siRNA (AllStars Hs Cell Death siRNA; P.C.), eine spezifische KIT siRNA (Hs_KIT-5 FlexiTube siRNA), Syn-hsa-miR-221-3q miScript miRNA Mimic, Syn-hsa-miR-222-3q miScript miRNA Mimic (Qiagen, Hilden, DE) und eine Kombination aus beiden miRNAs transfiziert und mit unbehandelten oder Lipofectamine[®] behandelten Zellen verglichen. Hierfür wurden bei Aussaat in einer 12-Well Platte 5 µl miRNA bzw. siRNA mit 100 µl Opti-MEM[®] I reduced Medium gemischt. Parallel wurden 4 µl Lipofectamine[®] mit 100 µl Opti-MEM[®] I reduced Medium gemischt und für 5 Min. bei RT inkubiert. Opti-MEM[®] I reduced Medium wurde verwendet, um eine erhöhte Transfektionseffizienz mit serumfreiem Medium zu erhalten. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt und weitere 20 Min. bei RT inkubiert. 200 µl dieses Gemischs wurden auf die Zellen gegeben.

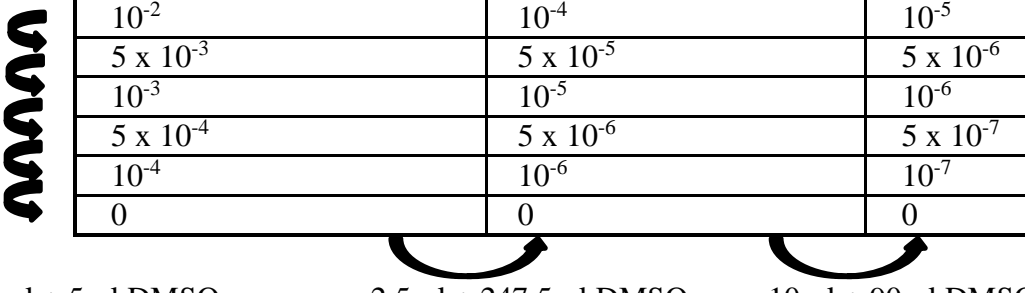
Bei einem Ansatz in einer 96-Well-Platte wurden 0,5 µl miRNA bzw. siRNA mit 25 µl Opti-MEM[®] I reduced Medium und 0,5 µl Lipofectamine[®] mit 25 µl Opti-MEM[®] I reduced Medium gemischt. 50 µl dieses Ansatzes wurden dann auf die Zellen gegeben. Nach sechs bis acht Stunden waren die Lipid-DNA-Komplexe zerfallen und das Medium wurde gewechselt.

4.2.6. Behandlung mit Histon-Deacetylase Inhibitoren

Zur Bestimmung der Sensitivität gegenüber HDAC-Inhibitoren wurden Sarkom- und GIST-Zelllinien mit verschiedenen Konzentrationen der HDACi Vorinostat, Belinostat, Mocetinostat und Entinostat (Selleck Chemicals LLC, Houston, US) behandelt. Alle Inhibitoren lagen in

DMSO gelöst vor. Um Eigeneffekte des DMSO ausschließen zu können, wurden die Inhibitoren zunächst auf ein 1000faches der gewünschten Konzentration verdünnt. Anschließend wurden die Inhibitoren 1: 100 in Medium verdünnt. 10 µl dieser Verdünnung wurden in den jeweiligen Ansatz zu 90 µl Medium pipettiert. Das Pipettierschema kann Tabelle 24 entnommen werden. Durch diese Verdünnungsschritte wurde sichergestellt, dass unabhängig von der eingesetzten Inhibitorkonzentration die gleiche Konzentration an DMSO vorliegt.

Tabelle 24: Pipettierschema zur Verdünnung der Histon-Deacetylase Inhibitoren.



1000fache Konzentration in DMSO [M]	10fache Konzentration in Medium [M]	1fache Konzentration im finalen Ansatz [M]
10^{-2}	10^{-4}	10^{-5}
5×10^{-3}	5×10^{-5}	5×10^{-6}
10^{-3}	10^{-5}	10^{-6}
5×10^{-4}	5×10^{-6}	5×10^{-7}
10^{-4}	10^{-6}	10^{-7}
0	0	0

5 µl + 5 µl DMSO 2,5 µl + 247,5 µl DMSO 10 µl + 90 µl DMSO

4.2.7. MTT-Proliferationsassay

Mit Hilfe des MTT-Proliferationsassays kann die Zellviabilität gemessen werden. Dieser Nachweis beruht auf der chemischen Reduktion des gelben, wasserlöslichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumsbromids (MTT) in ein blau violettes, wasserunlösliches Formazan [184]. Die Reduktion ist abhängig von den Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH. Die Menge des umgesetzten und gemessenen Farbstoffs korreliert somit mit der Glykolyserate der Zelle und damit mit der Viabilität der Zelle. Das Formazan wird mit einem geeigneten Detergenz aus den Zellen gelöst und photometrisch gemessen.

Für den MTT-Proliferationsassay wurde eine geeignete Zellzahl ausgesät (Tabelle 23). Der Versuch wurde in Quintuplikaten durchgeführt. Nach 24 h wurden die Zellen mit miRNA bzw. siRNA transfiziert oder mit dem entsprechenden HDAC-Inhibitor behandelt. Nach 0, 24, 48 und 72 h wurde die Zellviabilität mittels MTT bestimmt. Pro Well wurden 10 µl der MTT-Stocklösung zugegeben (Abschnitt 3.6) und mindestens fünf Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 5%igem CO₂ und 96%iger Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden 100 µl MTT-Solvent hinzugefügt und über Nacht unter gleichen Bedingungen inkubiert, um entstandene Formazankristalle zu lösen. Die photometrische Messung erfolgte bei 550 nm im Mikroplattenlesegerät Infinite F50 (Tecan, Männedorf, CH). Der Hintergrund wurde bei 690 nm gemessen und subtrahiert. Die

gemessene Viabilität der einzelnen Transfektionsansätze wurde gegen die der N.C. zum Zeitpunkt 0 h normalisiert.

4.2.8. ApoTox-GloTM Triplex Assay

Um die antiproliferativen Effekte zu verifizieren und weiter zu analysieren, wurde der ApoTox-GloTM Triplex Assay (Promega, Madison, US) durchgeführt. Dieser Nachweis ermöglicht die Messung von Viabilität, Zytotoxizität und Apoptose aus einem Zellkultur-Ansatz. Bei der Messung der Viabilität wird die Enzymaktivität einer intrazellulär exprimierten Protease gemessen. Diese Protease spaltet das Substrat Glycyl-Phenylalanylaminofluorocoumarin (GF-AFC) in das fluoreszierende Produkt AFC. Die Menge des Fluoreszenzsignals korreliert mit der Viabilität der Zellen.

Bei der Zytotoxizitätsmessung wird ebenfalls eine Protease gemessen, die nach Verlust der Membranintegrität aktiviert wird und damit ein Indikator für die zytotoxische Wirkung einer Substanz ist. Diese Protease spaltet das Substrat Bis-Alanylalanyl-Phenylalanyl-Rhodamine 110 (BIS-AAF-R110) in das fluoreszierende Produkt R110. Da beide Fluoreszenzsignale unterschiedliche Wellenlängen haben, wurden sie parallel im Fluorimeter gemessen (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech GmbH, Ortenberg, DE).

Bei der Apoptosemessung wird die Enzymaktivität der Caspasen 3 und 7 gemessen. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die ihr Peptid C-Terminal vom Aspartat spalten. Die Caspasen 3 und 7 gehören zu den Effektorcaspasen, die am Ende einer proteolytischen Signalkaskade Apoptose induzieren. Die Aktivität dieser beiden Caspasen ist damit proportional zur Apoptoseinduktion. Die Caspasen spalten das mit Rhodamin 110 markierte Substrat DEVD-Tetrapeptid (Z-DEVD_R110). Das Spaltprodukt dient der hitzestabilen *Ultra-GloTM Recombinant Luciferase* als Substrat. Das entstandene Luciferasesignal wurde im Centro LB 960 Luminometer (Bertold Technologies, Pforzheim, DE) gemessen.

Der ApoTox-GloTM Triplex Assay wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls in Quintuplikaten durchgeführt. Eine geeignete Zellzahl (Tabelle 23) wurde in einer 96-Well Platte für jeden Versuchsansatz ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Transfektion der miRNAs bzw. siRNAs oder die Behandlung mit den HDAC-Inhibitoren. Nach weiteren 24, 48 und 72 h wurde der zelluläre Effekt mittels ApoTox-GloTM Triplex Assay nach Herstellerangaben gemessen. Die Inkubationszeiten betragen jeweils eine Stunde.

4.3. Histologische Methoden

4.3.1. Fixierung von Zellpellets mit Formaldehyd und Einbettung in Paraffin

Um die kultivierten Zelllinien histologisch untersuchen zu können, wurden die Zelllinien in 4%igem, gepufferten Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Dadurch können Färbungen an Zelllinien mit denen anderer formaldehydfixierter/paraffineingebetteter Proben verglichen werden. Hierfür wurden die Zelllinien von mindestens vier 75 cm² Zellkulturflaschen pelletiert und mit PBS gewaschen (vgl. 4.2.2). Zur Fixierung wurden die Zellen vorsichtig mit 4%igem, gepufferten Formaldehyd überschichtet und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Formaldehyd vorsichtig abgenommen und das Pellet mit Eosin angefärbt. Nach Einbettung in Agar wurde das Pellet entwässert, um es anschließend in Paraffin einzubetten.

4.3.2. Herstellung von Zytospins

Alternativ zur Fixierung von Zellpellets mit Formaldehyd und Einbettung in Paraffin können Zytospinpräparate hergestellt werden. Hierfür wurden die kultivierten Zelllinien, wie unter 4.2.5 beschrieben, behandelt und nach 48, wie unter 4.2.2 beschrieben, trypsiniert. Die Zellpellets wurden in je 1 ml PBS resuspendiert. 100 µl je Ansatz wurden in die Zytospin-Trichter pipettiert und durch anschließende Zentrifugation (10 Min., 1000 rpm) auf die Objektträger gebracht. Die Zytospins wurden bei RT an der Luft getrocknet und 10 Min. mit 2-Methylaminomethanol fixiert.

4.3.3. Herstellung von Tissue Microarrays

Der *Tissue MircoArray* (TMA) bietet den Vorteil, dass man viele Proben parallel histologisch und immunhistochemisch bearbeiten kann und somit Zeit und Geld sparen kann. Hierfür werden verschiedene, ausgestanzte Gewebszylinder in einem Paraffinblock zusammengesetzt. Die Größe einer Stanze liegt zwischen 0,6 und 2 mm Durchmesser, so dass bis zu 400 Proben in einem Paraffinblock untergebracht werden können.

Für die immunhistochemische Analyse der HR23b Expression in klinischen Proben wurden 11 Sarkom- und fünf GIST-TMAs angefertigt. Pro Tumorprobe wurden zwei repräsentative Stenzen angefertigt, die einen Durchmesser von 1,2 mm hatten.

4.3.4. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) werden fluoreszenzmarkierte Sonden zum Nachweis spezifischer Genabschnitte verwendet, die komplementär an diese Genregion binden. Die Auswertung erfolgt unter einem Mikroskop, daher müssen die Sonden eine Größe von >100 kb aufweisen, um die Signale detektieren zu können. Die Sonden ermöglichen einen

Nachweis von Amplifikationen, Deletionen und Translokationen auf histologischen Schnittpräparaten oder Zytospins (*in situ*).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sonden wurden alle über ZytoVision GmbH, Bremerhaven, DE bezogen (Tabelle 9). Beim Nachweis von Amplifikationen wurde zusätzlich zu der Sonde, die den gesuchten Genabschnitt spezifisch nachweist, eine Kontrollsonde mitgeführt. Dabei handelt es sich um zentromerspezifische Sonden (CEP-Sonden), die eine Beurteilung des Ploidiegrades des jeweiligen Chromosoms ermöglichen. Liegen zwei Signale im Zellkern vor, geht man davon aus, dass die Zelle diploid in Bezug auf das betreffende Chromosom ist. Liegen mindestens doppelt so viele Gensignale wie CEP-Signale vor, ist der der Genabschnitt amplifiziert. Liegen sowohl Gen- als auch CEP-Signale in erhöhter Anzahl vor, geht man von Polysomie aus. Amplifikation und Polysomie können hierbei parallel auftreten.

Zur FISH-Analyse wurden 2-3 µm dicke Paraffinschnitte der FFPE Zelllinien auf Adhäsionsobjektträgern verwendet. Zuerst erfolgte eine automatisierte Vorbehandlung der Präparate im VP 2000 Processor (Abbott Laboratories, Illinois, US), um die Zellkerne aufzuschließen. 9 µl der spezifischen Gensonde wurden mit 1 µl der CEP-Sonde gemischt und auf die Schnitte pipettiert. Die Präparate wurden luftdicht mit Fixogum abgedichtet und 10 Min. im HyBrite™ VYSIS (Abbott) inkubiert. Hierbei wurden sowohl die Sonden als auch die chromosomale Ziel-DNA denaturiert. Die Denaturierungstemperatur ist abhängig von der Sonde und variierte zwischen 75 °C und 85 °C. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37 °C.

Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, folgte ein stringenter Waschschriff mit Post-Hybridisierungspuffer bei 76 °C im Wasserbad für zwei Minuten. Im Anschluss wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Zur Detektion der Zellkerne wurde mit DAPI gegengefärbt. Nach Auflegen eines Objektglases wurde das Präparat unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

4.4. Immunhistochemische Methoden

4.4.1. Immunhistochemische Färbungen

Für die immunhistochemischen HR23b Färbungen wurden 3 µm dünne Schnitte der TMAs am SM 2400 Mikrotom angefertigt (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE). Im Brutschrank wurden diese Schnitte über Nacht getrocknet, bevor sie durch Xylol entparaffiniert (2 x 10 Min.) und durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert wurden (2 x 100%iger Ethanol 10 Min., 1 x 96%iger Ethanol 5 Min., 1 x 80%iger Ethanol 5 Min., 1 x 70%iger Ethanol 5 Min.). Zur Optimierung der Färbung wurden die Schnitte in Citratpuffer, pH 6, eine halbe Stunde in der Mikrowelle bei 500 W gekocht. Dies dient der Zerstörung von Aldehydvernetzungen, die durch

die Fixierung mit Formaldehyd entstehen können. Nach 20 minütiger Abkühlung wurden die Schnitte in Wasser überführt und die Färbung dann semiautomatisch im Färbeautomaten Dako TechMate™ 500 (Agilent Technologies, Santa Clara, US) durchgeführt. Der polyklonale Primärantikörper gegen HR23b (Abcam plc., Cambridge, UK) wurde 1: 100 mit der REAL™ Antikörperverdünnungslösung verdünnt (Agilent Technologies). Dieses Färbeprotokoll basiert auf dem Protokoll von Yeo et al., 2012 [113]. Die gefärbten Schnitte wurden mit dem Eindeckmedium Aquatex (Merck KGaG, Darmstadt, DE) konserviert.

Die Auswertung der immunhistochemischen HR23b Färbung basiert auf der Publikation von Khan et al, 2010 [112]. Sowohl Färbeintensität als auch Anzahl der HR23b positiven Zellen wurden als unabhängige Parameter unter einem DM5500B Mikroskop bestimmt (Leica Microsystems, Wetzlar, DE). Es wurden folgende Bewertungskriterien für die Anzahl der gefärbten Tumorzellen definiert:

Tabelle 25: Kriterien für die Beurteilung der immunhistochemischen HR23b Färbung.

Anzahl der positiven Tumorzellen		Färbeintensität	
Anzahl [%]	Punktzahl	Intensität	Punktzahl
≤ 5	0	Negativ	0
5-25	1	Schwach	1
26-50	2	Mittel	2
51-75	3	Stark	3
76-100	4		

Da sowohl nukleäre als auch zytoplasmatische HR23b Färbung in der Literatur beschrieben sind [112, 185], wurde der Bewertungsscore von Yeo et al, 2012 so modifiziert, dass sowohl die nukleäre als auch die zytoplasmatische Färbung unabhängig voneinander beurteilt wurden. Beide Ergebnisse wurden addiert und eine Gesamtpunktzahl vergeben. Diese Gesamtpunktzahl wurde wie folgt definiert: 0 bzw. 1 Punkt: negativ, 2-7 schwache und 8-14 starke HR23b Färbung. Für die nachfolgenden statistischen Analysen wurde nur eine Gesamtpunktzahl von 8-14 als HR23b Positivität bewertet.

Die immunhistochemische KIT Färbung der Formaldehyd fixierten und in Paraffin eingebetteten Zelllinien und der 2-Methylaminomethanol fixierten Zytospins erfolgte nach demselben Prinzip. Für die immunhistochemische Färbung der Zytospins wurde jedoch die doppelte Antikörperkonzentration verwendet.

4.5. Proteinbiochemische Methoden

4.5.1. Proteinisolation aus kultivierten Zellen

Für die Proteinexpressionsanalysen nach miRNA/siRNA Transfektion und HDACi-Behandlung wurden Proteine aus Zellkulturzellen isoliert. Die in einer bestimmten Zellzahl ausgezählten und in Doppelansatz transfizierten Zellen wurden einmal mit kaltem PBS auf Eis gewaschen. Pro Well einer 12-Well Platte wurden dann 80 µl RIPA-Puffer zu den Zellen pipettiert. Mit einem Zellschaber wurden die adhärennten Zellen von der Kulturoberfläche abgelöst und eine Stunde bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Um die Effizienz der Proteinisolation zu erhöhen, wurde die Zellsuspension mit einer Spritze mit einer Surecan® Portkanüle (gerade 0,9 mm x 40 mm, Braun Melsungen AG, Melsungen, DE) manuell geschert. Das Lysat beider Ansätze wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammen pipettiert und 30 Min. bei 32000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Proteinüberstand wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C im Gefrierschrank eingefroren.

4.5.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) nach Herstellerangaben. Dieser Nachweis beruht auf der Biuret-Reaktion. Zweiwertige Kupferionen werden in alkalischer Lösung durch Proteine zu einwertigen Kupferionen reduziert, die wiederum mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex bilden. Die Absorption wird photometrisch bei 562 nm bestimmt.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde zunächst eine BSA-Standardreihe in RIPA-Puffer hergestellt (25-2000 µg/ml und Leerwert). Der Nachweis wurde in Doppelbestimmung durchgeführt und jeweils 25 µl 1:10 verdünnter Probe bzw. unverdünnter Standard eingesetzt. Nach 30 Min. Inkubation bei 37 °C wurde die Absorption in dem Mikroplattenlesegerät Infinite F50 (Tecan) gemessen.

4.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht [186]. Sie basiert auf einem diskontinuierlichen System, das aus denaturierenden, SDS-haltigen Sammel- und Trenngelen besteht. Beide Gele unterscheiden sich durch den pH-Wert, die Ionenstärke und die Porengröße. Im Sammelgel findet eine Fokussierung der Proteine statt, während im Trenngel die Auftrennung nach Molekulargewicht erfolgt.

In dieser Arbeit wurden fertige NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Protein Gele (Taschenbreite 1.5 mm, 15 Taschen, Thermo Fisher Scientific Inc.) verwendet. Die Proteine wurden zunächst mit

1 μl NuPAGE[®] Sample Reducing Agent und 4 μl Ladepuffer gemischt und 10 Min. bei 70 °C auf einem Schüttler inkubiert. Der Ladepuffer enthält Natrium-Dodecylsulfat (SDS), das die Eigenladung der Proteine abschirmt, so dass die Auftrennung ausschließlich auf Grund der Masse erfolgen kann. Das NuPAGE[®] Sample Reducing Agent enthält β -Mercaptoethanol, welches intra- und intermolekulare Disulfidbrücken reduziert, so dass sich die Proteine entfalten können. Die Proben wurden direkt gekühlt und zentrifugiert (13000 rpm, 1 Min., 4 °C). 30 μl Gesamtvolumen mit einer Menge von 35 μg Protein wurden in jede Tasche pipettiert. Taschen, die keine Probe enthielten, wurden mit Ladepuffer gefüllt. Zur Größenbestimmung wurden jeweils 5 μl HiMark[™] Pre-stained Protein Standard für große Proteine bis 460 kDa oder PageRuler Prestained Protein Ladder für Proteine bis 170 kDa mitgeführt (Thermo Fisher Scientific Inc., Abbildung 8). Die Gelelektrophorese wurde in einer Xcell SureLock[™] Elektrophoresekammer mit 1 x NuPAGE[®] MOPS SDS Running Buffer bei 100 V für bis zu drei Stunden (je nach Proteingröße) durchgeführt.

4.5.4. Westernblot Analyse

Bei dieser Analyse werden die aufgetrennten Proteine im elektrischen Feld auf eine Trägermembran übertragen und anschließend mittels spezifischer Antikörper detektiert.

Der Westernblot wurde in einer Mini-Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell Blotkammer (BIO-RAD Laboratories GmbH, München, DE) durchgeführt. Dabei wurden die Proteine auf eine Roti PVDF[™] Membran, 0,45 μm , transferiert (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE). Dies erfolgte 1,5 h bei 80 V mit frisch angesetzttem Transferpuffer nach Towbin (Abschnitt 28). Anschließend wurde die Membran eine Stunde in TBS-T + 5% BSA bei RT blockiert, um unspezifische Proteinbindungen zu maskieren. Nach dreimaligem stringenten Waschen mit TBS-T für je 5 Minuten wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem unmarkierten, primären Antikörper inkubiert (Antikörper verdünnt in TBS-T + 5% BSA). Nach erneutem Waschen der Membran erfolgte eine einstündige Inkubation bei RT mit dem sekundären Antikörper (Antikörper verdünnt in TBS-T + 5% Milchpulver). Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate[™] (Thermo Fisher Scientific Inc.) im ChemiDoc[™] XRS+ Fotoentwickler (BIO-RAD Laboratories GmbH, München, DE). Die graphische Darstellung der Westernblot Analyse erfolgte mit der Image Lab[™] Software (BIO-RAD laboratories). Mit Hilfe des GIMP- GNU Image Manipulation Programms wurden einzelne Banden ausgeschnitten und der Kontrast optimiert. Zur Quantifizierung der Proteinbanden wurden die Ergebnisse mittels der ImageJ Software normalisiert [187]. Als Bezugspunkt für die Beurteilung der Expression von HR23b diente die kutane T-Zell Lymphomzelllinie HUT78, deren

Expression 100% gleichgesetzt wurde. Eine HR23b Expression von 0-40% wurde als schwache Expression definiert, von 41-69% als moderat und die von 70-100% als hoch.

5. Ergebnisse

5.1. HR23b als prädiktiver Biomarker in Sarkomen

Bei Sarkomen ist die Resektion mit oder ohne anschließende Chemo- oder Strahlentherapie bei den meisten Subentitäten die einzige Therapieoption. Zielgerichtete, selektive Therapien sind nur bei wenigen Untergruppen etabliert (Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren in GISTs und MET Inhibitoren in alveolären Weichgewebssarkomen). Auf Grund von schlechten Ansprechraten bei der konventionellen Chemo- oder Strahlentherapie und der Resistenzentwicklung bei der zielgerichteten Therapie ist die Entwicklung alternativer Therapieoptionen essentiell. Histondeacetylase Inhibitoren (HDACi) stellen einen solchen potentiellen Therapieansatz dar. Aktuelle Studien haben gezeigt, dass HDACi basierte Therapien nicht nur in hämatogenen, sondern auch in soliden Tumoren zu einem klinischen Ansprechen führen [188, 189, 96, 99, 97, 98, 190]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Expression von HR23b ein prädiktiver Biomarker für die Sensitivität gegenüber HDACi in kutanen T-Zell Lymphomen ist [114, 112, 191, 113].

Um den Einfluss von HDACi in Sarkomen zu untersuchen, wurde zunächst ein Kollektiv aus 17 Sarkom- und GIST-Zelllinien zusammengestellt. Alle Zelllinien wurden mit vier verschiedenen HDACi (Vorinostat, Belinostat, Mocetinostat und Entinostat) behandelt und der Einfluss auf die zelluläre Proliferation und Apoptose konzentrations- und zeitabhängig untersucht. Hierbei wurde auch die HR23b Expression unter HDACi Behandlung analysiert. Die Bedeutung von HR23b als potentieller Biomarker für die HDACi Sensitivität in Sarkomen wurde durch eine Korrelation der IC₅₀-Werte der analysierten Zelllinien und der HR23b Expression überprüft. Zusätzlich wurde retrospektiv die HR23b Expression in einem Kollektiv aus 523 klinischen Sarkom- und GIST-Proben immunhistochemisch bestimmt.

5.1.1. Kollektivzusammenstellung der Zelllinien von Sarkomen und gastrointestinalen Stromatumoren

Zur Analyse der Sensitivität gegenüber HDACi in Sarkomen wurde ein Kollektiv aus 17 Sarkom- und GIST-Zelllinien zusammengestellt. Dieses Kollektiv besteht aus den in Tabelle 26 aufgeführten Entitäten.

Tabelle 26: Kollektivzusammenstellung der Zelllinien von Sarkomen und GISTs.

Entität	Zelllinie
Kutanes T-Zell Lymphom	HUT78
gastrointestinaler Stromatumor	GIST882
gastrointestinaler Stromatumor	GIST-T1
gastrointestinaler Stromatumor	GIST48
gut differenziertes Liposarkom	T778
gut differenziertes Liposarkom	T449
dedifferenziertes Liposarkom	Fu-DDLS-1
myxoides Liposarkom	MLS1765
myxoides Liposarkom	MLS402
Leiomyosarkom	SK-LMS-1
Leiomyosarkom	SK-UT-1
Synovialsarkom	HS-SY-II
Synovialsarkom	1273/99
Synovialsarkom	SW982
maligner peripherer Nervenscheidewandtumor	T265
maligner peripherer Nervenscheidewandtumor	STS26T
maligner peripherer Nervenscheidewandtumor	ST88-14
Ewingsarkom	SK-N-MC

Alle Zelllinien wurden auf ihre genetisch definierten Aberrationen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung oder Mutationsanalyse überprüft (Abbildung 9). In dieser Kollektion von Zelllinien sind die wichtigsten Sarkomentitäten vertreten, die bei Erwachsenen auftreten können. Die kutane T-Zell Lymphom Zelllinie diente als interne Kontrolle, da hier bereits eine Korrelation der hohen HR23b Expression und der Sensitivität gegenüber HDACi beschrieben wurde [114, 112].

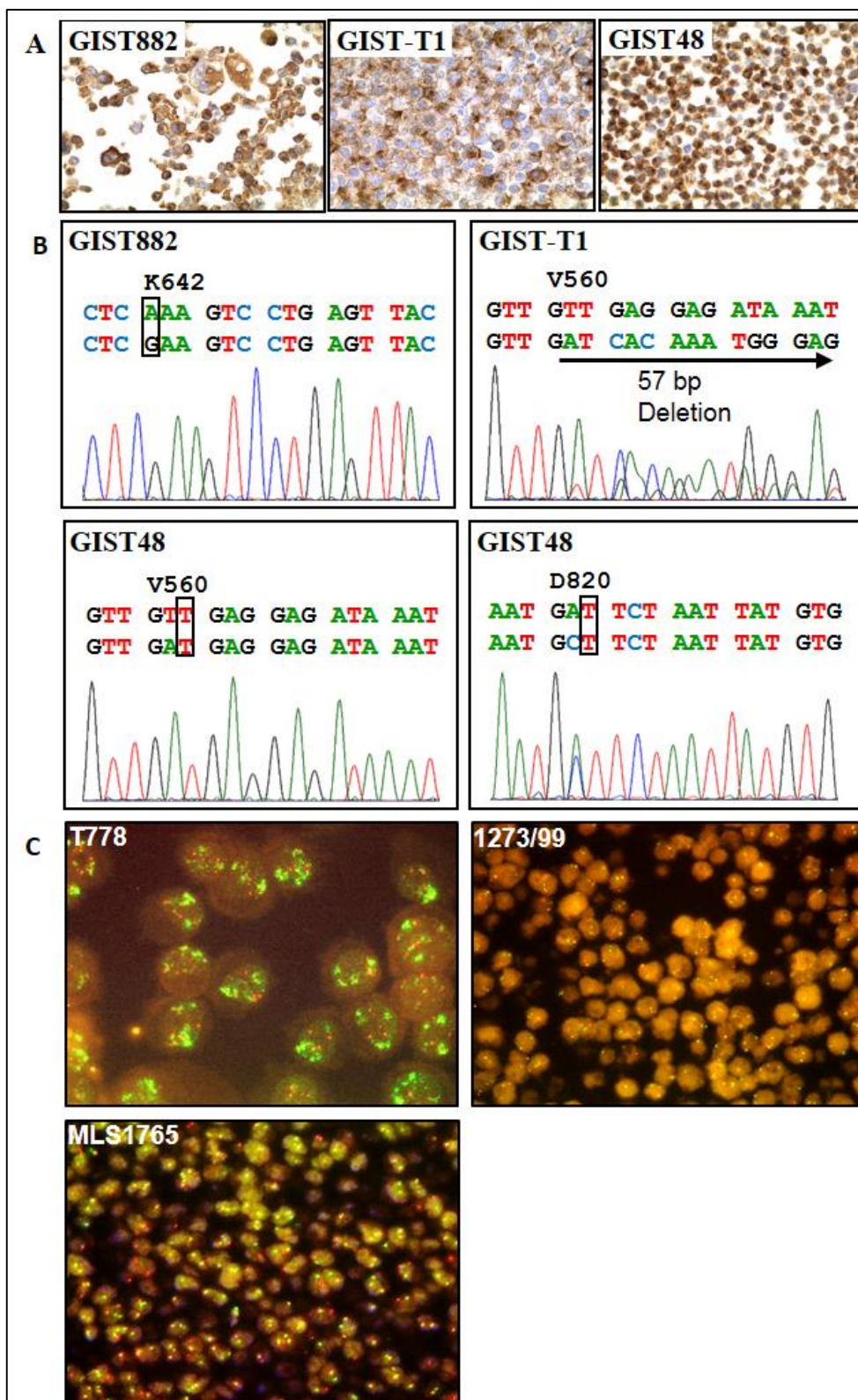


Abbildung 9: Genetische Alterationen der verwendeten Sarkom- und gastrointestinalen Stromatumor-Zelllinien. Alle GIST-Zelllinien wiesen eine positive, immunohistochemische KIT Färbung auf (A) und die beschriebenen genetischen Mutationen im *KIT* Gen (B). Die gut differenzierte Liposarkomzelllinie T778 wies die beschriebene *MDM2* Amplifikation auf (C), während die Synovialsarkomzelllinie 1273/99 durch eine *SYN-SYT* Translokation und die myxoide Liposarkomzelllinie MLS1765 durch eine *FUS-DDIT3* Translokation charakterisiert waren.

5.1.2. HR23b Expressionsanalysen im Zellkulturmodell

Zunächst wurde mittels Westernblot Analyse die Expression von HR23b in dem Kollektiv aus Sarkom- und GIST-Zelllinien bestimmt. Abbildung 10 zeigt, dass alle untersuchten Zelllinien HR23b exprimieren. Durch Verrechnung mit der Expression von ACTB wurde die HR23b Expression der Sarkomzelllinien normalisiert und anschließend in Bezug gesetzt zur Expression von HR23b der kutanen T-Zell Lymphomzelllinie HUT78 als Positivkontrolle. Dabei wurde letztere als 100% definiert.

Eine starke HR23b Expression wurde in der Zelllinie GIST48 (100%), der Synovialsarkomzelllinie HS-SY-II (99%), der myxoiden Liposarkomzelllinie MLS1765 (70%) und der dedifferenzierten Liposarkomzelllinie Fu-DDLS-1 (62%) detektiert. Eine mittlere bis geringe HR23b Expression wurde in der Zelllinie GIST882 (43%), der Ewingsarkomzelllinie SK-N-MC (35%) und der Synovialsarkomzelllinie 1273/99 (18%) beobachtet. Auf Grund dieser unterschiedlichen Werte für die HR23b Expression stellte dieses Kollektiv einen guten Ausgangspunkt für die weitere Analyse der HDACi Sensitivität in Sarkomen dar.

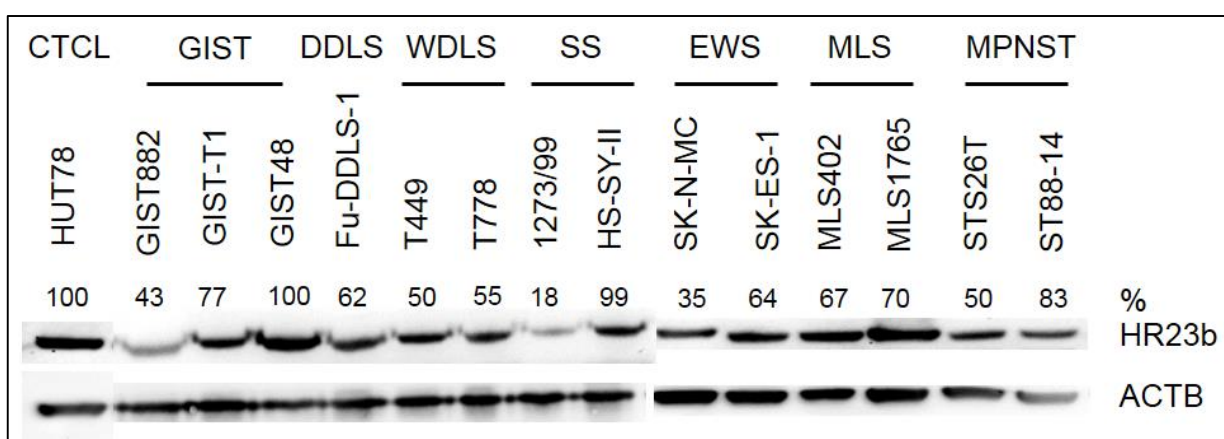


Abbildung 10: HR23b Expression in Sarkom- und gastrointestinalen Stromatumor-Zelllinien. Die Westernblot Analyse der HR23b Expression zeigt eine spezifische Bande bei 43 kDa und ein unterschiedliches Expressionslevel in den untersuchten Zelllinien. Durch Verrechnung mit der Expression von ACTB wurde die Expression von HR23b normalisiert und anschließend in Bezug gesetzt zur Expression von HR23b in der kutanen T-Zell Lymphomzelllinie HUT78 als Positivkontrolle. Dabei wurde die Expression von HR23b in dieser Zelllinie als 100% definiert.

5.1.3. Effekte von Histon-Deacetylase Inhibitoren auf die zelluläre Proliferation und Apoptose

Um eine Korrelation der HR23b Expression mit der Sensitivität gegenüber HDACi in Sarkom- und GIST zu analysieren, wurden die Zelllinien mit den vier verschiedenen HDACi Vorinostat, Belinostat, Mocetinostat und Entinostat behandelt. Zuerst wurden die zellulären Effekte auf die Proliferation in Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors mittels MTT Assay gemessen und die IC₅₀-Werte kalkuliert. Als sensitiv gegenüber HDACi wurden Zelllinien mit einem IC₅₀-Wert <0,5 definiert. Die Induktion von Apoptose in Abhängigkeit der Konzentration der HDACi-Behandlung wurde mittels ApoTox-Glo™ Triplex Assay gemessen. Zur Analyse der zeitabhängigen Effekte der HDACi wurde ebenfalls der ApoTox-Glo™ Triplex Assay 24, 48 und 72 h nach HDACi Behandlung durchgeführt.

Wie man in Tabelle 27 sehen kann, ist keine der untersuchten Zelllinien sensitiv gegenüber den vier analysierten HDACi. Zehn der 17 analysierten Sarkom- und GIST-Zelllinien waren sensitiv gegenüber Vorinostat mit IC₅₀-Werten zwischen 0,03 und 0,47 µM. Darunter waren alle vier Zelllinien, die eine starke HR23b Expression aufweisen, während keine der Zelllinien mit einer geringen HR23b Expression als sensitiv definiert werden konnte. Bei den Zelllinien mit einer moderaten HR23b Expression waren sechs von neun Zelllinien sensitiv gegenüber diesem HDACi. Sieben der 17 Sarkom- und GIST-Zelllinien wurden als sensitiv gegenüber Belinostat beurteilt (3/4 mit hoher HR23b Expression, 4/9 mit moderater und 0/4 mit geringer HR23b Expression). Bei der Behandlung mit Mocetinostat zeigten acht der 17 untersuchten Zelllinien einen IC₅₀-Wert <0,5 (2/4 mit hoher, 5/9 mit moderater und 1/4 mit geringer HR23b Expression). Nur zwei der untersuchten Sarkomzelllinien waren sensitiv gegenüber Entinostat (0/4 mit hoher, 2/9 mit moderater und 0/4 mit schwacher HR23b Expression).

Tabelle 27: IC₅₀-Werte der Histon-Deacetylase Inhibitoren Vorinostat, Belinostat, Mocetinostat und Entinostat in den untersuchten Sarkom- und GIST-Zelllinien.

Zelllinie	HR23b Protein- expression*	HDACi			
		Vorinostat IC ₅₀ [µM]	Belinostat IC ₅₀ [µM]	Mocetinostat IC ₅₀ [µM]	Entinostat IC ₅₀ [µM]
HUT78	hoch	0,03	0,05	0,08	0,06
GIST-T1	hoch	0,12	0,07	0,07	0,83
GIST882	moderat	0,39	0,08	0,37	0,72
GIST48	hoch	0,26	0,11	1,33	/
T778	moderat	0,47	/	0,06	0,04
T449	moderat	0,22	4,19	0,13	1,16
Fu-DDLS-1	moderat	0,57	3,27	9,14	0,08
MLS1765	moderat	0,56	0,94	0,55	1,3
MLS402	moderat	0,43	0,73	4,09	4,43
SK-LMS	gering	0,94	3,24	11,43	2,47
SK-UT-1	moderat	0,72	0,14	0,47	4,03
HS-SY-II	hoch	0,11	0,03	0,21	0,98
1273/99	gering	0,62	71,8	344,4	3,61
SW982	gering	0,81	2,67	3,77	/
T265	moderat	0,09	0,04	0,40	1,24
STS26T	moderat	0,44	0,42	0,98	570,5
ST88-14	hoch	0,22	0,61	3,65	55,57
SK-N-MC	gering	0,67	90,78	0,13	3,37

Zelllinien mit einem IC₅₀-Wert <0.5 wurden als sensitiv gegenüber HDACi definiert (fett markiert). *HR23b Expressionslevel wurde mittels Westernblot Analyse bestimmt. Normalisierte HR23b Expression wurde als gering (0-40%), moderat (41-69%) oder hoch (70-100%) definiert. /: keine Daten konnten erhoben werden, da kein sigmoidaler Kurvenverlauf angenähert werden konnte.

Die Positivkontrolle, die kutane T-Zell Lymphomzelllinie HUT78 zeigte im MTT Proliferationsassay die stärkste Reduktion der zellulären Proliferation in Abhängigkeit der HDACi-Konzentration (Abbildung 11 A). Unter den Zelllinien mit moderater Expression von HR23b wies die Zelllinie GIST882 eine Sensitivität gegenüber drei von vier HDACi auf, war aber weniger sensitiv als die Positivkontrolle. Die dedifferenzierte Liposarkomzelllinie Fu-DDLS-1 zeigte besonders unter Behandlung mit Entinostat eine starke Reduktion der zellulären Proliferation. Die gut differenzierte Liposarkomzelllinie T778 war sensitiv gegenüber allen HDACi außer Belinostat bei einer mittleren, relativen Expression von HR23b. Bei den Zelllinien mit einer geringen Expression von HR23b zeigten die Ewingsarkomzelllinie SK-N-MC und die Synovialsarkomzelllinie 1273/99 das schlechteste Ansprechen auf alle vier HDACi.

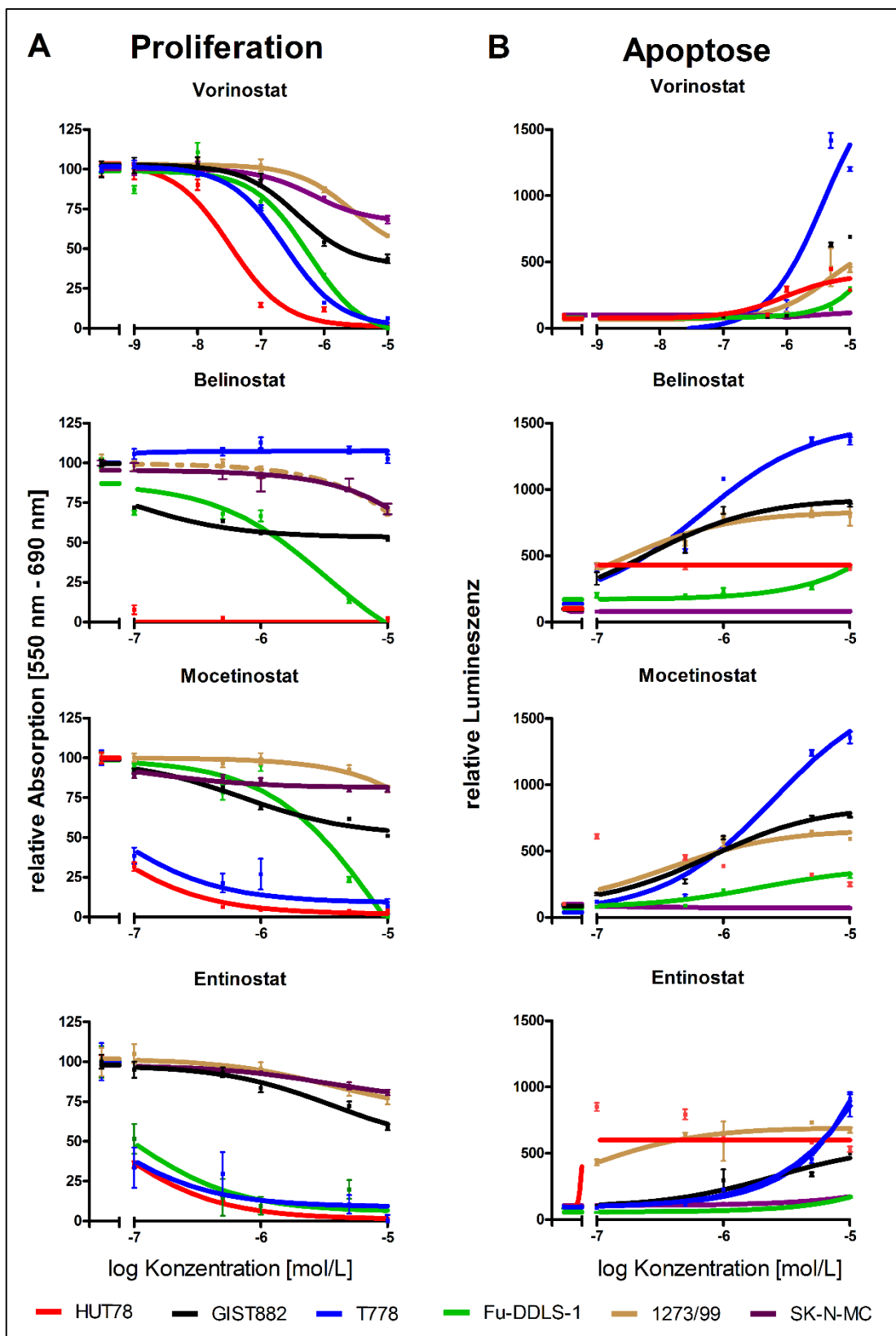


Abbildung 11: Histon-Deacetylase Inhibitor vermittelte Effekte auf die zelluläre Proliferation und Apoptose. Sarkom- und GIST-Zelllinien wurden *in vitro* mit Histon-Deacetylase Inhibitoren behandelt. Nach 48 h wurden die Effekte auf die Proliferation (A) mittels MTT und auf die Apoptose (B) mittels ApoTox-Glo™ Triplex Assay analysiert. Alle Ergebnisse wurden mit denen der DMSO behandelten Kontrolle normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler.

Um die beobachtete Reduktion der zellulären Proliferation weiter zu untersuchen, wurde der ApoTox-Glo™ Triplex Assay mit den Zelllinien HUT78, GIST882, T778, FU-DDLS-1, 1273/99 und SK-N-MC durchgeführt. Diese Zelllinien wurden ausgewählt, um ein breites Spektrum der Sarkomentitäten mit unterschiedlicher Expression von HR23b zu analysieren. Der ApoTox-Glo™ Triplex Assay ermöglicht die Messung der Viabilität und der Apoptose in einem Versuchsansatz. Hierbei wurden die Ergebnisse des MTT Versuchs bestätigt (Daten nicht gezeigt). Desweiteren wurde eine Induktion von Apoptose in Abhängigkeit von der Zelllinie und vom eingesetzten HDACi beobachtet. Bei der Positivkontrolle HUT78 kam es nach Behandlung mit allen vier HDACi zu einer Induktion der Apoptose. Jedoch war der Effekt in der gut differenzierten Liposarkomzelllinie T778 deutlich stärker ausgeprägt. Die Ewingsarkomzelllinie SK-N-MC dagegen zeigte keine HDACi vermittelte Apoptoseinduktion (Abbildung 11 B).

Zur Analyse der Effekte der vier verschiedenen HDACi in Abhängigkeit von der Zeit wurde der ApoTox-Glo™ Triplex Assay nach 24, 48 und 72 h unter HDACi Behandlung mit 1 µM Inhibitor durchgeführt. Diese Konzentration wurde gewählt, da sich in den vorherigen Experimenten zur Konzentrationsabhängigkeit bei diesem Wert deutliche Unterschiede in der Sensitivität gegenüber den HDACi gezeigt haben und diese Konzentration als therapeutisch einsetzbar gilt. Sowohl die Effekte auf die zelluläre Proliferation als auch die Apoptose wurden gemessen. Die Ergebnisse wurden in Bezug gesetzt zum Mittelwert der mit DMSO behandelten Kontrolle nach 24 h unter Behandlung mit den HDACi. Dieser Wert wurde als 100% definiert.

Die zelluläre Proliferation in der Positivkontrolle, der kutanen T-Zell Lymphomzelllinie HUT78, wurde unter Behandlung mit allen vier HDACi in Abhängigkeit von der Zeit signifikant reduziert (Abbildung 12). Bei den Sarkom- und GIST-Zelllinien war die Reduktion der zellulären Proliferation nach 72 h unter Behandlung mit den HDACi am stärksten ausgeprägt. Vor allem Vorinostat reduzierte die zelluläre Proliferation in Abhängigkeit von der Zeit. Eine signifikante, zeitabhängige Reduktion der zellulären Proliferation unter Behandlung mit Belinostat wurde in 4/5 der Sarkom- und GIST-Zelllinien beobachtet, unter Mocetinostat waren es ebenfalls 4/5 Zelllinien, während unter Entinostat nur in der gut differenzierten Liposarkomzelllinie T778 ein entsprechender Effekt beobachtet wurde. Diese Ergebnisse wurden mittels MTT Assay bestätigt (Daten nicht gezeigt).

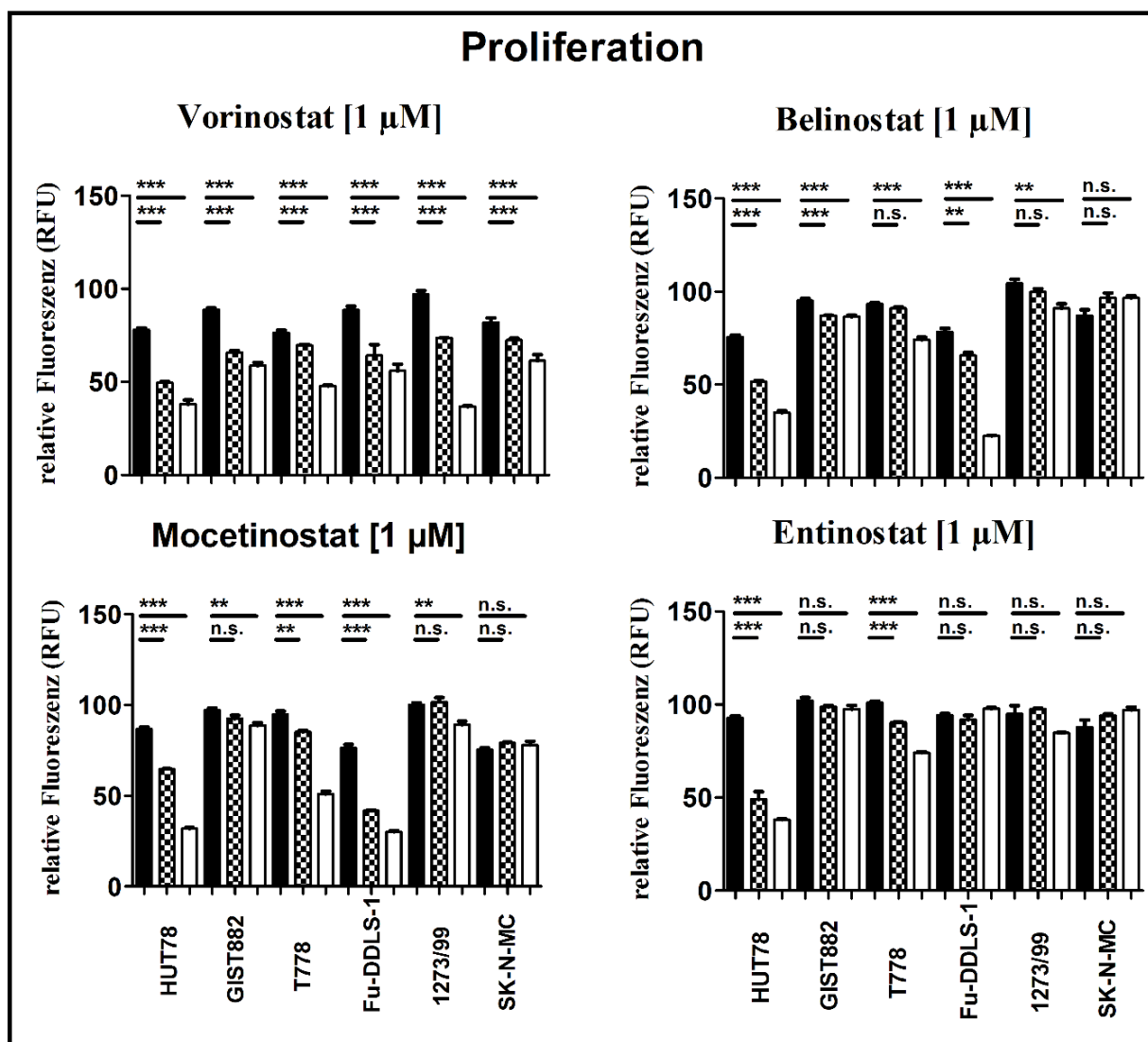


Abbildung 12: Einfluss der HDACi auf die zelluläre Proliferation in Abhängigkeit der Zeit. Sarkom- und GIST-Zelllinien wurden *in vitro* mit Histon-Deacetylase Inhibitoren in einer Konzentration von 1 μM behandelt. Nach 24, 48 und 72 h wurden die Effekte auf die Proliferation mittels ApoTox-Glo™ Triplex Assay analysiert. Alle Ergebnisse wurden auf die der mit DMSO behandelten Kontrolle 24 h nach Behandlung bezogen. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung.

Die zeitabhängige Analyse des HDACi Einflusses auf die Apoptose zeigte, dass die Positivkontrolle, die Zelllinie HUT78, eine Sensitivität gegenüber allen HDACi in Abhängigkeit von der Zeit aufweist (Abbildung 13). In den Sarkom- und GIST-Zelllinien zeigte vor allem die Behandlung mit Entinostat für alle Zelllinien eine signifikante, zeitabhängige Induktion der Apoptose (in 4/5). Unter Behandlung mit Vorinostat zeigten 5/5 Sarkom- und GIST-Zelllinien eine signifikante Induktion der Apoptose bereits nach 24 h, unter Belinostat 4/5 und unter Mocetinostat 3/5.

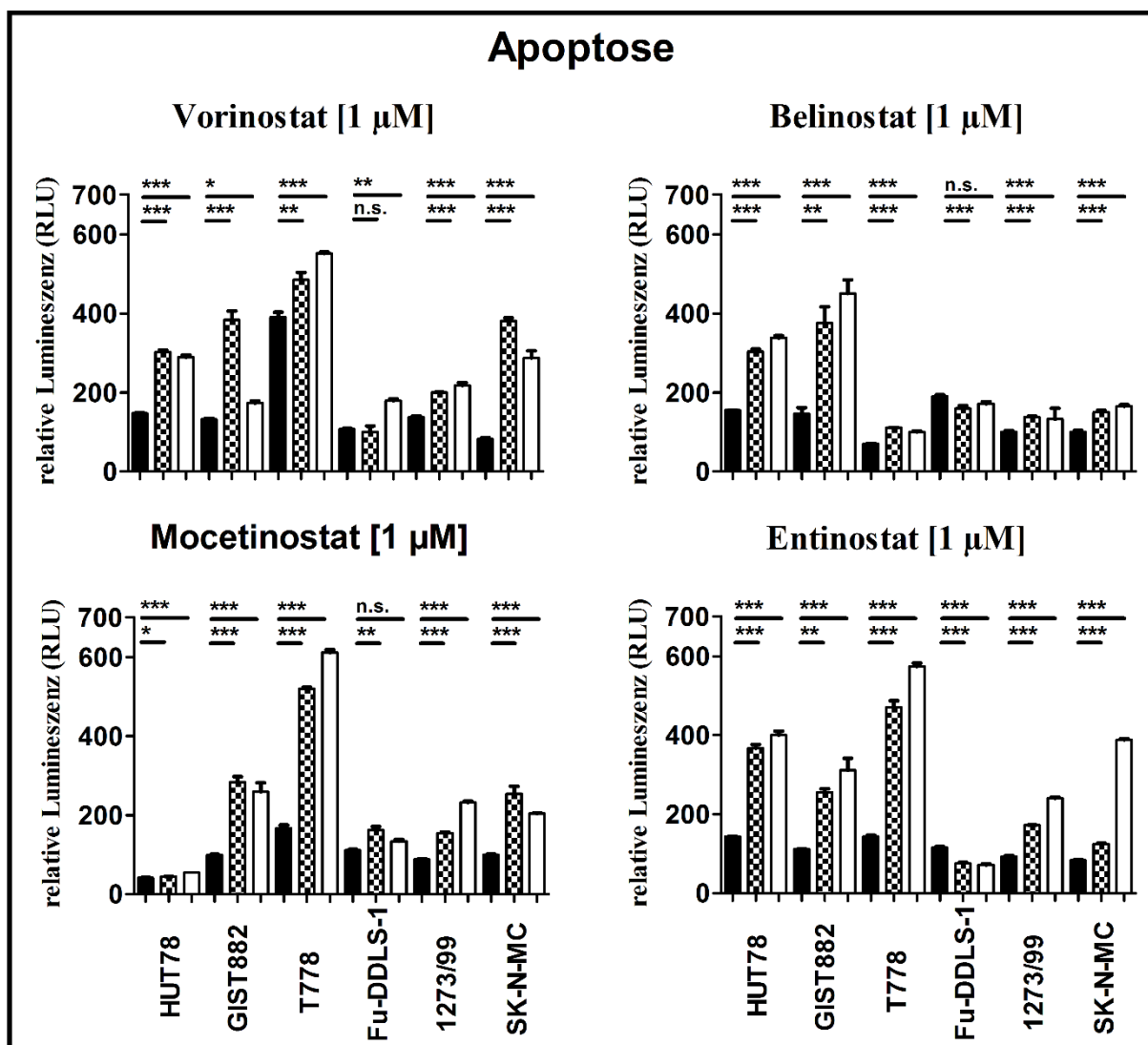


Abbildung 13: Einfluss der HDACi auf die Apoptose in Abhängigkeit der Zeit. Sarkom- und gastrointestinale Stromatumoren wurden *in vitro* mit Histon-Deacetylase Inhibitoren in einer Konzentration von 1 μM behandelt. Nach 24, 48 und 72 h wurden die Effekte auf die Apoptose mittels ApoTox-Glo™ Triplex Assay analysiert. Alle Ergebnisse wurden auf die der mit DMSO behandelten Kontrolle 24 h nach Behandlung bezogen. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung

5.1.4. Korrelation der HR23b Expression mit dem Ansprechen auf Histon-Deacetylase Inhibitoren

Die ermittelten IC₅₀-Werte wurden zur gemessenen HR23b Expression in Korrelation gesetzt (Abbildung 14 A) Die Sensitivität, definiert als ein IC₅₀-Wert <0,5, wird durch eine durchgezogene Linie dargestellt. Die untersuchten Zelllinien zeigten ein unterschiedliches Ansprechen auf die verschiedenen HDACi. Eine Korrelation mit der HR23b Expression wurde für einige Zelllinien, wie die Synovialsarkomzelllinie SW982 und die Zelllinie GIST-T1 gezeigt. Jedoch konnte diese Korrelation nicht für alle Zelllinien nachgewiesen werden, wie z.B. bei der MPNST Zelllinie ST88-14.

Um zu überprüfen, ob es generell eine signifikante Korrelation zwischen der HR23b Expression und der Sensitivität gegenüber den vier HDACi gibt, wurden die IC₅₀-Werte der gesamten Zelllinien zusammengefasst und gegen die verschiedenen Stufen der HR23b Expression (hohe versus moderate versus geringe) korreliert. Eine signifikante Korrelation zwischen Expression und Sensitivität wurde für Vorinostat gezeigt ($p = 0,016$), jedoch nicht für Belinostat, Mocetinostat und Entinostat ($p = 0,125$, $p = 0,813$, $p = 0,471$, Fisher`s Exact Test). Auch der Vergleich zwischen hoher HR23b Expression und moderater oder geringer HR23b Expression zusammengefasst (Abbildung 14 B), zeigte sich eine signifikante Korrelation für Vorinostat ($p = 0,0096$), nicht aber für Belinostat, Mocetinostat und Entinostat ($p = 0,376$, $p = 0,5778$ und $p = 0,7616$, T-Test).

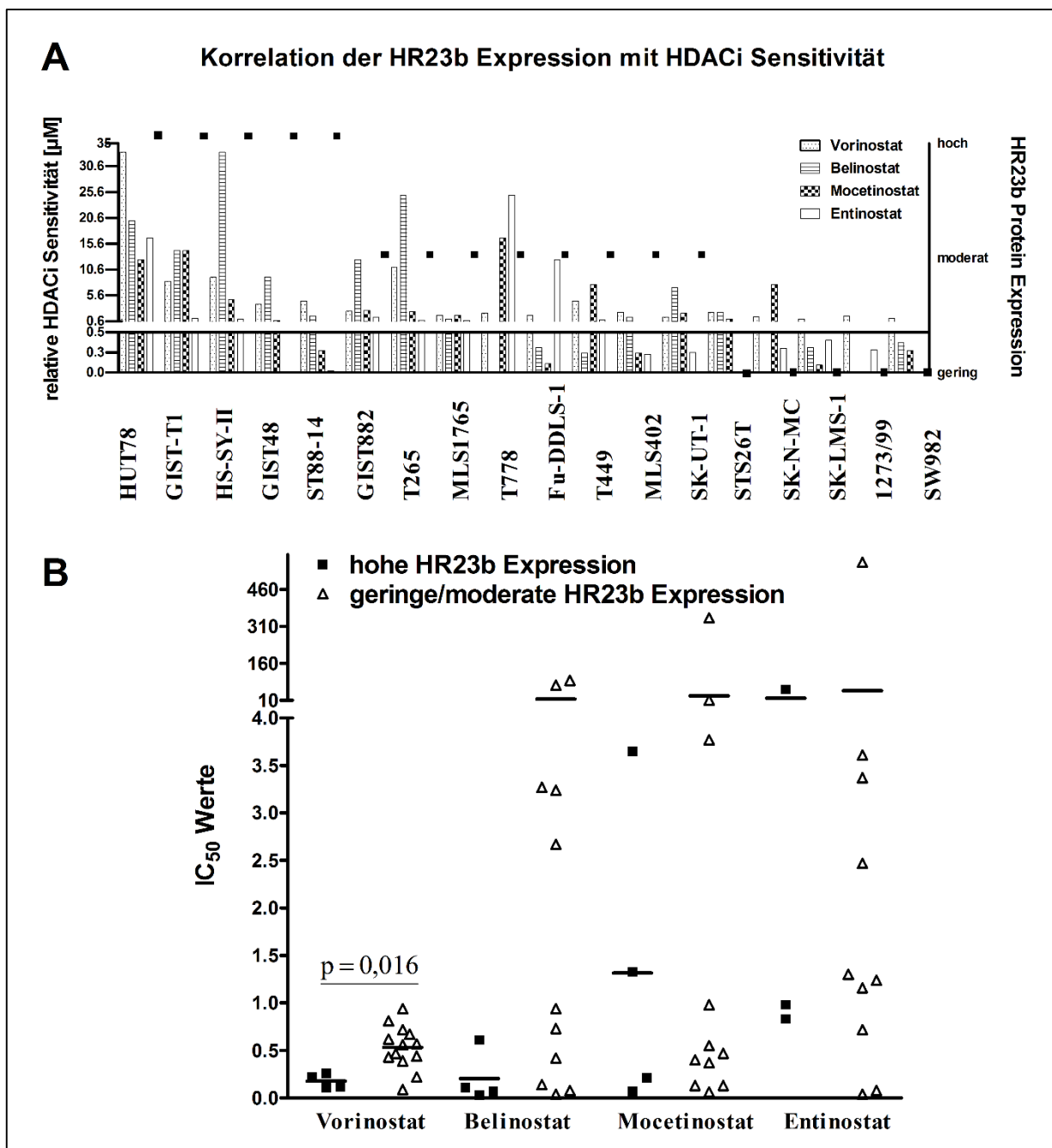


Abbildung 14: Korrelation der HR23b Expression mit der Sensitivität gegenüber Histon-Deacetylase Inhibitoren. Reziproke IC₅₀-Werte für Vorinostat, Belinostat, Mocetinostat und Entinostat einzeln dargestellt für jede untersuchte Zelllinie (A). Die durchgezogene Linie bei IC₅₀ = 0.5 definiert den Schwellenwert für die Sensitivität einer Zelllinie gegenüber HDACi. Die HR23b Expression, ermittelt durch Westernblot Analysen, wurde eingeteilt in eine geringe (14%), moderate (41-69%) und hohe Expression (70-100%). IC₅₀-Werte der gesamten Zelllinien wurden pro Inhibitor zusammengefasst und gegen eine hohe bzw. geringe oder moderate HR23b Expression korreliert (B). Dargestellt ist der Mittelwert \pm 95%ige Konfidenzintervall.

5.1.5. HR23b Expression unter Histon-Deacetylase Inhibitor Behandlung

Um die Effekte der HDACi Behandlung auf die HR23b Expression zu analysieren und eine Verbindung zwischen beiden aufzudecken, wurde die Zelllinie GIST882 mit den HDACi Vorinostat, Belinostat, Mocetinostat und Entinostat behandelt. Westernblot Analysen zeigten, dass die HR23b Expression 48 h unter Behandlung mit den HDACi in Abhängigkeit der Konzentration stark reduziert wurde im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen. Eine Konzentration von 10 μ M Vorinostat führte zu einer Reduktion der HR23b Expression um 75%. Belinostat führte in der gleichen Konzentration zu einer 90%igen Reduktion der HR23b Expression. Die Effekte von Mocetinostat und Entinostat waren mit denen von Belinostat zu vergleichen (Abbildung 15).

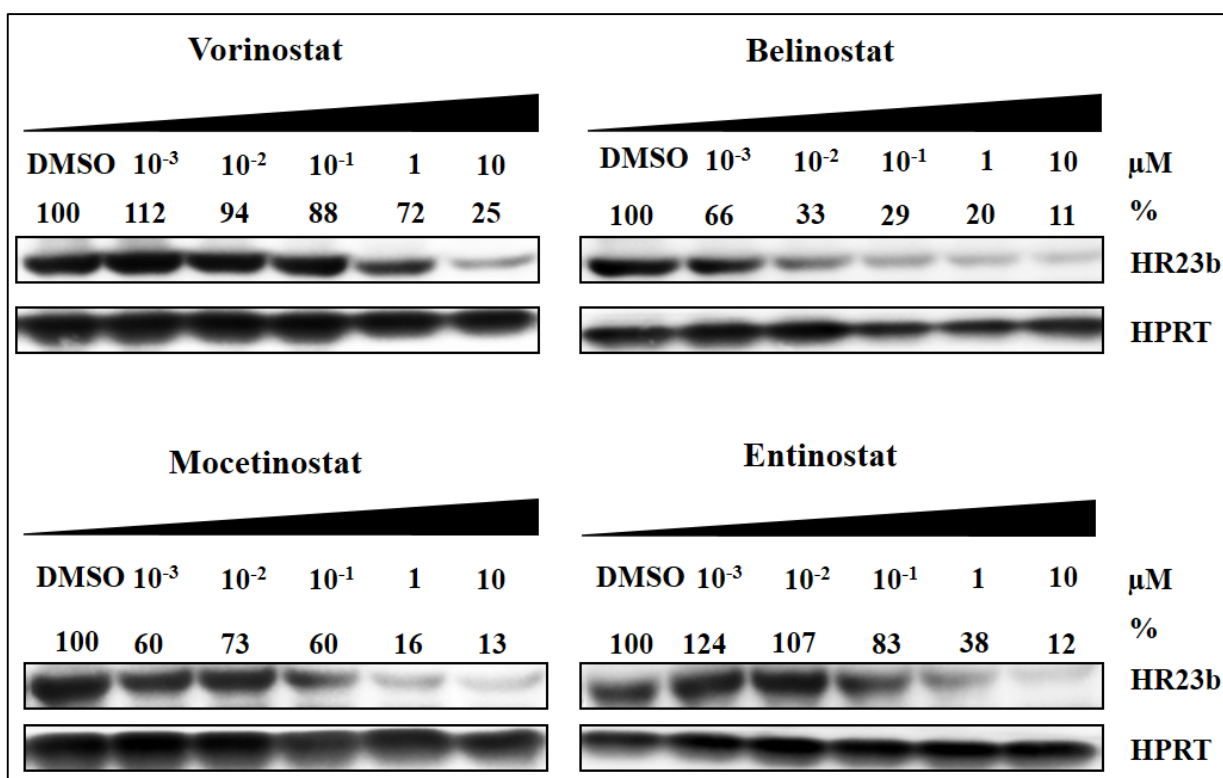


Abbildung 15: HR23b Expression unter Histon-Deacetylase Inhibitorbehandlung. Die Zelllinie GIST882 wurde mit verschiedenen Konzentrationen (10^{-3} bis 10 μ M) der Histon-Deacetylase Inhibitoren Vorinostat, Belinostat, Mocetinostat und Entinostat behandelt. Nach 48 h unter Behandlung wurden Proteine isoliert und die HR23b Expression mittels Westernblot analysiert.

5.1.6. HR23b Expression in humanen Gewebeproben

Kollektivzusammenstellung

Basierend auf den oben beschriebenen Ergebnissen wurde ein Kollektiv klinischer Proben retrospektiv zusammengestellt und die HR23b Expression immunhistochemisch analysiert. Dieses Kollektiv beinhaltet sowohl 312 verschiedene Sarkomproben und 211 GIST-Proben. Die Sarkomproben umfassen alle wichtigen Sarkomentitäten, die bei Erwachsenen auftreten. Das Kollektiv besteht aus 67 gut differenzierten Liposarkomen (WDLS), 61 dedifferenzierten Liposarkomen (DDLs), neun pleomorphen Liposarkomen (PLS), 24 myxoiden Liposarkomen (MLS), 66 Leiomyosarkomen (LMS), 23 Angiosarkomen (ASA), von denen drei durch Strahlung induziert wurden, 14 Synovialsarkomen (SS), 17 malignen peripheren Nervenscheidewandtumoren (MPNST) und 31 nicht differenzierten pleomorphen Sarkomen (UPS).

Bei der Auswahl der gastrointestinalen Stromatumoren wurden alle Lokalisationen eingeschlossen (Magen-, Dünndarm-, Rektum- bzw. Colon- und extragastrale GISTs). Außerdem wurde der Mutationsstatus berücksichtigt (Exon 8, 9, 11, 13, 17 von *KIT* und Exon 18 von *PDGFRA* mutierte und Wildtyp-GISTs). Auf Grund der unterschiedlichen Häufigkeiten der Subgruppen wurde nicht von allen die gleiche Anzahl an Tumorproben eingeschlossen.

Expressionsanalyse

Die immunhistochemische Analyse der HR23b Expression in dem oben beschriebenen Kollektiv zeigte, dass alle Subentitäten mindestens eine geringe oder moderate HR23b Expression aufweisen. Dabei wurde die Färbung nukleär und zytoplasmatisch beobachtet, wobei zwischen den beiden Lokalisationen keine Unterschiede in der Färbeintensität und Häufigkeit festgestellt wurden. Bei der Auswertung wurde daher nur noch die Gesamtfärbung betrachtet. Eine hohe HR23b Expression (HR23b Positivität mit einem Wert von 8-14) zeigten jedoch nur 12,5% der untersuchten Sarkom- und GIST-Proben. Dabei konzentrierten sich die positiven Fälle insbesondere auf sechs Untergruppen der Sarkome: MPNST (23,5%), PLS (22,2%), LMS (21,2%), DDLs (16,7%), SS (14,3%) und ASA (13,0%, Tabelle 28). Im Gegensatz dazu wurde bei keinem der 24 myxoiden Liposarkomen eine hohe HR23b Expression nachgewiesen. Bei den nicht differenzierten, pleomorphen Sarkomen (UPS, 3,2%) und den gut differenzierten Liposarkomen (WDLS, 1,5%) wurde nur eine geringe Fallzahl mit einer hohen HR23b Expression detektiert. Eines der drei durch Strahlung induzierten Angiosarkome wies eine hohe HR23b Expression auf, während zwei der 19 nicht durch Strahlung induzierten Angiosarkome positiv für HR23b waren.

Tabelle 28: HR23b Expression in klinisch relevanten Sarkom- und GIST-Entitäten.

Entität	HR23b Expression		Gesamtzahl
	Negativ	Positiv	
WDLS	66 (98,5)	1(1,5)	67
DDLS	49 (80,3)	12 (16,7)	61
PLS	7 (77,8)	2 (22,2)	9
MLS	24 (100,0)	0 (0,0)	24
LMS	52 (78,8)	14 (21,2)	66
ASA	20 (87,0)	3 (13,0)	23
Strahleninduziert	2 (66,7)	1 (33,3)	3
Nicht Strahleninduziert	17 (89,5)	2 (10,5)	19
SS	12 (85,7)	2 (14,3)	14
MPNST	13 (76,5)	4 (23,5)	17
UPS	30 (96,8)	1 (3,2)	31
Gesamt	273 (87,5)	39 (12,5)	312
GIST			
Lokalisation			
Magen	82 (83,7)	16 (16,3)	98
Dünndarm	36 (62,1)	22 (37,9)	58
Rektum/Colon	6 (85,7)	1 (14,3)#	7
E-GIST	5 (62,5)	3 (37,5)	8
Metastase	22 (84,6)	4 (15,4)	26
Gesamt	151 (76,6)	46 (23,4)	197
Mutationsstatus			
<i>KIT</i>	115 (76,2)	36 (23,8)	151
Exon 8	0 (0,0)	1 (100,0)	1
Exon 9	25 (89,3)	3 (10,7)	28
Exon 11	89 (74,8)	30 (25,2)	119
Exon 13	1 (50,0)	1 (50,0)	2
Exon 17	0 (0,0)	1 (100,0)	1
<i>PDGFRA</i> Exon 18^s	12 (63,2)	7 (36,8)	19
Wildtyp	15 (93,8)	1 (6,2)	16
Gesamt	142 (76,3)	44 (23,7)	186
Risikoklassifikation*			
kein	8 (53,3)	7 (46,7)	15
sehr gering	25 (65,8)	13 (34,2)	38
gering	18 (60,0)	12 (40,0)	30
moderat	17 (70,8)	7 (29,2)	24
hoch	28 (70,0)	12 (30,0)	40
Metastase/Rezidiv	21 (75,0)	7 (25,0)	28
Gesamt	117 (66,9)	58 (33,1)	175

Entität	HR23b Expression		Gesamtzahl
	Negativ	Positiv	
Mittelwert (Median) Mitoserate/50 HPF	18 (1,0)	4.0 (1,0)	14.7 (1.0)
Mittelwert (Median) Größe [cm]	7.2 (6,5)	6.5 (4,7)	6.9 (6.0)
Gesamt	162 (76,8)	49 (23,2)	211 (100)

Dieser positive Fall war im Colon lokalisiert

§ Exon 12 und 14 von *PDGFRA* wurden ebenfalls analysiert, jedoch wurden keine Mutationen in diesen beiden Exonen detektiert

* Einteilung der Risikoklassifikation nach Miettinen und Lasota, 2006 [37]

Prozentzahlen sind in eckigen Klammern angegeben, Informationen zur Lokalisation, zum Mutationsstatus und zur Risikoklassifikation waren nicht für alle GIST Proben dokumentiert. Wildtyp-GISTs wurden definiert als Wildtyp Status in Exon 9, 11, 13 und 17 von *KIT* und Exon 12, 14 und 18 von *PDGFRA*.

In dem Kollektiv aus 211 GISTs-Proben war $\frac{1}{4}$ der analysierten Proben stark positiv für HR23b. Die positiven Proben waren unabhängig vom Mutationsstatus und der Lokalisation über alle Untergruppen verteilt, jedoch wiesen vor allem Dünndarm- und E-GISTs eine hohe HR23b Expression auf. 38% der Dünndarm-GISTs zeigten eine starke HR23b Färbung, die Korrelation zwischen HR23b Expression und Lokalisation wies jedoch kein Signifikanzniveau auf. Auch zwischen Mutationsstatus bzw. Risikoklassifikation und HR23b Expression wurde keine signifikante Korrelation nachgewiesen ($p = 0,15$ bzw. $p = 0,937$, Fisher`s Exakt Test).

Abbildung 16 zeigt repräsentative, immunhistochemische Färbungen gegen HR23b aus dem untersuchten Kollektiv. Dargestellt sind jeweils eine schwache bis negative (0-1), eine moderate (2-7) und eine starke HR23b Färbung (8-14) in GISTs, DDLS, LMS und MPNSTs. Die HR23b Expression wurde sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch detektiert.

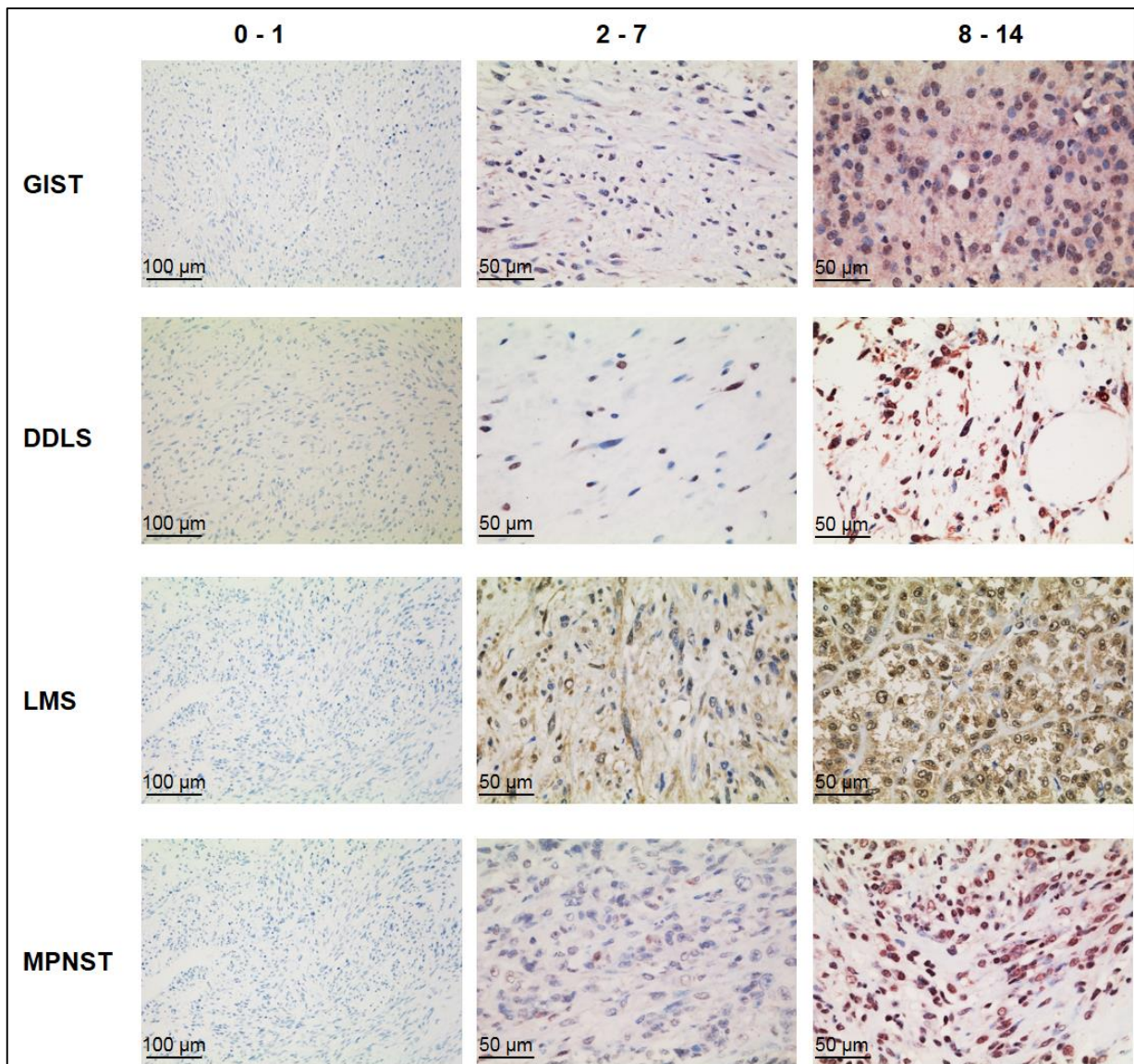


Abbildung 16: Immunhistochemische HR23b Färbung in klinisch relevanten Sarkom- und gastrointestinalen Stromatumoren. Repräsentative immunhistochemische Färbungen aus einem Kollektiv von 523 klinischen Sarkom- und GIST-Proben. Die Färbungen wurden eingeteilt in eine geringe (0-1), moderate (2-7) und hohe HR23b Expression (8-14).

5.2. Funktionelle Rolle von miR-221 und miR-222 in gastrointestinalen Stromatumoren

Die meisten GISTs weisen eine onkogene *gain of function* Mutation in den homologen Rezeptortyrosinkinasen *KIT* oder *PDGFRA* auf [43, 29]. Die Mehrzahl der Tumoren mit diesen Mutationen ist sensitiv gegenüber spezifischen Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren wie z.B. Imatinib. Jedoch kommt es bei GISTs auch zu primären und sekundären Resistenzen, so dass alternative Therapieoptionen, wie z.B. der Einsatz von miRNAs dringend benötigt werden [118, 192-195].

Gastrointestinale Stromatumoren weisen ein spezifisches miRNA Expressionsprofil im Vergleich zu anderen Sarkomentitäten und zum Normalgewebe auf [74, 75, 160]. *In vitro* Studien zeigten, dass sowohl miR-221 als auch miR-222 eine genregulatorische Funktion auf die Rezeptortyrosinkinase KIT ausüben [161] und mit einer KIT Überexpression assoziiert sind [162, 74]. In der GIST Zelllinie GIST-T1 konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Interaktion von miR-222 und KIT zu einer Reduktion der Proliferation führt [163].

Um den genregulatorischen Effekt der miR-221 und miR-222 auf den KIT Rezeptor zu analysieren, wurden funktionelle *in vitro* Versuche zur Untersuchung von Proliferation und Apoptose unter Einfluss der miRNAs etabliert. Hierzu wurden drei verschiedene, immunhistochemisch KIT positive, GIST-Zelllinien charakterisiert, kultiviert und analysiert (Abbildung 9). Von diesen Zelllinien waren zwei sensitiv gegenüber Imatinib (GIST882 und GIST-T1) und eine resistent gegenüber Imatinib (GIST48). Zur Analyse der nachfolgenden Signaltransduktion wurde der PI3K/AKT Signalweg ausgewählt, da aktuelle Studien gezeigt haben, dass dieser Signalweg an der Imatinib vermittelten Apoptose beteiligt ist [27, 28].

5.2.1. Charakterisierung der gastrointestinalen Stromatumor-Zelllinien

Um die GIST-Zelllinien bezüglich ihres Mutationsstatus ausführlich zu charakterisieren, wurde DNA aus allen drei Zelllinien isoliert und mittels massiver Parallelesequenzierung analysiert. Hierfür wurden zwei verschiedene Primerpanel verwendet. Das erste Panel (Panel 1) deckt die Gene ab, die in der Tumorentstehung und -progression von GISTs beschrieben sind (Tabelle 31). Es umfasst 15 Gene mit 132 Amplikons. Das zweite Primerpanel (Panel 2) weist 632 Amplikons auf und umfasst 27 Gene (Tabelle 32).

Die DNA Konzentration wurde mittels Quant-iT™ dsDNA HS Assay im Qubit® 2.0 Fluorometer nach Herstellerangaben (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Die isolierte DNA hatte folgende Konzentrationen:

GIST882	25,20 ng/μl
GIST-T1	31,60 ng/μl
GIST48	6,28 ng/μl.

Die Bibliothek wurde erstellt wie unter 4.1.6 beschrieben und die Fragmentgröße nach der Amplifikation der Bibliothek mittels Kapillarelektrophorese im QIAxcel (Qiagen) überprüft (Abbildung 17).

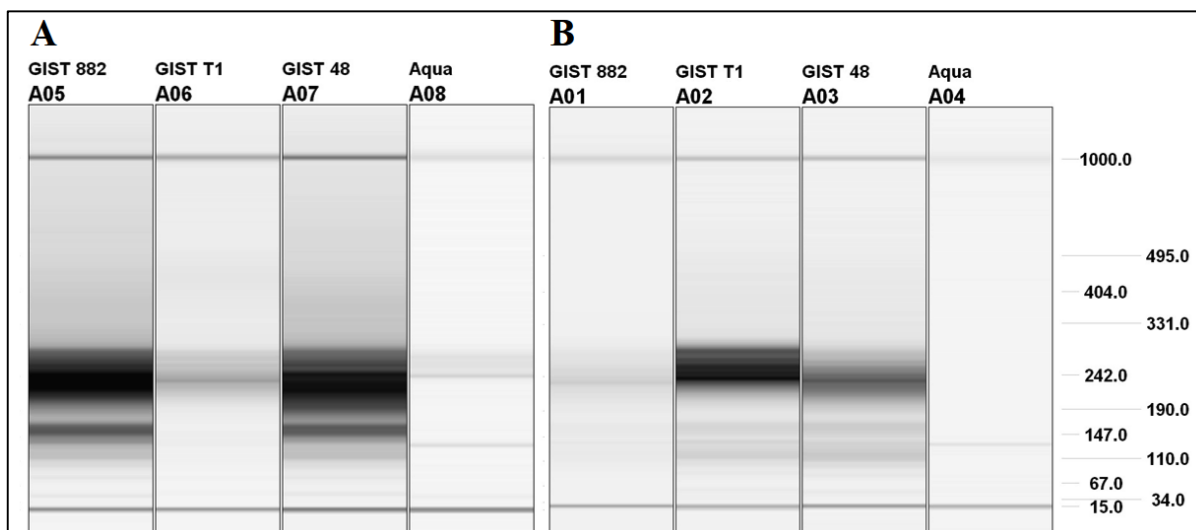


Abbildung 17: Fragmentgrößenbestimmung nach der Ion AmpliSeq™ Custom Panel Multiplex PCR und der Bibliotheksvorbereitung. Das Gelbild zeigt unter A die Bibliothek mit Panel 1 und unter B mit Panel 2.

Für die massive Parallelsequenzierung wurden die Proben auf 3 nM verdünnt und äquimolar gepoolt. Die Sequenzierung erfolgte mit MiSeq™ System von Illumina. Die Coverage für Panel 1 wies einen Mittelwert von 3745 auf, während Panel 2 eine mittlere Coverage von 726 aufwies. Die Läufe der massiven Parallelsequenzierung mit den beiden Primerpanels wurden jeweils einmal wiederholt, um Artefakte auszuschließen und um die Mutationen zu bestätigen.

Zu jeder gelesenen Base wird von der Sequenziersoftware ein Qualitätswert (Phred-Score) ermittelt, der über einem Schwellenwert von 30 liegen sollte. Dieser Wert bedeutet, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,001% an dieser Stelle eine falsche Base detektiert wurde. Die Prozentzahl der Basen, die diesen Wert erreicht (Q30-Wert), wird automatisch angegeben und sollte nach Herstellerangaben >80% sein. Im 1. Lauf wurde in der vorliegenden Arbeit ein

Q30Wert von 93,7% und im 2. Lauf von 91,8% erreicht. Außerdem wurden die Qualität der beiden Läufe mit dem Illumina Sequencing Analysis Viewer beurteilt. Die Dichte der Cluster auf der Durchflusszelle, angegeben als *Cluster density* (K/mm²), sollte laut Herstellerangaben mindestens in einem Bereich von 800-1000 K/mm² liegen. Im 1. Lauf lag der Wert bei 1091 und im 2. Lauf bei 1696. Somit wurden diese Qualitätskriterien für die massive Parallelsequenzierung bei der Sequenzierung der GIST-Zelllinien erfüllt.

Alle bisher beschriebenen Mutationen im *KIT* Gen wurden in allen drei Zelllinien bestätigt. Zusätzlich zu den beschriebenen Mutationen wurden weitere Mutationen detektiert. In der Zelllinie GIST882 wurde eine Variation im *MET* Gen nachgewiesen (Tabelle 29). Hierbei handelte es sich um eine Veränderung in Codon 1010, bei der es zu einem Austausch der Aminosäure Threonin zu Isoleucin kommt.

Bei der Zelllinie GIST-T1 wurde durch die massive Parallelsequenzierung zusätzlich eine Mutation im *SDHA* Gen detektiert. Bei dieser *missense* Mutation kommt es in Codon 55 zu einem Austausch der Aminosäure Tyrosin zu Histidin. In der Zelllinie GIST48 konnten keine weiteren Mutationen detektiert werden.

Eine Auflistung der Mutationen und ihrer Coverage kann Tabelle 29 entnommen werden.

Tabelle 29. Ergebnisse der massiven Parallelsequenzierung der GIST-Zelllinien. GIST882

Gen	cDNA	Protein	Allelfrequenz	Coverage
KIT	c.1924A>G	p.K642E	0,999313	3928
MET	c.3029C>T	p.T1010I	0,262857	157

GIST-T1

Gen	cDNA	Protein	Allelfrequenz	Coverage
KIT	c.1678_1734del57bp	p.V560_Y578del	0,730521	2384
SDHA	c.163T>C	p.Y55H	0,434636	2671

GIST48

Gen	cDNA	Protein	Allelfrequenz	Coverage
KIT	c.1679T>A	p.V560D	0,982143	756
KIT	c.2459A>C	p.D820A	0,518064	1245

5.2.2. Einfluss von miR-221 und miR-222 auf die zelluläre Proliferation

Um den regulatorischen Einfluss der miR-221 und miR-222 auf die zelluläre Proliferation zu analysieren, wurden alle drei GIST-Zelllinien mit miR-221, miR-222, einer Kombination aus beiden, einer KIT spezifischen siRNA (Hs_KIT-5 FlexiTube siRNA), einer nicht funktionellen siRNA (AllStars Hs Negative Control siRNA; N.C.) und einer Apoptose induzierenden siRNA (Allstars Hs cell death siRNA) in einer Endkonzentration von 100 nM transient transfiziert. Lipofektamin (Mock) unbehandelte und mit Camptothecin behandelte Zellen dienten als Kontrollen.

Nach 48 h wurden morphologische Veränderungen bei den Zelllinien detektiert, die in der Zelllinie GIST882 am stärksten waren (Abbildung 18 A). Vor allem die miR-221 zeigte ähnliche Effekte, wie sie durch RNA Interferenz mit einer spezifischen siRNA gegen KIT detektiert wurden. Die GIST-T1 Zelllinie zeigte ebenfalls morphologische Veränderungen nach Transfektion der miR-221, jedoch waren hier die miR-222 vermittelten Effekte stärker. Die GIST48 zeigte nur geringe morphologische Veränderungen nach Transfektion beider miRNAs.

Um die Ursache dieser morphologischen Veränderungen näher zu charakterisieren, wurden MTT Versuche durchgeführt und der zelluläre Effekt der miRNAs nach 0, 24, 48 und 72 h gemessen. Sowohl miR-221, miR-222 als auch die Kombination beider reduzierten die zelluläre Proliferation um fast ein Viertel in der Zelllinie GIST882 (Abbildung 18 B). In der Zelllinie GIST-T1 zeigte sich nach miR-222 Transfektion der stärkste Effekt auf die zelluläre Proliferation, was zum oben beschriebenen Einfluss auf die Morphologie der Zellen passt. Die Überexpression der miR-221 führte nur zu einer geringen Reduktion der zellulären Proliferation. In der Zelllinie GIST48 wurde eine geringe Reduktion der zellulären Proliferation nach Transfektion der miR-221 detektiert werden. miR-222 oder die Kombination aus beiden zeigten keinen Effekt. Auch die Kontrollen (KIT siRNA und Camptothecin) zeigten in der Zelllinie GIST48 einen geringeren Einfluss auf die zelluläre Proliferation im Vergleich den Zelllinien GIST882 und -T1. Die Kombination aus beiden miRNAs wies in keiner Zelllinie einen additiven Effekt auf.

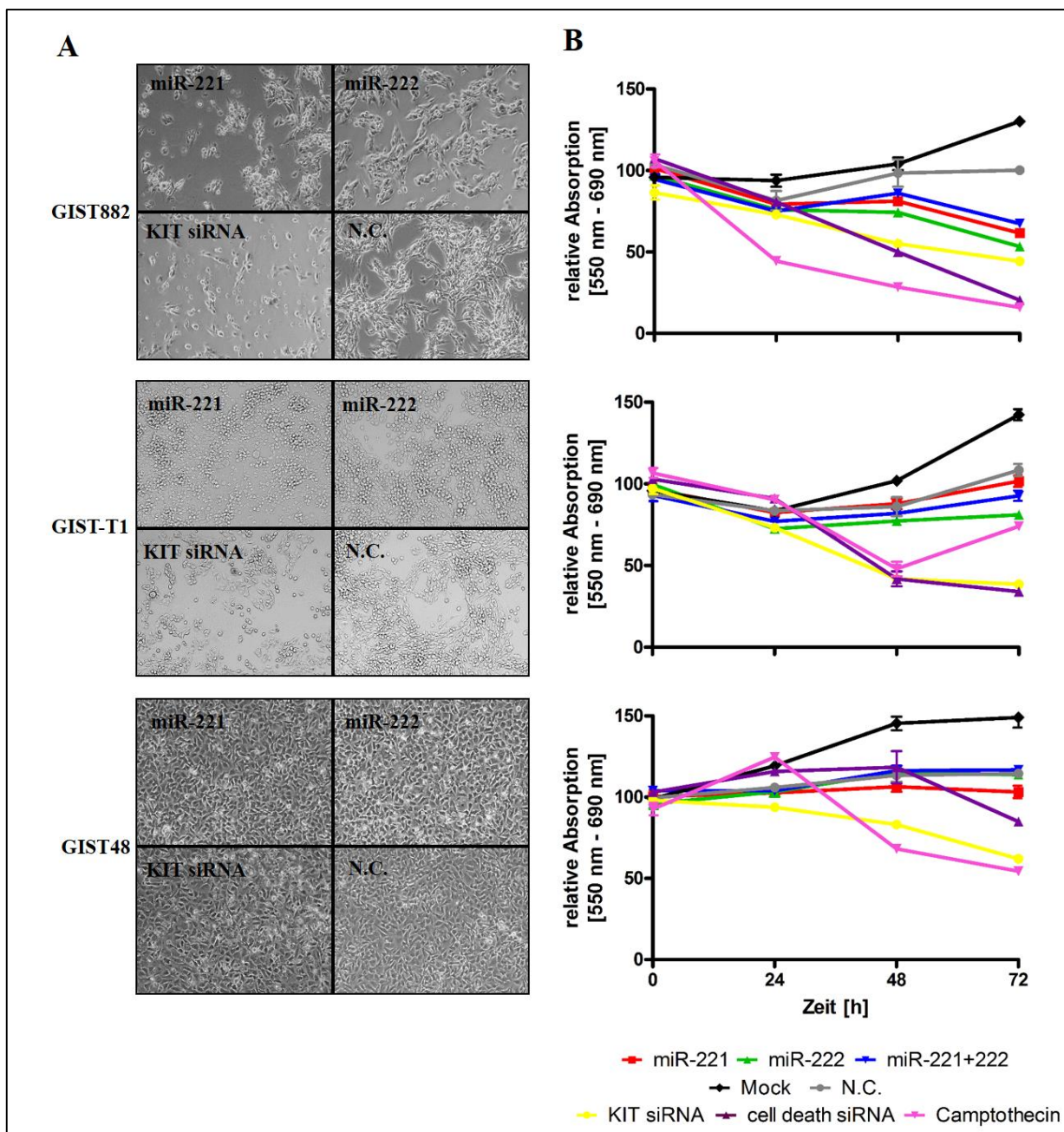


Abbildung 18: miR-221 und miR-222 vermittelte morphologische und proliferative Veränderungen in GISTs. Morphologische (A) Veränderungen in den GIST-Zelllinien GIST882, -T1 und 48 48 h nach Transfektion der miR-221, miR-222, einer KIT spezifischen siRNA (Hs_KIT-5 FlexiTube siRNA) und einer nicht funktionellen siRNA (AllStars Hs Negative Control siRNA; N.C.) mit einer Endkonzentration von 100 nM. Reduktion der zellulären Proliferation im MTT Assay (B) im Vergleich zur mit Lipofektamin behandelten Kontrolle (Mock). Als Positivkontrollen wurden eine Apoptose induzierende siRNA (AllStars Hs Cell Death siRNA) und Camptothecin benutzt. Die Ergebnisse wurden zur N.C. zum Zeitpunkt 0 h normalisiert. Gemessen wurde 0, 24, 48 und 72 h nach Transfektion der miRNAs bzw. der Behandlung mit Lipofektamin und Camptothecin.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde ein ApoTox-Glo™ Triplex Assay mit allen drei GIST-Zelllinien durchgeführt. 24, 48 und 72 h nach transienter Transfektion der miR-221, miR-222, einer Kombination aus beiden, einer nicht funktionellen siRNA (AllStars Hs Negative Control siRNA; N.C.), einer Apoptose induzierender siRNA (AllStars Hs Cell Death siRNA; P.C.) und einer KIT spezifischen siRNA (Hs_KIT-5 FlexiTube siRNA) wurde der Einfluss auf die zelluläre Proliferation gemessen.

Nach 24 h wurde in keiner Zelllinie ein miRNA vermittelter Effekt beobachtet (Abbildung 19). Nach 48 h wurde in allen drei GIST-Zelllinien eine signifikante Reduktion der zellulären Proliferation nach Transfektion der miR-221 und miR-222 detektiert. Die Kombination reduziert nach 48 h nur in den Zelllinien GIST882 und GIST48 die zelluläre Proliferation. Nach 72 h wurde der antiproliferative Effekt der miR-221, der miR-222 und der Kombination aus beiden miRNAs in der Zelllinie GIST882 und GIST48 noch verstärkt. In der Zelllinie GIST-T1 wurde dagegen in allen Zeitstufen kein signifikanter Effekt mehr auf die Proliferation nach Transfektion der miR-221 beobachtet. In allen drei GIST-Zelllinien konnte erneut kein additiver Effekt der miRNA-221 und miR-222 beobachtet werden.

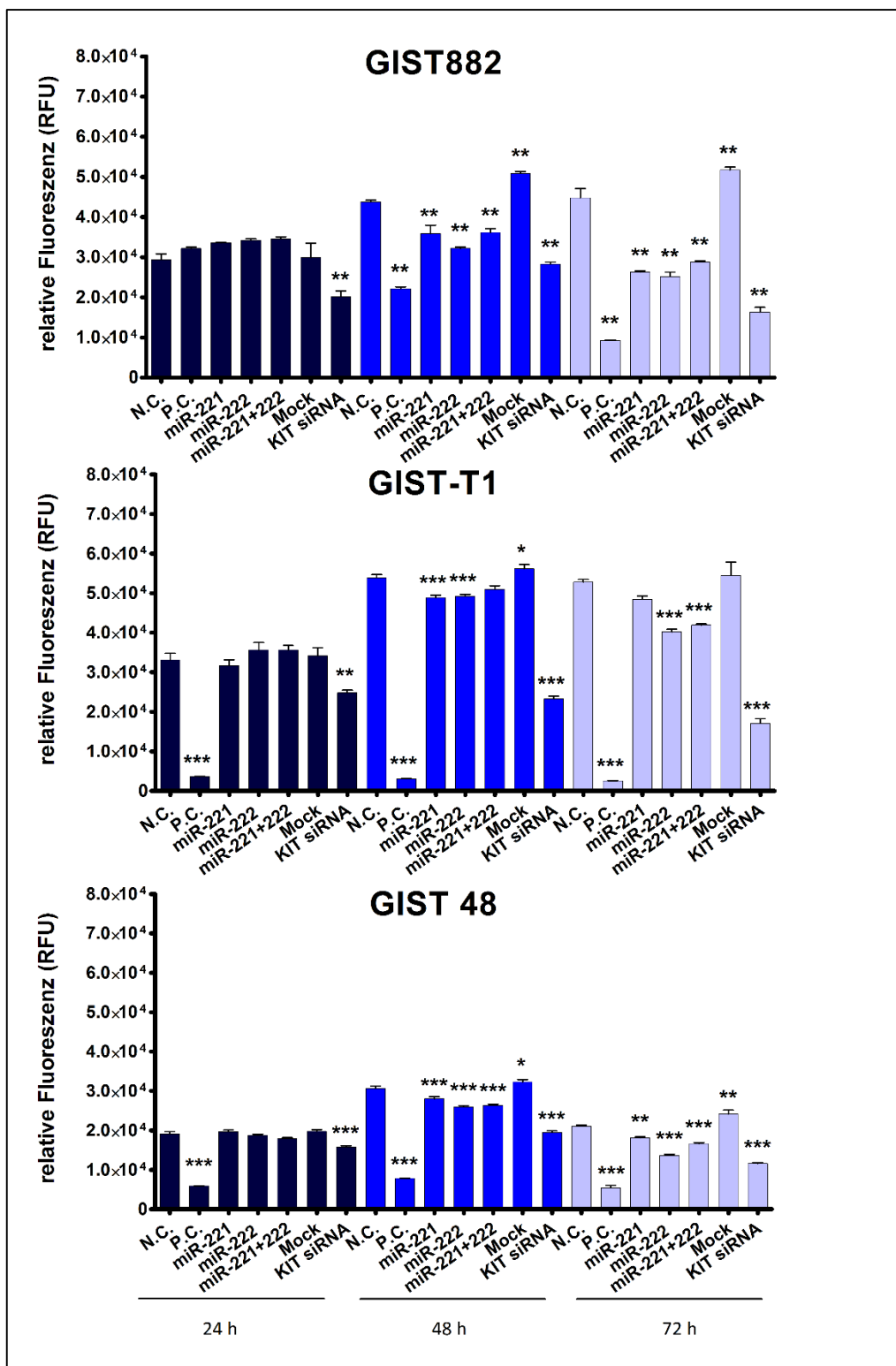


Abbildung 19: Verifizierung der antiproliferativen Effekte der miR-221 und miR-222 durch den ApoTox-Glo™ Triplex Assay. GIST-Zelllinien wurden mit je 100 nM miR-221, miR-222, einer Kombination aus beiden, einer nicht funktionellen siRNA (AllStars Hs Negative Control siRNA; N.C.), einer Apoptose induzierenden siRNA (AllStars Hs Cell Death siRNA; P.C.) und einer KIT spezifischen siRNA (Hs_KIT-5 FlexiTube siRNA) transfiziert. Mit Lipofektamin behandelte Zellen dienten als Mock-Kontrolle. Signifikante und zeitabhängige Reduktion (24, 48 und 72 h nach Transfektion) der zellulären Proliferation in allen drei GIST-Zelllinien wurde beobachtet. RFU: *relative fluorescence units*, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler.

5.2.3. Einfluss von miR-221 und miR-222 auf die Apoptose

Zur weiteren Analyse dieses antiproliferativen Effektes wurde mittels ApoTox-Glo™ Triplex Assay die Induktion der Apoptose gemessen. Mit dem ApoTox-Glo™ Triplex Assay werden Viabilität und Apoptose im gleichen Reaktionsansatz gemessen, so dass eine direkte Korrelation hergestellt werden kann. Abbildung 20 zeigt, dass in keiner der drei GIST-Zelllinien eine signifikante Induktion der Apoptose nach 24 h beobachtet wurde, während die Positivkontrolle, eine Apoptose induzierende siRNA, bereits nach 24 h eine signifikante Induktion der Apoptose in allen drei GIST-Zelllinien verursachte. Nach 48 h wurde in der Zelllinie GIST882 signifikant Apoptose induziert durch die transiente Transfektion der miR-221, miR-222 und einer Kombination aus beiden miRNAs. Dieser Effekt wurde nach 72h noch verstärkt und korrelierte mit der signifikanten Reduktion der Viabilität. In der Zelllinie GIST-T1 zeigten nach 48 h die miR-222 und die Kombination einen Einfluss auf die Apoptose. Nach 72 h jedoch wurde durch alle verwendeten Transfektionsansätze eine signifikante Apoptoseinduktion nachgewiesen. Die Ergebnisse der miR-222 und der Kombination korrelierten mit der denen aus dem Viabilitätsnachweis.

In der Zelllinie GIST48 zeigte die miR-221 den stärksten Effekt auf die Apoptose. Nach 48 h induzierten die miR-221 und etwas schwächer die miR-222 und die Kombination signifikant Apoptose. Nach 72 h wurde der Einfluss der miR-221 weiter verstärkt. Die miR-222 und die Kombination aus beiden miRNAs induzierten ebenfalls Apoptose, jedoch erreichte der durch die miR-222 ausgelöste Effekt kein Signifikanzniveau.

Die RNA Inferenz mit der KIT spezifischen siRNA zeigte in allen drei GIST-Zelllinien in allen drei Zeitstufen mit Ausnahme der Zelllinie GIST882 nach 24 h eine signifikante Induktion der Apoptose.

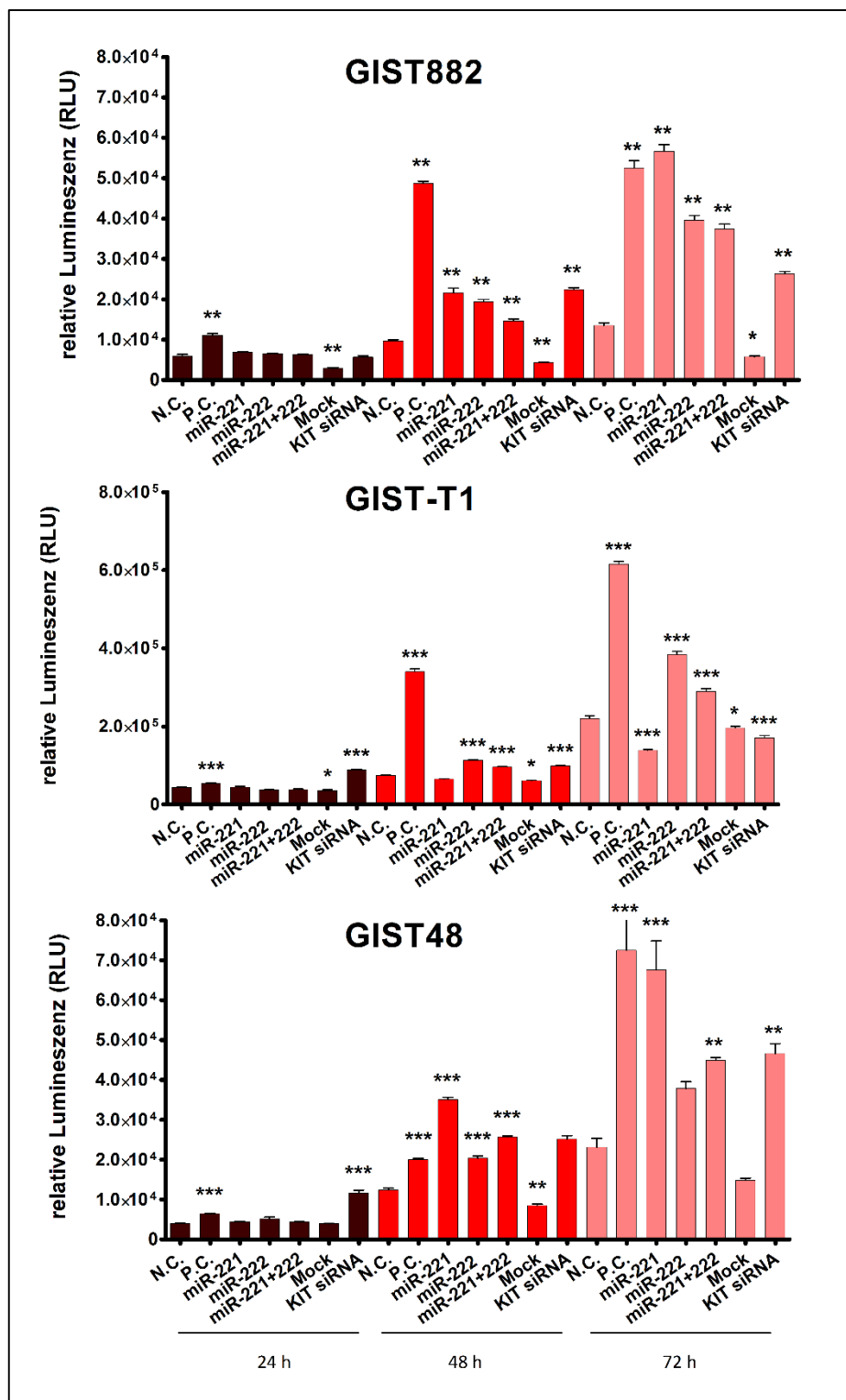


Abbildung 20: miR-221 und miR-222 vermittelte Induktion von Apoptose. Apoptoseinduktion 24, 48 und 72 h nach Transfektion der GIST-Zelllinien mit miR-221, miR-222, einer Kombination aus beiden, einer nicht funktionellen siRNA (AllStars Hs Negative Control siRNA; N.C.), einer Apoptose induzierender siRNA (AllStars Hs Cell Death siRNA; P.C.) und einer KIT spezifischen siRNA (Hs_KIT-5 FlexiTube siRNA). Mit Lipofektamin behandelte Zellen dienten als Mock-Kontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse des ApoTox-Glo™ Triplex Assay nach 24, 48 und 72 h. RLU: *relative luminescence units*, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler.

5.2.4. miR-221 und miR-222 induzieren Apoptose über den KIT/AKT Signalweg in gastrointestinalen Stromatumoren

Zur weiteren Analyse der miR-221 und miR-222 vermittelten Regulation der KIT-Rezeptortyrosinkinase in GISTs wurden Zytospins 48 h nach Transfektion von miR-221, miR-222, einer Kombination aus beiden, einer KIT spezifischen siRNA und einer nicht funktionellen siRNA (AllStars Hs Negative Control siRNA; N.C.) angefertigt. Die immunhistochemische Analyse der KIT Expression in den Zytospins zeigte, dass die GIST-Zelllinien GIST882, GIST-T1 und GIST48 positiv für die Expression von KIT sind. Diese Expression wurde durch die Transfektion einer KIT spezifischen siRNA in allen drei Zelllinien fast vollständig reduziert. Auch die Transfektion der miR-221 und miR-222 reduzierte die Expression von KIT in allen drei untersuchten Zelllinien, jedoch war der Einfluss weniger ausgeprägt wie durch die Transfektion einer KIT spezifischen siRNA (Abbildung 21).

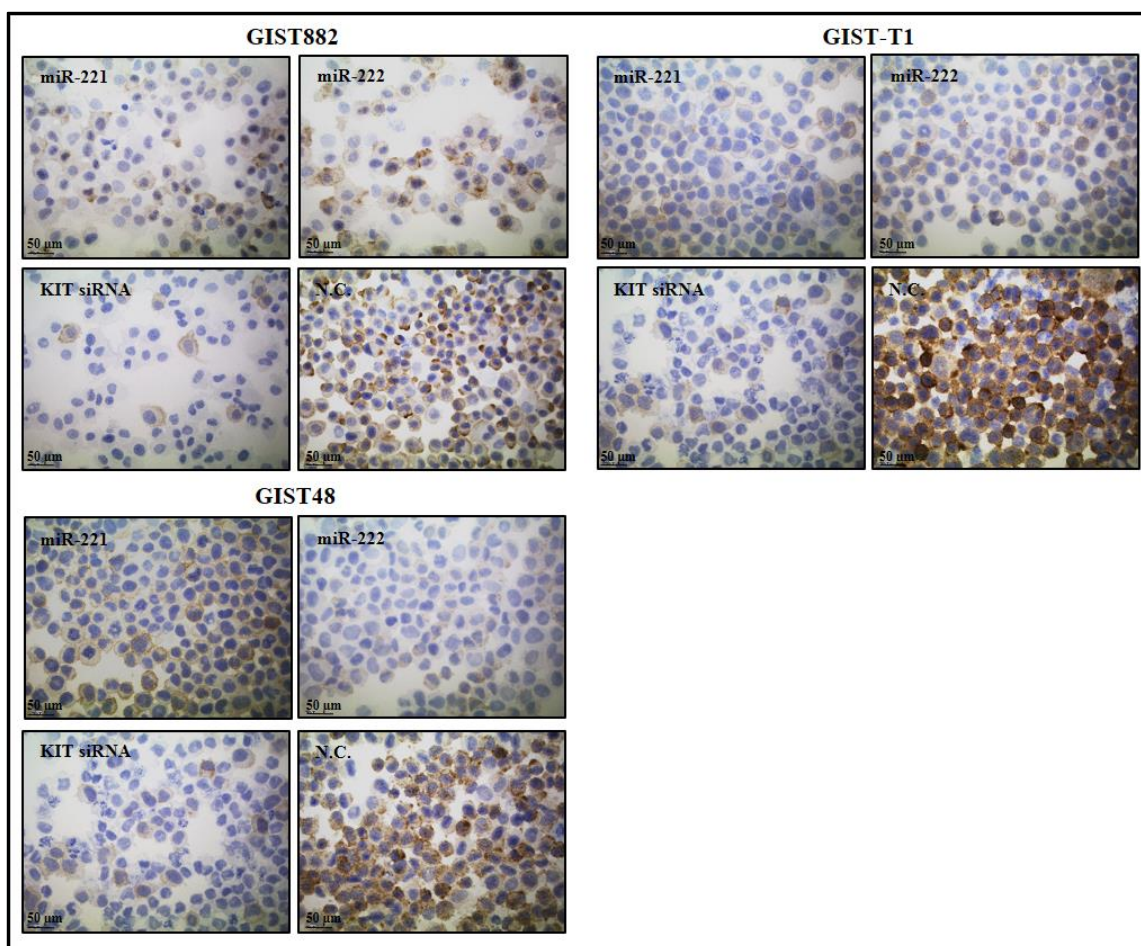


Abbildung 21: Immunhistochemische KIT Färbung der gastrointestinalen Stromatumorzelllinien GIST882, GIST-T1 und GIST48. Repräsentative immunhistochemische KIT Färbungen an Zytospins der untersuchten GIST-Zelllinien 48 h nach Transfektion von miR-221, miR-222 und einer KIT spezifischen siRNA und einer nicht funktionellen siRNA (AllStars Hs Negative Control siRNA; N.C.).

Zur weiteren Analyse der miRNA vermittelten Apoptoseinduktion wurden Westernblot Analysen durchgeführt. Proteine wurden 24, 48 und 72 h nach Transfektion der miR-221, miR-222, einer Kombination aus beiden und einer KIT spezifischen siRNA isoliert. Zum Vergleich wurden Proteine aus Zellen isoliert, die entweder mit Lipofektamin behandelt oder einer nicht funktionellen siRNA (AllStars Hs Negative Control siRNA; N.C.) transfiziert wurden. Da aktuelle Studien gezeigt haben, dass der PI3K/AKT Signalweg an der durch Imatinib induzierten Apoptose beteiligt ist, wurden die weiteren Analysen auf diesen Signalweg fokussiert [27, 28]. Repräsentativ für den PI3K/AKT Signalweg wurden der Phosphorylierungsstatus von KIT, MTOR und AKT sowie die Gesamtproteinexpression überprüft. Zur weiteren Analyse der Apoptose wurde die Proteinexpression von BCL2 und BCL2L11 (BIM) untersucht.

In der Zelllinie GIST882 konnte eine starke Reduktion der Phosphorylierung des KIT Rezeptors bereits 24 h nach Transfektion der miR-221, miR-222 und einer Kombination aus beiden nachgewiesen werden (Abbildung 22 A). Dieser Effekt hielt bis 72 h nach Transfektion an. Ähnliche Effekte konnten für das KIT Protein nachgewiesen werden. RNA Interferenz mit einer KIT spezifischen siRNA verhinderte fast vollständig die Phosphorylierung und die Gesamtproteinexpression von KIT im Vergleich zu den mit einer nicht funktionellen siRNA transfizierten oder mit Lipofektamin behandelten Zellen (Abbildung 22 B).

Um den Einfluss der miRNAs auf die Signaltransduktion vom KIT Rezeptor bis hin zur Apoptose weiter zu analysieren, wurden Westernblot Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen den Phosphorylierungsstatus und das Gesamtprotein von MTOR und AKT durchgeführt. Sowohl miR-221, miR-222 als auch die Kombination der beiden reduzierten die Phosphorylierung von AKT und die Gesamtproteinexpression in der Zelllinie GIST882 in allen Zeitstufen. Die miR-221 zeigte hierbei den stärksten Effekt (Abbildung 22 C). Die Expression und Phosphorylierung von MTOR dagegen wurde nahezu nicht durch die Transfektion der beiden miRNAs beeinflusst. Bei der Analyse der Apoptose vermittelnden Proteine BCL2 und BCL2L11 wurde eine Reduktion der BCL2 Expression durch die miR-221 nach 24 h beobachtet. Nach 48 und 72 h wurde eine geringe Reduktion der BCL2 Expression durch alle miRNA Transfektionsansätze im Vergleich zu den mit Lipofektamin behandelten Zellen nachgewiesen. Die Expression von BCL2L11 dagegen blieb konstant.

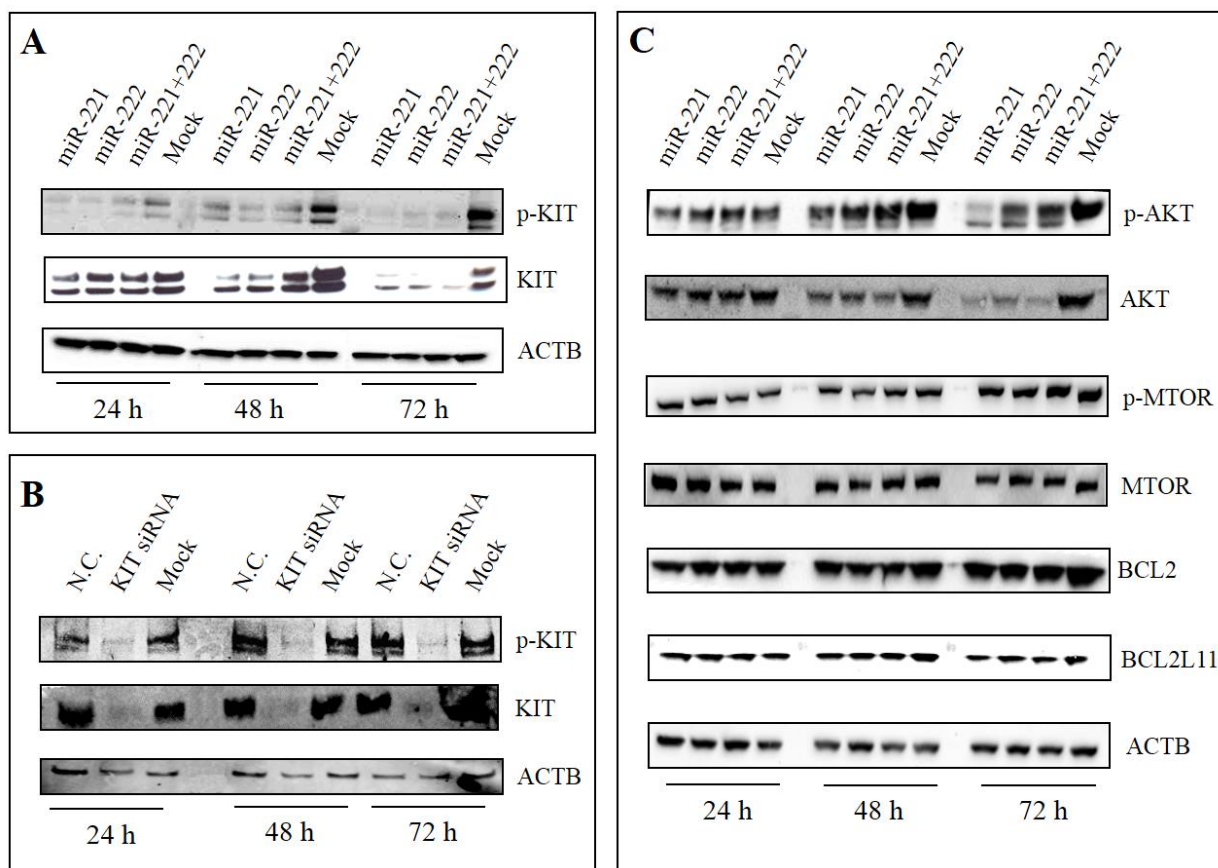


Abbildung 22: miR-221 und miR-222 vermittelte Signaltransduktion in der Zelllinie GIST882. Westernblot Analysen 24, 48 und 72 h nach Transfektion der miR-221, miR-222 und einer Kombination aus beiden und einer KIT spezifischen siRNA (Hs_KIT-5 FlexiTube siRNA) im Vergleich zu einer nicht funktionellen siRNA (AllStars Hs Negative Control siRNA; N.C.) und mit Lipofektamin behandelten Zellen (Mock). Einfluss der miRNAs (A) und der RNA Interferenz (B) auf die KIT Expression sowie der miRNAs auf die nachgeschaltete Signalkaskade (C).

In der Zelllinie GIST-T1 wurde eine miRNA vermittelte Reduktion der Phosphorylierung des KIT Rezeptors detektiert. Die Gesamtproteinexpression von KIT dagegen blieb nach 24 und 48 h stabil und zeigte erst nach 72 h eine Reduktion (Abbildung 23 A). Die RNA Interferenz verhinderte dagegen nahezu vollständig die Phosphorylierung und reduzierte die Gesamtproteinexpression von KIT im Vergleich zu den mit der nicht funktionellen siRNA (AllStars Hs Negative Control siRNA; N.C.) transfizierten und mit Lipofektamin behandelten Zellen (Mock). Im nachgeschalteten Signalweg wurde eine miRNA vermittelte Reduktion des Phosphorylierungsstatus von AKT und der Gesamtproteinexpression von AKT beobachtet. Der Einfluss der miR-221 und miR-222 auf die Phosphorylierung von MTOR war weniger prominent. Nur die Transfektion der miR-221 und der Kombination führte nach 72 h zu einer sehr schwachen Reduktion der MTOR Phosphorylierung und der Gesamtproteinexpression. Ähnliche Effekte

wurden bei der BCL2L11 Proteinexpression beobachtet, wohingegen BCL2 eine reduzierte Proteinexpression nach Transfektion der miRNAs nach 72 h aufwies.

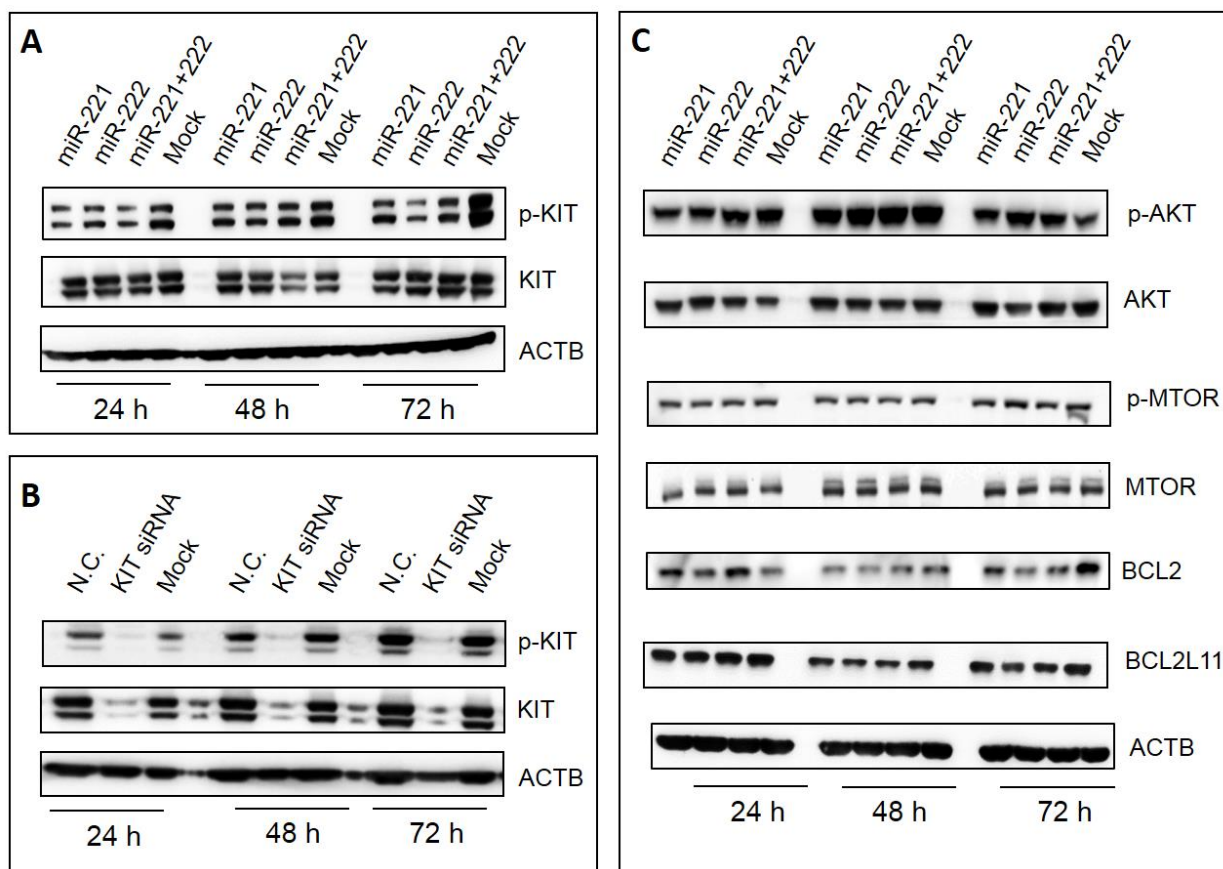


Abbildung 23: miR-221 und miR-222 vermittelte Signaltransduktion in der Zelllinie GIST-T1. Westernblot Analysen 24, 48 und 72 h nach Transfektion der miR-221, miR-222, einer Kombination aus beiden, einer KIT spezifischen siRNA (Hs_KIT-5 FlexiTube siRNA) im Vergleich zu einer nicht funktionellen siRNA (AllStars Hs Negative Control siRNA; N.C.) und mit Lipofektamin behandelten Zellen (Mock). Einfluss der miRNAs (A) und der RNA Interferenz (B) auf die KIT Expression sowie der miRNAs auf die nachgeschaltete Signalkaskade (C).

Westernblot Analysen der Zelllinie GIST48 nach miR-221, miR-222 Transfektion und einer Kombination aus beiden miRNAs zeigte eine Reduktion des Phosphorylierungsstatus von KIT in allen drei Zeitstufen (Abbildung 24 A), jedoch war der Effekt nicht so stark ausgeprägt wie in den beiden anderen Zelllinien. Die Reduktion der Gesamtproteinexpression war nach 48 h am stärksten und ist vergleichbar mit der in der Zelllinie GIST882 beobachteten Reduktion. Die RNA Interferenz dezimierte auch in der Zelllinie GIST48 die Phosphorylierung und die Gesamtproteinexpression von KIT nahezu vollständig. Bei der Analyse der nachgeschalteten Signalkaskade wurde bereits nach 24 h eine Reduktion der Phosphorylierung von AKT durch die Transfektion der miR-221, miR-222 und einer Kombination aus beiden nachgewiesen. Die

Gesamtproteinexpression von AKT jedoch blieb stabil. Es wurde desweiteren kein erheblicher Unterschied in der Phosphorylierung und der Gesamtproteinexpression von MTOR und BCL2L11 beobachtet. Die Expression von BCL2 wurde nach 48 h durch die Transfektion der miR-222 und der Kombination aus beiden miRNAs reduziert. Nach 72 h war zusätzlich durch die Transfektion der miR-221 eine Reduktion der BCL2 Proteinexpression zu beobachten.

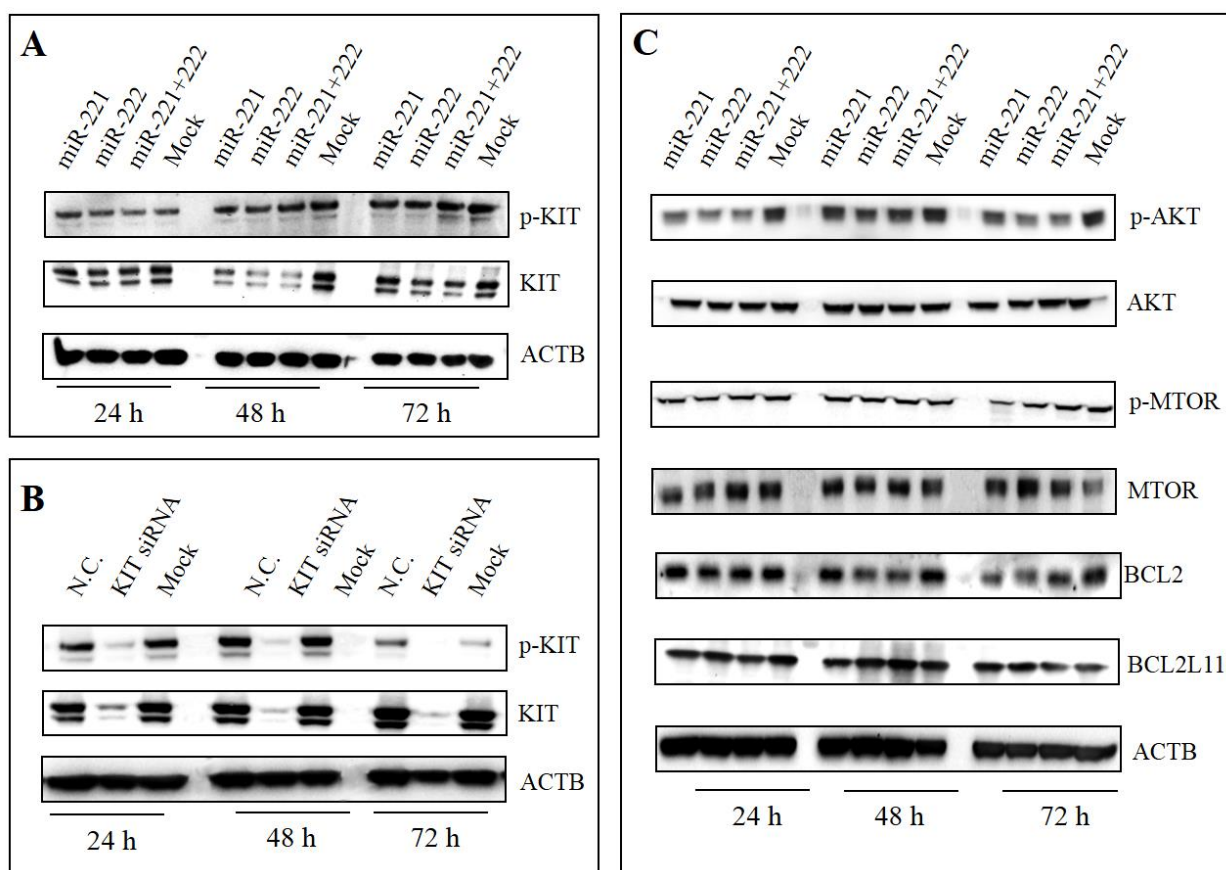


Abbildung 24: miR-221 und miR-222 vermittelte Signaltransduktion in der Zelllinie GIST48. Einfluss der miRNAs (A) auf die Phosphorylierung und die Gesamtproteinexpression von KIT im Vergleich zum Einfluss der RNA Interferenz mit einer spezifischen KIT siRNA (Hs_KIT-5 FlexiTube siRNA; B). Analyse des PI3K/AKT Signalweges nach miRNA Transfektion (C). Proteine wurden 24, 48 und 72 h nach Transfektion isoliert und mittels Westernblot analysiert.

6. Diskussion

Sarkome sind sehr selten und machen nur etwa 1% aller Tumorerkrankungen aus [196]. Sie sind eine histologisch und genetisch sehr heterogene Gruppe der Weichgewebs- und Knochentumore mit ca. 50 Untergruppen [2]. Trotz intensiver Erforschung der Sarkome ist die chirurgische Resektion mit oder ohne anschließender Strahlen- oder Chemotherapie oft die einzige Therapieoption. Jedoch rezidivieren 90% der Tumore bei ausschließlicher Resektion und die Ansprechrate auf Strahlen- oder Chemotherapie ist meist gering [197]. Auf Grund der hohen Heterogenität sind selektive, zielgerichtete Therapieansätze bisher nur in kleinen Untergruppen der Sarkome etabliert. So können z.B. alveoläre Sarkome mit MET-Inhibitoren oder gastrointestinale Stromatumoren (GISTs) mit dem Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Imatinib spezifisch therapiert werden [13-15]. Jedoch hat sich bei den GISTs gezeigt, dass nicht alle Tumore auf eine spezifische und selektive Therapie ansprechen (primäre Resistenz) oder im Verlauf der Therapie eine sekundäre Resistenz entwickeln. Diese begrenzten Behandlungsmöglichkeiten sowie primäre und sekundäre Resistenzen verstärken den Druck, alternative Therapieoptionen zu entwickeln.

Aktuelle Studien haben gezeigt, dass Histon-Deacetylase Inhibitoren (HDACi) eine potentielle, alternative Therapieoption in soliden Tumoren darstellen. In vielen Tumoren konnte gezeigt werden, dass eine Deregulation, Überexpression oder Mutation die Balance zwischen Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs) zerstören und damit die Transkription vieler wichtiger Gene pathogen verändern. Diese Imbalance führt zur Entstehung und Progression von vielen Erkrankungen, inklusive Tumoren [86-88]. Durch die Therapie mit HDACi kann diese Balance wiederhergestellt werden. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass HDACi in einer großen Anzahl von Sarkomen therapeutisch aktiv sind. Hierzu gehören Rhabdomyosarkome, Osteosarkome, Chondrosarkome, GISTs und synoviale Sarkome [70, 198-200, 69, 201, 202].

Eine weitere, potentielle Therapieoption stellt der Einsatz von miRNAs dar. miRNAs sind eine Klasse kleiner, nicht kodierender RNAs, die posttranskriptionell die Expression von Zielgenen regulieren. 50% dieser miRNAs sind in instabilen oder tumorassoziierten Genomregionen lokalisiert [145]. Hier kann es zu einer abnormen miRNA Expression und damit zur Tumorentstehung kommen [203]. Je nach Expression weisen miRNAs eine onkogene Funktion auf (Überexpression im Tumor- im Vergleich zum Kontrollgewebe, z.B. mir-17-92) oder eine Tumorsuppressorfunktion (verminderte Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe, z.B. let-7) auf [204]. Der Einsatz von Antagomirs und miRNA Ersatztherapie

stellt eine alternative Therapieoption in Tumoren dar. Antagomirs sind synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die komplementär zu einer spezifischen zellulären miRNA sind und diese inhibieren.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sowohl HDACi als auch miRNAs potentielle neue Therapieoptionen in Sarkomen darstellen können.

Hierbei wurde der Effekt von Vorinostat, Belinostat, Mocetinostat und Entinostat in einem gut charakterisierten Kollektiv von Sarkomzelllinien in Bezug auf die zelluläre Proliferation und Apoptose untersucht. Die erzielten Ergebnisse wurden mit der HR23b Expression korreliert, um eine Assoziation zwischen der Sensitivität gegenüber HDACi und der HR23b Expression herstellen zu können. Ein umfassendes Kollektiv von klinischen Sarkomproben wurde immunhistochemisch auf die Expression von HR23b untersucht.

Desweiteren wurde der regulatorische Einfluss von miR-221 und miR-222 auf die zelluläre Proliferation und die Apoptose in GISTs *in vitro* untersucht. Zur Signalweganalyse wurden die miRNAs überexprimiert und die miRNA vermittelten Effekte mit Hilfe von Westernblot Analysen untersucht.

6.1. HR23b als prädiktiver Biomarker für die Sensitivität gegenüber HDACi in Sarkomen

Zur Behandlung von hämatogenen Tumoren sind derzeit drei HDACi seitens der FDA, jedoch nicht seitens der EMA zugelassen: Vorinostat seit 2006 für die Drittlinientherapie des fortgeschrittenen, kutanen T-Zell Lymphoms, Belinostat seit 2014 für die Therapie von refraktären oder progredienten peripheren T-Zell Lymphomen und Romidepsin seit 2009 für die Therapie des kutanen T-Zell Lymphoms und seit 2011 für die Therapie von rezidierten oder refraktären peripheren T-Zell Lymphomen. Zusätzlich werden viele weitere HDACi in klinischen Studien als Mono- oder Kombinationstherapie getestet. Aktuell gibt es laut der Datenbank *ClinicalTrials.gov* fast 200 Studien mit verschiedenen HDACi (Stand Dez. 2014, <https://clinicaltrials.gov/>). 84 davon untersuchen HDACi in soliden Tumoren und drei davon in Sarkomen. Im Juni 2014 waren es nach eigenen Recherchen in der gleichen Datenbank nur etwa 30 offene, klinische Studien mit HDACi. Hier zeigt sich die hohe Dynamik in diesem Forschungsbereich und das hohe Potential der HDACi basierten Therapie.

Jedoch waren bisher die meisten klinischen, HDACi basierten Studien in soliden Tumoren nicht so erfolgreich, wie es die *in vitro* Ergebnisse vorhersagen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass Biomarker für die Selektion von Patienten, die einen Vorteil durch diese Therapie haben, bisher nicht systematisch entwickelt wurden. Wie andere Beispiele an soliden Tumoren gezeigt haben,

ist dies jedoch essentiell für den Erfolg zielgerichteter Therapien im Rahmen der personalisierten Medizin [205].

Aktuelle Studien haben gezeigt, dass HR23b ein Biomarker für HDACi basierte Therapien in kutanen T-Zell Lymphomen und hepatozellulären Karzinomen sein kann [112, 113]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher analysiert, ob sich dieses Konzept auch auf Sarkome übertragen lässt. Hierfür wurde ein Kollektiv aus 17 Sarkom- und GIST-Zelllinien zusammengestellt. Dieses Kollektiv umfasst alle wichtigen Subentitäten, die bei Erwachsenen auftreten können. Sarkome, die vor allem bei Kindern auftreten (Rhabdomyosarkome) und Sarkome mit intermediärem biologischen Potential (desmoide Fibromatosen) wurden ausgeschlossen, da vor allem Sarkome untersucht werden sollten, die auch in frühe klinische Studien eingeschlossen werden können.

Zuerst wurden alle Zelllinien auf ihre beschriebenen genetischen Alterationen untersucht [171, 169, 167, 174, 166, 206, 165]. Deren Bestätigung ist essentiell, da die Zellkulturen über einen längeren Zeitraum (<50 Passagen) in einem künstlichen Milieu kultiviert wurden. Da dies nicht den natürlichen Bedingungen entspricht und durch Passagieren, Trypsin-Behandlungen, Auftauen und Einfrieren Stress auf die Zellen ausgeübt wird, kann es zur genetischen Instabilität in den Zellen kommen. Die Struktur und Funktion wichtiger Proteine kann verändert werden [207, 208] und es kommt zu Alterungsprozessen, die Auswirkungen auf die Teilungs- und Funktionsfähigkeit der Zellen haben können [209-211]. Eine weitere Problematik der *in vitro* Versuche sind Kreuzkontaminationen. Laut wissenschaftlichen Schätzungen treten diese mit einer Häufigkeit von 10-15% auf, wodurch falsche Rückschlüsse aus den Ergebnissen gezogen werden [212-214]. Da alle beschriebenen Alterationen nachgewiesen werden konnten, diente dieses Kollektiv aus Sarkom- und GIST-Zelllinien als Basis für die nachfolgenden Versuche.

6.1.1. HR23b Expressionsanalysen im Zellkulturmodell

Westernblot Analysen zeigten eine unterschiedliche HR23b Expression in den untersuchten Sarkom- und GIST-Zelllinien. Dieses breite Spektrum der HR23b Expression war ideal für die nachfolgenden Versuche, da anzunehmen war, dass die Zelllinien mit hoher HR23b Expression auf eine HDACi Behandlung ansprechen, während die mit einer geringen Expression nur geringe HDACi vermittelte Effekte aufweisen. Diese Annahme basierte auf der Publikation von Fotheringham et al., in der die Korrelation von HR23b Expression und Sensitivität gegenüber HDACi bereits für die multiple Myelomzelllinien MC/CAR und U266 sowie für die kutane T-Zell Lymphomzelllinie HUT78 gezeigt werden konnte [114].

6.1.2. Effekte von Histon-Deacetylase Inhibitoren auf die zelluläre Proliferation und Apoptose

Die Effekte vier verschiedener HDACi Vorinostat, Belinostat, Mocetinostat und Entinostat, auf die zelluläre Proliferation sowie die Induktion von Apoptose wurden *in vitro* untersucht. Alle HDACi zeigten in unterschiedlichem Ausmaß Effekte auf Proliferation und Apoptose in den untersuchten Zelllinien. In den meisten von ihnen korrelierten die antiproliferativen mit den proapoptotischen Effekten unter HDACi Behandlung. Die gut differenzierte Liposarkomzelllinie T778 zeigte unter Behandlung mit Vorinostat die stärkste Reduktion der Proliferation und die stärkste Induktion von Apoptose. In der Ewingsarkomzelllinie SK-N-MC zeigte dieser Inhibitor keine Effekte auf die Proliferation korrelierend zur fehlenden Induktion von Apoptose.

Auch in der Literatur sind HDACi vermittelte Effekte auf die Apoptose beschrieben [215]. In Rhabdomyosarkomen verursachte die Behandlung mit Vorinostat *in vitro* eine Induktion des Tumorsuppressors CDKN1A, einem Zyklin abhängigen Inhibitor des Zellzyklus, wodurch Apoptose induziert wurde [198]. Ähnliche Beobachtungen wurden in Osteosarkomen gemacht [200]. In Chondrosarkomen konnte eine Reduktion der Proliferation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet werden [202]. In einem Kollektiv aus verschiedenen Sarkomzelllinien konnte gezeigt werden, dass auch in multiresistenten Sarkomen Apoptose induziert wird durch die Behandlung mit dem HDACi PCI-24781 [72]. Hierbei spielten vor allem Proteine wie BAX, BAK, BAD, NOXA, BID und APAF1 eine Rolle [70, 216, 217].

Die Korrelation zwischen Reduktion von Proliferation und Induktion von Apoptose konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht für alle Zelllinien gezeigt werden. Die dedifferenzierte Liposarkomzelllinie Fu-DDLS-1 zeigte die stärkste Reduktion der zellulären Proliferation unter Entinostat Behandlung, jedoch keine Induktion von Apoptose. Desweiteren führte die Behandlung mit Belinostat zu keiner Veränderung der zellulären Proliferation in der gut differenzierten Liposarkomzelllinie T778, jedoch zu der stärksten beobachteten Induktion der Apoptose.

Bei ausbleibender Apoptoseinduktion können auch andere zelluläre Prozesse für eine reduzierte Proliferation verantwortlich sein. So könnte Entinostat Einfluss auf die Zellzykluskontrolle nehmen. Ähnliche Effekte konnten bereits in der multiplen Myelomzelllinie U266 gezeigt werden. Hier wurde eine starke Reduktion der Proliferation bei ausbleibender Induktion von Apoptose unter Behandlung mit Entinostat gezeigt. Mittels Durchflusszytometrie wurde eine erhöhte Anzahl von U266 Zellen in der G1-Phase und eine reduzierte Anzahl in der G2/M-Phase des Zellzykluse detektiert [218]. Dieser Effekt kann *in vitro* durch die Hochregulation von CDKN1A und die Herunterregulation von CCND ausgelöst werden. Dadurch kommt es zu einer

Blockade des Zellzyklus [219]. In der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 führte diese Blockade ebenfalls zu einer reduzierten Proliferation bei ausbleibender Induktion von Apoptose [220-222]. Daher scheinen die HDACi vermittelten Effekte nicht nur in den untersuchten Sarkomzelllinien zelltypspezifisch zu sein.

Bei Betrachtung einzelner Zelllinien zeigten die verschiedenen HDACi unterschiedliche Effekte. So führten beispielsweise Belinostat und Entinostat in der EWS Zelllinie SK-N-MC zu einer geringen Reduktion der Viabilität. Mocetinostat dagegen wirkte stark antiproliferativ. Die Ursache hierfür ist, dass die Inhibitoren verschiedene HDAC Klassen gezielt beeinflussen. Vorinostat und Belinostat sind pan-HDACi, die Klasse I (HDAC1, -2, -3 und -8) und IIb HDACi (HDAC6 und -10) inhibieren [223, 224]. Im Gegensatz dazu sind Mocetinostat und Entinostat selektive Isotyp-spezifische HDACi, die vor allem HDACs der Klasse I inhibieren [101, 225]. Daher ist der Einfluss der Inhibitoren abhängig von den HDACs, die in der entsprechenden Zelllinie exprimiert werden. Dies hat ebenfalls Einfluss auf die Rolle von HR23b als potentiellen Biomarker für die Sensitivität von HDACi.

6.1.3. Korrelation der HR23b Expression mit dem Ansprechen auf Histon-Deacetylase Inhibitoren

Doch wie definiert man eine Zelle als sensitiv? In der Studie von Tula-Sanchez et al., wird Sensitivität als eine G₂/M Blockade des Zellzyklus und Resistenz als eine reversible G₁ Blockade definiert [226]. Die meisten Publikationen verwenden jedoch die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀-Wert) zur Definition der Sensitivität [71, 69, 168]. Das zeigt, dass es keine einheitlichen Kriterien zur Bestimmung der Sensitivität im Zellkulturmodell gibt, die aber essentiell für die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Studien sind.

Basierend auf Daten aus der Literatur wurde in der vorliegenden Arbeit die mittlere inhibitorische Konzentration als Sensitivitätskriterium angewendet [227, 228, 185, 69]. Auch in der Datenbank *Genomics of Drug Sensitivity in Cancer* (<http://www.cancerrxgene.org/>) wird der IC₅₀-Wert als ein Kriterium für die *in vitro* Sensitivität gegenüber Inhibitoren genutzt [229], was unsere Wahl ebenfalls bekräftigt.

Jedoch sind in der Literatur unterschiedliche Schwellenwerte definiert worden. In der Studie von Hu et al. zeigte die Inhibition rekombinater HDAC durch HDACi einen IC₅₀-Wert von 0,3 µM für Entinostat, der mit Sensitivität gleichgesetzt wurde, jedoch ohne einen Schwellenwert zu definieren. Larsson et al. definieren einen IC₅₀-Wert <10 µM als sensitiv in einem Kollektiv aus humanen neuroendokrinen Tumorzellen [228]. Eine weitere Studie definiert einen

IC₅₀Wert <4 µM als Schwellenwert für die Sensitivität einer Zelllinie gegenüber dem HDACi Belinostat [227].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein IC₅₀-Wert <0,5 µM HDACi als Sensitivitätskriterium definiert, basierend auf der Publikation von Dejligbjerg et al. [227]. Dieser wesentlich striktere Schwellenwert wurde gewählt, um die Rolle von HR23b als prädiktiven Biomarker zu stabilisieren und wirklich nur diejenigen Sarkom- und GIST-Entitäten zu selektionieren, die sicher von einer HDACi Behandlung profitieren würden. Durch die Wahl des stringenten Schwellenwertes wurde nur für Vorinostat eine signifikante Korrelation zwischen HR23b Expression und HDACi Sensitivität detektiert. Eine Korrelation zwischen dem Ansprechen auf Belinostat und der HR23b Expression wurde zwar gezeigt, erreichte aber nicht das Signifikanzniveau. Daher scheint die HR23b Expression vor allem für die Verwendung von Vorinostat in Sarkom- und GIST-Zelllinien als Biomarker für die HDACi Sensitivität in Frage zu kommen.

Generell sind die erhobenen IC₅₀-Werte vergleichbar mit denen anderer Studien, bei denen sich ebenfalls die Werte im niedrigen, mikromolaren Bereich befinden [227, 69, 230]. In der hepatozellulären Karzinomzelllinie HepG2 wurde ein IC₅₀-Wert von 1,55 µM unter Behandlung mit Belinostat detektiert [113]. In den GIST-Zelllinien GIST882, GIST-T1 und GIST48 wurden IC₅₀-Werte zwischen 1,7-3,5 µM unter Behandlung mit Vorinostat bestimmt. Die Rhabdomyosarkomzelllinie RMS176 zeigte in der gleichen Studie einen IC₅₀-Wert von 2,8 µM unter Vorinostat Behandlung [69]. In uterinen Sarkomen wurde ein IC₅₀-Wert für Vorinostat von 3 µM gefunden [71]. In der Studie von Cubitt et al. wurde die Sensitivität von Ewingsarkom, Osteosarkom-, Rhabdomyosarkom-, Fibrosarkom-, Leiomyosarkom- und Liposarkomzelllinien auf Vorinostat untersucht und IC₅₀-Werte von 0,52-4,3 µM detektiert [231]. Diese Konzentrationen gelten klinisch als therapeutisch einsetzbar. O'Connor et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass diese Vorinostat Konzentration sehr gut toleriert wird und nur wenige Nebenwirkungen aufweist [232]. Daher sind die in dieser Arbeit detektierten IC₅₀-Werte vergleichbar mit denen anderer Studien. Die Wirksamkeit von Vorinostat, Belinostat, Mocetinostat und Entinostat in Sarkomen in klinisch tolerierbaren Dosen wurde somit nachgewiesen.

6.1.4. HR23b Expression unter Histon-Deacetylase Inhibitor Behandlung

Zur weiteren Analyse der Assoziation von HR23b mit der Sensitivität gegenüber HDACi wurde die Zelllinie GIST882 mit allen vier HDACi in verschiedenen Konzentrationen von 10⁻³ bis 10 µM behandelt. Nach 48 h Behandlung wurde eine starke, konzentrationsabhängige Reduktion der

HR23b Expression nachgewiesen. Dies zeigt deutlich die Wechselwirkung der Sensitivität gegenüber HDACi und der HR23b Expression. Fotheringham et al. konnten zeigen, dass die HDACi-basierte Induktion von Apoptose durch eine aberrante Proteasomaktivität verursacht wird. Dieser Vorgang ist von HR23b abhängig, da ein Ausschalten von HR23b die proteasomale Aktivität wiederherstellte [114]. In einer klinischen Studie der Phase II mit Vorinostat in kutanen T-Zell Lymphomen zeigte ein Patient mit hoher HR23b Expression zunächst ein Ansprechen auf die HDACi Therapie. Während der Laufzeit dieser Studie wurde der Tumor des Patienten jedoch progredient. Dieser Progress war assoziiert mit einem Verlust der HR23b Expression [112]. Dies zeigt, dass die dynamische Wechselwirkung von HR23b und HDACi, die wir hier in Sarkom- und GIST-Zelllinien zeigen konnten, auch in klinischen Studien von Relevanz ist. Aufgrund dieser Wechselwirkungen wird bei vielen Studien ein Behandlungsmodell mit Behandlungspausen und längeren Zeiträumen ohne HDACi Behandlung angestrebt [233-235].

Weitere Analysen dieser dynamischen Wechselwirkung von HR23b Expression und Sensitivität gegenüber HDACi sind für den klinischen Erfolg des Einsatzes von HDACi erforderlich. Eine Möglichkeit sind Westernblot Analysen der HDACi-abhängigen Signaltransduktion in Korrelation zur HR23b Expression. Experimente mit einer spezifischen siRNA gegen HR23b unter HDACi Behandlung sind eine andere Möglichkeit, um die Assoziation zwischen einer hohen HR23b Expression und der Sensitivität gegenüber HDACi zu analysieren.

6.1.5. HR23b Expression in humanen Gewebeproben

Die vorliegenden *in vitro* Ergebnisse zeigen, dass HR23b ein potentieller neuer Biomarker in Sarkomen sein kann. Hierauf basierend wurde ein Kollektiv aus über 500 klinischen Sarkom- und GIST-Proben zusammengestellt, um die HR23b Expression in Sarkomen immunhistochemisch zu bestimmen. Auch in diesem Kollektiv wurde, ähnlich wie in den Zelllinien, ein breites Spektrum der HR23b Expression nachgewiesen. In allen Subentitäten, außer den myxoiden Liposarkomen, wurden Fälle mit einer starken HR23b Expression (IHC Score 8-14) detektiert. Bei den myxoiden Liposarkomen zeigten 19 von 24 Fällen eine moderate HR23b Expression mit einem IHC Score von 2-7. Die Kriterien für eine HR23b Positivität wurden sehr strikt gewählt, um nur die Subentitäten zu bestimmen, die wahrscheinlich klinisch einen Benefit von der HDACi-basierten Therapie haben werden. Gustafsson et al. haben kürzlich beschrieben, dass ein großer Anteil der myxoiden Liposarkome seneszent ist [236]. Expressionsanalysen haben gezeigt, dass diese Sarkomentität durch eine hohe Expression der zyklinabhängigen Kinaseinhibitoren CDKN2A und D bzw. CDKN1B charakterisiert sind. Diese Proteine sind mit Seneszenz assoziiert [237]. Desweiteren konnte nur eine kleine Fraktion von Zellen mit hoher S-G₂ spezifischen CCNA

Expression nachgewiesen werden. Die Schlussfolgerung dieser Studie war, dass diese Zellen in der G₁ Phase arretiert sind. Eine geringe KI-67 Expression (4-8% der Zellen) sowie die Expression des Seneszenz assoziierten IL8 Rezeptor beta (CXCR2) in 50-91% der Zellen unterstützen diese Hypothese [236]. Rückwirkend auf die vorliegenden Ergebnisse bedeutet das, dass ein Teil der untersuchten myxoiden Liposarkome seneszent gewesen sein könnte. In diesem Zustand sind die Tumorzellen inaktiv und es findet keine Zellteilung statt. Der gesamte Stoffwechsel ist verändert, so dass auch die Sensitivität gegenüber HDACi und wahrscheinlich die Expression von HR23b beeinflusst wird [238]. Daher ist HR23b als potentieller Biomarker für die Sensitivität gegenüber HDACi in myxoiden Liposarkomen nicht optimal. Weitere Analysen zur Expression der Seneszenz-Marker sind aber zur Bestätigung dieser Hypothese notwendig.

12,5% der untersuchten Sarkome wiesen jedoch eine hohe HR23b Expression auf. Vor allem hoch aggressive Sarkome wie maligne periphere Nervenscheidewandtumore, pleomorphe Liposarkome, Leiomyosarkome, dedifferenzierte Liposarkome, Synovialsarkome und Angiosarkome zeigten eine hohe HR23b Positivität. Auch bei den GISTs wurde in 23,2% der Fälle eine starke HR23b Expression nachgewiesen. Auch hier zeigten ebenfalls Tumore mit einem hohen Progressionsrisiko eine hohe HR23b Expression. Gerade für diese aggressiven Sarkome ist es wichtig, alternative Therapieoptionen zu entwickeln. Daher sind besonders diese Untergruppen als potentielle Kandidaten für HDACi basierte Therapien interessant. Die Effektivität von Vorinostat in Leiomyosarkomen wurde bereits als Fallbeispiel publiziert werden. Eine Patientin zeigte nach mehrfachem Therapieversagen ein teilweises Ansprechen unter HDACi Therapie mit Vorinostat [239].

6.2. Funktionelle Rolle von miR-221 und miR-222 in gastrointestinalen Stromatumoren

Gastrointestinale Stromatumore sind resistent gegenüber Strahlen- und Chemotherapie. Sie besitzen in ca. 90% der Fälle eine aktivierende Mutation im Gen der homologen Rezeptortyrosinkinasen *KIT* oder *PDGFRA* [240]. Diese Mutation führt zu einer ligandenunabhängigen, konstitutiven Aktivierung des Rezeptors sowie der nachgeschalteten Signalwege. Die Einführung des selektiven Kinaseinhibitors Imatinib 2001 führte zu einer deutlichen Verbesserung der Therapie von GISTs (85% Ansprechrate [241]). Jedoch ist der Therapieerfolg abhängig vom Mutationsstatus, da bestimmte Mutationen primär resistent gegenüber Imatinib sind. Zusätzlich entstehen sekundäre Resistenzen unter Therapie. Dadurch ist die Entwicklung alternativer Therapieoptionen in GISTs essentiell.

Die Möglichkeit einer solchen Entwicklung bietet die Nutzung von miRNAs. Dabei handelt es sich um kleine, 22 Nukleotide lange, nicht kodierende RNAs, die posttranskriptionell die Expression von Genen beeinflussen können. Eine abnorme miRNA Expression kann daher zur Tumorentstehung beitragen [203]. Onkogene miRNAs weisen eine erhöhte Expression bei Krebserkrankungen auf und fördern die Entstehung und Progression [139, 148, 203, 155] des Tumors durch die Inhibition eines Tumorsuppressorgens [242]. miRNAs mit einer verminderter Expression agieren als Tumorsuppressor, wenn ihr Funktionsverlust zur Transformation einer gesunden Zelle zur Tumorzelle führt [243-245]. Substanzen, die die Funktion dieser miRNAs hemmen können, werden als Antagomire bezeichnet. Der Einsatz von *small interfering RNAs* (siRNAs) oder *peptide nucleic acids* (PNA) stellen eine Behandlungsmöglichkeit überexprimierter miRNAs dar. Beispielsweise führte der Einsatz von Peptid-Nukleinsäuren (PNA) gegen miR-21 zu einer reduzierten Metastasierung von Mammakarzinomen *in vivo* [246]. Rekombinante Expressionsvektoren, die z.B. *small hairpin RNAs* (shRNAs) kodieren, werden zur miRNA-Esatztherapie eingesetzt [247]. Die Behandlung mit synthetischen miR-34a Analogen führte in Lungentumoren zu einer Repression bekannter miR-34a Zielgene und damit zur Inhibition der Tumorstadiums [248].

Der Einsatz von miRNAs im Rahmen innovativer zielgerichteter Therapiekonzepte stellt jedoch eine große Herausforderung dar. Es treten vor allem Probleme auf durch eine geringe Stabilität der miRNAs, eine hohe Anzahl an Zielgenen für eine einzelne miRNA, eine beschriebene Zytotoxizität und eine unspezifische Administration der miRNAs. Durch den Einsatz von LNAs (*locked nucleic acid*), kationischen Liposomen und polymerbasierten Nanopartikeln wurde die Behandlung mit miRNAs deutlich verbessert. Modifikationen der miRNAs (z.B. Phosphorothioat, 2'-O-Methyl oder 2'-O-Methoxyethyl-Addition und Fluoridderivate) erhöhen die Stabilität von

miRNAs [150-153]. Gold-Nanopartikel, adeno-assoziierte virale Vektoren und RNA poly L-Lysin Komplexe verbessern die Administration der miRNAs [118, 154, 155].

Auch in GISTs wird eine miRNA basierte Therapie diskutiert [73, 249, 76, 74, 250]. GISTs weisen ein spezifisches miRNA Expressionsprofil im Vergleich zu anderen Sarkomen auf [149, 251, 75]. miR-133b Repression und Fascin-1 Überexpression sind mit einer Progression in GISTs assoziiert [252]. miR-218 dagegen scheint die Invasion zu inhibieren [77], während miR-494 die zelluläre Proliferation inhibiert [76]. Da aktivierende Mutationen in den Rezeptortyrosinkinasen *KIT* oder *PDGFRA* wesentlich zur Tumorgenese von GISTs beitragen, sind miRNAs, die diese Proteine posttranskriptionell regulieren, von besonderer Bedeutung.

Bioinformatische Studien zeigten, dass miR-221 und miR-222 an die *KIT* 3`UTR binden können [161]. Zuerst wurde in papillären Schilddrüsenkarzinomen ein regulatorischer Einfluss dieser miRNAs auf die *KIT* mRNA Expression gezeigt. In GISTs, mit verminderter miR-221 und miR-222 Expression, zeigte sich ebenfalls ein Effekt dieser beiden miRNAs auf den *KIT* Rezeptor [73, 76].

Die Konsequenzen der Interaktion von miR-221 und miR-222 mit *KIT* sind hinsichtlich der damit verbundenen physiologischen Prozesse bisher nicht ausreichend verstanden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der miR-221 und miR-222 auf die zelluläre Proliferation und Apoptose in drei verschiedenen GIST-Zelllinien (GIST882, GIST-T1 und GIST48) untersucht. Zusätzlich wurden Analysen zur miRNA vermittelten Signaltransduktion durchgeführt.

6.2.1. Charakterisierung der gastrointestinalen Stromatumor-Zelllinien

Zunächst wurden die verwendeten Zelllinien auf ihre in der Literatur beschriebenen Mutationen im *KIT* Gen untersucht. Durch Sanger Sequenzierung wurden diese bestätigt. Zur weiteren Analyse wurde die genomische DNA mittels massiver Parallelsequenzierung untersucht. Hierbei wurden zwei verschiedene Primerpanels verwendet. Panel 1 detektiert spezifisch Mutationen, die in GISTs beschrieben sind. Das zweite Primerpanel umfasst weitere Gene, so dass auch bisher bei GISTs unbekannte oder bisher klinisch nicht relevante Mutationen in verschiedenen Genen detektiert werden konnten. Sowohl *KRAS* als auch *BRAF* Mutationen können mit diesem Primerpanel detektiert werden. Mutationen in diesen beiden Genen werden mit einer primären Resistenz gegenüber Imatinib in GISTs assoziiert [253]. Auch aktivierende Mutationen im Gen der Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptortyrosinkinase Typ 3 (*FGFR3*) können detektiert werden, die beispielsweise mit der Entstehung und Progression von Urothelkarzinomen, von Zervix-, Prostata-, Lungen und Endometriumkarzinomen assoziiert sind [254-256]. Auch in GISTs konnte eine Wechselwirkung von *FGFR3* und *KIT* nachgewiesen werden [257].

Mutationen im Gen der Phosphatidylinositol 3-Kinase (*PIK3CA*) sind mit der Tumorgenese in Kolon-, Mamma und Lungenkarzinomen assoziiert [258] und können mit dem 2. Primerpanel detektiert werden. Für Patienten mit einer Mutation im Gen von *FGFR3*, *PIK3CA* oder *BRAF* stehen in anderen Tumorentitäten bereits Inhibitoren als Therapieoption zur Verfügung, so dass besonders diese Gene als neue Kandidatengene in GISTs interessant sind [259, 260].

Neue Technologien wie die massive Parallelsequenzierung ermöglichen eine umfassende molekulare Charakterisierung von Tumoren [261]. Diese neu gewonnenen Informationen können helfen, die Tumorentstehung und -Progression besser zu verstehen und neue, zielgerichtete Therapien zu entwickeln [262-264, 261, 265]. In GISTs sind durch die Sequenzierung ganzer Genome, Exome oder Gene neue Kandidatengene charakterisiert worden. Aufgrund dieser Daten wird die Definition Wildtyp-GISTs zukünftig erweitert werden [266-268]. In aktuellen Studien wurden Mutationen in allen vier Untereinheiten der *SDH*, in *BRAF*, *KRAS* und *NRAS* detektiert. 7,5% der Magen-GISTs sind *SDH* defizient durch eine Mutation in diesem Gen [269]. Allerdings weisen auch GISTs mit Mutationen in *KIT* oder *PDGFRA* weitere genetische Alterationen auf, die dann vor allem in Hinblick auf Resistenz und Progression wichtig sind. Ein Beispiel hierfür sind *BRAF* Mutationen, die nicht nur in den sogenannten Wildtyp-GISTs auftreten, sondern auch in Patienten mit Imatinibresistenz [34, 270]. 5% der GISTs mit aktivierender Mutation in *KIT* oder *PDGFRA* weisen eine zusätzliche *KRAS* Mutation auf, die mit Resistenz assoziiert ist [253]. Die massive Parallelsequenzierung der Zelllinien zeigte, dass die Zelllinie GIST882 neben der beschriebenen *KIT* Mutation eine Variante im Gen für die MET Rezeptortyrosinkinase aufweist (p.T1010I). Unter physiologischen Bedingungen ist diese Rezeptortyrosinkinase an vielen wichtigen Prozessen wie z.B. Wachstum, Invasion, Metastasierung, Angiogenese und Wundheilung beteiligt. [271]. Die in der Zelllinie GIST882 detektierte Variante ist sowohl als somatische als auch als Keimbahnmutation beschrieben und liegt in der juxtamembranären Domäne [272, 273]. Aussagen zu funktionellen Konsequenzen dieser Variante in Bezug auf die Aktivierung der MET Rezeptortyrosinkinase sind widersprüchlich. In Zelllinien von kleinzelligen Lungentumoren und Adenokarzinomen der Lunge wurde ein moderater Anstieg der autonomen zellulären Proliferation und der reaktiven Sauerstoffproduktion für diese Variante beschrieben [274]. Hier führt die Mutation zu einer konstitutiven Aktivierung des MET-Rezeptors. Funktionell führt dies zu einer Regulation der zellulären Transformation, der Proliferation, des Zytoskeletts und der Migration [275, 272]. Präklinische Untersuchungen zeigten, dass der zielgerichtete MET Inhibitor SU11274 die Proliferation reduziert und Apoptose induziert [275]. Andere Studien zeigten, dass diese Variante die Phosphorylierung von MET im Vergleich zur Wildtyp-Variante

nicht steigert und somit keine onkogene Treiberfunktion besitzt [276, 277]. In Bezug auf die untersuchte GIST-Zelllinie kann daher keine Aussage über die funktionellen Auswirkungen dieser Variante gemacht werden.

In der Zelllinie GIST-T1 wurde zusätzlich zu der beschriebenen Deletion in Exon 11 von *KIT* eine Punktmutation in Exon 3 von *SDHA* gefunden. Diese Mutation, die zu einem Austausch von Tyrosin zu Histidin in Codon 55 führt, ist bisher nicht beschrieben. Durch Wiederholung der Herstellung der Sequenzierbibliothek und der Sequenzierung wurde jedoch ein Artefakt ausgeschlossen. Das Enzym SDH ist ein Komplex, der aus vier Untereinheiten besteht. Als Teil des Citratzyklus und als Teil der Elektronentransportkette ist es an die Membran von Mitochondrien gebunden. In Paragangliomen führt die Inaktivierung eines Teil des Komplexes zum vollständigen Funktionsverlustes des gesamten Komplexes [278]. SDH Mutationen führen zum Funktionsverlust und zu einer Akkumulation von Succinat. Hierdurch werden wiederum Dioxygenaseenzyme der TET Familie und infolgedessen die DNA Methylierung und Genexpression inhibiert [279]. Auch in GISTs wurden Mutationen in allen Untereinheiten der Succinatdehydrogenase detektiert. 7,5% der Magen-GISTs weisen eine Mutation in einer der SDH Untereinheit auf, wobei die SDHA Untereinheit am häufigsten betroffen ist [280]. SDH ist ein klassischer Tumorsuppressor, bei dem ein vollständiger Funktionsverlust durch die Inaktivierung beider Allele beschrieben ist. In den meisten Fällen wird dies durch eine Kombination aus *loss-of-function* Keimbahnmutationen in einer der SDH Untereinheiten und einer somatischen Mutation im Gen der *SDH* in der Tumorzelle erzielt. Der Funktionsverlust in nur einem Allel kann toleriert und kompensiert werden [269]. Daher ist die Bedeutung der p.Y55H Mutation im *SDHA* Gen in der Zelllinie GIST48 ohne weitere funktionelle Analyse nicht vorhersagbar.

6.2.2. Einfluss von miR-221 und miR-222 auf die zelluläre Proliferation und Apoptose

Zur Untersuchung der Proliferation unter Einfluss der miR-221 und miR-222 wurden diese miRNAs in allen GIST-Zelllinien überexprimiert. Morphologische Veränderungen wurden lichtmikroskopisch festgehalten und mittels MTT Versuchen weiter untersucht. Sowohl miR-221 als auch miR-222 reduzierten die zelluläre Proliferation in allen drei GIST-Zelllinien unabhängig vom beschriebenen Mutationsstatus. Dieser antiproliferative Effekt wurde mittels ApoTox-Glo™ Triplex Assay bestätigt. Darüber hinaus korrelierte die Reduktion der Proliferation mit einer Induktion der Apoptose *in vitro*. In Prostatakarzinomen reguliert miR-221 ebenfalls die Proliferation und Apoptose [158]. *In vitro* Studien an Leukämiezelllinien zeigten, dass auch

miR-222 signifikant die Proliferation inhibiert und parallel Apoptose und einer Blockade des Zellzyklus induziert [281]. Die Korrelation aus Reduktion von Proliferation und Induktion von Apoptose wurde auch für die miR-494 [76] und miR-218 [77] in GISTs gezeigt. Beide miRNAs beeinflussen diese physiologischen Prozesse durch eine Regulation von KIT.

Gits et al., zeigten, dass miR-222 nur einen schwachen Effekt auf die zelluläre Proliferation und Apoptose in der Zelllinie GIST882 aufwies. In der Zelllinie GIST-T1 wurde ein wesentlich stärkerer Einfluss dieser miRNA auf die Proliferation und Apoptose beobachtet. Interessanterweise zeigte die KIT mRNA Expressionsanalyse nach miRNA Transfektion eine Reduktion der KIT mRNA um 38% in der Zelllinie GIST-T1 und um 46% in der Zelllinie GIST882 [163]. Das bedeutet, dass in der Studie von Gits et al. auf mRNA Ebene die miR-222 abhängigen Effekte in der Zelllinie GIST882 stärker waren.

Obwohl beide miRNAs unter dem Einfluss desselben Promotors vom gleichen Genabschnitt auf Chromosom Xp11.3 transkribiert werden, zeigten sie einen unterschiedlich starken Effekt auf die GIST-Zelllinien. Dieses Phänomen wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen in anderen Tumorentitäten beobachtet [282-284] und kann auf einer differentiellen Regulation der miRNAs beruhen. Eine Recherche in der Datenbank *microRNA.org - Targets and Expression* zeigte, dass beide miRNAs einen unterschiedlichen miRSVR Wert für den KIT Rezeptor aufweisen (miR-221: -2.11 und miR-222: -2.20, Stand März 2015). Die miRSVR Werte für die Interaktion mit anderen Genen liegen bei beiden miRNAs in einem Bereich von -3,02 bis 0. Die miRSVR Regressionsmethode dient der Vorhersage der Wahrscheinlichkeit der Herunterregulation der Ziel-mRNA anhand der Sequenz und der Struktur der miRNA/mRNA Interaktionssequenz. Das bedeutet, dass beide miRNAs unterschiedlich starke Regulationswahrscheinlichkeiten in Bezug auf KIT aufweisen. Ähnliche Unterschiede konnten für weitere Zielgene, wie z.B. SNX4 beobachtet werden. Desweiteren zeigten die bioinformatischen Vorhersagen der oben genannten Datenbank, dass miR-221 5670 potentielle Zielgene aufweist, miR-222 dagegen 5434 bei einer Gesamtzahl von 34911 verschiedenen 3'UTR-Isoformen von 19898 humanen Genen (Stand März 2015). Dies stellt eine Erklärung für die unterschiedlich starken Regulationen der miR-221 und miR-222 in den untersuchten GIST-Zelllinien dar.

6.2.3. miR-221 und miR-222 induzieren Apoptose über den KIT/AKT Signalweg in gastrointestinalen Stromatumoren

Wie sich letztendlich die Regulation des KIT Rezeptors durch die miRNAs auf den weiteren Signalweg und damit auf Proliferation und Apoptose in GISTs auswirkt, ist bisher unbekannt. Daher war die Analyse der Signaltransduktion ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit.

GISTs mit Mutationen in *KIT* zeigen eine hohe Expression von phosphoryliertem KIT. Diese Expression ist mit einer Aktivierung der nachgeschalteten Proteine wie MAPK3/1, AKT, STAT1 und STAT3 assoziiert ist [28]. In der Imatinib und Flavopiridol vermittelten Apoptose spielt der PI3K/AKT Signalweg eine wichtige Rolle [27, 28, 66]. In Osteosarkomen reguliert die Überexpression von miR-221 die zelluläre Proliferation, Apoptose und den Zellzyklus über den PI3K/AKT Signalweg. Daher scheint dieser Signalweg von besonderer Bedeutung in der miR-221 und miR-222 abhängigen Regulation von Proliferation und Apoptose zu sein [285].

Phosphoryliertes AKT wirkt antiapoptotisch durch eine Inhibition der Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien [286]. Unter physiologischen Bedingungen führt die Cytochrom c Freisetzung zur Aktivierung von Caspasen und damit zur Apoptose [287]. Im gleichen Signalweg liegt MTOR, ein Protein, das ebenfalls mit Apoptose assoziiert wird. Die durch p-MTOR aktivierte RPS6K (p70S6K) kann an die mitochondriale Membran binden und dort das proapoptotische Protein BAD phosphorylieren. Das so inaktivierte Protein dissoziiert von den mitochondrialen Apoptoseinhibitoren BCL2L1 (BCL-xL) und BCL2 [288]. Daher wurden die Proteine AKT und MTOR sowie BCL2 und BCL2L1 für die Westernblot Analysen ausgewählt. Hierbei wurde der Effekt der miR-221, miR-222 und einer Kombination aus beiden 24, 48 und 72 h nach Transfektion der Zelllinien GIST882, -T1 und 48 auf die Gesamtproteinexpression und Phosphorylierung von KIT, AKT, MTOR, BCL2 und BCL2L1 (BIM) untersucht. Die Überexpression von miR-221 und miR-222 reduzierte die Phosphorylierung und die Gesamtexpression von KIT in allen drei Zelllinien. Die Reduktion der Gesamtexpression von KIT wurde mittels immunhistochemischer KIT Färbung bestätigt. Dieser Effekt war vergleichbar mit der Reduktion der KIT Expression und der Phosphorylierung durch RNA Interferenz. Zusätzlich korrelierte diese Reduktion mit einer verminderten Phosphorylierung und Expression von AKT. Die MTOR Expression und Phosphorylierung keine Veränderung in allen Zelllinien. Die Transfektion der miR-221 zeigte in allen drei Zelllinien keinen Einfluss auf die Phosphorylierung und Gesamtproteinexpression von MTOR. Die Effekte der miRNAs auf die zelluläre Proliferation und Apoptose wurden demzufolge über eine Signalkaskade unter Einbeziehung von KIT und AKT, aber nicht MTOR vermittelt. Ähnliche Signaltransduktionswege sind bereits für andere miRNAs beschrieben. miR-494 reduzierte die Proliferation durch eine verringerte Expression von KIT und p-AKT in GISTs [76]. Neben KIT ist auch der Transkriptionsfaktor ETV-1 an der

miR-221 und miR-222 abhängigen Inhibition der Proliferation und Induktion der Apoptose beteiligt [163].

Der Einfluss von AKT und Caspase 3 auf die Proliferation und Apoptose wurde auch in Melanomen beschrieben [289]. In der akuten myeloischen Leukämie ist eine miR-193b abhängige Signaltransduktion über KIT und AKT beschrieben, die zu einer verminderten Proliferation führt. In vaskulären glatten Muskelzellen führte die Überexpression von miR-221 zu einer Reduktion von KIT und CDKN1B und damit zur einer Regulation der zellulären Proliferation [290]. Auch in hepatozellulären und Schilddrüsenkarzinomen ist ein regulatorischer Einfluss von miR-221 und miR-222 auf CDKN1B beschrieben [195, 291]. CDKN1B ist ein direktes Zielgen von miR-221 und miR-222, das als ein weiteres Protein in der Signaltransduktion von KIT und AKT in GISTs denkbar ist. Weitere Westernblot Analysen sind notwendig, um den Zusammenhang zwischen miR-221 und miR-222 Expression und CDKN1B Regulation in GISTs zu untersuchen.

Der Einfluss der miRNAs auf die Regulation von KIT und AKT war in den untersuchten Zelllinien unterschiedlich. Die KIT Expression und Phosphorylierung wurden am stärksten in der Zelllinie GIST882 verändert. Der Einfluss auf p-AKT war in der Zelllinie GIST882 am stärksten, während die Proteinexpression in der Zelllinie GIST48 kaum reguliert wurde. Diese unterschiedlichen Effekte deuten auf eine Variabilität der Signaltransduktion in den untersuchten GIST-Zelllinien hin. Eine Korrelation zwischen Mutationsstatus und Signaltransduktion wurde bereits gezeigt. GISTs mit einer Mutation in Exon 9 von *KIT* weisen eine geringere Phosphorylierung von AKT auf, als GISTs mit einer Mutation in Exon 11 des *KIT* Gens [28]. Da alle untersuchten Zelllinien eine Mutation im *KIT* Gen aufweisen (GIST-T1 mit einer heterozygoten Mutation in Exon 11 von *KIT* (p.V560_Y578del); GIST882 mit einer homozygoten Mutation in Exon 13 (p.K642E) von *KIT* und GIST48 mit einer homozygoten Mutation in Exon 11 (p.V560D) und einer zusätzlichen sekundären, heterozygoten Mutation in Exon 17 (p.D820A) von *KIT*) sollten auch GIST-Zelllinien mit einer Mutation von *PDGFRA* oder mit Wildtyp Status analysiert werden.

Die oben beschriebene Variabilität kann auch mit den zusätzlich gefundenen Mutationen zusammenhängen, da die Zelllinie GIST882 eine zusätzliche Mutation im Gen der *MET* Rezeptortyrosinkinase aufweist, deren funktioneller Einfluss bislang nicht geklärt ist und die Zelllinie GIST48 eine zusätzliche Mutation im Gen der *SDHA* Untereinheit, deren funktioneller Einfluss ebenfalls nicht geklärt ist.

Auch die Merkmalsausprägung kann eine Rolle spielen. Bachet et al. zeigten, dass GISTs mit einer homozygoten Mutation in *KIT* ein anderes Genexpressionsprofil aufweisen, als GISTs mit

einer heterozygoten Mutation. Basierend hierauf wurde die Hypothese postuliert, dass diese GISTs einen distinkten onkogenen Signalweg aktivieren [292]. Die Zelllinie GIST882 weist eine homozygote Mutation in *KIT* auf, die Zelllinie GIST-T1 eine heterozygote und die GIST48 eine homozygote Primär- und eine heterozygote Sekundärmutation. Nach der oben aufgeführten Hypothese können somit die drei Zelllinien ein unterschiedliches Genexpressionsprofil aufweisen, das ebenso unterschiedlichen Einfluss auf die Signaltransduktion haben könnte.

BCL2L11 ist ein proapoptotisches Protein, das durch den Transkriptionsfaktor FOXL1 nachgeschaltet von AKT aktiviert werden kann [293]. Die durch Imatinib induzierte Apoptose in BCR/ABL+ Leukämiezellen wird durch BCL2L11 und BAD reguliert [294]. Auch BCL2 scheint eine wichtige Rolle in GISTs zu spielen. Die synergistische Behandlung durch den BCL2-Inhibitor ABT-737 mit Imatinib erhöhte signifikant die Apoptose in GISTs [64]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls die Expression dieser beiden Proteine nach miRNA Transfektion mittels Westernblot Analysen untersucht. Es konnte eine miRNA abhängige Reduktion der BCL2 Expression detektiert werden, während die Expression von BCL2L11 nahezu konstant blieb. Daher ist davon auszugehen, dass die Induktion der Apoptose durch miR-221 und miR-222 über eine Signalkaskade von KIT, AKT und BCL2 vermittelt wird.

6.2.4. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von HR23b in Sarkomen sowohl im Zellkulturmodell als auch in klinischen Proben gezeigt. Die *in vitro* Analysen deuten einen erfolgsversprechenden Einsatz von Vorinostat in Sarkomen an, wenn die Expression von HR23b als prädiktiver Biomarker für die Sensitivität genutzt wird. Dies sollte aber in weiteren Experimenten bestätigt werden. Die unterschiedliche Sensitivität der Zelllinien gegenüber den pan-HDACi als auch Isotyp-spezifischen HDACi kann durch den immunhistochemischen Nachweis der exprimierten HDAC weiter analysiert werden. Damit kann ein Zusammenhang zwischen exprimiertem HDAC und Ansprechen auf die unterschiedlichen HDACi hergestellt werden. Experimente mit RNA Interferenz können einen direkten Zusammenhang der HDACi Sensitivität und der HR23b Expression demonstrieren. Auch die Analyse der Signaltransduktion kann einen weiteren Zusammenhang zwischen HR23b Expression und der HDACi Sensitivität herstellen. Hierbei sind vor allem Proteine interessant, die mit der proteasomalen Funktion von HR23b assoziiert sind.

Desweiteren sollte die HDACi Sensitivität in Sarkomen *in vivo* Experimenten untersucht werden. Ein geeignetes Modell sind Xenotransplantate mit einer Zelllinie, die sensitiv gegenüber Vorinostat, Belinostat, Mocetinostat und Entinostat ist und einer Zelllinie, die resistent gegenüber diesen HDACi ist. Zur kompletten Reduktion der HR23b Expression sind auch hier RNA Interferenz Experimente denkbar. Auf Grundlage der gewonnenen *in vitro* Ergebnisse können die Xenotransplantate mit HDACi behandelt und der Einfluss der HR23b Expression weiter analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Analysen könnten HR23b als einen prädiktiven Biomarker für eine HDACi Behandlung in Sarkomen beweisen. Dies kann zu einer Optimierung der HDACi Behandlung führen, indem Patienten ausgewählt werden, die wahrscheinlich von dieser Therapie profitieren.

Weiterhin wurde die funktionelle Rolle der miR-221 und miR-222 in GISTs analysiert. Die Überexpression von beiden miRNAs führte in drei verschiedenen GIST-Zelllinien zu einer Reduktion der Proliferation und Induktion von Apoptose. Bei der Signalweganalyse zeigte sich, dass KIT, AKT und BCL2 an diesen Prozessen beteiligt sind. Jedoch sind weitere Analysen erforderlich, um den Verlauf der Signaltransduktion aufzuschlüsseln. Eine Überexpression von miR-221 und miR-222 in einer miRNA Ersatztherapie und die gleichzeitige Anwendung entsprechender Antagomirs können die direkte Korrelation aus miR-221 und miR-222 Expression und Reduktion der Proliferation bzw. Induktion der Apoptose weiter analysieren. Denkbar wären auch umfassende Expressionsanalysen vor und nach Überexpression der miR-221 und miR-222,

um weitere Zielgene zu identifizieren, die an diesen physiologischen Prozessen beteiligt sind. Diese Kandidatengene können in Reporterstudien weiter analysiert werden.

Interessant ist auch die Analyse weiterer GIST-Zelllinien, die beispielsweise eine Wildtypsequenz für KIT aufweisen oder kein KIT exprimieren, um den Einfluss von miR-221 und miR-222 auf die Tumorgenese von GISTs zu generalisieren. Durch ein genaueres Verständnis der Funktion von miR-221 und miR-222 in GISTs und der hiervon abhängigen Signaltransduktion ist ein Einsatz dieser miRNAs als miRNA-Ersatztherapie in GISTs denkbar.

7. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HDACi und der Einsatz von miRNAs als alternative Therapieoptionen in mesenchymalen Neoplasien untersucht. Als Modellsystem diente ein Kollektiv aus 17 verschiedenen Sarkom- und GIST-Zelllinien, das alle wichtigen Sarkomentitäten abdeckte, die bei Erwachsenen auftreten können.

HR23b wurde als ein potentieller Biomarker für die Sensitivität gegenüber HDACi in kutanen T-Zell Lymphomen und hepatozellulären Karzinomen beschrieben. Die Grundvoraussetzung für den Einsatz dieses Proteins auch in Sarkomen ist seine Expression. Westernblot Analysen zeigten, dass die ausgewählten Sarkom- und GIST-Zelllinien ein breites Spektrum an HR23b Expression aufwiesen. Die HDACi Behandlung mit Vorinostat, Belinostat, Mocetinostat und Entinostat zeigte in Sarkomen antiproliferative und proapoptotische Effekte. Keine der untersuchten Zelllinien war sensitiv gegenüber allen vier HDACi. Die Korrelation der HR23b Expression und der Sensitivität gegenüber HDACi zeigte, dass HR23b ein potentieller neuer Biomarker für das Ansprechen von Vorinostat in Sarkomen darstellen könnte, da eine signifikante Korrelation beobachtet werden konnte. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die HR23b Expression konzentrationsabhängig unter HDACi reduziert wird. In einem Kollektiv aus über 500 klinischen Sarkom- und GIST-Proben konnte weiterhin gezeigt werden, dass 12,5% der Sarkome und 23,2% der GISTs stark positiv für HR23b sind. Vor allem stark aggressive Entitäten wie maligne periphere Nervenscheidewandtumore, Leiomyosarkome und Angiosarkome zeigten eine hohe HR23b Positivität, die sie zu potentiellen neuen Kandidaten für weitere Studien mit HDACi basierter Therapie machen.

Aber auch miRNAs stellen eine neue potentielle Therapieoption in der Behandlung von Tumoren dar. In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedenen GIST-Zelllinien (zwei Imatinib sensitive GIST882 und GIST-T1 und eine Imatinib resistente GIST48) verwendet, um den miR-221 und miR-222 vermittelten Effekt in Bezug auf die Proliferation, Apoptose und Signaltransduktion zu analysieren. Lichtmikroskopisch konnten Veränderungen in allen drei Zelllinien nach Überexpression der miRNA detektiert werden. MTT und ApoTox-Glo™ Triplex Assays zeigten, dass die miRNAs die zelluläre Proliferation in allen drei GIST-Zelllinien reduzierten und dass diese Reduktion mit einer signifikanten Apoptoseinduktion korrelierte. Die Effekte der miRNAs waren weder additiv noch kompetitiv. Westernblot Analysen zur Signaltransduktion zeigten, dass diese antiproliferativen und proapoptotischen Effekte über eine Signalkaskade von KIT über AKT und BCL2, aber nicht über MTOR und BCL2L11 vermittelt wurde.

Die hier vorliegenden Ergebnisse ermöglichen einen detaillierten Einblick in die posttranskriptionelle Regulation der miR-221 und miR-222 in GISTs. Sie bilden eine Basis, um die molekularpathologische Tumorgenese von GISTs weiter zu charakterisieren und neue, alternative Therapieoptionen in Form von miRNAs zu etablieren.

8. Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 30: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin
ACTB	Beta Aktin
ADP	Adenindiphosphat
AKT	Engl.: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ASA	Angiosarkom
ATP	Adeninriphosphat
BCL2	B-Zell CLL/Lymphom 2 (engl.: B-cell CLL/lymphoma 2)
bp	Basenpaare
BRAF	Engl.: rapidly accelerated fibrosarcoma isoform B
BSA	Rinderalbumin (engl.: bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CD	Differenzierungscluster (engl. Cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre DNA (engl.: complementary DNA)
CTCL	Kutanes T-Zell Lymphom (engl.: cutaneous T-cell lymphoma)
DAPI	4, 6-Diamidin-2-Phenylindol
DDIT3	Engl.: DNA damage inducible transcript 3
DDL5	Dedifferenziertes Liposarkom
ddNTP	didesoxy-NTP
DMEM	Medium für die Zellkultur (engl.: Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: Desoxyribonucleic Acid)
dNTP	desoxy-NTP
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EWS	Ewingsarkom
FBS	Fötales Rinderserum (engl.: Fetal Bovine Serum)
FFPE	Formalin-fixiert/Paraffin-eingebettet
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
G	Guanin
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
HDAC	Histon Deacetylase
HDACi	Histon Deacetylase Inhibitor
HAT	Histon Acetyltransferasen
HCC	hepatozelluläres Karzinom (engl.: hepatocellular carcinoma)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPF	Gesichtsfeld bei maximaler Vergrößerung (engl.: high power fields)
HPLC	Hochdruck Flüssigchromatographie (engl.: High Pressure Liquid Chromatography)
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Merrettichperoxidase (engl.: horseradish peroxidase)

Abkürzung	Bedeutung
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration, Konzentration, die 50% Hemmung bewirkt
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IMDM	Medium für die Zellkultur (engl.: Iscove's Modified Dulbecco's Medium)
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LMS	Leiomyosarkom
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MDM2	MDM2 Protoonkogen
MEK	MAPK-Kinase
MEM	Medium für die Zellkultur (engl.: Minimal Essential Medium α)
Min	Minuten
miRISC	microRNA-RISC
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
MLS	Myxoides Liposarkom
MPNST	Maligner peripherer Nervenscheidewandtumor
mRNA	Boten-RNA (engl.: messenger RNA)
N	Normalgewebe
ncRNA	nicht Protein kodierende RNA (engl.: non-coding RNA)
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid
NTP	Nukleosidtriphosphat
OS	Gesamtüberleben (engl.: overall survival)
p	phospho
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: Phosphate Buffered Saline)
PBS-T	PBS-Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction)
PDGFRA	Engl.: Platelet derived growth factor alpha
PFS	progressionsfreie Überleben (engl.: progression free survival)
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3 Kinase
Pre-miRNA	Vorläufer microRNA (engl.: Precursor microRNA)
Pri-miRNA	Primäre microRNA (engl.: Primary microRNA)
R	Rückwärts (engl.: Reverse)
REST	Relative Expressionssoftware (engl.: Relative Expression Software Tool)
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit (engl.: relative fluorescence unit)
RISC	RNA-induzierter Silencing Komplex (engl.: RNA-induced Silencing Complex)
RLU	Relative Lumineszenzeinheit (engl.: relative luminescence unit)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: Ribonucleic Acid)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RPMI	Medium für die Zellkultur
SDS	Sodiumdodecylsulfat

Abkürzung	Bedeutung
sec	Sekunden (engl.: seconds)
Seq	Sequenz
SH-2	Src- homology-2 Domäne
siRNA	kleine Interferenz-RNA (engl.: small interfering RNA)
SNP	einzelner Nukleotid Polymorphismus (engl.: single nucleotide polymorphism)
SS	Synovialsarkom
STAT	Singaltransduzierendes und transkriptionsaktivierendes Protein (engl.: signal transducer and activator of transcription)
T	Tumorgewebe
T	Thymin
TBE	TRIS-Borat-EDTA Puffer
TM	Schmelzpunkt (engl.: Melting Point)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ü/N	über Nacht
UTR	untranslatierter Bereich (engl.: Untranslated Region)
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
vs	versus
WDLS	Gut differenziertes Liposarkom (engl.: well differentiated liposarcoma)
z.B.	zum Beispiel

9. *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1:	Hämatoxylin-Eosin Färbungen morphologischer Subtypen gastrointestinaler Stromatumoren.....	3
Abbildung 2:	Primär- und Sekundärmutationen in den homologen Rezeptortyrosinkinasen KIT und PDGFRA.	7
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Chromatins.....	9
Abbildung 4:	Die Rolle von HR23b (RAD23) in der proteasomalen Degradierung von Proteinen.	14
Abbildung 5:	Die Biogenese der miRNAs [138].	16
Abbildung 6:	Prinzipien der miRNA-mRNA Bindung. Wichtige Basenpaarungen der miRNA-mRNA Interaktion, die für die Bindung und Spaltung der mRNA in Metazoa wichtig sind.....	17
Abbildung 7:	Größenstandard für die Agarosegelelektrophorese.....	30
Abbildung 8:	Größenstandards für die SDS-PAGE.....	30
Abbildung 9:	Genetische Alterationen der verwendeten Sarkom- und gastrointestinalen Stromatumor-Zelllinien.....	58
Abbildung 10:	HR23b Expression in Sarkom- und gastrointestinalen Stromatumor-Zelllinien.	59
Abbildung 11:	Histon-Deacetylase Inhibitor vermittelte Effekte auf die zelluläre Proliferation und Apoptose.	62
Abbildung 12:	Einfluss der HDACi auf die zelluläre Proliferation in Abhängigkeit der Zeit.	64
Abbildung 13:	Einfluss der HDACi auf die Apoptose in Abhängigkeit der Zeit.	65
Abbildung 14:	Korrelation der HR23b Expression mit der Sensitivität gegenüber Histon-Deacetylase Inhibitoren.	67
Abbildung 15:	HR23b Expression unter Histon-Deacetylase Inhibitorbehandlung.	68
Abbildung 16:	Immunhistochemische HR23b Färbung in klinisch relevanten Sarkom- und gastrointestinalen Stromatumoren.	72
Abbildung 17:	Fragmentgrößenbestimmung nach der Ion AmpliSeq™ Custom Panel Multiplex PCR und der Bibliotheksvorbereitung.	74
Abbildung 18:	miR-221 und miR-222 vermittelte morphologische und proliferative Veränderungen in GISTs.	77
Abbildung 19:	Verifizierung der antiproliferativen Effekte der miR-221 und miR-222 durch den ApoTox-Glo™ Triplex Assay.	79
Abbildung 20:	miR-221 und miR-222 vermittelte Induktion von Apoptose.	81

Abbildung 21:	Immunhistochemische KIT Färbung der gastrointestinalen Stromatumorzelllinien GIST882, GIST-T1 und GIST48.	82
Abbildung 22:	miR-221 und miR-222 vermittelte Signaltransduktion in der Zelllinie GIST882.	84
Abbildung 23:	miR-221 und miR-222 vermittelte Signaltransduktion in der Zelllinie GIST-T1.	85
Abbildung 24:	miR-221 und miR-222 vermittelte Signaltransduktion in der Zelllinie GIST48.	86

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Risikoklassifikation von gastrointestinalen Stromatumoren nach Miettinen und Lasota, 2006 [37].	5
Tabelle 2:	Klassifikation von Histon-Deacetylase Inhibitoren (HDACi) basierend auf der chemischen Struktur (modifiziert nach [92]).	11
Tabelle 3:	Laborgeräte.	21
Tabelle 4:	Verbrauchsmaterialien.	23
Tabelle 5:	Chemikalien und Reagenzien.	24
Tabelle 6:	Reaktionskits.	27
Tabelle 7:	Medien und Zusätze für die Zellkultur.	27
Tabelle 8:	Primer für die Polymerasekettenreaktion (PCR).	30
Tabelle 9:	Sonden für die Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.	31
Tabelle 10:	Kultivierte Zelllinien.	31
Tabelle 11:	Primäre, nicht markierte Antikörper.	32
Tabelle 12:	sekundäre Antikörper.	33
Tabelle 13:	siRNAs und miRNAs.	33
Tabelle 14:	Histon-Deacetylase Inhibitoren.	33
Tabelle 15:	Software und Datenbanken.	33
Tabelle 16:	PCR-Bedingungen für die Amplifikation von <i>KIT</i> .	38
Tabelle 17:	Bedingungen für die Sequenzierungs-PCR.	39
Tabelle 18:	PCR-Bedingungen für die Ion AmpliSeq™ Multiplex PCR.	40
Tabelle 19:	Bedingungen für den FuPa-Verdau.	41
Tabelle 20:	Bedingungen für die Adenylierung.	41
Tabelle 21:	Bedingungen für die Adapter-Ligation.	42
Tabelle 22:	Bedingungen für die Amplifikation der Bibliothek.	42
Tabelle 23:	Kultivierungsbedingungen und Zellzahl für die <i>in vitro</i> Versuche.	45
Tabelle 24:	Pipettierschema zur Verdünnung der Histon-Deacetylase Inhibitoren.	48
Tabelle 25:	Kriterien für die Beurteilung der immunhistochemischen HR23b Färbung	52
Tabelle 26:	Kollektivzusammenstellung der Zelllinien von Sarkomen und GISTs.	57
Tabelle 27:	IC ₅₀ -Werte der Histon-Deacetylase Inhibitoren Vorinostat, Belinostat, Mocetinostat, Entinostat in den untersuchten Sarkom- und GIST-Zelllinien.	61
Tabelle 28:	HR23b Expression in klinisch relevanten Sarkom- und GIST-Entitäten.	70
Tabelle 30:	Abkürzungsverzeichnis	107

11. Literaturverzeichnis

1. Ducimetiere F, Lurkin A, Ranchere-Vince D, Decouvelaere AV, Peoc'h M, Istier L, Chalabreysse P, Muller C, Alberti L, Bringuier PP, et al: **Incidence of sarcoma histotypes and molecular subtypes in a prospective epidemiological study with central pathology review and molecular testing.** *PLoS One* 2011, **6**:e20294.
2. Clark MA, Fisher C, Judson I, Thomas JM: **Soft-tissue sarcomas in adults.** *N Engl J Med* 2005, **353**:701-711.
3. Gregorian C, Nakashima J, Dry SM, Nghiemphu PL, Smith KB, Ao Y, Dang J, Lawson G, Mellinghoff IK, Mischel PS, et al: **PTEN dosage is essential for neurofibroma development and malignant transformation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:19479-19484.
4. Horvai AE, DeVries S, Roy R, O'Donnell RJ, Waldman F: **Similarity in genetic alterations between paired well-differentiated and dedifferentiated components of dedifferentiated liposarcoma.** *Mod Pathol* 2009, **22**:1477-1488.
5. Rosai J, Akerman M, Dal Cin P, DeWever I, Fletcher CD, Mandahl N, Mertens F, Mitelman F, Rydholm A, Sciot R, et al: **Combined morphologic and karyotypic study of 59 atypical lipomatous tumors. Evaluation of their relationship and differential diagnosis with other adipose tissue tumors (a report of the CHAMP Study Group).** *Am J Surg Pathol* 1996, **20**:1182-1189.
6. Snyder EL, Sandstrom DJ, Law K, Fiore C, Sicinska E, Brito J, Bailey D, Fletcher JA, Loda M, Rodig SJ, et al: **c-Jun amplification and overexpression are oncogenic in liposarcoma but not always sufficient to inhibit the adipocytic differentiation programme.** *J Pathol* 2009, **218**:292-300.
7. Subramanian S, Thayanithy V, West RB, Lee CH, Beck AH, Zhu S, Downs-Kelly E, Montgomery K, Goldblum JR, Hogendoorn PC, et al: **Genome-wide transcriptome analyses reveal p53 inactivation mediated loss of miR-34a expression in malignant peripheral nerve sheath tumours.** *J Pathol* 2010, **220**:58-70.
8. Taylor BS, Barretina J, Maki RG, Antonescu CR, Singer S, Ladanyi M: **Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets.** *Nat Rev Cancer* 2011, **11**:541-557.
9. Ren T, Lu Q, Guo W, Lou Z, Peng X, Jiao G, Sun Y: **The clinical implication of SS18-SSX fusion gene in synovial sarcoma.** *Br J Cancer* 2013, **109**:2279-2285.
10. Greene FL: **The American Joint Committee on Cancer: updating the strategies in cancer staging.** *Bull Am Coll Surg* 2002, **87**:13-15.
11. Shoushtari AN, Van Tine BA, Schwartz GK: **Novel treatment targets in sarcoma: more than just the GIST.** *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2014:e488-495.
12. Bauer S, Lang H, Schutte J, Hartmann JT: **Complete remission with imatinib in metastatic gastrointestinal stromal tumors.** *J Clin Oncol* 2005, **23**:6800-6801; author reply 6801-6802.
13. Davis IJ, Kim JJ, Ozsolak F, Widlund HR, Rozenblatt-Rosen O, Granter SR, Du J, Fletcher JA, Denny CT, Lessnick SL, et al: **Oncogenic MITF dysregulation in clear cell sarcoma: defining the MiT family of human cancers.** *Cancer Cell* 2006, **9**:473-484.
14. McGill GG, Haq R, Nishimura EK, Fisher DE: **c-Met expression is regulated by Mitf in the melanocyte lineage.** *J Biol Chem* 2006, **281**:10365-10373.
15. Tsuda M, Davis IJ, Argani P, Shukla N, McGill GG, Nagai M, Saito T, Lae M, Fisher DE, Ladanyi M: **TFE3 fusions activate MET signaling by transcriptional up-regulation, defining another class of tumors as candidates for therapeutic MET inhibition.** *Cancer Res* 2007, **67**:919-929.
16. Kolb EA, Gorlick R: **Development of IGF-IR Inhibitors in Pediatric Sarcomas.** *Curr Oncol Rep* 2009, **11**:307-313.
17. Mosse YP, Wood A, Maris JM: **Inhibition of ALK signaling for cancer therapy.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**:5609-5614.

18. Scotlandi K, Benini S, Sarti M, Serra M, Lollini PL, Maurici D, Picci P, Manara MC, Baldini N: **Insulin-like growth factor I receptor-mediated circuit in Ewing's sarcoma/peripheral neuroectodermal tumor: a possible therapeutic target.** *Cancer Res* 1996, **56**:4570-4574.
19. Rubin BP, Heinrich MC, Corless CL: **Gastrointestinal stromal tumour.** *Lancet* 2007, **369**:1731-1741.
20. Lasota J, Miettinen M: **A new familial GIST identified.** *Am J Surg Pathol* 2006, **30**.
21. Miettinen M, Lasota J: **Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis.** *Arch Pathol Lab Med* 2006, **130**:1466-1478.
22. Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC: **Biology of gastrointestinal stromal tumors.** *J Clin Oncol* 2004, **22**:3813-3825.
23. Espinosa I, Lee CH, Kim MK, Rouse BT, Subramanian S, Montgomery K, Varma S, Corless CL, Heinrich MC, Smith KS, et al: **A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors.** *Am J Surg Pathol* 2008, **32**:210-218.
24. Wang C, Jin MS, Zou YB, Gao JN, Li XB, Peng F, Wang HY, Wu ZD, Wang YP, Duan XM: **Diagnostic significance of DOG-1 and PKC-theta expression and c-Kit/PDGFR mutations in gastrointestinal stromal tumours.** *Scand J Gastroenterol* 2013, **48**:1055-1065.
25. West RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, Zhu S, Ball CA, Nielsen TO, Patel R, et al: **The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status.** *Am J Pathol* 2004, **165**:107-113.
26. Roskoski R, Jr.: **Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **338**:1307-1315.
27. Bauer S, Duensing A, Demetri GD, Fletcher JA: **KIT oncogenic signaling mechanisms in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor: PI3-kinase/AKT is a crucial survival pathway.** *Oncogene* 2007, **26**:7560-7568.
28. Duensing A, Medeiros F, McConarty B, Joseph NE, Panigrahy D, Singer S, Fletcher CD, Demetri GD, Fletcher JA: **Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs).** *Oncogene* 2004, **23**:3999-4006.
29. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, et al: **Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors.** *Science* 1998, **279**:577-580.
30. Corless CL, Barnett CM, Heinrich MC: **Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology.** *Nat Rev Cancer* 2011, **11**:865-878.
31. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, McGreevey LS, Chen CJ, Van den Abbeele AD, Druker BJ, et al: **Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor.** *J Clin Oncol* 2003, **21**:4342-4349.
32. Lasota J, Wozniak A, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Kordek R, Nassar A, Sobin LH, Miettinen M: **Mutations in exons 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors. A study of 200 cases.** *Am J Pathol* 2000, **157**:1091-1095.
33. Huss S, Kunstlinger H, Wardelmann E, Kleine MA, Binot E, Merkelbach-Bruse S, Rudiger T, Mittler J, Hartmann W, Buttner R, Schildhaus HU: **A subset of gastrointestinal stromal tumors previously regarded as wild-type tumors carries somatic activating mutations in KIT exon 8 (p.D419del).** *Mod Pathol* 2013.
34. Agaram NP, Wong GC, Guo T, Maki RG, Singer S, Dematteo RP, Besmer P, Antonescu CR: **Novel V600E BRAF mutations in imatinib-naive and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors.** *Genes Chromosomes Cancer* 2008, **47**:853-859.

35. Karnoub AE, Weinberg RA: **Ras oncogenes: split personalities.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**:517-531.
36. Demetri GD, von Mehren M, Antonescu CR, DeMatteo RP, Ganjoo KN, Maki RG, Pisters PWT, Raut CP, Riedel RF, Schuetze S, et al: **NCCN Task Force report: update on the management of patients with gastrointestinal stromal tumors.** *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* 2010, **8 Suppl 2**:S1-41; quiz S42-44.
37. Miettinen M, Lasota J: **Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites.** *Semin Diagn Pathol* 2006, **23**:70-83.
38. Zhong Y, Deng M, Liu B, Chen C, Li M, Xu R: **Primary gastrointestinal stromal tumors: Current advances in diagnostic biomarkers, prognostic factors and management of its duodenal location.** *Intractable Rare Dis Res* 2013, **2**:11-17.
39. Woodall CE, 3rd, Brock GN, Fan J, Byam JA, Scoggins CR, McMasters KM, Martin RC, 2nd: **An evaluation of 2537 gastrointestinal stromal tumors for a proposed clinical staging system.** *Arch Surg* 2009, **144**:670-678.
40. Agaimy A: **Gastrointestinal stromal tumors (GIST) from risk stratification systems to the new TNM proposal: more questions than answers? A review emphasizing the need for a standardized GIST reporting.** *Int J Clin Exp Pathol* 2010, **3**:461-471.
41. Antonescu CR, Sommer G, Sarran L, Tschernyavsky SJ, Riedel E, Woodruff JM, Robson M, Maki R, Brennan MF, Ladanyi M, et al: **Association of KIT exon 9 mutations with nongastric primary site and aggressive behavior: KIT mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**:3329-3337.
42. Debiec-Rychter M, Dumez H, Judson I, Wasag B, Verweij J, Brown M, Dimitrijevic S, Sciot R, Stul M, Vranck H, et al: **Use of c-KIT/PDGFR α mutational analysis to predict the clinical response to imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors entered on phase I and II studies of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group.** *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2004, **40**:689-695.
43. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, et al: **PDGFR α activating mutations in gastrointestinal stromal tumors.** *Science* 2003, **299**:708-710.
44. DeMatteo RP: **The GIST of targeted cancer therapy: a tumor (gastrointestinal stromal tumor), a mutated gene (c-kit), and a molecular inhibitor (STI571).** *Ann Surg Oncol* 2002, **9**:831-839.
45. Blanke CD, Rankin C, Demetri GD, Ryan CW, von Mehren M, Benjamin RS, Raymond AK, Bramwell VH, Baker LH, Maki RG, et al: **Phase III randomized, intergroup trial assessing imatinib mesylate at two dose levels in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing the kit receptor tyrosine kinase: S0033.** *J Clin Oncol* 2008, **26**:626-632.
46. Trent JC, Subramanian MP: **Managing GIST in the imatinib era: optimization of adjuvant therapy.** *Expert Rev Anticancer Ther* 2014:1-15.
47. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB: **Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells.** *Nat Med* 1996, **2**:561-566.
48. Frolov A, Chahwan S, Ochs M, Arnoletti JP, Pan ZZ, Favorova O, Fletcher J, von Mehren M, Eisenberg B, Godwin AK: **Response markers and the molecular mechanisms of action of Gleevec in gastrointestinal stromal tumors.** *Mol Cancer Ther* 2003, **2**:699-709.
49. Dow N, Giblen G, Sobin LH, Miettinen M: **Gastrointestinal stromal tumors: differential diagnosis.** *Semin Diagn Pathol* 2006, **23**:111-119.
50. Al-Batran SE, Hartmann JT, Heidel F, Stoehlmacher J, Wardelmann E, Dechow C, Dux M, Izbicki JR, Kraus T, Fischer T, Jager E: **Focal progression in patients with gastrointestinal stromal tumors after initial response to imatinib mesylate: a three-center-based study of 38 patients.** *Gastric Cancer* 2007, **10**:145-152.

51. Heinrich MC, Corless CL, Blanke CD, Demetri GD, Joensuu H, Roberts PJ, Eisenberg BL, von Mehren M, Fletcher CD, Sandau K, et al: **Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors.** *J Clin Oncol* 2006, **24**:4764-4774.
52. D'Allard D, Gay J, Descarpentries C, Frisan E, Adam K, Verdier F, Floquet C, Dubreuil P, Lacombe C, Fontenay M, et al: **Tyrosine kinase inhibitors induce down-regulation of c-Kit by targeting the ATP pocket.** *PLoS One* 2013, **8**:e60961.
53. Sierra JR, Cepero V, Giordano S: **Molecular mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase targeted therapy.** *Mol Cancer* 2010, **9**:75.
54. Nishida T, Doi T, Naito Y: **Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors.** *Expert Opin Pharmacother* 2014, **15**:1979-1989.
55. Hapkova I BF, Barbara PDS, Vesely J: **Gastrointestinal stromal tumour: From the clinic to the molecules.** *J Cancer Res Ther* 2014, **2**:54-67.
56. Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, McArthur G, Judson IR, Heinrich MC, Morgan JA, et al: **Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial.** *Lancet* 2006, **368**:1329-1338.
57. Ferraro D, Zalcborg J: **Regorafenib in gastrointestinal stromal tumors: clinical evidence and place in therapy.** *Ther Adv Med Oncol* 2014, **6**:222-228.
58. Overton LC, Heinrich MC: **Regorafenib for treatment of advanced gastrointestinal stromal tumors.** *Expert Opin Pharmacother* 2014, **15**:549-558.
59. Poole CD, Connolly MP, Chang J, Currie CJ: **Health utility of patients with advanced gastrointestinal stromal tumors (GIST) after failure of imatinib and sunitinib: findings from GRID, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study of regorafenib versus placebo.** *Gastric Cancer* 2014.
60. Rey JB, Launay-Vacher V, Tournigand C: **Regorafenib as a single-agent in the treatment of patients with gastrointestinal tumors: an overview for pharmacists.** *Target Oncol* 2014.
61. Sirohi B, Philip DS, Shrikhande SV: **Regorafenib in gastrointestinal stromal tumors.** *Future Oncol* 2014, **10**:1581-1587.
62. Antonescu CR: **The GIST paradigm: lessons for other kinase-driven cancers.** *J Pathol* 2011, **223**:251-261.
63. Guo T, Hajdu M, Agaram NP, Shinoda H, Veach D, Clarkson BD, Maki RG, Singer S, Dematteo RP, Besmer P, Antonescu CR: **Mechanisms of sunitinib resistance in gastrointestinal stromal tumors harboring KITAY502-3ins mutation: an in vitro mutagenesis screen for drug resistance.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**:6862-6870.
64. Reynoso D, Nolden LK, Yang D, Dumont SN, Conley AP, Dumont AGP, Zhou K, Duensing A, Trent JC: **Synergistic induction of apoptosis by the Bcl-2 inhibitor ABT-737 and imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumor cells.** *Molecular oncology* 2011, **5**.
65. Bauer S, Yu LK, Demetri GD, Fletcher JA: **Heat shock protein 90 inhibition in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor.** *Cancer Res* 2006, **66**:9153-9161.
66. Sambol EB, Ambrosini G, Geha RC, Kennealey PT, Decarolis P, O'Connor R, Wu YV, Motwani M, Chen J-H, Schwartz GK, Singer S: **Flavopiridol targets c-KIT transcription and induces apoptosis in gastrointestinal stromal tumor cells.** *Cancer research* 2006, **66**:5858-5866.
67. Edris B, Willingham SB, Weiskopf K, Volkmer AK, Volkmer JP, Muhlenberg T, Montgomery KD, Contreras-Trujillo H, Czechowicz A, Fletcher JA, et al: **Anti-KIT monoclonal antibody inhibits imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor growth.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:3501-3506.
68. Tanaka M, Kataoka H, Yano S, Ohi H, Moriwaki K, Akashi H, Taguchi T, Hayashi N, Hamano S, Mori Y, et al: **Antitumor effects in gastrointestinal stromal tumors using**

- photodynamic therapy with a novel glucose-conjugated chlorin.** *Mol Cancer Ther* 2014, **13**:767-775.
69. Muhlenberg T, Zhang Y, Wagner AJ, Grabellus F, Bradner J, Taeger G, Lang H, Taguchi T, Schuler M, Fletcher JA, Bauer S: **Inhibitors of deacetylases suppress oncogenic KIT signaling, acetylate HSP90, and induce apoptosis in gastrointestinal stromal tumors.** *Cancer Res* 2009, **69**:6941-6950.
70. Hrzenjak A, Kremser ML, Strohmeier B, Moinfar F, Zatloukal K, Denk H: **SAHA induces caspase-independent, autophagic cell death of endometrial stromal sarcoma cells by influencing the mTOR pathway.** *J Pathol* 2008, **216**:495-504.
71. Hrzenjak A, Moinfar F, Kremser ML, Strohmeier B, Petru E, Zatloukal K, Denk H: **Histone deacetylase inhibitor vorinostat suppresses the growth of uterine sarcomas in vitro and in vivo.** *Mol Cancer* 2010, **9**.
72. Yang C, Choy E, Hornicek FJ, Wood KB, Schwab JH, Liu X, Mankin H, Duan Z: **Histone deacetylase inhibitor PCI-24781 enhances chemotherapy-induced apoptosis in multidrug-resistant sarcoma cell lines.** *Anticancer Res* 2011, **31**:1115-1123.
73. Haller F, von Heydebreck A, Zhang JD, Gunawan B, Langer C, Ramadori G, Wiemann S, Sahin O: **Localization- and mutation-dependent microRNA (miRNA) expression signatures in gastrointestinal stromal tumours (GISTs), with a cluster of co-expressed miRNAs located at 14q32.31.** *J Pathol* 2010, **220**:71-86.
74. Koelz M, Lense J, Wrba F, Scheffler M, Dienes HP, Odenthal M: **Down-regulation of miR-221 and miR-222 correlates with pronounced Kit expression in gastrointestinal stromal tumors.** *International journal of oncology* 2011, **38**:503-511.
75. Subramanian S, West RB, Corless CL, Ou W, Rubin BP, Chu KM, Leung SY, Yuen ST, Zhu S, Hernandez-Boussard T, et al: **Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with KIT and PDGFRA mutations have distinct gene expression profiles.** *Oncogene* 2004, **23**:7780-7790.
76. Kim WK, Park M, Kim YK, Tae YK, Yang HK, Lee JM, Kim H: **MicroRNA-494 downregulates KIT and inhibits gastrointestinal stromal tumor cell proliferation.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**:7584-7594.
77. Fan R, Zhong J, Zheng S, Wang Z, Xu Y, Li S, Zhou J, Yuan F: **MicroRNA-218 inhibits gastrointestinal stromal tumor cell and invasion by targeting KIT.** *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2014, **35**:4209-4217.
78. Kornberg RD: **Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA.** *Science* 1974, **184**:868-871.
79. Horsager A: **A short introduction to epigenetics.** vol. 2014; 2014.
80. Kouzarides T: **Chromatin modifications and their function.** *Cell* 2007, **128**:693-705.
81. Jenuwein T, Allis CD: **Translating the histone code.** *Science* 2001, **293**:1074-1080.
82. Vidali G, Gershey EL, Allfrey VG: **Chemical studies of histone acetylation. The distribution of epsilon-N-acetyllysine in calf thymus histones.** *J Biol Chem* 1968, **243**:6361-6366.
83. Kleff S, Andrulis ED, Anderson CW, Sternglanz R: **Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase.** *J Biol Chem* 1995, **270**:24674-24677.
84. Ocker M: **Deacetylase inhibitors - focus on non-histone targets and effects.** *World J Biol Chem* 2010, **1**:55-61.
85. Spange S, Wagner T, Heinzl T, Kramer OH: **Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels.** *Int J Biochem Cell Biol* 2009, **41**:185-198.
86. Choi JH, Kwon HJ, Yoon BI, Kim JH, Han SU, Joo HJ, Kim DY: **Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues.** *Jpn J Cancer Res* 2001, **92**:1300-1304.
87. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, et al: **Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer.** *Nat Genet* 2005, **37**:391-400.

88. Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN: **Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer.** *Prostate* 2004, **59**:177-189.
89. Zupkovitz G, Tischler J, Posch M, Sadzak I, Ramsauer K, Egger G, Grausenburger R, Schweifer N, Chiocca S, Decker T, Seiser C: **Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:7913-7928.
90. Fulda S: **Modulation of TRAIL-induced apoptosis by HDAC inhibitors.** *Curr Cancer Drug Targets* 2008, **8**:132-140.
91. Marks PA, Richon VM, Breslow R, Rifkind RA: **Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs.** *Curr Opin Oncol* 2001, **13**:477-483.
92. New M, Olzscha H, La Thangue NB: **HDAC inhibitor-based therapies: can we interpret the code?** *Mol Oncol* 2012, **6**:637-656.
93. Kelly WK, Richon VM, O'Connor O, Curley T, MacGregor-Curtelli B, Tong W, Klang M, Schwartz L, Richardson S, Rosa E, et al: **Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**:3578-3588.
94. Spiller SE, Ravanpay AC, Hahn AW, Olson JM: **Suberoylanilide hydroxamic acid is effective in preclinical studies of medulloblastoma.** *J Neurooncol* 2006, **79**:259-270.
95. Thompson CA: **Belinostat approved for use in treating rare lymphoma.** *Am J Health Syst Pharm* 2014, **71**:1328.
96. Gimsing P, Hansen M, Knudsen LM, Knoblauch P, Christensen IJ, Ooi CE, Buhl-Jensen P: **A phase I clinical trial of the histone deacetylase inhibitor belinostat in patients with advanced hematological neoplasia.** *Eur J Haematol* 2008, **81**:170-176.
97. Mackay HJ, Hirte H, Colgan T, Covens A, MacAlpine K, Greci P, Wang L, Mason J, Pham PA, Tsao MS, et al: **Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor belinostat in women with platinum resistant epithelial ovarian cancer and micropapillary (LMP) ovarian tumours.** *Eur J Cancer* 2010, **46**:1573-1579.
98. Molife LR, de Bono JS: **Belinostat: clinical applications in solid tumors and lymphoma.** *Expert Opin Investig Drugs* 2011, **20**:1723-1732.
99. Lemoine M, Younes A: **Histone deacetylase inhibitors in the treatment of lymphoma.** *Discov Med* 2010, **10**:462-470.
100. Ververis K, Hiong A, Karagiannis TC, Licciardi PV: **Histone deacetylase inhibitors (HDACi): multitargeted anticancer agents.** *Biologics* 2013, **7**:47-60.
101. Bumber Y, Younes A, Garcia-Manero G: **Mocetinostat (MGCD0103): a review of an isotype-specific histone deacetylase inhibitor.** *Expert Opin Investig Drugs* 2011, **20**:823-829.
102. Younes A, Oki Y, Bociek RG, Kuruvilla J, Fanale M, Neelapu S, Copeland A, Buglio D, Galal A, Besterman J, et al: **Mocetinostat for relapsed classical Hodgkin's lymphoma: an open-label, single-arm, phase 2 trial.** *Lancet Oncol* 2011, **12**:1222-1228.
103. Le Tourneau C, Siu LL: **Promising antitumor activity with MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor.** *Expert Opin Investig Drugs* 2008, **17**:1247-1254.
104. **US National Institutes of Health Clinical Trials** [www.clinicaltrials.gov]
105. Juergens RA, Wrangle J, Vendetti FP, Murphy SC, Zhao M, Coleman B, Sebree R, Rodgers K, Hooker CM, Franco N, et al: **Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer.** *Cancer Discov* 2011, **1**:598-607.
106. **Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework.** *Clin Pharmacol Ther* 2001, **69**:89-95.
107. Sugasawa K, Ng JM, Masutani C, Maekawa T, Uchida A, van der Spek PJ, Eker AP, Rademakers S, Visser C, Aboussekhra A, et al: **Two human homologs of Rad23 are**

- functionally interchangeable in complex formation and stimulation of XPC repair activity.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**:6924-6931.
108. Hoeijmakers JH: **Genome maintenance mechanisms for preventing cancer.** *Nature* 2001, **411**:366-374.
109. Petrusheva IO, Evdokimov AN, Lavrik OI: **Molecular mechanism of global genome nucleotide excision repair.** *Acta Naturae* 2014, **6**:23-34.
110. Masutani C, Araki M, Sugasawa K, van der Spek PJ, Yamada A, Uchida A, Maekawa T, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Hanaoka F: **Identification and characterization of XPC-binding domain of hHR23B.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**:6915-6923.
111. Dantuma NP, Heinen C, Hoogstraten D: **The ubiquitin receptor Rad23: at the crossroads of nucleotide excision repair and proteasomal degradation.** *DNA Repair (Amst)* 2009, **8**:449-460.
112. Khan O, Fotheringham S, Wood V, Stimson L, Zhang C, Pezzella F, Duvic M, Kerr DJ, La Thangue NB: **HR23B is a biomarker for tumor sensitivity to HDAC inhibitor-based therapy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:6532-6537.
113. Yeo W, Chung HC, Chan SL, Wang LZ, Lim R, Picus J, Boyer M, Mo FK, Koh J, Rha SY, et al: **Epigenetic therapy using belinostat for patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a multicenter phase I/II study with biomarker and pharmacokinetic analysis of tumors from patients in the Mayo Phase II Consortium and the Cancer Therapeutics Research Group.** *J Clin Oncol* 2012, **30**:3361-3367.
114. Fotheringham S, Epping MT, Stimson L, Khan O, Wood V, Pezzella F, Bernards R, La Thangue NB: **Genome-wide loss-of-function screen reveals an important role for the proteasome in HDAC inhibitor-induced apoptosis.** *Cancer Cell* 2009, **15**:57-66.
115. Liang RY, Chen L, Ko BT, Shen YH, Li YT, Chen BR, Lin KT, Madura K, Chuang SM: **Rad23 interaction with the proteasome is regulated by phosphorylation of its ubiquitin-like (Ubl) domain.** *J Mol Biol* 2014, **426**:4049-4060.
116. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: **The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.** *Cell* 1993, **75**:843-854.
117. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G: **The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans.** *Nature* 2000, **403**:901-906.
118. Ahmad J, Hasnain SE, Siddiqui MA, Ahamed M, Musarrat J, Al-Khedhairi AA: **MicroRNA in carcinogenesis & cancer diagnostics: a new paradigm.** *Indian J Med Res* 2013, **137**:680-694.
119. Bartel DP: **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 2004, **116**:281-297.
120. Lima RT, Busacca S, Almeida GM, Gaudino G, Fennell DA, Vasconcelos MH: **MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer.** *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2011, **47**:163-174.
121. Wienholds E, Plasterk RH: **MicroRNA function in animal development.** *FEBS Lett* 2005, **579**:5911-5922.
122. Ameres SL, Zamore PD: **Diversifying microRNA sequence and function.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013, **14**:475-488.
123. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ: **Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex.** *Nature* 2004, **432**:231-235.
124. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN: **MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.** *EMBO J* 2004, **23**:4051-4060.
125. Ha M, Kim VN: **Regulation of microRNA biogenesis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, **15**:509-524.
126. Gregory RI, Chendrimada TP, Shiekhattar R: **MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex.** *Methods Mol Biol* 2006, **342**:33-47.

127. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN: **The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing.** *Genes Dev* 2004, **18**:3016-3027.
128. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN: **The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing.** *Nature* 2003, **425**:415-419.
129. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D: **Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs.** *RNA* 2004, **10**:185-191.
130. Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Laine S, Sack R, Gatignol A, Filipowicz W: **TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing.** *EMBO Rep* 2005, **6**:961-967.
131. Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M: **Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain.** *Nature* 2003, **426**:465-469.
132. Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M: **Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain.** *Nat Struct Mol Biol* 2004, **11**:576-577.
133. Park JE, Heo I, Tian Y, Simanshu DK, Chang H, Jee D, Patel DJ, Kim VN: **Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing.** *Nature* 2011, **475**:201-205.
134. Hutvagner G, Zamore PD: **A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex.** *Science* 2002, **297**:2056-2060.
135. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD: **Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias.** *Cell* 2003, **115**:209-216.
136. Ruvkun G: **Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world.** *Science* 2001, **294**:797-799.
137. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD: **Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex.** *Cell* 2003, **115**:199-208.
138. Lodish HF, Zhou B, Liu G, Chen CZ: **Micromanagement of the immune system by microRNAs.** *Nat Rev Immunol* 2008, **8**:120-130.
139. Ameres SL, Horwich MD, Hung JH, Xu J, Ghildiyal M, Weng Z, Zamore PD: **Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs.** *Science* 2010, **328**:1534-1539.
140. Baccarini A, Chauhan H, Gardner TJ, Jayaprakash AD, Sachidanandam R, Brown BD: **Kinetic analysis reveals the fate of a microRNA following target regulation in mammalian cells.** *Curr Biol* 2011, **21**:369-376.
141. Ryan BM, Robles AI, Harris CC: **Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research.** *Nat Rev Cancer* 2010, **10**:389-402.
142. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM: **Principles of microRNA-target recognition.** *PLoS Biol* 2005, **3**.
143. Doench JG, Sharp PA: **Specificity of microRNA target selection in translational repression.** *Genes Dev* 2004, **18**:504-511.
144. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N: **Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?** *Nat Rev Genet* 2008, **9**:102-114.
145. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM: **Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:2999-3004.
146. Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M: **Epigenetic alteration and microRNA dysregulation in cancer.** *Frontiers in genetics* 2013, **4**.
147. Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W: **Tissue-dependent paired expression of miRNAs.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:5944-5953.
148. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP: **Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**:1290-1297.

149. Akcakaya P, Caramuta S, Ahlen J, Ghaderi M, Berglund E, Ostman A, Branstrom R, Larsson C, Lui WO: **microRNA expression signatures of gastrointestinal stromal tumours: associations with imatinib resistance and patient outcome.** *Br J Cancer* 2014.
150. Crooke ST, Graham MJ, Zuckerman JE, Brooks D, Conklin BS, Cummins LL, Greig MJ, Guinosso CJ, Kornbrust D, Manoharan M, et al: **Pharmacokinetic properties of several novel oligonucleotide analogs in mice.** *J Pharmacol Exp Ther* 1996, **277**:923-937.
151. Karkare S, Bhatnagar D: **Promising nucleic acid analogs and mimics: characteristic features and applications of PNA, LNA, and morpholino.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, **71**:575-586.
152. Pallan PS, Greene EM, Jicman PA, Pandey RK, Manoharan M, Rozners E, Egli M: **Unexpected origins of the enhanced pairing affinity of 2'-fluoro-modified RNA.** *Nucleic Acids Res* 2011, **39**:3482-3495.
153. Yoo BH, Bochkareva E, Bochkarev A, Mou TC, Gray DM: **2'-O-methyl-modified phosphorothioate antisense oligonucleotides have reduced non-specific effects in vitro.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:2008-2016.
154. Jin H, Yu Y, Chrisler WB, Xiong Y, Hu D, Lei C: **Delivery of MicroRNA-10b with Polylysine Nanoparticles for Inhibition of Breast Cancer Cell Wound Healing.** *Breast Cancer (Auckl)* 2012, **6**:9-19.
155. Kim JH, Yeom JH, Ko JJ, Han MS, Lee K, Na SY, Bae J: **Effective delivery of anti-miRNA DNA oligonucleotides by functionalized gold nanoparticles.** *J Biotechnol* 2011, **155**:287-292.
156. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP: **Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets.** *Cell* 2005, **120**:15-20.
157. Stinson S, Lackner MR, Adai AT, Yu N, Kim HJ, O'Brien C, Spoerke J, Jhunjhunwala S, Boyd Z, Januario T, et al: **TRPS1 targeting by miR-221/222 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer.** *Sci Signal* 2011, **4**:ra41.
158. Kneitz B, Krebs M, Kalogirou C, Schubert M, Joniau S, van Poppel H, Lerut E, Kneitz S, Scholz CJ, Strobel P, et al: **Survival in patients with high-risk prostate cancer is predicted by miR-221, which regulates proliferation, apoptosis, and invasion of prostate cancer cells by inhibiting IRF2 and SOCS3.** *Cancer research* 2014, **74**:2591-2603.
159. Zhang CZ, Zhang JX, Zhang AL, Shi ZD, Han L, Jia ZF, Yang WD, Wang GX, Jiang T, You YP, et al: **MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma.** *Mol Cancer* 2010, **9**:229.
160. Trautmann M: **Untersuchungen zur molekularen Pathogenese gastrointestinaler Stromatumoren ohne Mutationen in den "hot spots" von c-KIT.** Universität Bonn, 2009.
161. Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, Liuzzi F, Lulli V, Morsilli O, Santoro S, et al: **MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:18081-18086.
162. Choi H-J, Lee H, Kim H, Kwon JE, Kang HJ, You KT, Rhee H, Noh SH, Paik Y-K, Hyung WJ, Kim H: **MicroRNA expression profile of gastrointestinal stromal tumors is distinguished by 14q loss and anatomic site.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2010, **126**:1640-1650.
163. Gits CMM, van Kuijk PF, Jonkers MBE, Boersma AWM, van Ijcken WF, Wozniak A, Scot R, Rutkowski P, Schoffski P, Taguchi T, et al: **MiR-17-92 and miR-221/222 cluster members target KIT and ETV1 in human gastrointestinal stromal tumours.** *British journal of cancer* 2013, **109**:1625-1635.
164. Bunn PA, Jr., Foss FM: **T-cell lymphoma cell lines (HUT102 and HUT78) established at the National Cancer Institute: history and importance to understanding the biology, clinical features, and therapy of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) and adult T-cell leukemia-lymphomas (ATLL).** *J Cell Biochem Suppl* 1996, **24**:12-23.

165. Tuveson DA, Willis NA, Jacks T, Griffin JD, Singer S, Fletcher CD, Fletcher JA, Demetri GD: **STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications.** *Oncogene* 2001, **20**:5054-5058.
166. Taguchi T, Sonobe H, Toyonaga S, Yamasaki I, Shuin T, Takano A, Araki K, Akimaru K, Yuri K: **Conventional and molecular cytogenetic characterization of a new human cell line, GIST-T1, established from gastrointestinal stromal tumor.** *Lab Invest* 2002, **82**:663-665.
167. Pedeutour F, Forus A, Coindre JM, Berner JM, Nicolo G, Michiels JF, Terrier P, Ranchere-Vince D, Collin F, Myklebost O, Turc-Carel C: **Structure of the supernumerary ring and giant rod chromosomes in adipose tissue tumors.** *Genes Chromosomes Cancer* 1999, **24**:30-41.
168. Muller CR, Paulsen EB, Noordhuis P, Pedeutour F, Saeter G, Myklebost O: **Potential for treatment of liposarcomas with the MDM2 antagonist Nutlin-3A.** *Int J Cancer* 2007, **121**:199-205.
169. Nishio J, Iwasaki H, Ishiguro M, Ohjimi Y, Fujita C, Ikegami H, Ariyoshi A, Naito M, Kaneko Y, Kikuchi M: **Establishment of a novel human dedifferentiated liposarcoma cell line, FU-DDLS-1: conventional and molecular cytogenetic characterization.** *International journal of oncology* 2003, **22**:535-542.
170. Kazmierczak B, Bartnitzke S, Hartl M, Bullerdiek J: **In vitro transformation by the SV40 'early region' of cells from a human benign salivary gland tumor with a 12q13----q15 rearrangement.** *Cytogenet Cell Genet* 1990, **53**:37-39.
171. Aman P, Ron D, Mandahl N, Fioretos T, Heim S, Arheden K, Willen H, Rydholm A, Mitelman F: **Rearrangement of the transcription factor gene CHOP in myxoid liposarcomas with t(12;16)(q13;p11).** *Genes Chromosomes Cancer* 1992, **5**:278-285.
172. Jeffers M, Rong S, Vande Woude GF: **Enhanced tumorigenicity and invasion-metastasis by hepatocyte growth factor/scatter factor-met signalling in human cells concomitant with induction of the urokinase proteolysis network.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**:1115-1125.
173. Ganiatsas S, Dow R, Thompson A, Schulman B, Germain D: **A splice variant of Skp2 is retained in the cytoplasm and fails to direct cyclin D1 ubiquitination in the uterine cancer cell line SK-UT.** *Oncogene* 2001, **20**:3641-3650.
174. Sonobe H, Manabe Y, Furihata M, Iwata J, Oka T, Ohtsuki Y, Mizobuchi H, Yamamoto H, Kumano O, Abe S: **Establishment and characterization of a new human synovial sarcoma cell line, HS-SY-II.** *Lab Invest* 1992, **67**:498-505.
175. Xie Y, Tornkvist M, Aalto Y, Nilsson G, Girnita L, Nagy B, Knuutila S, Larsson O: **Gene expression profile by blocking the SYT-SSX fusion gene in synovial sarcoma cells. Identification of XRCC4 as a putative SYT-SSX target gene.** *Oncogene* 2003, **22**:7628-7631.
176. Yamazaki T, Yokoyama T, Akatsu H, Tukiyaama T, Tokiwa T: **Phenotypic characterization of a human synovial sarcoma cell line, SW982, and its response to dexamethasone.** *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2003, **39**:337-339.
177. Lee PR, Cohen JE, Tendi EA, Farrer R, GH DEV, Becker KG, Fields RD: **Transcriptional profiling in an MPNST-derived cell line and normal human Schwann cells.** *Neuron Glia Biol* 2004, **1**:135-147.
178. DeClue JE, Papageorge AG, Fletcher JA, Diehl SR, Ratner N, Vass WC, Lowy DR: **Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis.** *Cell* 1992, **69**:265-273.
179. Fletcher JA, Kozakewich HP, Hoffer FA, Lage JM, Weidner N, Tepper R, Pinkus GS, Morton CC, Corson JM: **Diagnostic relevance of clonal cytogenetic aberrations in malignant soft-tissue tumors.** *N Engl J Med* 1991, **324**:436-442.
180. Giovannini M, Biegel JA, Serra M, Wang JY, Wei YH, Nycum L, Emanuel BS, Evans GA: **EWS-erg and EWS-Fli1 fusion transcripts in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors with variant translocations.** *J Clin Invest* 1994, **94**:489-496.

181. Biedler JL, Helson L, Spengler BA: **Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture.** *Cancer Res* 1973, **33**:2643-2652.
182. Sanger C: **Population: the Singapore experience.** *IDRC Rep* 1975, **4**:3-6.
183. Coletta A, Molter C, Duque R, Steenhoff D, Taminau J, de Schaetzen V, Meganck S, Lazar C, Venet D, Detours V, et al: **InSilico DB genomic datasets hub: an efficient starting point for analyzing genome-wide studies in GenePattern, Integrative Genomics Viewer, and R/Bioconductor.** *Genome Biol* 2012, **13**:R104.
184. Berridge MV, Tan AS: **Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction.** *Arch Biochem Biophys* 1993, **303**:474-482.
185. Milde T, Lodrini M, Savelyeva L, Korshunov A, Kool M, Brueckner LM, Antunes AS, Oehme I, Pekrun A, Pfister SM, et al: **HD-MB03 is a novel Group 3 medulloblastoma model demonstrating sensitivity to histone deacetylase inhibitor treatment.** *J Neurooncol* 2012, **110**:335-348.
186. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-685.
187. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW: **NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.** *Nat Methods* 2012, **9**:671-675.
188. Chan D, Zheng Y, Tyner JW, Chng WJ, Chien WW, Gery S, Leong G, Braunstein GD, Koeffler HP: **Belinostat and panobinostat (HDACI): in vitro and in vivo studies in thyroid cancer.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2013, **139**:1507-1514.
189. Duvic M, Talpur R, Ni X, Zhang C, Hazarika P, Kelly C, Chiao JH, Reilly JF, Ricker JL, Richon VM, Frankel SR: **Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL).** *Blood* 2007, **109**:31-39.
190. Slingerland M, Guchelaar HJ, Gelderblom H: **Histone deacetylase inhibitors: an overview of the clinical studies in solid tumors.** *Anticancer Drugs* 2014, **25**:140-149.
191. New M, Olzscha H, Liu G, Khan O, Stimson L, McGouran J, Kerr D, Coutts A, Kessler B, Middleton M, La Thangue NB: **A regulatory circuit that involves HR23B and HDAC6 governs the biological response to HDAC inhibitors.** *Cell Death Differ* 2013, **20**:1306-1316.
192. Christensen BC, Moyer BJ, Avissar M, Ouellet LG, Plaza SL, McClean MD, Marsit CJ, Kelsey KT: **A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR is associated with reduced survival in oral cancers.** *Carcinogenesis* 2009, **30**:1003-1007.
193. Chun-Zhi Z, Lei H, An-Ling Z, Yan-Chao F, Xiao Y, Guang-Xiu W, Zhi-Fan J, Pei-Yu P, Qing-Yu Z, Chun-Sheng K: **MicroRNA-221 and microRNA-222 regulate gastric carcinoma cell proliferation and radioresistance by targeting PTEN.** *BMC cancer* 2010, **10**.
194. Godshalk SE, Paranjape T, Nallur S, Speed W, Chan E, Molinaro AM, Bacchiocchi A, Hoyt K, Tworokski K, Stern DF, et al: **A Variant in a MicroRNA complementary site in the 3' UTR of the KIT oncogene increases risk of acral melanoma.** *Oncogene* 2011, **30**:1542-1550.
195. le Sage C, Nagel R, Egan DA, Schrier M, Mesman E, Mangiola A, Anile C, Maira G, Mercatelli N, Ciafre SA, et al: **Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation.** *EMBO J* 2007, **26**:3699-3708.
196. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafour A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ: **Cancer statistics, 2004.** *CA Cancer J Clin* 2004, **54**:8-29.
197. Gerrand CH, Wunder JS, Kandel RA, O'Sullivan B, Catton CN, Bell RS, Griffin AM, Davis AM: **Classification of positive margins after resection of soft-tissue sarcoma of the limb predicts the risk of local recurrence.** *J Bone Joint Surg Br* 2001, **83**:1149-1155.

198. Kutko MC, Glick RD, Butler LM, Coffey DC, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM, LaQuaglia MP: **Histone deacetylase inhibitors induce growth suppression and cell death in human rhabdomyosarcoma in vitro.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**:5749-5755.
199. Liu S, Cheng H, Kwan W, Lubieniecka JM, Nielsen TO: **Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest, apoptosis, and differentiation in clear cell sarcoma models.** *Mol Cancer Ther* 2008, **7**:1751-1761.
200. Maeda T, Nagaoka Y, Kawai Y, Takagaki N, Yasuda C, Yogosawa S, Sowa Y, Sakai T, Uesato S: **Inhibitory effects of cancer cell proliferation by novel histone deacetylase inhibitors involve p21/WAF1 induction and G2/M arrest.** *Biol Pharm Bull* 2005, **28**:849-853.
201. Su L, Sampaio AV, Jones KB, Pacheco M, Goytain A, Lin S, Poulin N, Yi L, Rossi FM, Kast J, et al: **Deconstruction of the SS18-SSX fusion oncoprotein complex: insights into disease etiology and therapeutics.** *Cancer Cell* 2012, **21**:333-347.
202. Yamamoto S, Tanaka K, Sakimura R, Okada T, Nakamura T, Li Y, Takasaki M, Nakabeppu Y, Iwamoto Y: **Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces apoptosis or autophagy-associated cell death in chondrosarcoma cell lines.** *Anticancer Res* 2008, **28**:1585-1591.
203. Esau CC, Monia BP: **Therapeutic potential for microRNAs.** *Adv Drug Deliv Rev* 2007, **59**:101-114.
204. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA: **microRNAs as oncogenes and tumor suppressors.** *Dev Biol* 2007, **302**:1-12.
205. Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, Sunpaweravong P, Leong SS, Sriuranpong V, Chao TY, Nakagawa K, Chu DT, Saijo N, et al: **Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS).** *J Clin Oncol* 2011, **29**:2866-2874.
206. Trautmann M, Sievers E, Aretz S, Kindler D, Michels S, Friedrichs N, Renner M, Kirfel J, Steiner S, Huss S, et al: **SS18-SSX fusion protein-induced Wnt/beta-catenin signaling is a therapeutic target in synovial sarcoma.** *Oncogene* 2014, **33**:5006-5016.
207. Calles K, Svensson I, Lindskog E, Haggstrom L: **Effects of conditioned medium factors and passage number on Sf9 cell physiology and productivity.** *Biotechnol Prog* 2006, **22**:394-400.
208. Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H, Gelber C: **The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need?** *Biotechniques* 2007, **43**:575-577-578, 581-572 passim.
209. Draper JS, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E, Johnson J, Meisner L, Zwaka TP, Thomson JA, Andrews PW: **Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells.** *Nat Biotechnol* 2004, **22**:53-54.
210. Inzunza J, Sahlen S, Holmberg K, Stromberg AM, Teerijoki H, Blennow E, Hovatta O, Malmgren H: **Comparative genomic hybridization and karyotyping of human embryonic stem cells reveals the occurrence of an isodicentric X chromosome after long-term cultivation.** *Mol Hum Reprod* 2004, **10**:461-466.
211. Mitalipova MM, Rao RR, Hoyer DM, Johnson JA, Meisner LF, Jones KL, Dalton S, Stice SL: **Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells.** *Nat Biotechnol* 2005, **23**:19-20.
212. Boonstra JJ, van der Velden AW, Beerens EC, van Marion R, Morita-Fujimura Y, Matsui Y, Nishihira T, Tselepis C, Hainaut P, Lowe AW, et al: **Mistaken identity of widely used esophageal adenocarcinoma cell line TE-7.** *Cancer Res* 2007, **67**:7996-8001.
213. Cabrera CM, Cobo F, Nieto A, Cortes JL, Montes RM, Catalina P, Concha A: **Identity tests: determination of cell line cross-contamination.** *Cytotechnology* 2006, **51**:45-50.
214. Drexler HG, Dirks WG, MacLeod RA: **False human hematopoietic cell lines: cross-contaminations and misinterpretations.** *Leukemia* 1999, **13**:1601-1607.

215. Rosato RR, Almenara JA, Dai Y, Grant S: **Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells.** *Mol Cancer Ther* 2003, **2**:1273-1284.
216. Marchion D, Munster P: **Development of histone deacetylase inhibitors for cancer treatment.** *Expert Rev Anticancer Ther* 2007, **7**:583-598.
217. Wozniak MB, Villuendas R, Bischoff JR, Aparicio CB, Martinez Leal JF, de La Cueva P, Rodriguez ME, Herreros B, Martin-Perez D, Longo MI, et al: **Vorinostat interferes with the signaling transduction pathway of T-cell receptor and synergizes with phosphoinositide-3 kinase inhibitors in cutaneous T-cell lymphoma.** *Haematologica* 2010, **95**:613-621.
218. Cai B, Lyu H, Huang J, Wang S, Lee CK, Gao C, Liu B: **Combination of bendamustine and entinostat synergistically inhibits proliferation of multiple myeloma cells via induction of apoptosis and DNA damage response.** *Cancer Lett* 2013, **335**:343-350.
219. Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA: **Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:10014-10019.
220. Mills J, Hricik T, Siddiqi S, Matushansky I: **Chromatin structure predicts epigenetic therapy responsiveness in sarcoma.** *Mol Cancer Ther* 2011, **10**:313-324.
221. Munster PN, Troso-Sandoval T, Rosen N, Rifkind R, Marks PA, Richon VM: **The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells.** *Cancer Res* 2001, **61**:8492-8497.
222. Rosato RR, Almenara JA, Grant S: **The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1.** *Cancer Res* 2003, **63**:3637-3645.
223. Bradner JE, West N, Grachan ML, Greenberg EF, Haggarty SJ, Warnow T, Mazitschek R: **Chemical phylogenetics of histone deacetylases.** *Nat Chem Biol* 2010, **6**:238-243.
224. Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, Khramtsov N, Qian X, Mills E, Berghs SC, Carey N, et al: **Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors.** *Biochem J* 2008, **409**:581-589.
225. Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I: **HDAC family: What are the cancer relevant targets?** *Cancer Lett* 2009, **277**:8-21.
226. Tula-Sanchez AA, Havas AP, Alonge PJ, Klein ME, Doctor SR, Pinkston W, Glinsmann-Gibson BJ, Rimsza LM, Smith CL: **A model of sensitivity and resistance to histone deacetylase inhibitors in diffuse large B cell lymphoma: Role of cyclin-dependent kinase inhibitors.** *Cancer Biol Ther* 2013, **14**:949-961.
227. Dejligbjerg M, Grauslund M, Christensen IJ, Tjornelund J, Buhl Jensen P, Sehested M: **Identification of predictive biomarkers for the histone deacetylase inhibitor belinostat in a panel of human cancer cell lines.** *Cancer Biomark* 2008, **4**:101-109.
228. Larsson DE, Lovborg H, Rickardson L, Larsson R, Oberg K, Granberg D: **Identification and evaluation of potential anti-cancer drugs on human neuroendocrine tumor cell lines.** *Anticancer Res* 2006, **26**:4125-4129.
229. Yang W, Soares J, Greninger P, Edelman EJ, Lightfoot H, Forbes S, Bindal N, Beare D, Smith JA, Thompson IR, et al: **Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC): a resource for therapeutic biomarker discovery in cancer cells.** *Nucleic Acids Res* 2013, **41**:D955-961.
230. Nimmanapalli R, Fuino L, Bali P, Gasparetto M, Glozak M, Tao J, Moscinski L, Smith C, Wu J, Jove R, et al: **Histone deacetylase inhibitor LAQ824 both lowers expression and promotes proteasomal degradation of Bcr-Abl and induces apoptosis of imatinib mesylate-sensitive or -refractory chronic myelogenous leukemia-blast crisis cells.** *Cancer Res* 2003, **63**:5126-5135.

231. Cubitt CL, Menth J, Dawson J, Martinez GV, Foroutan P, Morse DL, Bui MM, Letson GD, Sullivan DM, Reed DR: **Rapid screening of novel agents for combination therapy in sarcomas.** *Sarcoma* 2013, **2013**:365723.
232. O'Connor OA, Heaney ML, Schwartz L, Richardson S, Willim R, MacGregor-Cortelli B, Curly T, Moskowitz C, Portlock C, Horwitz S, et al: **Clinical experience with intravenous and oral formulations of the novel histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid in patients with advanced hematologic malignancies.** *J Clin Oncol* 2006, **24**:166-173.
233. Pili R, Salumbides B, Zhao M, Altiok S, Qian D, Zwiebel J, Carducci MA, Rudek MA: **Phase I study of the histone deacetylase inhibitor entinostat in combination with 13-cis retinoic acid in patients with solid tumours.** *Br J Cancer* 2012, **106**:77-84.
234. Reimer P, Chawla S: **Long-term complete remission with belinostat in a patient with chemotherapy refractory peripheral t-cell lymphoma.** *J Hematol Oncol* 2013, **6**:69.
235. Witta SE, Jotte RM, Konduri K, Neubauer MA, Spira AI, Ruxer RL, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., Hirsch FR: **Randomized phase II trial of erlotinib with and without entinostat in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed on prior chemotherapy.** *J Clin Oncol* 2012, **30**:2248-2255.
236. Kabjorn Gustafsson C, Stahlberg A, Engstrom K, Danielsson A, Turesson I, Aman P: **Cell senescence in myxoid/round cell liposarcoma.** *Sarcoma* 2014, **2014**:208786.
237. Olofsson A, Willen H, Goransson M, Engstrom K, Meis-Kindblom JM, Stenman G, Kindblom LG, Aman P: **Abnormal expression of cell cycle regulators in FUS-CHOP carrying liposarcomas.** *International journal of oncology* 2004, **25**:1349-1355.
238. Pazolli E, Alspach E, Milczarek A, Prior J, Piwnica-Worms D, Stewart SA: **Chromatin remodeling underlies the senescence-associated secretory phenotype of tumor stromal fibroblasts that supports cancer progression.** *Cancer Res* 2012, **72**:2251-2261.
239. Lee J, McGuire C: **Clinical efficacy of vorinostat in a patient with leiomyosarcoma.** *Clin Med Insights Oncol* 2012, **6**:101-105.
240. Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, Hibbard MK, Chen CJ, Xiao S, Tuveson DA, et al: **KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors.** *Cancer Res* 2001, **61**:8118-8121.
241. Duensing S, Duensing A: **Targeted therapies of gastrointestinal stromal tumors (GIST)-The next frontiers.** *Biochem Pharmacol* 2010.
242. Esquela-Kerscher A, Slack FJ: **Oncomirs - microRNAs with a role in cancer.** *Nat Rev Cancer* 2006, **6**:259-269.
243. Wang W, Luo YP: **MicroRNAs in breast cancer: oncogene and tumor suppressors with clinical potential.** *J Zhejiang Univ Sci B* 2015, **16**:18-31.
244. Wang X, Zhang Y, Fu Y, Zhang J, Yin L, Pu Y, Liang G: **MicroRNA-125b may function as an oncogene in lung cancer cells.** *Mol Med Rep* 2015, **11**:3880-3887.
245. Yang CH, Pfeffer SR, Sims M, Yue J, Wang Y, Linga VG, Paulus E, Davidoff AM, Pfeffer LM: **The Oncogenic MicroRNA-21 Inhibits the Tumor Suppressive Activity of FBXO11 to Promote Tumorigenesis.** *J Biol Chem* 2015, **290**:6037-6046.
246. Yan LX, Wu QN, Zhang Y, Li YY, Liao DZ, Hou JH, Fu J, Zeng MS, Yun JP, Wu QL, et al: **Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth.** *Breast Cancer Res* 2011, **13**:R2.
247. Bader AG, Brown D, Winkler M: **The promise of microRNA replacement therapy.** *Cancer Res* 2010, **70**:7027-7030.
248. Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, Patrawala L, Brown D, Bader AG: **Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34.** *Cancer Res* 2010, **70**:5923-5930.
249. Kelly L, Bryan K, Kim SY, Janeway KA, Killian JK, Schildhaus H-U, Miettinen M, Helman L, Meltzer PS, van de Rijn M, et al: **Post-transcriptional dysregulation by miRNAs is implicated in the pathogenesis of gastrointestinal stromal tumor [GIST].** *PloS one* 2013, **8**.

250. Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, Nosho K, Yamamoto H, Takamaru H, Yamamoto E, Maruyama R, Nobuoka T, Miyazaki Y, et al: **Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors.** *Cancer research* 2012, **72**:1126-1136.
251. Subramanian S, Lui WO, Lee CH, Espinosa I, Nielsen TO, Heinrich MC, Corless CL, Fire AZ, van de Rijn M: **MicroRNA expression signature of human sarcomas.** *Oncogene* 2008, **27**:2015-2026.
252. Yamamoto H, Kohashi K, Fujita A, Oda Y: **Fascin-1 overexpression and miR-133b downregulation in the progression of gastrointestinal stromal tumor.** *Mod Pathol* 2013, **26**:563-571.
253. Miranda C, Nucifora M, Molinari F, Conca E, Anania MC, Bordoni A, Saletti P, Mazzucchelli L, Pilotti S, Pierotti MA, et al: **KRAS and BRAF mutations predict primary resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumors.** *Clin Cancer Res* 2012, **18**:1769-1776.
254. Feng S, Zhou L, Nice EC, Huang C: **Fibroblast growth factor receptors: multifactorial-contributors to tumor initiation and progression.** *Histol Histopathol* 2015, **30**:13-31.
255. Fischbach A, Rogler A, Erber R, Stoehr R, Poulsom R, Heidenreich A, Schneevoigt BS, Hauke S, Hartmann A, Knuechel R, et al: **Fibroblast growth factor receptor (FGFR) gene amplifications are rare events in bladder cancer.** *Histopathology* 2015, **66**:639-649.
256. Hagel M, Miduturu C, Sheets M, Rubin N, Weng W, Stransky N, Bifulco N, Kim JL, Hodous B, Brooijmans N, et al: **First Selective Small Molecule Inhibitor of FGFR4 for the Treatment of Hepatocellular Carcinomas with an Activated FGFR4 Signaling Pathway.** *Cancer Discov* 2015.
257. Javidi-Sharifi N, Traer E, Martinez J, Gupta A, Taguchi T, Dunlap J, Heinrich MC, Corless CL, Rubin BP, Druker BJ, Tyner JW: **Crosstalk between KIT and FGFR3 Promotes Gastrointestinal Stromal Tumor Cell Growth and Drug Resistance.** *Cancer Res* 2015, **75**:880-891.
258. Karakas B, Bachman KE, Park BH: **Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers.** *Br J Cancer* 2006, **94**:455-459.
259. da Rocha Dias S, Salmonson T, van Zwieten-Boot B, Jonsson B, Marchetti S, Schellens JH, Giuliani R, Pignatti F: **The European Medicines Agency review of vemurafenib (Zelboraf(R)) for the treatment of adult patients with BRAF V600 mutation-positive unresectable or metastatic melanoma: Summary of the scientific assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use.** *Eur J Cancer* 2013, **49**:1654-1661.
260. Janku F, Wheler JJ, Naing A, Falchook GS, Hong DS, Stepanek VM, Fu S, Piha-Paul SA, Lee JJ, Luthra R, et al: **PIK3CA mutation H1047R is associated with response to PI3K/AKT/mTOR signaling pathway inhibitors in early-phase clinical trials.** *Cancer Res* 2013, **73**:276-284.
261. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA, et al: **Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes.** *Nature* 2013, **499**:214-218.
262. **A genomics-based classification of human lung tumors.** *Sci Transl Med* 2013, **5**.
263. Dutton-Regester K, Irwin D, Hunt P, Aoude LG, Tembe V, Pupo GM, Lanagan C, Carter CD, O'Connor L, O'Rourke M, et al: **A high-throughput panel for identifying clinically relevant mutation profiles in melanoma.** *Mol Cancer Ther* 2012, **11**:888-897.
264. Jancik S, Drabek J, Berkovcova J, Xu YZ, Stankova M, Klein J, Kolek V, Skarda J, Tichy T, Grygarkova I, et al: **A comparison of Direct sequencing, Pyrosequencing, High resolution melting analysis, TheraScreen DxS, and the K-ras StripAssay for detecting KRAS mutations in non small cell lung carcinomas.** *J Exp Clin Cancer Res* 2012, **31**.
265. Ross JS, Cronin M: **Whole cancer genome sequencing by next-generation methods.** *Am J Clin Pathol* 2011, **136**:527-539.

266. Hechtman JF, Zehir A, Mitchell T, Borsu L, Singer S, Tap W, Oultache A, Ladanyi M, Nafa K: **Novel oncogene and tumor suppressor mutations in KIT and PDGFRA wild type gastrointestinal stromal tumors revealed by next generation sequencing.** *Genes Chromosomes Cancer* 2015, **54**:177-184.
267. Hostein I, Faur N, Primois C, Boury F, Denard J, Emile JF, Bringuier PP, Scoazec JY, Coindre JM: **BRAF mutation status in gastrointestinal stromal tumors.** *Am J Clin Pathol* 2010, **133**:141-148.
268. Nannini M, Astolfi A, Urbini M, Indio V, Santini D, Heinrich M, Corless C, Ceccarelli C, Saponara M, Mandrioli A, et al: **Integrated genomic study of quadruple-WT GIST (KIT/PDGFRA/SDH/RAS pathway wild-type GIST).** *BMC Cancer* 2014, **14**:685.
269. Miettinen M, Lasota J: **Succinate dehydrogenase deficient gastrointestinal stromal tumors (GISTs) - a review.** *Int J Biochem Cell Biol* 2014, **53**:514-519.
270. Zheng S, Huang KE, Pan YL, Zhou Y, Pan SD, Li X, Jia J, Zheng XL, Tao DY: **KIT and BRAF heterogeneous mutations in gastrointestinal stromal tumors after secondary imatinib resistance.** *Gastric Cancer* 2014.
271. Natali PG, Prat M, Nicotra MR, Bigotti A, Olivero M, Comoglio PM, Di Renzo MF: **Overexpression of the met/HGF receptor in renal cell carcinomas.** *Int J Cancer* 1996, **69**:212-217.
272. Ma PC, Kijima T, Maulik G, Fox EA, Sattler M, Griffin JD, Johnson BE, Salgia R: **c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions.** *Cancer Res* 2003, **63**:6272-6281.
273. Wasenius VM, Hemmer S, Karjalainen-Lindsberg ML, Nupponen NN, Franssila K, Joensuu H: **MET receptor tyrosine kinase sequence alterations in differentiated thyroid carcinoma.** *Am J Surg Pathol* 2005, **29**:544-549.
274. Jagadeeswaran R, Jagadeeswaran S, Bindokas VP, Salgia R: **Activation of HGF/c-Met pathway contributes to the reactive oxygen species generation and motility of small cell lung cancer cells.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007, **292**:L1488-1494.
275. Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, Tretiakova MS, Nallasura V, Fox EA, Hansen M, Schaefer E, Naoki K, Lader A, et al: **Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer.** *Cancer Res* 2005, **65**:1479-1488.
276. Tyner JW, Fletcher LB, Wang EQ, Yang WF, Rutenberg-Schoenberg ML, Beadling C, Mori M, Heinrich MC, Deininger MW, Druker BJ, Loriaux MM: **MET receptor sequence variants R970C and T992I lack transforming capacity.** *Cancer Res* 2010, **70**:6233-6237.
277. Voortman J, Harada T, Chang RP, Killian JK, Suuriniemi M, Smith WI, Meltzer PS, Lucchi M, Wang Y, Giaccone G: **Detection and therapeutic implications of c-Met mutations in small cell lung cancer and neuroendocrine tumors.** *Curr Pharm Des* 2013, **19**:833-840.
278. Gimenez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, Mourad JJ, Plouin PF, Corvol P, Rotig A, Jeunemaitre X: **The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway.** *Am J Hum Genet* 2001, **69**:1186-1197.
279. Mason EF, Hornick JL: **Succinate dehydrogenase deficiency is associated with decreased 5-hydroxymethylcytosine production in gastrointestinal stromal tumors: implications for mechanisms of tumorigenesis.** *Mod Pathol* 2013, **26**:1492-1497.
280. Wagner AJ, Remillard SP, Zhang YX, Doyle LA, George S, Hornick JL: **Loss of expression of SDHA predicts SDHA mutations in gastrointestinal stromal tumors.** *Mod Pathol* 2013, **26**:289-294.
281. Coskun E, Neumann M, Schlee C, Liebertz F, Heesch S, Goekbuget N, Hoelzer D, Baldus CD: **MicroRNA profiling reveals aberrant microRNA expression in adult ETP-ALL and functional studies implicate a role for miR-222 in acute leukemia.** *Leuk Res* 2013, **37**:647-656.

282. Gan R, Yang Y, Yang X, Zhao L, Lu J, Meng QH: **Downregulation of miR-221/222 enhances sensitivity of breast cancer cells to tamoxifen through upregulation of TIMP3.** *Cancer gene therapy* 2014, **21**:290-296.
283. Yang C-J, Shen WG, Liu C-J, Chen Y-W, Lu H-H, Tsai M-M, Lin S-C: **miR-221 and miR-222 expression increased the growth and tumorigenesis of oral carcinoma cells.** *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 2011, **40**:560-566.
284. Yu B, Zhou S, Wang Y, Qian T, Ding G, Ding F, Gu X: **miR-221 and miR-222 promote Schwann cell proliferation and migration by targeting LASS2 after sciatic nerve injury.** *Journal of cell science* 2012, **125**:2675-2683.
285. Zhao G, Cai C, Yang T, Qiu X, Liao B, Li W, Ji Z, Zhao J, Zhao H, Guo M, et al: **MicroRNA-221 induces cell survival and cisplatin resistance through PI3K/Akt pathway in human osteosarcoma.** *PloS one* 2013, **8**.
286. Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN: **Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level.** *J Cell Biol* 2000, **151**:483-494.
287. Altomare DA, Wang HQ, Skele KL, De Rienzo A, Klein-Szanto AJ, Godwin AK, Testa JR: **AKT and mTOR phosphorylation is frequently detected in ovarian cancer and can be targeted to disrupt ovarian tumor cell growth.** *Oncogene* 2004, **23**:5853-5857.
288. Harada H, Andersen JS, Mann M, Terada N, Korsmeyer SJ: **p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:9666-9670.
289. Dar AA, Majid S, de Semir D, Nosrati M, Bezrookove V, Kashani-Sabet M: **miRNA-205 suppresses melanoma cell proliferation and induces senescence via regulation of E2F1 protein.** *J Biol Chem* 2011, **286**:16606-16614.
290. Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, Lagna G, Hata A: **Induction of microRNA-221 by platelet-derived growth factor signaling is critical for modulation of vascular smooth muscle phenotype.** *J Biol Chem* 2009, **284**:3728-3738.
291. Visone R, Russo L, Pallante P, De Martino I, Ferraro A, Leone V, Borbone E, Petrocca F, Alder H, Croce CM, Fusco A: **MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle.** *Endocr Relat Cancer* 2007, **14**:791-798.
292. Bachet JB, Tabone-Eglinger S, Dessaux S, Besse A, Brahimi-Adouane S, Emile JF, Blay JY, Alberti L: **Gene expression patterns of hemizygous and heterozygous KIT mutations suggest distinct oncogenic pathways: a study in NIH3T3 cell lines and GIST samples.** *PLoS One* 2013, **8**:e61103.
293. Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ: **Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1.** *Curr Biol* 2000, **10**:1201-1204.
294. Kuroda J, Puthalakath H, Cragg MS, Kelly PN, Bouillet P, Huang DC, Kimura S, Ottmann OG, Druker BJ, Villunger A, et al: **Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of Bcr/Abl+ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:14907-14912.

12. Anhang

Tabelle 31: Oligonukleotide für das GIST spezifische Panel der Parallelsequenzierung

Gen	Forward-Sequenz [5'-3']	Reverse-Sequenz [5'-3']
<i>BRAF</i>	GATGCGAACAGTGAATATTTTCCTTTGA	TGGATCATTTTGGAACAGTCTACAAGG
<i>BRAF</i>	CACATTACATACTTACCATGCCACTTTC	TCTGTTTGGCTTGACTTGACTTTT
<i>BRAF</i>	GTTGAGACCTTCAATGACTTTCTAGTAA	GTGGGTCCCATCAGTTTGAACA
<i>BRAF</i>	CATCCACAAAATGGATCCAGACAAC	GCTTGCTCTGATAGGAAAATGAGAT
<i>CDKN2A</i>	CCTTCTGAAAACCTCCCCAGGAA	CACCGAATAGTTACGGTCGGA
<i>CDKN2A</i>	GCGGGATGTGAACCACGA	GCTCACCTCTGGTGCCAAA
<i>CDKN2A</i>	GTCAGCCGAAGGCTCCAT	GGCTCTTCCGCCAGCAC
<i>CDKN2A</i>	GACCCTTACCCACCTGGAT	GGAGCAGCATGGAGCCTT
<i>CDKN2A</i>	CGGACTTTTTCGAGGGCCTT	GCCGCGAGTGAGGGTTT
<i>CDKN2A</i>	CCCCTTCAGATCTTCTCAGCA	GCTTCGATTCTCCGAAAAAAGG
<i>CDKN2A</i>	TTTGGAAGCTCTCAGGGTACAA	GTCTGCCCGTGGACCTG
<i>CDKN2A</i>	ACCAGCGTGTCCAGGAAG	CCTGGCTCTGACCATTCTGTT
<i>CDKN2A</i>	GATGGCCCAGCTCCTCAG	CGACCCCGCCACTCTCA
<i>CDKN2A</i>	CCTGTAGGACCTTCGGTGACT	TGTGCCACACATCTTTGACCT
<i>CDKN2A</i>	CCAGCCAGCTTGCATAAC	AGAAGCCAGAGCACATGAATAAATGA
<i>CTNNB1</i>	CCTTCTCTGAGTGGTAAAGGCAATC	ATTCTGACTTTTCAGTAAGGCAATGAA
<i>CTNNB1</i>	ATTTCAATGGGTCATATCACAGATTCTT	GTAAGACTGTTGCTGCCAGTG
<i>CTNNB1</i>	AGACAGAAAAGCGGCTGTTAGT	AGGTATCCACATCCTCTTCTCAG
<i>GNAS</i>	GGTTGGCTTTGGTGAGATCCAT	TGAATGTCAAGAAACCATGATCTCTGTT A
<i>KIT</i>	CAGCCTCAGGAAGGTTGTAGG	CTGTCGTAAGTCAGGATTTCTGGTT
<i>KIT</i>	GCCATTTCTGTTTTCTGTAGCAA	CTCTGCATTATAAGCAGTGCCAAAAATA
<i>KIT</i>	TCCTAGAGTAAGCCAGGGCTTT	CCATTGTGCTTGAATGCACTAGAATCTA
<i>KIT</i>	TGGAAAGCTAGTGGTTCAGAGTTCTA	AGCCTAAACATCCCCTTAAATTGGATT
<i>KIT</i>	ACCATTATTTGTTCTCTCTCCAGAGT	TCTCCTCAACAACCTTCCACTGTA
<i>KIT</i>	CCCCACAGAAACCCATGTATGAAG	TGGAAAGCCCCTGTTTCATACTG
<i>KIT</i>	TTGCCAGTTGTGCTTTTTGCT	CAGCTTGGACACGGCTTT
<i>KIT</i>	CCCTGGTCATTACAGAATATTGTTGCTAT	GGAAGACTCCTTTGAATGCAGAAGA
<i>KIT</i>	TCATGCAGAAGCTGCACTTTATAAGAA	GCCTTGATTGCAAACCCTTATGAC
<i>KIT</i>	TTTATGGGAGGCAGAATTAATCTATATATCTC A	GCATGATCTTCTGCTTTGAACAAATAA A
<i>KIT</i>	GTCATGACTTGTTTCATCTCTCCCA	TGGTTGCTTGATAGGTAGGTACTCA
<i>KIT</i>	GTCTAGCCAGAGACATCAAGAATGATT	TGTGATATCCCTAGACAGGATTTACATT
<i>KIT</i>	AATGGTTTTCTTTTCTCCTCCAACCTAA	GGTACTCACGTTTCCTTTAACACATAA
<i>KIT</i>	AACATTATTGACTCTGTTGTGCTTCTA	TGAAGTTGTCTTTGGCAAGGATCA
<i>KRAS</i>	AAAGAATGGTCCTGCACCAGTAA	AGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAA
<i>KRAS</i>	CCAGCTCCAACCTACCACAAGT	CTGGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAAC CTT
<i>KRAS</i>	AATGTCAGCTTATTATATTCAATTTAAACCCA C	GCAATGAGGGACCAGTACATGA
<i>KRAS</i>	GAAAGCCCTCCCCAGTCC	TGCACTGTAATAATCCAGACTGTGTTT
<i>NRAS</i>	TCACCTCTATGGTGGGATCATATTCA	ACCCTGATTACTGGTTTCCAACAG
<i>NRAS</i>	AAATAACTTTTTACTTTCTCTCCTTTATTCCT	CAGCTAATCCAGAACCCTTTGTAGA
<i>NRAS</i>	AAAAGCTCTATCTTCCCTAGTGTGGTA	GCTTCTCTGTGTATTTGCCATCAATAA
<i>NRAS</i>	TCTTCTTGCCAGCTGTATCCAGTAT	AAAAATTGAACTTCCCTCCCTCC
<i>NRAS</i>	AGGTTAATATCCGCAAATGACTTGCTA	GATGGTGAAACCTGTTTGTGGAC
<i>TP53</i>	CTCTGGCATTCTGGGAGCTT	ACTGCTCTTTTACCCTATCTACAG

Gen	Forward-Sequenz [5'-3']	Reverse-Sequenz [5'-3']
TP53	CGTAGCTGCCCTGGTAGGTTT	CTGAAGACCCAGGTCCAGATG
TP53	GGATACGGCCAGGCATTGAAG	TCATCTTCTGTCCCTTCCCAGA
TP53	GACCTAAGAGCAATCAGTGAGGAA	CATCTACAAGCAGTCACAGCAC
TP53	CGCCTCACAACTCCGTCAT	CTCTGTCTCCTTCCCTCTTCTACA
TP53	GCCACTGACAACCACCCTTAA	GGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTA
TP53	GTCGAAAAGTGTTTCTGTCATCCAAA	CAGATAGCGATGGTGAGCAG
TP53	GGGATGTGATGAGAGGTGGAT	CCATCCTCACCATCATCACACTG
TP53	GGCTCCTGACCTGGAGTCTT	CATCTTGGGCCTGTGTTATCTCC
TP53	CGCTTCTGTGCTGCTTGCTTA	TCCTATCCTGAGTAGTGGTAATCTACTG
TP53	GCACCTCAAAGCTGTTCCGT	CAAGGGTGGTTGGGAGTAGATG
PDGFRA	TCCACTCATTGCCATGACTCT	CCTCCACGGTACTCCTGTCTC
PDGFRA	TCAAACATCATCACGGAGATCCAC	TGTCCTGACTGTTGAGGAACTCA
PDGFRA	GGTGCACCTGGGACTTTGGTA	CCATCTCTTGGAAACTCCCATCTTG
PDGFRA	CGATGCAGCTGCCTTATGACT	GGCCTATAAATTGTAAAGTTGTGTGCAA
PDGFRA	TTTTCTGAGAACAGGAAGTTGGTAG	CCAGGTGAGTCATTATCTTCAGTTCAG
PDGFRA	TCCAGTGAAAAACAAGCTCTCATGT	GAAAATCCTCACTCCAGGTCAGT
PDGFRA	ATTCAGCTACAGATGGCTTGATCC	AGGCCAAAGTCACAGATCTTCAC
PDGFRA	TCCTCCTGGCACAAGGAAAAATT	AGAAGCAACACCTGACTTTAGAGATTA
PIK3CA	TTTTATTTTACAGAGTAACAGACTAGCTAGAG A	GCACTTACCTGTGACTCCATAGAAA
PIK3CA	CGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGA	ACATGCTGAGATCAGCCAAATT
PIK3CA	ATTTGCTTTTTCTGTAAATCATCTGTGAAT	TGAGCTGTTCTTTGTCAATTTCCCTTAA
PIK3CA	TCTAATTTTGTGACATTTGAGCAAAGAC	GAGCCAAGCATCATTGAGAAAAGATT
PIK3CA	AGCAAGAGGCTTTGGAGTATTTCA	AGAGTGAGCTTTCATTTTCTCAGTTATC
PIK3CA	CGACAGCATGCCAATCTCTTCATA	CCATGATGTGCATCATTATTTGTTTCA
SDHA	CTCTGGATCTGTGCTTCTGTGT	GATCCTTACCCCTAAGCCAAAAA
SDHA	GTTTGGCATAAGTGAACATGTGATT	CTTGTAACACATGCTGTATTAACCC
SDHA	GAGCTGCATTTGGCCTTTCTG	GGCTGCCCAGGTAGAAAGTG
SDHA	GCATTTCTACGACACCGTGAAG	TTTTCCAGGATTCTTTTGTACTAGAAAC A
SDHA	ACAAAGTTGGCGCTCCTGTT	TCATGTAGTGGATGGCATCCTG
SDHA	GTTTAGCAGAAGTGAAGATGGGAAGATT	AGGTGTGCAATAGCGAGTGG
SDHA	GCGAATATCTTGACTCCTTTAAGGTGTT	TCCACCAAATGCACGCTGATA
SDHA	CTGTGTGGCTGATCGGACT	TGGGCACGCTAACCATT
SDHA	ACATGAGCAGATACCACCTTAAAACC	CCTCTATGCACAGTGCGATGAC
SDHA	TTTAGTCTCTGCGATATGATACCAGCTA	TCCTACCCTGTGGCAACAAC
SDHA	CATCGCATAAGAGCAAAGAACA	CAAGGCCTGTGTCTAAACCGT
SDHA	CTCACCAGATAGGAGGTCCAGAT	AACAAACTCTAGGTCTGGCAAG
SDHA	CACGGCCATGATCACCAG	CACATGCTTACAAGACACACACAAG
SDHA	AAGGATGTCGTGGAGAGGGA	CTCAGACAGTGCTGGTGGTAAAT
SDHA	AAAAATAATGCATTTGAAATAGAGATCTAGC AA	CCTTTCGCCTTGACTGTTAATGAG
SDHA	TTGCCGTTCTCTGCCGTAT	GCTCCTTCGTGACGTCCA
SDHA	GCCTGCCTGGCATTTCAGA	CGTCGTCCCAGCCTTCTTT
SDHA	AGCACAGACACCCTGTTGG	AGGCCGGGCACAATCTG
SDHA	GGAGATAAAGTCCCTCCAATTAACCAA	AGGTATGCAGCCCTCCTG
SDHA	TTGTGTGTCATTCTAAATCCATTTGGT	TTCCGATGTTCTTATGCTTCCATCA
SDHA	TTTTGTGCCACAGTCAATGCAA	GCCCAACAGTGTGCACAGA
SDHA	CTTGGTATGGCTGCTTCTATGGAT	GCTCACCCCGGTCGAAC
SDHA	GTGCGCTGCAGACCATCTA	GCAACGAAAGAAAATGCAGAGAAAATG

Gen	Forward-Sequenz [5'-3']	Reverse-Sequenz [5'-3']
<i>SDHA</i>	CCTGCCCTGATGGAACCTTT	GCCCACCTTGTAGTCTTCCCT
<i>SDHA</i>	GGTGCGGATTGATGAGTACGATT	GCTGGGCTGTGGTGAGAAC
<i>SDHA</i>	GGCCTCAGGTGCGGATT	TCCACACTGACCTTCCCAGT
<i>SDHA</i>	ACTGAGAATCTTAAAGTTCACATGCCA	GCCTCGTTCAAAGTTTTGTGCGAT
<i>SDHA</i>	CTCTTCTTTTCAAGGTCACCTCTGGAATA	CATGGACACATGCATGAGCTATTATACA
<i>SDHB</i>	CTCTGAGGCTCCAGGACTCA	CGATGTTTCGACGGGACAC
<i>SDHB</i>	TCGGATGATCTCAGATTTTTAAGCCTTC	ATCTATCGATGGGACCCAGACA
<i>SDHB</i>	CATATGAGGTTTGTCTCCAGCCT	GCCAGCAAATGGAATTATCTTGTATT
<i>SDHB</i>	TGCAGCTGTTTTCCAGATGTCT	CCATGGTATTGGATGCTTTAATCAAGAT T
<i>SDHB</i>	GGAAGGTCAAAGTAGAGTCAACTTCATT	TACATCCAGGTGTCTCCGATTATATTAT
<i>SDHB</i>	ATCTGACTAGAAGAGGAGCCTTAAAT	CAAAAATCTACCCTCTTCCACACATGTA
<i>SDHB</i>	CACGGGAACAAGATCCTTTATCACA	GGATGTGTTAAATGTGTGTCTCTTTTCAG
<i>SDHB</i>	GCCACACTCCTGGCAATCAT	CCATTGAGCCTTATTTGAAGAAGAAGG A
<i>SDHB</i>	CTGCTTGCCTTCTGAGATTCA	GTAAATAAAGCTGAGGTGATGATGGAA T
<i>SDHB</i>	GCTTGAGTTTCAATTTCTCTTAAAGCA	GCTCCTGCCTCTCTTTTCTCC
<i>SDHB</i>	CCCACGTACCTTAGGACAGG	CAGCTAATCATCCCTGGTTTTCCA
<i>SDHB</i>	CAGGCATATGCTGGTCCCTTT	ACCATCATGAACTGCACAAGGA
<i>SDHB</i>	TGCTGTATTCATGGAAAACCAAGAT	AGAAAATGATGGCAACCTATAAGGAGA AG
<i>SDHB</i>	GCATGGAAACAGTTAAACTGAAGCTTT	GAAGGAGTTTACCCAAGATTGTG
<i>SDHC</i>	GCCTTTTAAAGAGACTCTCGTCACAT	CAGGCACCAACTCCCAGTC
<i>SDHC</i>	TCCCTTACCCCCTAAAAATAGAGAAGT	CTGATACAGAGCTGAGGGCTAAAG
<i>SDHC</i>	AACGTTATGCAAAATATTAACCAAGTTTACT T	AGACAGAGGACGGTTTGAACCTATAT
<i>SDHC</i>	GATGGAGCGGTTCTGGAATAAGA	CTTCAGAACTTTCACCCACTACCT
<i>SDHC</i>	ACTCCCTGGGAACCTTGTAGTCT	GAGAAAATGTGCAAATCCCGAATTAAC T
<i>SDHC</i>	GATGTCCATCTGCCACCGT	TCTAAATCAAGTGCTGAGTTTCAAAGGA
<i>SDHC</i>	TGTAACCTATGAGCAGCTGTGACAA	CACAGGGACTTCACAAGTTCCAAATA
<i>SDHC</i>	GACTCTCTACTATGGTGTCTCTTTTCC	CATACCTGCACTCAAAGCAATACC
<i>SDHC</i>	CACAGATGTGGGACCTAGGAAAAG	TGACAAACAGAAAGATGGGTGAATGTA A
<i>SDHC</i>	CCCAGCATCATCTTCTACACATTA	ACCCTTTTCCACTATTATGGTCTACCAG
<i>SDHC</i>	TCATGCTGAGAGGAGATATCTATTCTT	GACAACCACTCCAGACTGGTATAG
<i>SDHD</i>	CTAAGTGGTTCCGGGTTGGT	AGTCCTCACTTCCATCCCCTT
<i>SDHD</i>	AACCCAGTGAAATAGATGCTATCT	CCACTGGAGTTCGAAGCAACA
<i>SDHD</i>	CATCCTAATGACTCTTCTCAGCTC	AGCAGCGATGGAGAGAACATAC
<i>SDHD</i>	GTTTGGGTTACTGTGTGGCATA	GGATTCAAATAAGCAGCCGGAAG
<i>SDHD</i>	AGTGTTTTGCTCCTGGGTCTG	ACATAAGACAAGCTCACAGCAAACAAA
<i>SDHD</i>	GGATGCCTTGCAGAAAGCTG	GCAAAGAGGCATACATCAATTCTTCAA A
<i>SDHD</i>	GCAGCCAAGTTATCTGTATAGTCTTCT	CAAAGGTTAAAGCTGAAAGTGCCA
<i>VEGFR2</i>	GTTCCGGTTCCCATCCTTCA	ATCCCATGTGACTCTACAGAGTTAGAT
<i>VEGFR2</i>	TGACCTTCTATTATGAAAAATGCCTCCA	CGTTTTCTTCTCTGTTAGGCATTGTAT
<i>VEGFR2</i>	ACCGCCGTGCTACTAGAATA	GCTTGGGATTTTGTCTTAGTGCTAA
<i>VEGFR2</i>	CAAAGAACCCAGTCAGTTTTCA	CAGGAAAAGACGAACTTGGAATCAT
<i>VEGFR2</i>	CTGGATGGAAGGACAAAAAGAAATGAC	GGGTTCTGAATCCTTGTCTTCTACC

Tabelle 32: Oligonukleotide für das 2. Panel für die massive Parallelesequenzierung

Gen	Forward-Sequenz [5`-3`]	Reverse-Sequenz [5`-3`]
<i>AKT</i>	CCTGGCAGCGGGTACTA	CTTTGCTTCTCCAGAGGCT
<i>AKT</i>	GCTCCTTGTAGCCAATGAAGGT	GGGTCTGACGGGTAGAGTGT
<i>AKT</i>	CTGAATCCCGAGAGGCCAAG	CGCTACTTCCTCCTCAAGAATGATG
<i>AKT</i>	CCCACGTACCGCTCCTC	GCAGAGTGCCAGCTGATGAA
<i>AKT</i>	CCAAACTGGGCTCTGAGGA	GCACCTTCCATGTGGAGACT
<i>AKT</i>	AGCGGATGATGAAGGTGTTGG	ACCTGGTGGGTGGTATGCAA
<i>AKT</i>	CAGCCCTCCACAGTCCAAG	CTGACGGCCTCAAGAAGCA
<i>AKT</i>	GGAAGTCCATCTCCTCCTCCTC	GGTGGAGCTCCTGATCTGGTA
<i>AKT</i>	GCCACGATGACTTCCTTCTTGA	GCCCATAGACCATGAACGAGT
<i>AKT</i>	CCAGCAGCTTCAGGTACTION	TGTGAAGTGGACGCCTCTC
<i>AKT</i>	AAGACAGGACATCGTCCCCTA	CTCACCCAGCCCTGCTTT
<i>AKT</i>	CCACCTCGTCTGTAAAGCA	CGCTACTACGCCATGAAGATCC
<i>AKT</i>	AGGCCGCGAAGTCCATC	AGTTCAGCTCCCCTTCT
<i>AKT</i>	CACCTTGAGTCCCAGTA	CGGCTGTGCCTCAGGTT
<i>AKT</i>	GCAGCAACGCGTATGCAC	GAACCTCATGCTGGACAAGGA
<i>AKT</i>	CAGCCCGAAGTCTGTGATCTTA	ACTCGGAGAAGAACGTGGTG
<i>AKT</i>	GTGTAGCCTGTAGCTGGGATG	TTCTACAACCAGGACCATGAGAAG
<i>AKT</i>	CCTCCATGAGGATGAGCTCAAAA	CCCTTGATGCCGAGTCCTG
<i>AKT</i>	GCGAGTGTGTGGGAAATCTGG	CGCTTCTTTGCCGGTATCGT
<i>AKT</i>	GCCTCTCTGAGTGTGGAGAGAAA	TCGGAGACTGACACCAGGTAT
<i>AKT</i>	GGCCGTGAACTCCTCATCAA	CTTGAGCACACTTGAGGGTGT
<i>AKT</i>	TCCATCCCTCCAAGCTATCGT	GAGGTGGCAGGGAGGTG
<i>ALK</i>	GGGTGAGGGTGTCTCTCTG	TTGGCTTGCGGACTCTGTAG
<i>ALK</i>	ACTGCAGCAAAGACTGGTTCTC	GCTCTGCAGCAAATTCACCAC
<i>ALK</i>	CCAATGCAGCGAACAATGTTCTG	AGCTGCTGAAAATGTAACCTTGTATCCT
<i>BRAF</i>	GATGCGAACAGTGAATATTTCTTTGA	TGGATCATTTGGAACAGTCTACAAGG
<i>BRAF</i>	CACATTACATACTTACCATGCCACTTTC	TCTGTTTGGCTTGACTTGACTTT
<i>BRAF</i>	ACACTGATTTTTGTGAATACTGGGAA	GTGGGTCCCATCAGTTTGAACA
<i>BRAF</i>	CATCCACAAAATGGATCCAGACAAC	GCTTGCTCTGATAGGAAAATGAGAT
<i>CDK4</i>	CCTCAGTCGCCTCAGTAAAG	TGGCTGAAATTGGTGTCCGGT
<i>CDK4</i>	CTCAGGGTCCCCTTCTCTA	CATCAGCACAGTTCGTGAGGT
<i>CDK4</i>	GGCCTTGTACTIONTCCCATAG	TGTAAGCGACTTTTGGTGTAGGAG
<i>CDK4</i>	CAGATGCACTGGAACTAGGCA	GAGCATGTAGACCAGGACCTAAG
<i>CDK4</i>	GGGTGCCTTGTCCAGATATGTC	GGATTGAAAAGTGAGCATTACTCTGGT
<i>CDK4</i>	GCTACGGCAATCACTCTCCTA	CGAGATCTGAAGCCAGAGAACAT
<i>CDK4</i>	GTTCCACCACTTGTACCAGA	CATCTGTACCTCCCCTTTGAAACTA
<i>CDK4</i>	GAATTCAAGGTAGTCCAGGGTATGT	CCCCATCCATTCTTCTATTCCC
<i>CDK4</i>	GGTTCAGCAGAAAGAGGACTCA	GAAAATGACTGCTACCTTATATCCCCTTCT
<i>CDK4</i>	CCCACAGCCATCTCCAGTA	GCTGCCTCCAGAGGATGAC
<i>CDK4</i>	CAGGGATACATCTCGAGGCCA	CTGAACCCAGGATGGCAACT
<i>CDK4</i>	TGGCAGCTTTTCTCCTTCCAT	TCTGTTTTCTTCATGGTTTTCTGACCT
<i>MET</i>	ATTTGTCATTTTTAGTGGAAGCAAGCAA	CCCAAGTAGTAATAACAGTGCTGTTGAT

Gen	Forward-Sequenz [5`-3`]	Reverse-Sequenz [5`-3`]
<i>MET</i>	TGAAGGCAGTTATGCCATTTGTAGA	ACTTTTCCAAGGACGGTTGAAGAAA
<i>MET</i>	TTGATTGCTGGTGTGTCTCAAT	ACAAGAATCGACGACAATCTTAAACTGT
<i>MET</i>	GGCCCATGATAGCCGTCTTT	CTTCGGGCACTTACAAGCCTAT
<i>MET</i>	GCAAGAGTACACACTCCTCATTGG	TCACAACCCACTGAGGTATATGTATAGG
<i>MET</i>	TGTTACGCAGTGCTAACCAAGTT	GCAAACCACAAAAGTATACTCCATGGT
<i>MET</i>	CCAATGTCTCTCGCTCCTG	AGTTAGTAAGCTTGGCAGTCAACTT
<i>MET</i>	GAAGTTAATGTCTCCACCACTGGATT	CTTCACTTCGCAGGCAGATTC
<i>MET</i>	GCTTTTCTAACTCTCTTTGACTGCAGA	GGATTGTGGCACAGAGATTCTGATAC
<i>MET</i>	AAATTATTCTATTTTCAGCCACGGGTAA	TCCAAAGCCATCCACTTCACTG
<i>MET</i>	GTGTACACAACAAAACAGGTGCAA	AGAGGAGAACTCAGAGATAACCAATAC A
<i>CREBBP</i>	CGGACGCTCTCTTTCAGGTG	AGCAGGTGAAAATGGCTGAGA
<i>CREBBP</i>	TGAAGAATCTCCCTGGCTCAGA	CGGCTCTAGTATCAACCCAGGA
<i>CREBBP</i>	CCGCGGTTAGGTAGGAAGTATT	GAATGCCGTACCCTACTCCAG
<i>CREBBP</i>	TGCCCTTGTGAAGCCTGATTAA	CCAAGCACTGAATCCGCAAG
<i>CREBBP</i>	AAGCAGCATCTGGAACAAGGT	GCTGTAAAGGTTGCTTAGTTTCTCATTTC
<i>CREBBP</i>	GCTGGCGCTCACATTTCTAT	GAGAATTAGGCCTTTTAAACAGTGGGA
<i>CREBBP</i>	AAACCTGCGTTAGGGTCTCAG	CTCAATAGTAACTCTGGCCATAGCTTAA
<i>CREBBP</i>	CAGCCCCACTTGCTTTTGTG	TCAGTGCCATGGGCAAGAG
<i>CREBBP</i>	GTTGACCATGCTCTGTTTGTCTG	ACCACAGCTGATGTTACCTCTTTTT
<i>CREBBP</i>	CTGAGGGCCAAGGGTAACTT	CTGGAGTGAACCCCAAGTTAG
<i>CREBBP</i>	CGGAGCCTTATGAACCAGAGA	CGCATTGTGCAACCATGAAAAAC
<i>CREBBP</i>	TGACAATGCGTCATGTGATTCAAAAC	GCAGATCCTGAAAAACGCAACT
<i>CREBBP</i>	AGAACCAGCTGCTGCTGTATC	TGAATATGACTTGGAACCTCTGAGAGGTT
<i>CREBBP</i>	AGTCATGTGCTGTGCAGTTCTT	TTAGGTATAATTGAAAGTGTGACGATTTG GA
<i>CREBBP</i>	CAACTTCTATTCTCATCTCCAAGCTTCT	TCTTCACGACAAATCATCTCTCATTGG
<i>CREBBP</i>	ACGAAGTTGAGAGTTCCTTCACCTA	CCAGCTCCATGCAGCGA
<i>CREBBP</i>	GGGAGTCCGAGAGCAGCATA	TTGTCTGTCTGTCTGTTTGTCTGTTATAG
<i>CREBBP</i>	AGGGAAGTCGGAAGAGCTGAT	GCATGTTGGTTATCTGTCATCAAACT
<i>CREBBP</i>	CCATTTAACTATTTTCTCTGCCACACA	AGCCCCAAACTTGATTTTCAAG
<i>CREBBP</i>	GCCAATGGGCAACACAGGAATA	CACTATACCAACAGCAGCTCCTC
<i>CREBBP</i>	TTTCTTACACCGGTGCTAGAAG	GTTTGAGTCACTTCAGTAGATGGATGA
<i>CREBBP</i>	AGTCTGTCCCACTACATAGATTCCA	GGAAAACCTGGTAGCCTATGCTAAG
<i>CREBBP</i>	CGTACATGTCCCCTTCCACTTT	CTGGACGAAACCCCATGTCTTTA
<i>CREBBP</i>	CAGGCTAAGGGATGGCAGTAG	AAACGGAGGTCGCGTTTACATA
<i>CREBBP</i>	GGTCCCCAAGATGCCTTGTT	CACAGATCATTCAAGTTGCTTTTTACAGT
<i>CREBBP</i>	CAGTGAAAGTTATGGCTGTTGAATGT	GAATCAAGGATTATATTAATAACTAGG GTGGT
<i>CREBBP</i>	AGAGAACACTTACCCCTGGCA	TGAACCGTTGTGGGTACATTTACAG
<i>CREBBP</i>	GCATAACCCAAATTCAAAGGAACAAGA A	AGATGAACAGCATGGGCTCAG
<i>CREBBP</i>	GATGACGGGAACTGGTTCTGT	GGTGGTGCTTGTGTCTCGTAG
<i>CREBBP</i>	ACAAGAATTTTATTTCTAGGGAGCCA	CCCGCTCAGAGCCAGTTTC
<i>CREBBP</i>	GCTGTTGCTGCGATGACTGA	CAGTGCTACCCAAACCCAGAG

Gen	Forward-Sequenz [5`-3`]	Reverse-Sequenz [5`-3`]
<i>CREBBP</i>	GCTGCTGCCTGGACTGTAG	CCATCTCTCCAGCACACGA
<i>CREBBP</i>	GGTGCAGTGGTGACTGTGT	ACCATACTCTGTCCATTCTGGTA
<i>CREBBP</i>	AGGAGTCATCCCAGGTGGT	CTCAGGCCAGCCAGCTA
<i>CREBBP</i>	CCTGGCCTGACACACAATTTTTAT	CCCGTCTGTGGCTACCC
<i>CREBBP</i>	GCTGGGTCTCCGTCTTCAT	CTGAAGTCAGTGCTTTCGGTTTTT
<i>CREBBP</i>	AAGCAGCATGCTTTAATAAGGTAATGA	AGAGCAGAAATCAGAACCAATGGAA
<i>CREBBP</i>	CTTTCACTTCAGGTTTCTTTTCATCCAC	GTTGCGGTAACATAAAGGTGTTTGATAT
<i>CREBBP</i>	AAACAATGGACACTCAGAAGTCACA	CTAGAAGCACTGTATCGACAGGAC
<i>CREBBP</i>	GCCGGAAAGGTAATGACTCTGG	AGGGATCTGAGCACCTTTTACAAAG
<i>CREBBP</i>	TGCGTCCACAGCAATATCCAA	AGTACGTGGACGACGTCTG
<i>CREBBP</i>	GCACATATGCACTCCCAGTATACA	TTGACCCTGTGCATGCAGTCC
<i>CREBBP</i>	GCCAGGCATTGTTGAACATGAG	GGGATTCCCTATACTGAGACCATTTT
<i>CREBBP</i>	ATGAACGTGCCTTGCCCTAA	TTGCAGTATGAGTTTTCCCACA
<i>CREBBP</i>	CAATTTAAGGTCACCCTCCCTCA	GATGGACCAGTTCACCCAAGTA
<i>CREBBP</i>	CCCACAACCCACTCCATAAGG	AACAAGGACAATTTCAAAGGATCAGTTT G
<i>CREBBP</i>	CACTGGCTCTGTGCAGAACT	TCTTGTGGTTCCGTGTGCTTTA
<i>CREBBP</i>	TGTGCAGTCCAGGAAACAGAAA	CTGCATTTTGTGGTTTGACAATTTACA
<i>CREBBP</i>	CTGCTCGCAGAGCACTGTA	ACTTGAAGACCGAGTGAACAAA
<i>CREBBP</i>	GATTCTGGCGCCGCAAAAA	AGTCTCAGTCACTGTCTCAGCA
<i>CREBBP</i>	GCCGTCAATTCCTCAAAGCA	GTCAGCAACAGCCTTTGTAAATGTC
<i>CREBBP</i>	GGTCTATCCTAACACGGTCACT	CCCATATCGAACCAAAGCTCTGTT
<i>CREBBP</i>	GGATCTCATGGTAAACGGCTGTG	TCAGATTTGAGGGATACCCTGAGT
<i>CREBBP</i>	AAGGGTTCTTACTAGTTCCAAATAATTT AATCC	TCATTTCTTCCGGCCACGTT
<i>CREBBP</i>	GGTAATTAACAAGTATGCGAATGCAAG A	CAAAACGACTGCAGGAGTGGTA
<i>CREBBP</i>	ACGCCTTGCCAGCATCTTTT	GCACGTTTCATCTGACGTGTGT
<i>CREBBP</i>	GGAGCTCAGAGAAGGGTCTGTA	GTGATTTCTGGCCCAATGTGTT
<i>CREBBP</i>	CTTGTCTAGTTCCTTAATGCTCTCTTCT	CCTCATCTCACTGTTGTGCTTTG
<i>CREBBP</i>	CAGCTGCGAGTCTTTCCCT	CATGCCCAACGTGTCCAATG
<i>CREBBP</i>	CATACAGCTTCTGGGACAGGT	CACAGCCTTGCGTGTGTT
<i>CREBBP</i>	GGAGAACTCCCAGTGCTTGT	ACTAAAGCCCCTCCTCTCCTG
<i>CREBBP</i>	CGTCTCCACGTGGTGCTT	CCTCACCTCGCCAGAG
<i>CREBBP</i>	CACCATCAGGTACAGACACCAA	TTTGTCTACACCTGCAACGAGT
<i>CREBBP</i>	GGCCAAGCTGTCCCATCT	CCAGTTCAGCAGCCTCA
<i>CREBBP</i>	GCTGTGCGCTGTTTGATGAAA	AGCGCTCTGCAAGACCTG
<i>CREBBP</i>	GACTCTGCTGAGGCACGTT	GCCCTCTGCTGCTACCAC
<i>CREBBP</i>	GCACCACCCGCTTCATCTT	CTGGGCCTGGATGACGAG
<i>CREBBP</i>	CCTGGGCCTGCATGGATA	CCCCGTGAGCCTGAATGTG
<i>CREBBP</i>	CGTAACATTTCTCGGTACTGTGGATT	CCAGCCTGCAGAACCTGA
<i>CREBBP</i>	GGCCTCACGCTCGATCTG	ACCCTCACCCGTGAGCAT
<i>CREBBP</i>	GAGCATTGCACTCTGTTCCGG	CAGTCCCAGCCTCCACATT
<i>CREBBP</i>	ACTAAGGGACGTGGCGATCT	CAGCGGATTCTGCAGCAAC

Gen	Forward-Sequenz [5`-3`]	Reverse-Sequenz [5`-3`]
<i>CREBBP</i>	GGGACCCAATCTGCTGCTT	AGCTCCATGGGCCAGATG
<i>CREBBP</i>	GGTAGCCTCCGGGTCTT	GTATGAATCCACAGTACCGAGAAATGTT
<i>CREBBP</i>	GGGAAGCCAGCTGGTGA	CGGATGGCCACCATGAACA
<i>CREBBP</i>	GGGAAAAGGTGATGCTCTCACA	CCATAGATCAGGGACACTTGGG
<i>CREBBP</i>	CTGGGCGACTTCAGGGT	CTTGCCAGGCCTGTGA
<i>CREBBP</i>	CCGCTCACCTGGTTGGG	CTCCTGCAGCGGTGGAA
<i>CREBBP</i>	GCATTTGTTTTCTTGGCAGTGCTT	CAACTGCTCGCTGCCATC
<i>CREBBP</i>	GCCAGCCTGCATGGCAT	CAAATCAAACCCGCAGCTAATGG
<i>CREBBP</i>	GGGCTCTTTGACTGTGGCT	CCTGTCCCCTTTCCTTGCTT
<i>CREBBP</i>	GGGCTGTATCCGTGGTGA	CCACAGGCCTCGCATCT
<i>CREBBP</i>	CGAGGACACCTGGGTAAGTTG	CTGACGTACCTGTGCTGGAA
<i>CTNNB1</i>	AGACAGAAAAGCGGCTGTTAGT	GAGAAAATCCCTGTTCCCCTCAT
<i>DDR2</i>	GCATTATTGGTTGGTGGCAGACT	TGCTGGTCTTCTAGCATATAGCTGA
<i>DDR2</i>	CCATGTCCTCTCTTTCTCTTTGGTTT	GAACATGGGCTTTCTTGATGTAACC
<i>DDR2</i>	TGCTTGCCTGTGAACCAGTAA	GCAGAAACTCCTTCAGGTCATCAG
<i>DDR2</i>	GCCCTGAGATTCCAGTGGAAC	GTGCCATCCCGACTGTAATTGA
<i>DDR2</i>	GAGTTTGCCCCATGTACAAGA	CCTTCTTCTCCTAGCCTAAGTCAAAAT
<i>DDR2</i>	AGGTGCTGGATGGAAATAGTAACC	GCTTCTGGGCTAGTGACCTA
<i>DDR2</i>	GTAGATGCATTCTGCTCCTCGAA	TCCAAGTCCTTTAGGAAAATGTCATAGG
<i>DDR2</i>	ACTCACTTGGCTGTGTTTCTT	AGTGGCCAATTTCCCATTCTAATAAAGTT
<i>DDR2</i>	TGTGGCCCGGCTATGACTA	TCCTTAAAGAAGTTCACCACACC
<i>DDR2</i>	TCAGATTTCTCTCCTTTTCTCCT	CCATTGGTGGCACTCTCGTT
<i>DDR2</i>	GAACCTAATGCCATTTCTTCCC	TGAACATCATCCAGGTATCTGCAAAA
<i>DDR2</i>	AGTGCCATCAAGTGTCAATACCA	CATTCCTCCTTCATCACCTTGCT
<i>DDR2</i>	ACCTTAGCAGGGCCAACCTA	TTGACGTCATCCAGGACAAGG
<i>DDR2</i>	ACTAGCTGTCTGTCTTCTCCCT	ATCCCCAGTAAGTCCCTTCA
<i>DDR2</i>	CCTGGTCACAGATCCAATGCTT	TTCTTATATCATGACCATTCTGCACCTC
<i>DDR2</i>	TAAGCAGAAGTATTAAGGTGGCATCT	CGAGTGTTGCTGTCATCAACTTT
<i>DDR2</i>	CACCTAGTGAACAAGGGTCCAA	TTGCTGAGGTTTCTCCCTTGAC
<i>DDR2</i>	CTTTCTCCTTGCTCTTCTCTCCA	GGAAAGATGCGATCGTAAGTTCGAG
<i>DDR2</i>	CCTCCTCTCAGAGTTCCTTCT	CTGTCACTCCTTGGAGGTTTAC
<i>DDR2</i>	CCACTATGCAGAGGCTGACATA	TCCTTCTCCCAGCTTCTCTTTGA
<i>DDR2</i>	AGTCCCCAGGAAACTCCTAACTT	GAAGGGACTCTTTGTTCTACTGATCATT
<i>DDR2</i>	TGGAGGGAATGGAAAAATTCAAAGACA	AGGAGTATTCCTGGTCCTAAAGATGAAA
<i>DDR2</i>	GCCTTGGTGTGCATTCTTCTC	CAGAGAGGGTCATCAGTGATACAC
<i>DDR2</i>	CCCAAACATCATCCATCTATTAGCTGT	GAGAAGGAAGACCTGGCTTGTTTA
<i>DDR2</i>	ACGAAACTGTTTAGTGGGTAAGAACT	ACAGGGCTTTAAAATGCTGAGAACTTA
<i>DDR2</i>	CTACCTTCTGTCTTCTTGTCTATTTCT	TTCCAAAGTCAGCTATCTTGATTGTGT
<i>DDR2</i>	AGCTGCAGATTATGAAATTTAACAGGG T	GGGAATAGGGCTGTTCTTGACAAAA
<i>DDR2</i>	GGTACTTTGTGGGAGACTTTCACC	ATCCATTTCATCCCCAACAGTTCTTAC
<i>DDR2</i>	AGCTGCTGGAGAAGAGATACGA	GGTCTTGTAGGGAGGACCTGAG
<i>DDR2</i>	CCCCGTCTTTGTAATATTCTCTCTCT	CTTGGAATGAGGGACGGTTCT

Gen	Forward-Sequenz [5`-3`]	Reverse-Sequenz [5`-3`]
<i>DDR2</i>	CAGGAAATGCCAGCAAGAGTA	GCACTGACATCTAGGGCAAAATCTT
<i>EGFR</i>	TGAGGTGACCCTTGCTCTGT	CCAGCACTTTGATCTTTTTGAATTCAGT
<i>EGFR</i>	AGCTCTCTTGAGGATCTTGAAGGAA	AAATATACAGCTTGCAAGGACTCTG
<i>EGFR</i>	ACGTCTTCCTTCTCTCTGTCA	CTGAGGTCAGAGCCATGGAC
<i>EGFR</i>	CTGGACTATGTCCGGGAACAC	TGAGGATCCTGGCTCCTTATCTC
<i>EGFR</i>	GCCTCTCCCTCCCTCCA	GGTACTGGGAGCCAATATTGTCTTT
<i>EGFR</i>	CAGGAACGTAAGGTGAAAACAC	CTGACCTAAAGCCACCTCCTTAC
<i>EGFR</i>	TGAATTCGGATGCAGAGCTTCTT	CCAAAATCTGTGATCTTGACATGCTG
<i>EP300</i>	CCTCGCTTGTATCTCCGAAAGAA	GAGTAGAAAAGATTAAAGGGAAACGTGGA A
<i>EP300</i>	TGGGACTAACCAATGGTGGTGATA	GGGCCACCAACTCCCATATTG
<i>EP300</i>	TGGTCAAAGCCCAATGACACA	CCAGGATTCATGCCCGCAT
<i>EP300</i>	CAGAATATGCAGTACCCAAACCCA	ATTGTGCACACAAACCAAAACTGT
<i>EP300</i>	TGGTTTTGTACTACTTTGACCTTTGTCT	GCCAAGACTTGTCTGAAGCTGATTAA
<i>EP300</i>	CATGGGAATGAACACAGGGATGA	TCAGTAAGTTGCCAGCACTTCC
<i>EP300</i>	TTCCTTTGAAACTGTCTTTGTGAACTTG	GCTGTCCAGGATTCTGAGTATATGG
<i>EP300</i>	AAAAGGCAGTTCTTGGTGGA	CCAGCATATATAACAGAAGGGTGAAAGT
<i>EP300</i>	CGATCTGGTAGTTCCCCTAACCT	CATGTTGGGAGAAGTCAAGCCT
<i>EP300</i>	AACAACCCCAATCCTTATGGTTCA	AGTACTCACCATGTTGGGCATTC
<i>EP300</i>	GTTCTCTTTTGCATGCTCACAA	GTAACCCTGTGGGTCCACTTAC
<i>EP300</i>	TTTATTAAGAAATAGCACATTATGACTC CTACC	TCAGCTGTATGTGCTCCAGAAC
<i>EP300</i>	CCAGTTGCCCAAGGGATGG	ACTTCCCCATTGGCCTGTT
<i>EP300</i>	TGTTTTCTTCTCTTTAGTGGCACACT	TTCATCACTTACGCTGTTGATTTCTCT
<i>EP300</i>	TACTATATCTTTTGTCTTCTCTAGCAATT TTGA	GGGATCAATCTGACTAACAGTGCTTA
<i>EP300</i>	CCCCCTCAAAAATGCTGGTGATA	ACAGGTCCCTCACATAATCAAGTAGT
<i>EP300</i>	TGCAGCTCTTGGACTACCCTA	TCATTTACTGACACAACCAATACCATGT
<i>EP300</i>	TTGGACTTGAAATCCTAGCTCTCTA	TTGTGTCGGCATCTGATTTACTTGA
<i>EP300</i>	GTGGCTGTTGTATTTATTTCTGTCTCCT	GTGACCCAGGGTATAAATCACGTT
<i>EP300</i>	AGTGTCAGCTTGAATTAATGAGGTCTT	TTCCGAATTCCAGTAGTGGATGG
<i>EP300</i>	CCTATGCCAACAGCAGCTCAA	ATGAGACGTGTCCACAATCTTACTTAC
<i>EP300</i>	CCGATCCTGCTGCTTTAAAAGA	CCACAACAGGTTCAATCTTGGCTATTAA
<i>EP300</i>	TTTTCTTTTCTCTATGTGTTCAAGTGT	GCAACTAGGTTTTCCATCCGTCTG
<i>EP300</i>	GCAGAACATGCTACCAAATGCT	TCTCTCAAACAGAAATATAACAAAAACC ACTTA
<i>EP300</i>	TCTGTTACCTGGTGGTAGTTCCT	TGGTCCTTCGTTTTTCTTCTAGTTCTTT
<i>EP300</i>	ACTACCACCTTCTAGCTGAGAAAATCT	TGGATTCATGGAACTGGAACCAT
<i>EP300</i>	GCAGTGTGCCAAACCAGATG	GCATAAAGCGGGTGTTCAGGTA
<i>EP300</i>	GGTTTGTGTGTGCAGTGAGTTTT	CAGATTGTGGAGTTATTCGAGGCAT
<i>EP300</i>	CATGGACAGTTGGCTCAACCT	CAGAAGAAGTGGAGTTATGGTCTGTTT
<i>EP300</i>	AGGCATTCAGATCTAACATTTTGTCTCAT	CGTCAAACCTAACCGGGTTGAGAG
<i>EP300</i>	CCAGTTCCTTCTCAGACTCAGT	GCCACTCTCTCCTATAAAAACCTACATC
<i>EP300</i>	AATGAAGCAGTTTGGTGATTTGTGTTT	GTTACATTCATTCCCTGTGATGGGA
<i>EP300</i>	TCTGTTCTGAATTGCTGTCTTGTATGT	GGTACAGGCGAGGGTGAATT

Gen	Forward-Sequenz [5`-3`]	Reverse-Sequenz [5`-3`]
EP300	TGTTCTACACCTCCTGCCAT	AGGTGCAGCAGGAAGTGAAG
EP300	TTCCTCAACCAGCTCTTCATCAG	GGATGTAGAGCCTGGGACTGT
EP300	CAACACAACCTCCCAACAAGTG	TCTACTTACTGGAGTTGCAGGCT
EP300	TGTTCTACCCCAACAGCAC	GAGAATGGAAATGGCCCAGAAGTAATAT
EP300	ACTCTGCGTGTGTCTCACCTA	CATTTTGGCCTCCATCTTCACTTC
EP300	CCATTGCTGAGAAGCAGCCTT	CTGAGGTCCTAACCAAATCAAACAGTA
EP300	TTGCATGAGAAAGGGTGTTCAGA	GGCTGGTCTTCCTCCTCTTTTATT
EP300	AAGAGAGAAGCACTGAGTTAAAACTG A	CCAGAACGAATGGCTTCAGAGA
EP300	GGGACAGAGTGGTTAATTTTGTATTG	AGTGCCTCCAAAGTTGGCAT
EP300	AGAAGAACTACGACAGGCACTG	ACCACCAAATACTTACAGGGATTCTTA
EP300	TGGATGATACTCCATCTCCCGTAAA	GCCAGGGCTCCTGATACTGT
EP300	GCTCCAAGCTCTCTGAGGTCT	AAAGCCAGAAGCAGGATATTCTTTATC
EP300	CTACCATTAAGAGGAAGTTAGACACTG G	CATCACTGGGTCAATTTCTTGTTCAA
EP300	GCCTCTGTGCTTTTTTAACAAATGGT	CCCTGGACATGTGGACACA
EP300	CGGAACAGTTCACCCAGTA	CTGGACAACAACTAATTAGCACTTTTCA
EP300	CCTTTGGTTAGAACAGCAGTCAGA	AAGAAAAGCCAAAGCGTACTGACTA
EP300	TCAGAAGTCATGGGAAATATTGCAAGT	ACAACGTTAAGACTTACCCAGCAG
EP300	GTGTCCTTACCATGAGATCATCTG	TATCGTGGCCAAACCCAAAG
EP300	TCAACGGTTTATCTAAGTTGTGTAAGCA	TCTAGGCTTCAGATAAGTTTTGCCAAA
EP300	GAGGTTGAACCTTAAGACTAACAACAG T	CCTCAGAAAGTCATTACACGATTCTC
EP300	TCTACCAGACTTGGCACCTTTCTA	CGAGGAGAAGAAAAGTGAAATGACTAGA T
EP300	GACAGTGGAGAGATGGCAGAATC	GCTAGCCACTGTGAGCTAGTCATA
EP300	ATTTCACTTTTCTTCTCCTCGTGGAT	GGCTTTGGTTCGGTATGGAAAG
EP300	CCTCGATAGTGTTCAATTTCTTCCGT	CCAGAATGCCATGCTAGTTAAAGAAAAA
EP300	CTGGGAGAGTGAGAGGGGTGTTA	ACTGCAGTCCTCAAGCATTTAG
EP300	TGTCCACCAAGTGAGGGAGAT	GCCCCTATGTCCCAACTGAC
EP300	TCAACTCCAACCTGTGGTTTAAAATGT	CAGGAGGATGGCAATGGAAGATATAATC
EP300	GCTTTCATGTTTCTTGTCAGCCAT	GGCCAGAAATCACCTCGAAATAA
EP300	ATAGATTAACAAGTGCAAAGGAATTGC C	GCTGGTGTTCCTCCTCGTTTTCT
EP300	GGGAGATATTCTGTGCTATTCCCAA	GCTGCTCTTATTTTGTGGTTTTCTTA
EP300	GGAGACAGCAAAAATGCTAAAAAGAAG A	CTCTGGGTGGCTGCATCTTA
EP300	CTGGCCCAATGTTCTGGAAGA	ATGATAGAAGTTTCAAAGGAACTCAAT GC
EP300	GTTTCTCACGCTGGCAAGG	CCACATGGTGCTTGCATTTCATTG
EP300	AGAGACTGTCTGTTTTTTCAGGTCTTC	AAGAGAACTCCAGGTGCTTGTC
EP300	AGGACCGCTTTGTCTACACC	GCCTCTATAAAATACGTGGCTGCAT
EP300	CCAGAATTCAATGCTTTCTCAGCTT	GCTCCCAAATACTACAAGGTGTCT
EP300	GCATGCAGCGGACTGGT	GCTTGAGTCCTGGCAAGT
EP300	CTTGAGAGTTTACGTGCACCT	GCTGGTTGTTGCTCTCATCATC
EP300	CAGGCTCAGCAGATGAACATGA	TGCTGGAACTGGTTATGGTTGG

Gen	Forward-Sequenz [5`-3`]	Reverse-Sequenz [5`-3`]
<i>EP300</i>	CAACTACAGTCTGGGATGCCAA	ACCTGAGAGTCCGCAAAAGG
<i>EP300</i>	GCAGCAGTGGAAATGGCAAT	AAATGCCCACTGGGACCTC
<i>EP300</i>	GGATGCAGCATCACATGCAA	CTGTTGCTGAAGGAGTCGCT
<i>EP300</i>	TGCTTGCCAGTGTCCGAAT	GCATTTGTTCTCCTGGCAGTG
<i>EP300</i>	GTTGGCTGCATTCATCAAGCA	CGCCTGCATTGGATTCATGTTT
<i>EP300</i>	GCCAGCAGATCCCTAATTCTCT	CAGCTACCAGTCCAGGATGTG
<i>EP300</i>	GTTTCCCCACAGACAAGTTCC	TGCCATGCCTGGATTGCTA
<i>EP300</i>	CCCAATAGCATGCCACCCT	TCTCCGCTGCTCTCTGAATCT
<i>EP300</i>	GGAGAAACTAGGCCCTTGGCTTA	GGATGGCAGTGAGCAATTGG
<i>EP300</i>	CAGGAATAGGCCCTGGAATGG	TGTCCCATATTCCTTGTTCATCT
<i>EP300</i>	GTATGAACCCACCTCCCATGAC	GGCCACTGACATCATGGCT
<i>EP300</i>	ACTGTGTCTCAACAAGCCTTACAAAA	GGATTAGAGTTGGCATACTTGGCA
<i>EP300</i>	TGCCAGTCTACAGGCCTATCA	GAGAGCGCACTTGATTGGAG
<i>EP300</i>	GTCCACTCCAATCCAGCCAT	AATTGTGAAGGCATGGTGTGTG
<i>EP300</i>	TCTGCTGCTACCATGCCAAG	CCTGTTGCTGCCCAACCA
<i>FGFR1</i>	CATGCAGAGGTCCTCGGT	TGTATGTTGGATCAGTACTCCAGTGA
<i>FGFR1</i>	GGCACTTCCAGCTCCACATC	CCCTACCTAGACCCTCCTAACTTTT
<i>FGFR1</i>	ACGTATTTTGGCTTTGAAATGGAACTG	CGAGAGTTGAGAGAAACACATTTTGG
<i>FGFR1</i>	CAGCCCATCCTGTTCCCAA	CACCAACCTCTAACTGCAGAACT
<i>FGFR1</i>	GACCCAAAGGGCAGTAAGATAGG	TCCCTAGGAGGAACCTCAGTG
<i>FGFR1</i>	CCACCTCCTCCCCTGTGAT	GGAGTCCTCCTGGTCCAC
<i>FGFR1</i>	GCAGGGCTTGGCTACCAA	GTGCAGCTGGCGGAAAG
<i>FGFR1</i>	CGAAGCTGCAGCAGGTCA	CGTGTGGCCAGCGTAATT
<i>FGFR1</i>	GTCCCACTGGAAGGGCATT	CCTGTCTCTTGGCTTTCCC
<i>FGFR1</i>	CCTCCCCTGTTCCATTACTCTA	GGCTGCCAAGACAGTGAAGTT
<i>FGFR1</i>	CCTCTTACCCACGACATCCAG	CCCTCAATGTATCCCTTTGGCATT
<i>FGFR1</i>	AGTAGACTGGCCACGAAGA	GTAGCAACGTGGAGTTCATGTG
<i>FGFR1</i>	GCGGGTCACTGTACACCTTA	CCTCTTTAGCCATGGCAAGGTC
<i>FGFR1</i>	GCTATCCTGACTCTGCCCTAA	CAGCATCAACCACACATACCAG
<i>FGFR1</i>	AGAACGGTCAACCATGCAGAG	CCATTTTGGCTCCGTTGTCTCTTCTA
<i>FGFR1</i>	CAAGCCTGGAAATGCATGCTC	GTAACCTATCGGACTCTCCCATCA
<i>FGFR1</i>	GAGTGTGCAAATCCCCATCTA	GGGTCGGTCATCGTCTACAAG
<i>FGFR1</i>	TCACTCTTCTTGGTACCACTCTTCAT	CTAACACCCTGTTCCGACTGA
<i>FGFR1</i>	GGACAGAAGCATCACTTACACTCA	AACTTATGCCACTCTCTGTTTCCC
<i>FGFR1</i>	CCTTCAAAAAGTTGGGAGTCAAAGTAT	TCCAGTGCATCCATGAACTCTG
<i>FGFR1</i>	CGTGATGGCCGAACCAGAA	GACTAAGAATGGGAAGGAGTCACC
<i>FGFR1</i>	CCTCCACTCCCAGGTAACCC	ACCAAAGTGGCTGTGAAGATGT
<i>FGFR1</i>	CCCCCAGCAGGTTGATGATATT	CAAGTAAATGAGTCTCAACGTGTTCTTT
<i>FGFR1</i>	CCTCTCTTAACCCCTTCCCTA	TGATGAAGATGATCGGGAAGCATAAG
<i>FGFR1</i>	GCTGCTCCTCTGGGTTGTG	CCCATGGCCTCTTCTCCTG
<i>FGFR1</i>	CTGTTCCCACCCTGGCATT	GGCTGGAATACTGCTACAACCC
<i>FGFR1</i>	CGAGGCCAAAGTCTGCTATCTT	ACAAGTCGGCTAGTTGCATGG
<i>FGFR1</i>	CCCACTCCTTGCTTCTCAGAT	TGGTGACAGAGGACAATGTGATG

Gen	Forward-Sequenz [5`-3`]	Reverse-Sequenz [5`-3`]
<i>FGFR1</i>	CCACACCTCCCTGGCAA	CCCACCTGTGCCCTCAT
<i>FGFR1</i>	GCAGTTACTGGGCTTGCCAT	CTCTAACACCCTGTGGCTCTC
<i>FGFR1</i>	CAGGGACGTCTCCTGGAGAT	GAACTTTTCAAGCTGCTGAAGGA
<i>FGFR1</i>	GCCTGAGCTCTGGCTCT	AGGAGACGTCCCTGACCTT
<i>FGFR1</i>	GCTGTGGGTGAGGGTTACA	GAGCTCTACGTGCTCCTCAG
<i>FGFR1</i>	GGCTCATGAGAGAAGACGGAAT	CTTCCTCTCGCCCATCACAG
<i>FGFR2</i>	GCATGGTTGGCATTGGGTTC	GGAAGCTGTCCATCAGTATACATTCTAA
<i>FGFR2</i>	AATGTGATGTTCTGAAAGCTTAATTCTA CCT	CGGCCAACACTGTCAAGTTTC
<i>FGFR2</i>	GGCAAACACCCACAACATC	CCGCCTTTGCTTTGATCTTTTCA
<i>FGFR2</i>	CTGAAACTTATGGGAGAAACAGGACTT	CCATCAATCACACGTACCACCTG
<i>FGFR2</i>	GCATCACTGTAAACCTTGACAGACA	CTTCTTCCCTCTCTCCACCAG
<i>FGFR2</i>	ACCCAGTTGTGGGTACCTTCA	GGTCGGAGGAGACGTAGAGTT
<i>FGFR2</i>	CCATGCAGAGTGAAAGGATATCCC	GCCTTTTCTTTTGCTTCCCTTGTT
<i>FGFR2</i>	AGCTGTGTTAATTTTATAGCAGTCAACC A	CGTGCTTGGCGGGTAATTCTATT
<i>FGFR2</i>	TGTCTGCCGTTGAAGAGAGG	CCTTCTCAGATGGAGCCAGGATTA
<i>FGFR2</i>	TCCAATATCCCCATTTATAGCTGAGTCT	CGCTGGTGAGGATAACAACAC
<i>FGFR2</i>	TGTCTTTGTCAATTCCCCTGCTT	CCCCATCACCAGATGCTATGTG
<i>FGFR2</i>	GATAGAGTTCACATGCCACAAAAGG	CTTTGGGCAAGTGGTCATGG
<i>FGFR2</i>	TTGGGCGAATGCAGTTTTTCC	AACTGATTTGTGAATATGCCTACTGT
<i>FGFR2</i>	GAGCATGTCCAAATTGCCTGTT	TTCCTGAGGAGCAGATGACCT
<i>FGFR2</i>	TGCATGACACCAAGTCCTGA	GGAGCTTCTCTTCTTCTCAACAG
<i>FGFR2</i>	GGCCTTTCTTCTGGAACATTCT	CAGCCAGAAATGTTTTGGTAACAGAAAA
<i>FGFR2</i>	GTCCAAAGTCTGCTATTTTCATCACATT G	TTTGTCTGGCGGTGTTTTGAAAT
<i>FGFR2</i>	GTGAAATGCAGCAGCCACTAAA	CAGTCAAGTGGATGGCTCCAG
<i>FGFR2</i>	TGAGTGTATACTCTATCAAACAGGGCTT	AGCCCTATTGAGCCTGCTAAGATA
<i>FGFR2</i>	CCAGAGAGCTTCAGCCATTCTT	CACAGAATGGATAAGCCAGCCA
<i>FGFR2</i>	CCTTACAGTTCGTTGGTGCAGT	GCCGTGCTTTCTCCTTTTGTTG
<i>FGFR2</i>	AAAGAATAAACAAGACCACAGACTCC	GAAGACTTGGATCGAATTCTCACTCT
<i>FGFR2</i>	AGGAAGTTCTTACCTCATTTGGTTGTG	CCACGTACCCAGTGCATATGAAATTAA
<i>FGFR3</i>	CGCGTACTGTGCCACTTC	CCATTTGGGCAGCACTTCTCT
<i>FGFR3</i>	GGTGCCTGCCTCATGGTT	CAGCCCTGTGCCATCCT
<i>FGFR3</i>	GCCCACTGTCTGGGTCA	CCTGTACCCCGCACACT
<i>FGFR3</i>	GCAGGTTGGGCATTGGTT	CTGGCCTGAACCCTGGAC
<i>FGFR3</i>	CAACCCCACTCCCTCCAT	GTGAGTGAGCGGAGGCA
<i>FGFR3</i>	CTCGGGTCATGGCCTTCA	GCCGTTCTTCAGCCAGGAG
<i>FGFR3</i>	CCTGCGTCGTGGAGAACA	GGGCAGATGACGCTCAGG
<i>FGFR3</i>	GCTGCCTCCGCTCACTC	GCCGGATGCTGCCAAACT
<i>FGFR3</i>	GGCAGCGACGTGGAGTT	ACGGTGGCCACCTTGA
<i>FGFR3</i>	GCCCCTGAGCGTCATCT	TCACTGTACACCTTGCAGTGG
<i>FGFR3</i>	ACGGCACACCCTACGTTAC	CCAACCCCTAGACCCAAATCCT
<i>FGFR3</i>	CCTATCGCTCTGCTCTCTTTGTA	ACGCAGAGTGATGAGAAAACCC

Gen	Forward-Sequenz [5`-3`]	Reverse-Sequenz [5`-3`]
<i>FGFR3</i>	GCCTGGCGGGCAATTCTATT	CGGCCGTAAGTCACAGGATTC
<i>FGFR3</i>	CGAGTACCTCTGTTCGAGCCA	CTTGGAGCTGGAGCTCTTGT
<i>FGFR3</i>	CTGAGCCGGGTCTCTTGTC	TCGGCCACGCCTATGAAATT
<i>FGFR3</i>	GGCCTCAACGCCCATGT	GGAGCCCAGGCCTTTCTTG
<i>FGFR3</i>	GCTTCTCCTGTTTCATCCTGGTG	CAGCTCAGAACCTGGTATCTACTTT
<i>FGFR3</i>	TCATTCAATGCTGGTGGAAGTCA	GGTGTGTTGGAGCTCATGGAC
<i>FGFR3</i>	GGTGTCCCTGGAGTCCAAC	GCCCTCAGCACCCTGA
<i>FGFR3</i>	CGAGTTTGCACACTCATGGT	CCCTCCTCACCTTTCAGCATC
<i>FGFR3</i>	CTGTCACCGTAGCCGTGAA	CATCATCTCCATCTCAGACACCAG
<i>FGFR3</i>	ACAGACGATGCCACTGACAA	GCCGCTACCGCACCTAC
<i>FGFR3</i>	GGGTAACCTGCGGGAGTTT	CTTCTGGGAGGCCAAGTACTC
<i>FGFR3</i>	GTCTGAGGAGCCCGTGTC	TGCAGGTGTGGAAGGAGTAGT
<i>FGFR3</i>	TGGTGTCCCTGTGCCTACCA	TGAAGCCTCTCCACCTCTCC
<i>FGFR3</i>	GGAGAGGTGGAGAGGCTTCA	CTCACGTTGGTCGTCTTCTTGTA
<i>FGFR3</i>	GACGTGCACAACCTCGACTA	CTCGGTCAAACAAGGCCTCA
<i>FGFR3</i>	CCTCCCACACCCTCCA	CGCCTCCACCCTGAAG
<i>FGFR3</i>	CCCTGCAGCTGGTCCTTT	GCCAGGGATGCCACTCAC
<i>FGFR3</i>	GCTCCTGGGTGTGGTTTCTAC	GAAGATCTCCCAGAGCAGGAC
<i>FGFR3</i>	GGAGGACCTGGACCGTGT	CCCACACCTCAGCACTCT
<i>FGFR3</i>	CCTTCAGGCTGTTCCCGAATAAG	CGGTGGACGTCACGGTAAG
<i>FGFR3</i>	GAGGTGGCTGTGCGAAGA	GTCCCCTGAGGAGCTGGA
<i>FGFR3</i>	CGCCTTTCGAGCAGTACTCC	GCTAGGGACCCCTCACATTGT
<i>ERBB2</i>	GCTCTTCTACTCATATCCTCCTCTT	TCCTTCCTGTCTCCTAGCAG
<i>ERBB2</i>	GTGGTCTCCCATACCCTCTCA	GTCTAAGAGGCAGCCATAGGG
<i>ERBB2</i>	CAGCTGGTGACACAGCTTATG	CCTAGCCCCTTGTGGACATAG
<i>HRAS</i>	CGCCAGGCTCACCTCTATAGT	CAGGAGACCCTGTAGGAGGA
<i>KEAP1</i>	GCAGCCCGTTGGTGAACAT	TCATACCAAGCAGGCCTTTGG
<i>KEAP1</i>	CTGGTGCAACTCCACACAG	CCATCTCCATGGGCGAGAAG
<i>KEAP1</i>	ACCTCCGCCTTGCACCTC	GGTGGTGTGCTTATCTTCTGGAA
<i>KEAP1</i>	GTTTCATGACGTGGAGGACACA	CTCATCCAGCCCTGTCTTCAAG
<i>KEAP1</i>	CAGTGATGAGCACTCGTCCAT	CAACTTCGCTGAGCAGATTGG
<i>KEAP1</i>	GCCGCAGCTCGTTCATGAT	GGTGATGTACGCCTCCACT
<i>KEAP1</i>	GCATAGATGTGGCCATCGATGA	GTGGGCGGGCTGTTGTA
<i>KEAP1</i>	GGGTTGTAAGCCTCCAGGTA	ACTCCCCTGCAAGGAC
<i>KEAP1</i>	TCCTCGAAGATCTTGACCAGGTA	CATCAACTGGGTCAAGTACGACT
<i>KEAP1</i>	GTCGGGCGAGTTGTTCTT	GCTACTTCCGACAGTCGCT
<i>KEAP1</i>	GCTGATGAGGGTCACCAGTTG	CGGTCTGCTTGGTGAGG
<i>HRAS</i>	GGATGTCCTCAAAGACTTGGTGTT	CTGCAGGATTCCTACCGGAAG
<i>KEAP1</i>	GAAGAATACCCGGATCTCAGTGT	TGCCCCGTAACCGCATC
<i>KEAP1</i>	GACGTAGAACCGTCGCTGTT	GGAGTTCTTCAACCTGTCCCA
<i>KEAP1</i>	GCGGTTTGTCCCGTCAAAG	TGGCCATGTCCCCATTTTTCTTA
<i>KEAP1</i>	CTGTGGTTACCCAGCATGAG	AACGAGTGGCGAATGATCACA
<i>KEAP1</i>	CCGCTTCGGATGGTGTTCATT	TCCTCAATCGTCTCCTTTATGCC

Gen	Forward-Sequenz [5`-3`]	Reverse-Sequenz [5`-3`]
<i>KEAP1</i>	GCAGTCCACAAAAGATGGGCTA	GAGCGCTACGATGTGGAAAC
<i>KEAP1</i>	GCTACGAAAGTCCACGTCTCT	CTTCTCTGCATGGTGCCTTTA
<i>KEAP1</i>	CGATGTCATTTCGGGTCACCT	CAGCTGCATCTCTCTCTTTCTGT
<i>KEAP1</i>	CATTGGACTGTATTTTTGCCCAAGA	AGTGTTACGACCCAGATACAGACA
<i>KRAS</i>	AAAGAATGGTCTGCACCAGTAA	AGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAA
<i>KRAS</i>	CCAGCTCCAACCTACCACAAGT	CTGGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAACC TT
<i>KRAS</i>	TTCAATTTAAACCCACCTATAATGGTGA	ACAGCAGGTCAAGAGGAGTACA
<i>KRAS</i>	ATGTAAGTGGTCCCTCATTGCAC	TCCAGACTGTGTTTCTCCCTTCT
<i>MAP2K1</i>	GGAGTACTTCTTTGGGTTGACTTCT	TCAGTTCTCCCACCTTCTGCT
<i>MAP2K1</i>	CTTGAGGCCTTTTCTTACCCAGA	CAATTACCTGTTAATCAAGGCAAACCTCA
<i>NFE2L2</i>	CCGCGGTTCCCTAGCTC	ACACACGGTCCACAGCTC
<i>NFE2L2</i>	ATTGGGAGAAATTCACCTGTCTCTTC	TGGGAGTAAGTCGAGAAGTATTTGACT
<i>NFE2L2</i>	CTCTTTCCGTCGCTGACTGA	AAACATGAGCTCTCTCCTTCTTTTT
<i>NFE2L2</i>	GTGTTTCCTTAAACCTGCCATAACTTTC	GCCTTTTTTCGCTCAGTTACAACCTAGAT
<i>NFE2L2</i>	GCAGTCATCAAAGTACAAAGCATCTGA	ACATCAATTATTGAATATTTAGCTTGGCA ATGG
<i>NFE2L2</i>	GAGATTCATTGACGGGACTTACATAGA	CCACATTCCCAAATCAGATGCTTT
<i>NFE2L2</i>	CAACAGAAGTTTCAGGTGACTGAG	CCTGTTGGTGGAAGACTCATAAATCA
<i>NFE2L2</i>	AGCACCTCCAATCCTTCTTA	GTATGCAACAGGACATTGAGCAAG
<i>NFE2L2</i>	AGGAATGGATAATAGCTCCTCCCAA	CCCAGTCTTCATTGCTACTAATCAGG
<i>NFE2L2</i>	GGCTTCTGGACTTGGAAACCAT	CCTGAAGATAATGTGGGTAGGGAGTTTA
<i>NFE2L2</i>	TCTGGCTTCTTACTTTTGGGAACAA	TGACAAAAGCCTTCACCTACTGAAAAA
<i>NFE2L2</i>	GGTTTTCCGATGACCAGGACT	AGATAGTGCCCCTGGAAGTGT
<i>NFE2L2</i>	TGAGCAGCCACTTTATTCTTACCC	TCTCCATATCCCATTCCCTGTAGAAAAA
<i>NFE2L2</i>	CACACTGGGACTTGTGTTTAGTG	CCTCACCTGCTACTTTAAGCCAT
<i>NFE2L2</i>	TGTGTTGACTGTGGCATCTGAA	CTCAATGGAAAAAGAAGTAGGTAAGTGT
<i>NFE2L2</i>	GCATTTACATCACAGTAGGAGCTT	CAAACAAGAGATGGCAATGTTTTCC
<i>NFE2L2</i>	CTTCGAGATATAAGGTGCTGAGTTGT	CTCAGAATTGCAGAAAAAGAAAAGTGGAA
<i>NFE2L2</i>	CCTCAAAGCATTAAAGAAAATGTGGAC T	TGAAAATGACAAGCTGGTTGAGACTA
<i>NFE2L2</i>	TTGAAGTCAACAACAGGGAGGTTAAT	CACACCAGAGAAAGAATTGCCTGTA
<i>NFE2L2</i>	CTGGTGTTTTAGGACCATTCTGTTTG	TCAATGATTCTGACTCCGGCATT
<i>NFE2L2</i>	GCCATTTAGAAGTTCAGAGAGTGA	CAACCAGTTGACAGTGAACCTATTAAA
<i>NRAS</i>	CCACTGGGCCTCACCTCTAT	ACCCTGATTACTGGTTTCCAACAG
<i>TP53</i>	GATGGGTGAAAAGAGCAGTCAGA	GGGAAGCGAAAATTCCATGGG
<i>NRAS</i>	GGCAAATACACAGAGGAAGCCTT	ACACCCCAGGATTCTTACAGA
<i>TP53</i>	GGGCCTGCCCTTCCAAT	GCAGCCAGACTGCCTTCC
<i>TP53</i>	GGATACGGCCAGGCATTGAAG	TCATCTTCTGTCCCTTCCCAGA
<i>TP53</i>	CTCTGGCATTCTGGGAGCTT	ACTGCTCTTTTACCCATCTACAG
<i>TP53</i>	CGTAGCTGCCCTGGTAGGTTT	CTGAAGACCCAGGTCCAGATG
<i>TP53</i>	ACCACCACACTATGTCGAAAAGTG	AGGCCTCTGATTCTCACTGATT
<i>TP53</i>	GACCTAAGAGCAATCAGTGAGGAA	CATCTACAAGCAGTCACAGCAC
<i>TP53</i>	CGCCTCACAACCTCCGTCAT	CTCTGTCTCCTTCTTCTTCTTCTACA

Gen	Forward-Sequenz [5`-3`]	Reverse-Sequenz [5`-3`]
<i>TP53</i>	GCCACTGACAACCACCCTTAA	CGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAA
<i>TP53</i>	GGCTCCTGACCTGGAGTCTT	CATCTTGGGCCTGTGTTATCTCC
<i>TP53</i>	GGGATGTGATGAGAGGTGGAT	CCATCCTCACCATCATCACACTG
<i>TP53</i>	GCACCTCAAAGCTGTTCCGT	CAAGGGTGGTTGGGAGTAGATG
<i>TP53</i>	CGCTTCTGTCTGCTTGCTTA	TCCTATCCTGAGTAGTGGTAATCTACTG
<i>TP53</i>	GCATTTTGTAGTGTTAGACTGGAACT	CCTCAGATTCACTTTTATCACCTTTTCT
<i>TP53</i>	GCATCTGTATCAGGCAAAGTCATAGA	TAGCTAACTAACTTCAGAACACCAACTTA
<i>TP53</i>	CTGGAGTGAGCCCTGCT	TCCCCCTCCTCTGTTGCT
<i>TP53</i>	TCAGCTGCCTTTGACCATGAA	GAGGCCTTGGAACTCAAGGAT
<i>TP53</i>	GTGCTTCTGACGCACACCTA	GTTCAAGACAGAAGGGCCTGA
<i>TP53</i>	CAAGAAGTGGAGAATGTCAGTCTGAG	CAGACCCTCTCACTCATGTGATG
<i>PIK3CA</i>	CCTTCGGCTTTTTCAACCCTTT	AGGGACAACAGTTAAGCTTTATGGTT
<i>PIK3CA</i>	CGACCATCATCAGGTGAACTGT	CTTTATGGTTATTAATGTAGCCTCACGGA
<i>PIK3CA</i>	ACAACCATACATCTAATTCCTTAAAGTA GTTT	CGGAGGCATTCTAAAGTCACTATCATTC
<i>PIK3CA</i>	TTCTTCAAGATGAATCTTCTTACATTTTC GT	GGTTGCCTACTGGTTCAATTACTTTTTAA
<i>PIK3CA</i>	GCATGCCAGTGTGTGAATTTGAT	AGACATACATTGCTCTACTATGAGGTGA
<i>PIK3CA</i>	GTGATCTTCCAAATCTACAGAGTTCCC	AGTCCTGTACTTCTGGATCTTTAACCAT
<i>PIK3CA</i>	CTGTGGATCTTAGGGACCTCAAT	ACAGGTAGAAGACTGCACTATAGTAATG A
<i>PIK3CA</i>	CGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGA	AAACATGCTGAGATCAGCCAAATT
<i>PIK3CA</i>	TTCTGTAAATCATCTGTGAATCCAGAG	TGAGCTGTTCTTTGTCATTTTCCCTTAA
<i>PIK3CA</i>	AGAGTAACAGACTAGCTAGAGACAATG AA	GCACTTACCTGTGACTCCATAGAAA
<i>PIK3CA</i>	ATGTGTTACAAGGCTTATCTAGCTATTC	TGAAATACTCCAAAGCCTCTTGCTC
<i>PIK3CA</i>	TCGAAAGACCCTAGCCTTAGATAAAAC T	CCAGAGTGAGCTTTCATTTTCTCAGTTA
<i>PIK3CA</i>	TTTGTCTACGAAAGCCTCTCTAATTTT	GATTTATGAAGAGATTGGCATGCTGTC
<i>PTEN</i>	GCCATCTCTCTCCTCCTTTTTTCTT	GTGACAGAAAGGTAAAGAGGGAGCA
<i>PTEN</i>	TCCAAACATTATTGCTATGGGATTTCCCT	ATCTTTTTCTGTGGCTTAGAAATCTTTTC
<i>PTEN</i>	AAAGTATTCTTTTAGTTTGATTGCTGCA T	CCTGTATACGCCTTCAAGTCTTTCTG
<i>PTEN</i>	TGTTAATGGTGGCTTTTTGTTTGTGTTGT	TCTACCTCACTCTAACAAGCAGATAACT
<i>PTEN</i>	AACTTTTCTTTTAGTTGTGCTGAAAGAC ATT	TCACTCGATAATCTGGATGACTCATT
<i>PTEN</i>	GAAAGGGACGAACTGGTGTAAATGAT	TCTCAGATCCAGGAAGAGGAAAG
<i>PTEN</i>	TGCAACATTCTAAAGTTACCTACTTGT	TGGTCAAGATCTTCACAAAAGGGTTT
<i>PTEN</i>	TAACCCACCACAGCTAGAACTTATC	TGCCCCGATGTAATAAATATGCACAT
<i>PTEN</i>	CAGTCAGAGGCGCTATGTGTATTATTAT A	TGGAAGGATGAGAATTTCAAGCACTT
<i>PTEN</i>	TGGCTACGACCCAGTTACCAT	CCACTGGTCTATAATCCAGATGATTCTT
<i>PTEN</i>	CGACGGGAAGACAAGTTTCATGTA	CTGTCCTTATTTTGGATATTTCTCCCAA
<i>PTEN</i>	ACAGTTAAAGGCATTTCCCTGTGAA	GTAACGGCTGAGGGAAGTCAAA
<i>PTEN</i>	TGACTTTTTGCAAATGTTTAAACATAGGT G	AGGTTTCTCTGGTCTGCTGTA
<i>PTEN</i>	AAGAAATCGATAGCATTTCAGTATAG A	TGGAGAAAAGTATCGGTTGGCTTT

Gen	Forward-Sequenz [5`-3`]	Reverse-Sequenz [5`-3`]
<i>PTEN</i>	AGCGTGCAGATAATGACAAGGAATAT	CATACAAGTCAACAACCCCCACA
<i>PTEN</i>	ATTTTCTTTCTCTAGGTGAAGCTGTACTT C	ATCAGAGTCAGTGGTGTGAGAATATCTA
<i>PTEN</i>	AGAATGAACCTTTTGATGAAGATCAGC A	TGTTCTATAACTGGTAATCTGACACA
<i>PTEN</i>	TTACAGTGCTTAAAAATTAATATGTTCA TCTGC	ATTTGACGGCTCCTCTACTGTTTT
<i>RB</i>	CGTCATGCCGCCAAAA	CGGCTCTGCTCGCTCAC
<i>RB</i>	GCGCTCCTCCACAGCTC	TGCTCTGGGTCCTCTCA
<i>RB</i>	TCACAGTAGTGTATGTGCAAACCTATTG A	TGCAGTAAAATCAGGTTCTTCTGTTTCT
<i>RB</i>	TCATTTGGTAGGCTTGAGTTTGAAGA	TCCACAGATGAACTTTCTCCCAAG
<i>RB</i>	GTTCACAGGGAGGTTATATTCAAAGA A	CGTTTCTTTTATGGCAGAGGCTTATAT
<i>RB</i>	AATACAGTTTAAACATAGTATCCAGTGT GTGAA	CAACTGCTGCAATAAAGATACAGATTCC
<i>RB</i>	ATTGATACCAGTACCAAAGTTGATAATG CT	TCCCAGAATCTAATTGTGAACAATGACA
<i>RB</i>	GTCATAATGTTTTCTTTTTCAGGACATG TGA	AGCCTGCTATAATCGATCAAACCTAAC
<i>RB</i>	TCTACTGAAATAAATTCTGCATTGGTGC T	GGAATTTAGTCCAAAGGAATGCCAATT
<i>RB</i>	TGCGATTTTCTCTCATACAAAGATCTGA	TGGTTCTTTGAGCAACATGGGA
<i>RB</i>	CAGAACAGGAGTGCACGGATA	TTGTTAGGGAGAACTTACATCTAAATCTA CTTT
<i>RB</i>	AGTAGAATGTTACCAAGATTATTTTTGA CCTA	CCGTGCACTCCTGTTCTGA
<i>RB</i>	TCTTGGACTTGTAACATCTAATGGACTT C	TGGCTAGATTCTTCTTGGGCAAAA
<i>RB</i>	TGAGACAACAGAAGCATTATACTGCTTT	CTGGAGTGTGTGGAGGAATTACATT
<i>RB</i>	CACGAAAAAGTAACCTTGATGAAGAGG	AAGAAACGTGAACAAATCTGAAACACTA
<i>RB</i>	GGGACAGGGTTGTGTCGAAAT	GCAGCAGGGATATAGTATCTGACAGTA
<i>RB</i>	CGACATTGATTTCTGTTTTTACCTCCTA	ACAATGAATTCAAGTTACCTGTGATCCA
<i>RB</i>	CAGGAAGAAGAACGATTATCCATTCAA A	CGCACGCCAATAAAGACATATGAA
<i>RB</i>	CCTTTAGCAAACCTTCTGAATGACAACAT	CTCTCCCCGACCAAAGAA
<i>RB</i>	AGAAGGCAACTTGACAAGAGAAATGAT A	ATTTGTTAGCCATATGCACATGAATGAAT TT
<i>RB</i>	ACCTTTCTACTGTTTTCTTTGTCTGAT	GAATCCATGGGAAAGACAAATCTGTTC
<i>RB</i>	CATTTTTAGGAAGTACATCTCAGAATCT TGATT	GCCTTCTGCTTTGATAAACTTTTCGAT
<i>RB</i>	GAGAAGGACCAACTGATCACCTT	AATCTATTTGCAGTTTGAATGGTCAACA
<i>RB</i>	CTGGGAAAATTATGCTTACTAATGTGGT TT	GAGGAAGATTAAGAGGACAAGCAGATTC
<i>RB</i>	GCCAACTTGAAATGAAGACTTTTCCT	GAAAGAGAGGTAGATTTCAATGGCTTCT
<i>RB</i>	TGTGAACGCCTTCTGTCTGAG	AAGTAGGGAGGAGAGAAGGTGAAG
<i>RB</i>	ACAGTAAAAATGACTAATTTTTCTTATT CCCAC	GGAAAAGGGTCCAGATGATATGTTCTAA
<i>RB</i>	GAACAAAACCATGTAATAAAATTCTGA CTACTT	CCTACCTCCTGAACAGCATGAG
<i>RB</i>	CATGTATGGCATATGCAAAGTGAAGAA T	AGATCAAATGAATTACCTATGTTATGTTA TGGA

Gen	Forward-Sequenz [5`-3`]	Reverse-Sequenz [5`-3`]
<i>RB</i>	CTGTTCTTCCTCAGACATTCAAACG	CCTGGTGAAGCATACTGCAAAATAT
<i>RB</i>	TCTTCATGCAGAGACTGAAAACAA	GAATGTGAGGTATTGGTGACAAGGTA
<i>RB</i>	CTCACATTCCCTCGAAGCCCTTA	ACTACTTCCCTAAAGAGAAAACACACAC
<i>RB</i>	CAGAATCTTAGTATCAATTGGTGAATCA TTCG	TAAAATTCTATGCAATATGCCTGGATGA
<i>RB</i>	GTGGTTCTAGGGTAGAGGTAACCTT	AAGAAAATACTCACCCCGAATGATTCA
<i>RB</i>	GATGGTATGTAACAGCGACCGT	GCTACTGGAAAACATTCAAAACTGGTT
<i>RB</i>	AACTTGAGGTTGCTAACTATGAAACACT	CCTTCAGCACTTCTTTTGAGCAC
<i>RB</i>	CAGTAAACATCTCCAGGAGAGTC	AACAAACCTGCCAACTGAAGAAATTATA
<i>RB</i>	GTAAGTCATCGAAAGCATCATAGTTACT	TTCTGCCAGTTTCTGCTGAAATTTG
<i>RB</i>	CAACTTACCCAGTACCATCAATGCT	GACAATGAATCCAGAGGTGTACACA
<i>STK11</i>	AAATTTTGGAGAAGGGAAGTCGGAA	GGTGGATGAACGTGTCCATACC
<i>STK11</i>	GGGAAGGCTCTTACGGCAA	ACCCAGCAAGCCATACTTAC
<i>STK11</i>	GGAGGGCGAGCTGATGTC	GAGTCCAGCACCTCCTTAC
<i>STK11</i>	CAGGCCATCATCCTGACGTT	CCGGAAAGGATATATTTTCTGCTTCTCT
<i>STK11</i>	GCTGGTGGATGTGTTATACAACGA	CGTGTGCCAGTCTCCTTCAAG
<i>STK11</i>	AGGAAATGCTGGACAGCGT	TCAATGAATATCAGGACAAGCAGTGT
<i>STK11</i>	TCCCTCCAGAGCCCCTTTT	GCACACTGGGAAACGCTTCT
<i>STK11</i>	GTGCCTGGACTTCTGTGACTT	GTACTIONCAGGCCGTCATCAG
<i>STK11</i>	CCCGCAGGTACTTCTGTCA	CCCCTAGCACGTGCCTAC
<i>STK11</i>	CTCCCTGAGGGCTGCAC	GCCGACCAGATGTCCACCTT
<i>STK11</i>	GACACCTTCTCCGGCTTCA	GTGGCCAGAGAGGGTCT
<i>STK11</i>	CCTTTCTTCCCTCCCCTCGAA	AGAGGGATGAGGCTCCCA
<i>STK11</i>	GCTTCTCCTCAGGGATGCTT	TCTAGCGCCCGCTCAAC
<i>STK11</i>	CCCTTAGGAGCGTCCAGGTAT	CTCTGGCCGGTTCGFACT
<i>STK11</i>	TGGCGCAGCATGACTGT	CTGGCCGAGTCAGCAGAG
<i>STK11</i>	CCACTGCTTCTGGGCGTTT	GCAGGTCCTCCAAGTACGG
<i>STK11</i>	CCAGGTCCCTGTGGCTCT	CGCCTCTGTGCCGTTCA
<i>STK11</i>	CAAGATCCGCCGGCTGT	TGACTAGCGCGGGCTATG
<i>STK11</i>	CCCCAAGGCCGTGTGTA	CAGCCTCACTGCTGCTTG
<i>TSC1</i>	GGAGTCCAGCATGGCAAGAAG	GGTAGTGGCCCAATGAAGAA
<i>TSC1</i>	GTGGCTCTAAAGTCAATCTCTTTCT	AGAATGGCCAACAAGCAAATG
<i>TSC1</i>	TCAGCCATTACCTTGTGATGTGG	AGTATCATCCATTGCCCTTTTCTTGATT
<i>TSC1</i>	CTGGGAACAATGTCATCAGTGG	ATCCTGACCACCTTGCAAGAG
<i>TSC1</i>	TTAGTAAAGAAGGCAAAAGAGGTGCT	GACTGCCCTTGTTCTTTTACATTTTCA
<i>TSC1</i>	AGCTTCCTTGCTTTAAGTTGCCT	CATCTTGGAAGCATAAGCTCTCTCA
<i>TSC1</i>	CAGCTATAAAAAGTCTACATGTCCATTCC	GACATTTTGGCCGTCTGTCA
<i>TSC1</i>	TGGTTTCTTCAGGCACCATGA	CGTTTCTGTTTGACCTTTTCTCC
<i>TSC1</i>	ACTTCTTCAAAGTCTCCAGGTTTTCTT	CTCTTCTCAACGGGTTCCTTTTCTA
<i>TSC1</i>	TCAAATTTCCCTGTCTGCCGTTA	TCCTTTTTGCGTTCTCATTACAGTATGA
<i>TSC1</i>	GAGTGCTTCCAAGTGGACTGA	ACTGGATCCAAGGACCATGAAC
<i>TSC1</i>	CTAGTTTCTATACCTTCGAGGGTCCA	GTTCCACAAACATTGAGCCCTTTATAAT
<i>TSC1</i>	GCTGAGATTTGGTGAGACACAGA	GTTTGCATTTCTTGACTTTCATTGCATT

Gen	Forward-Sequenz [5`-3`]	Reverse-Sequenz [5`-3`]
<i>TSC1</i>	TCCAGAGACAAAGTTGCAAAACAGATA A	CAGAAGCCTCATATGAAGATGGCTAT
<i>TSC1</i>	GAGAGCAGGCACACTAGTTGA	CCCCTGTGTTCTTCTCTTCCA
<i>TSC1</i>	AAGCCCCAGGGATTTGCAATA	CACACCCTTACAGTAAAGTCTTTGGT
<i>TSC1</i>	CCAACCTAAGACATACATACCAGTTGT	CCACTGCTGATGTACTTTATTAACCTCC
<i>TSC1</i>	CAGACGAGCTGGATCGCA	GTTCATATATGTTCTGCCCTTGTCTCT
<i>TSC1</i>	ATAACCCAATTAGAAGAGGCAAGCA	ACATGTGCAACATTTTCGTCTTGT
<i>TSC1</i>	GGTCAGGTTTTATCAACTCATAGCAATC	TGACTTCAGTTGTCTTTGTTTCTCTTCA
<i>TSC1</i>	GGTCTCCGCTGAGAACCTG	CCATTTCTTTTGTTCCTCTCTTCT
<i>TSC1</i>	GTCTATGGGAGTAAAGGCTTGCT	CCCTTTTACCGAGACAGTCTCC
<i>TSC1</i>	ATGGACCATTTAACACAGAAGAGAGTG	AGGAAGACTGAGGAGCTGTTAAAGA
<i>TSC1</i>	TCTTCCTCTGTGTTTCCTTTTGCTT	TCACTCCCAGTCCTTGTAATAATTCC
<i>TSC1</i>	CCCCTCTCGTCGGAGGT	TTGGGCCTGACACACCAA
<i>TSC1</i>	GGAACCATGTGGGCTGGATT	GCTGCAAATAAAAGTCCAGATACGTTTT
<i>TSC1</i>	GCTGCCTCTTAAAACGCTCATAGA	CATCTGTAAAAGGCATTTCTGCCA
<i>TSC1</i>	CGGCTGCTGTGCTTTATAAGCTA	GGTGATCAAAGCAGCAGCTC
<i>TSC1</i>	ATGGCAGCATTATGTTCTCTCA	TTGCTTTTACTGCACAACCAGTTAC
<i>TSC1</i>	TGCCTGGTGCTGCAGTTTATA	TGGAAGGTTAGTCTGCAGAAAGAAC
<i>TSC1</i>	TCCTGGAGCTGATTGTATCTAGCTT	GTTGGAAGACAGCTAAAATGATGACATT
<i>TSC1</i>	GCAGATTCAGGTCTGCCTCAT	CTCAAACCTCATGTCCACGTCTCT
<i>TSC1</i>	CCCTGGCATAACCTTTGTGGTA	TCGGATTTTCACTTTGCTCATGTTTTT
<i>TSC1</i>	ACTGCCGCTCCGTCTTTTAG	AACTGCAGAACAGCACTCAGA
<i>TSC1</i>	GCTGGAGAACATGGCTTCTGTT	CCTTCTCAGTCCTTCTTACATTGTCTTT
<i>TSC1</i>	GCCTGGAGTTTGACATCCTCTAGATAT	CGCCTATCGAAAGAGCTAGAAAAA
<i>TSC1</i>	CTGCAGCTGTCCTCTGAAAGAT	AGACCACCTTCTTTTGGAACAGA
<i>TSC1</i>	CTGCTTCTGCTTTTTCTTCTTCAAGT	CTATATTCTGGCTGGTCTGTATCTTTCA
<i>TSC1</i>	TGCAAGTTAACTACTGATTGACCATCAT	AAAGACAGAACTGGGCAAAGACTT
<i>TSC1</i>	CGAAATAACTCTCGAGCCTTCATACC	GCGAGCTTTCTACCCAGAGA
<i>TSC1</i>	TCTTGGTCTCACCGTTGTGG	AGTCCAATCACCGCTCCTTTTTT
<i>TSC1</i>	GGGAATCTTGGCTTCCACACC	GGGCTCACTTCCCAGTTCAAAA
<i>TSC1</i>	CCCACCGACTGCTGAATGG	GGCACAATGAAGAGGCATCTG
<i>TSC1</i>	CAGCCTGTCTAGTCAGCAGTAA	GGAGAAAGATGGCCTCCTGAAAAA
<i>TSC2</i>	GCAGAGGTGTTGCTCAGATGT	TCCCAACAGAATCTTAACTTCTCCTTC
<i>TSC2</i>	CCAACAAGCAAAGATTCAAGGCTT	CAAAGACACAGGTAGCTCACTCA
<i>TSC2</i>	TGAGCACTGGCCCTTTTT	GAATAGTCTACGTGCCTCTCTTAGTA
<i>TSC2</i>	GTCTTGGAGAGCACATCCTCA	GTCGCCCTGGGCCTTAC
<i>TSC2</i>	CCCTCTTCTTTAAGGTCATCAAGGA	TGATCGTCAAGGCCAGAGAAAC
<i>TSC2</i>	CACTTCAGGGACTTCTTGGCA	GAAGGTCTTCGTTGGAAGGGTAA
<i>TSC2</i>	TTGTCCTCGGAATTCCTTCTGG	AGGACCATTATCAGAACAGGATCTCAA
<i>TSC2</i>	GTGACGGGTTTGGACACACT	GAATTTGACCAAGTTCACCAGCA
<i>TSC2</i>	GTGTTATTGACGTCATAGAGTGACTAGA	GCACTGACCTCTATGTCCACA
<i>TSC2</i>	CCGTCTCCCTCTCCACCA	CTTCCAGAGCAGTTTCAGAAACC
<i>TSC2</i>	GCCCCTGACACGCATTGT	GCAAGGGACACTGGAGCTG

Gen	Forward-Sequenz [5`-3`]	Reverse-Sequenz [5`-3`]
<i>TSC2</i>	GCTCACATTCCGTCTCTCTGG	AGAAACCGCCTTACCTGGTAAAA
<i>TSC2</i>	CCGACATCTGTGTTGCCATCA	CTGGAAAGGCCTAGAAATGCCA
<i>TSC2</i>	CGTGGGACATTCTGCTGAACAT	CCAAGGTACCATCTTCTGAGTGG
<i>TSC2</i>	GTGCTACTCTCGGTCCCAA	GATGGACAGGACGATCTCATAGGA
<i>TSC2</i>	CATGTCCGAACGAGGTGGT	GCTGAAGGAGCCGTTTCGAT
<i>TSC2</i>	CCACGGGTCTCAGGAGAGATA	CTCAGAAAGCTGCACTTCACC
<i>TSC2</i>	GTGGAAGTCAGCCTGTGTCAT	GCACATCTCTCCACCAGTTCAAAG
<i>TSC2</i>	GGGCAACACCGGCTCTT	GTGCCAGGCAAGGCTACA
<i>TSC2</i>	AGCTCTGTGCCCTGTGTG	AGCACGTCCAGCACCTT
<i>TSC2</i>	CTCCCACATCCCCGAGGATA	CGGGTACAACGGCTCTCA
<i>TSC2</i>	CGGTTCCCTGAGGAATTGGAAGT	CTTTCGGACCTGGTGGTCTT
<i>TSC2</i>	GTGTGTAAGTCCTGGCCTTCTC	CAGAGGCCTCGTGCAGAA
<i>TSC2</i>	GGACAAGGGTGTGTCTTAGG	CTGTGCTTGTAGTGGAGCTGA
<i>TSC2</i>	GAGATGCTGGTCAGCCACAT	TCTGCAGCTTCCAGGAACC
<i>TSC2</i>	CTTTCACCATCCTCTTCCTGACA	GTAGTCGCAGACGCAGTAGG
<i>TSC2</i>	TGGAGTCGTGCGGTTTCAG	ACATCCCTCAGACATGCAAACAG
<i>TSC2</i>	CGTCCTGCTGCAGTGCTT	AGGCTCAGCTCTGAGGGA
<i>TSC2</i>	GCTGTTTGCATGTCTGAGGGAT	GGTCTTCTTCTCAGAGCCTCTCT
<i>TSC2</i>	GCTTCTGCAGGGAGCCA	GCCCCACTCACCTGCTT
<i>TSC2</i>	TGCGCTATAAAGTGCTCATCTTACTT	AGAGGCTCGCAGTCTTTTGG
<i>TSC2</i>	CTAGCTTCCGCCTCTGTCT	GCTGGTCCACACTGCAAGG
<i>TSC2</i>	GGTCCAGTGCTGACAGCATT	GGCAGAAACTCGTTTATGAGAAAAATGT
<i>TSC2</i>	GGAGAGGTTTCATGCCTGGATT	GTTTTGTCCAGGTAGTTATGGTAAGAGAT
<i>TSC2</i>	CGTGGAGATGCCTGACATCAT	GTTACACAGCCCGAACCTCT
<i>TSC2</i>	GGCCTGAGGTGTCCTGTCT	CAGGCAGCGCCTTGATG
<i>TSC2</i>	GCTGCCGCACCTCTACAG	TTTCTGCCGCAAGGCCTA
<i>TSC2</i>	CCGTGGCCTTCTCTCCTCT	GCTCCGCGGCAAAGTTC
<i>TSC2</i>	GTTCCCTGCTGCCAGGAT	CCTTCACCGGCCCTGAG
<i>TSC2</i>	CTCACTGTCTGGGTGTGCTC	GCCGTACCTCTTGGGTCTCT
<i>TSC2</i>	GCCCGGAGTACTAGTCTCAAC	GACCCATTTCCACTCACTGACTT
<i>TSC2</i>	GGCTCCTTCCTACCCGATA	CGCTACCTGCGGACCAC
<i>TSC2</i>	GCAGCATCAGTGTGTCTGAACAT	GCAGACGATGAGGTGCATGCAA
<i>TSC2</i>	GGTCACGGCCTCTCCCT	AGCCGTGAAGTTGGAGAAGAC
<i>TSC2</i>	GTCTGGACATGATGGCTCGATAC	CTAGAAGACAGGGAGCGTGAAA
<i>TSC2</i>	TGTGGGCGAGTTCCTCCTA	AGGAAAGGAAGGTGCAGTCAC
<i>TSC2</i>	CACCCTGTGCGTGGGATT	CCTGTGTGGAGGTGGCT
<i>TSC2</i>	CGAAACCTGAGAAGGCCTCA	GTGGGTGACTGGCAGAAAGAT
<i>TSC2</i>	CCAGTCTCTGCCCTCTTCTT	GTCTTCTCCTGCACAGGAACC
<i>TSC2</i>	CGGGACACAGCCCTGTA	GCCACATTGCCGTCACC
<i>TSC2</i>	CATCGTGGTCCCTGAGGATTGT	GGCTGAGCGGGTTCTCC
<i>TSC2</i>	GAACACCAGCTGGCTGATGA	GGCACCGACAGTGACTTG
<i>TSC2</i>	CCTCCTCCTGCTGACGTG	ACAGCACCTATGAGGCAGAGT
<i>TSC2</i>	AGCCCCGTCTGTGTCCT	CAGGCTCTGAGCCCACT

Gen	Forward-Sequenz [5`-3`]	Reverse-Sequenz [5`-3`]
TSC2	CCCTGGGATGGAGGACAGAT	GGAGCGACTTCTCCTCCTG
TSC2	CCCGGTCACAGTCAGGGA	TCTTGCCCCTGCGTGATG
TSC2	TCTGTGGACCTCTCCTTCCA	AGCACTTTCCCCGTCCAG
TSC2	GTCCTTTCTAGTCGTCCTCAGTCT	AGAGGAGCTGGACTTGCTCA
TSC2	CGAGGTTACACCATCTCCGACT	CCGCAGGAGAGGTGTCA
TSC2	CCCTTCTTTGGCGACGAGT	CTGCCACAGGGAGCTTAGG
TSC2	GATGGCCAGGCTCTGTGTT	GCAGCAGGATTGGCTTGTTT
TSC2	CTCAGGCAGGGCTCTGT	GCCCTGTCCAGGCACCTA
TSC2	CTTGTCTGCCTCAGGGATCAG	CGTGTACCTGTAGGAGCCAT
TSC2	TCGCCATCCTGTCCAATGAG	CCTCACACACACGTCCAG
TSC2	CCAGCCGGACAAGGTGTA	GGTAGCAGGACTGGATGGGA
TSC2	GAGGGCCTCAGCACTGG	CTCACCGGAGTCATTGTAGACA
TSC2	GGCAACGACTTTGTGTCCAT	CTCCTCGTGACCGAAGCTC
TSC2	CATGGAGCTGACAGGTGTCTA	CAGGTTGCACTCGTAGTCCAG
TSC2	TGTCCACGTGATCGTCACC	GCTCTTGGCGCCCACT
TSC2	GCAGTGTGGCGCCAAGA	CCAGCTCACGCCTGGAC
TSC2	CCCAGGTGCCACCTGAT	CGCTGAGGGAGCCCCATA
TSC2	CCCTCCGTCCCATAGCAA	TGACAGGCAATACCGTCCAAG
TSC2	CCACGCCTCCCAGACTTA	GCTCGGCTGGAGTCTGTG

Tabelle 33: aktive, offene klinische Studien laut der Datenbank *ClinicalTrials.gov* (Stand Dezember 2014)

No.	Entity	HDACi	Phase	clinicalTrials.gov Identifier
1	Advanced Hematologic Malignancies	4SC-202	I	NCT01344707
2	Acute Myeloid Leukemia	AR-42 (+ decitabine)	I	NCT01798901
3	Peripheral T-cell Lymphoma	belinostat	I	NCT01839097
4	Solid Tumors and Lymphomas	belinostat	I	NCT01273155
5	Ovarian Epithelial Cancer, Primary Peritoneal Cancer, Fallopian Tube Cancer or Ovarian Low Malignant Potential Tumors	belinostat	II	NCT00301756
6	Advanced Cancer	belinostat	I	NCT01583777
7	Acute Leukemia or Myelodysplastic Syndrome	belinostat (+ bortezomib)	I	NCT01075425
8	Non Small Cell Lung Cancer	belinostat (+ paclitaxel + carboplatin)	I/II	NCT01310244
9	Solid Tumors	belinostat (+ isotretinoin)	I	NCT00334789
10	Solid Tumors or Hematological Malignancies	belinostat (+ warfarin)	I	NCT01317927
11	Non-Hodgkin's Lymphoma	belinostat (+ carfilzomib)	I	NCT02142530

No.	Entity	HDACi	Phase	clinicalTrials.gov Identifier
12	Relapsed Aggressive B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma	belinostat (+ yttrium Y 90 ybritumomab tiuxetan)	II	NCT01686165
13	Small Cell Lung Cancer and Advanced Cancer	belinostat (+ cisplatin + etoposide)	I	NCT00926640
14	Thymic Malignancies	belinostat (+ cisplatin + doxorubicin + cyclophosphamide)	I/II	NCT01100944
15	Lymphoma or Multiple Myeloma	CUDC-907	I	NCT01742988
16	Solid Tumors	CUDC-907	I	NCT02307240
17	Advanced Cancer	CXD101	I	NCT01977638
18	Cutaneous Manifestations of Scleroderma	divalproex sodium	I/II	NCT02166229
19	Breast Cancer or Non-Small Cell Lung Cancer	entinostat	I	NCT01594398
20	Hodgkin's Lymphoma	entinostat	II	NCT00866333
21	Acute Myeloid Leukemia	entinostat (+ azacytidine)	II	NCT01305499
22	Brest Cancer	entinostat (+ exemestane)	III	NCT02115282
23	Metastatic Kidney Cancer	entinostat (+ aldesleukin)	I/II	NCT01038778
24	Stage IA-III A Non-Small Lung Cancer Undergoing Surgery	entinostat (+ azacytidine)	-	NCT01886573
25	Locally Recurrent or Distant Relapsed Metastatic Breast Cancer	entinostat (+ lapatinib ditosylate and trastuzumab)	I	NCT01434303
26	Advanced Non-Small Cell Lung Cancer	entinostat (+ azacytidine)	II	NCT01935947
27	Acute Myeloid Leukemia (AML), Myelodysplastic Syndromes, Chronic Myelomonocytic Leukemia	entinostat (+ azacytidine)	I	NCT00101179
28	Myelodysplastic Syndromes, Chronic Myelomonocytic Leukemia, or Acute Myeloid Leukemia	entinostat (+ azacytidine)	II	NCT00313586
29	Breast Cancer	entinostat (+ azacytidine)	II	NCT01349959
30	Demetia	FRM-0334	II	NCT02149160
31	Chronic Myeloproliferative Neoplasms	givinostat	II	NCT01761968
32	Stage Ib-IVa Cutaneous T-cell Lymphoma	JNJ-26481585	II	NCT01486277

No.	Entity	HDACi	Phase	clinicalTrials.gov Identifier
33	Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Follicular Lymphoma	mocetinostat	I/II	NCT02282358
34	Urothelial Carcinoma	mocetinostat	II	NCT02236195
35	Myelodysplastic Syndrome	mocetinostat (+ azacytidine)	I	NCT02018926
36	Myelofibrosis	panobinostat	I/II	NCT01298934
37	Sickle Cell Disease	panobinostat	I	NCT01245179
38	Refractory Hematologic Malignancies	panobinostat	I	NCT01321346
39	Hodgkin or Non-Hodgkin's Lymphoma	panobinostat	I	NCT01032148
40	Myelofibrosis	panobinostat	I/II	NCT01298934
41	Non-Hodgkin Lymphoma	panobinostat	II	NCT01261247
42	Diffuse Large B-Cell Lymphoma	panobinostat	II	NCT00978432
43	Multiple Myeloma	panobinostat	II	NCT01651039
44	Myelodysplastic Syndrome or Acute Myeloid Leukemia	panobinostat	I/II	NCT01451268
45	Neuroendocrine Tumors	panobinostat	II	NCT00985946
46	Von Hippel-Lindau Disease	panobinostat	II	NCT01013597
47	Haematologic Diseases	panobinostat	II	NCT01802879
48	Haematological Malignancy	panobinostat	II	NCT01658241
49	Solid Tumors	panobinostat	I	NCT01336842
50	Melanoma	panobinostat	I	NCT01065467
51	Breast Cancer	panobinostat	II	NCT00777049
52	Waldenstrom's Macroglobulinemia	panobinostat	II	NCT00936611
53	Lymphoid Malignancies	panobinostat	I/II	NCT02091063
54	Multiple Myeloma	panobinostat (+ carfilzomib)	I/II	NCT01496118
55	Multiple Myeloma	panobinostat (+ lenalidomide + bortezomib + dex)	I	NCT01965353
56	Non-Small Cell Lung Cancer	panobinostat (+ pemetrexed)	I/II	NCT00907179
57	Melanoma	Panobinostat (+ decitabine + temozolomide)	I/II	NCT00925132
58	Myelodysplastic Syndromes or Acute Myeloid Leukemia	panobinostat (+ decitabine)	I/II	NCT00691938
59	Hodgkin's Lymphoma	panobinostat (+ IGEV)	I	NCT01884428
60	Multiple Myeloma	panobinostat (+ ixazomib + dexamethasone)	I	NCT02057640

No.	Entity	HDACi	Phase	clinicalTrials.gov Identifier
61	Multiple Myeloma	panobinostat (+ lenalidomide + dexamethasone)	I	NCT00532675
62	Multiple Myeloma	panobinostat (+ carfilzomib)	I	NCT01549431
63	Multiple Myeloma	panobinostat (+ carfilzomib)	I	NCT01301807
64	Solid Tumors	panobinostat (+ epirubicin)	I	NCT00878904
65	Acute Myeloblastic Leukaemia	panobinostat (+ idarubicin + cytarabine)	I/II	NCT00840346
66	Hodgkin Lymphoma	panobinostat (+ ifosfamide + carboplatin + etoposide)	I	NCT01169636
67	Multiple Myeloma	panobinostat (+ rocilinostat)	I/II	NCT01323751
68	Myelofibrosis	panobinostat (+ ruxolitinib)	I	NCT01433445
69	Kidney, Soft Tissue or Lung Cancers	panobinostat (+ sorafenib)	I	NCT01005797
70	Multiple Myeloma	panobinostat (+ lenalidomide + bortezomib + examethasone)	I/II	NCT01440582
71	Aerodigestive Tract Cancers	panobinostat (+ erlotinib)	I	NCT00738751
72	Brain tumors	panobinostat (+ stereotactic radiation)	I	NCT01324635
73	Glioma	panobinostat (+ bevacizumab)	I/II	NCT00859222
74	Prostate Cancer	panobinostat (+ bicalutamide)	I/II	NCT00878436
75	Myelodysplastic Syndrome	panobinostat (+ azacitidine)	II	NCT01873703
76	Multiple Myeloma	panobinostat (+ bortezomib + dexamethasone)	III	NCT01023308
77	Multiple Myeloma, Non-Hodgkin Lymphoma, or Hodgkin Lymphoma	panobinostat (+ everolimus)	I/II	NCT00918333
78	Melanoma	panobinostat (+ ipilimumab)	I	NCT02032810
79	Diffuse Large B Cell Lymphoma	panobinostat (+ rituximab)	II	NCT01238692

No.	Entity	HDACi	Phase	clinicalTrials.gov Identifier
80	Patients With Acute Graft Versus Host Disease	panobinostat (+ corticosteroids)	I/II	NCT01111526
81	Myelodysplastic Syndromes, Chronic Myelomonocytic Leukemia or Acute Myeloid Leukemia	panobinostat (+ azacitidine)	I/II	NCT00946647
82	Hodgkin Lymphoma	panobinostat (+ lenalidomide)	II	NCT01460940
83	Multiple Myeloma	panobinostat (+ velcade, thalidomide, dexamethasone)	I/II	NCT02145715
84	Acute Myeloid Leukemia or Advanced Myelodysplastic Syndrome	panobinostat (+ cytarabine + daunorubicin)	I	NCT01463046
85	Renal Cell Cancer	panobinostat (+ everolimus)	I/II	NCT01582009
86	Diffuse Large B Cell Lymphoma	panobinostat (+ rituximab)	II	NCT01282476
87	Myelofibrosis	panobinostat (+ ruxolitinib)	I/II	NCT01693601
88	Myelofibrosis	panobinostat (+ ruxolitinib)	I/II	NCT01693601
89	Prostate Cancer	pracinostat	II	NCT01075308
90	Myelodysplastic Syndrome	pracinostat (+ hypomethylating agent)	II	NCT01993641
91	Untreated Myelodysplastic Syndrome	pracinostat (+ azacytidine)	II	NCT01873703
92	Multiple Myeloma	rocilinstat (+ lenalidomide + dexamethasone)	I/II	NCT01583283
93	Lymphoid Malignancies	romidepsin (+ pralatrexate)	I/II	NCT01947140
94	Advanced Cutaneous T Cell Lymphoma	romidepsin (+ poly ICLC and radiation)	I	NCT02061449
95	Suppressed HIV-1 Infected Adults on cART	romidepsin (+ Vacc-4x + rhuGM-CSF)	I/II	NCT02092116
96	Cutaneous T-cell Lymphoma	romidepsin (+ doxil)	I	NCT01902225
97	Relapsed/Refractory Hodgkin Lymphoma, Mature T-cell Lymphoma and Multiple Myeloma	romidepsin (+ lenalidomide)	I/II	NCT01742793
98	Lymphoid Malignancies	romidepsin (+ azacytidine)	I/II	NCT01998035
99	HIV+ Patients	romidepsin (+ vacc-4x)	I/II	NCT02092116

No.	Entity	HDACi	Phase	clinicalTrials.gov Identifier
100	High Grade Sarcomas	valproate	I	NCT01010958
101	Breast Cancer	valproic acid	I	NCT01007695
102	Spinal Muscular Atrophy	valproic acid (+ levocarnitine)	III	NCT01671384
103	Myelodysplastic Syndromes	valproic acid (+ azacitidine)	II	NCT01342692
104	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	valproic acid (+ chemoradiation)	II	NCT01695122
105	Acute Myeloid Leukemia	valproic acid (+ decitabine + all-trans retinoic acid)	II	NCT00867672
106	Advanced Sarcoma	valproic acid (+ bevacizumab and chemotherapy)	I/II	NCT01106872
107	Acute Myeloid Lymphoma	valproic acid (+ cytarabine + A TRA)	I/II	NCT00995332
108	Brain Tumors	valproic acid (+ temozolomide + radiation)	II	NCT00302159
109	Breast Cancer	vorinostat	-	NCT01153672
110	Advanced Staged Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma	vorinostat	I	NCT01064921
111	Breast Cancer	vorinostat	-	NCT01720602
112	Sickle Cell Disease	vorinostat	II	NCT01000155
113	Von Hippel-Lindau Disease	vorinostat	I	NCT02108002
114	Breast Cancer	vorinostat	I	NCT00788112
115	Children	vorinostat	I/II	NCT01422499
116	HIV+ Patients	vorinostat	I/II	NCT01319383
117	Breast Cancer	vorinostat	I/II	NCT00416130
118	Non-Hodgkin's Lymphoma	vorinostat	II	NCT00253630
119	Follicular Lymphoma or other indolent B-cell Non-Hodgkin's Lymphoma or Mantle Cell Lymphoma	vorinostat	II	NCT00875056
120	Adenoid Cystic Carcinoma	vorinostat	II	NCT01175980
121	Neuroblastoma	vorinostat	I	NCT01019850
122	Cutaneous T Cell Lymphoma	vorinostat	III	NCT01728805
123	Kidney Cancer	vorinostat	II	NCT00278395
124	Neuroblastoma	vorinostat	I	NCT01208454
125	Melanoma	vorinostat	II	NCT01587352
126	Niemann-Pick Disease	vorinostat	I/II	NCT02124083
127	Diffuse Intrinsic Pontine Glioma	vorinostat (+ radiation)	I/II	NCT01189266
128	Glioblastoma	vorinostat (+ bevacizumab)	I/II	NCT01266031

No.	Entity	HDACi	Phase	clinicalTrials.gov Identifier
129	Breast Cancer	vorinostat (+ ixabepilone)	I	NCT01084057
130	Glioma	vorinostat (+ temozolomide)	I	NCT00268385
131	Multiple Myeloma	vorinostat (+ bortezomib + doxorubicin hydrochloride liposome)	I	NCT00744354
132	Mantle Cell Lymphoma, Chronic Lymphocytic Leukemia, or Relapsed B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma	vorinostat (+ cladribine + rituximab)	I/II	NCT00764517
133	Mantle Cell Lymphoma or Recurrent and/or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma	vorinostat (+ bortezomib)	II	NCT00703664
134	Head and Neck Cancer	vorinostat (+ capecitabine)	II	NCT01267240
135	Unrelated Stem Cell Transplant	vorinostat (+ tacrolimus + methotrexate)	II	NCT01790568
136	Glioblastoma Multiforme	vorinostat (+ temozolomide + radiation)	I/II	NCT00731731
137	Acute Myeloid Leukemia	vorinostat (+ temozolomide)	II	NCT01550224
138	Neuroblastoma	vorinostat (+ 131I-MIBG)	II	NCT02035137
139	Refractory Lymphoma	vorinostat (+ azacitidine + gemcitabine + busulfan + melphalan)	I/II	NCT01983969
140	Myelodysplastic Syndromes or Chronic Myelomonocytic Leukemia	vorinostat (+ azacitidine)	II/III	NCT01522976
141	Nasopharyngeal Cancer or Nasal Natural Killer T-Cell Lymphoma	vorinostat (+ azacitidine)	I	NCT00336063
142	Acute Myeloid Leukaemia or High Risk Myelodysplastic Syndromes	vorinostat (+ azacitidine)	II	NCT01617226
143	Glioma	vorinostat (+ bevacizumab)	II	NCT01738646
144	Pancreatic Cancer	vorinostat (+ capecitabine + radiation)	I	NCT00983268
145	Small Cell Lung Cancer	vorinostat (+ carboplatin + etoposide)	I/II	NCT00702962

No.	Entity	HDACi	Phase	clinicalTrials.gov Identifier
146	Acute Myeloid Leukemia	vorinostat (+ chemotherapy + decitabine)	I/II	NCT01483690
147	Acute Myeloid Leukemia	vorinostat (+ cytarabine + daunorubicin hydrochloride or idarubicin + cytarabine)	III	NCT01802333
148	Chronic Lymphocytic Leukemia or Small Lymphocytic	vorinostat (+ fludarabine phosphate + cyclophosphamide + rituximab)		NCT00918723
149	Multiple Myeloma	vorinostat (+ lenalidomide + bortezomib + dexamethasone)	I	NCT01038388
150	p53 Mutant Malignancies	vorinostat (+ MLN9708)	I	NCT02042989
151	Breast Cancer	vorinostat (+ paclitaxel + bevacizumab)	I/II	NCT00368875
152	Patients with Brain Metastasis	vorinostat (+ radiation)	I	NCT00838929
153	Glioblastoma	vorinostat (+ radiation)	II	NCT02137759
154	HIV-Related Diffuse Large B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma or Other Aggressive B-Cell Lymphomas	vorinostat (+ rituximab)	I/II	NCT01193842
155	Non-Hodgkin Lymphoma	vorinostat (+ rituximab)	II	NCT00720876
156	Liver Cancer	vorinostat (+ sorafenib)	I	NCT01075113
157	Glioma	vorinostat (+ temozolomide or bevacizumab)	II/III	NCT01236560
158	Prostate Cancer	vorinostat (+ androgen deprivation therapy)	II	NCT00589472
159	Multiple Myeloma	vorinostat (+ bortezomib)	II	NCT00839956
160	Multiple Myeloma	vorinostat (+ carfilzomib + lenalidomide + dexamethasone)	I/II	NCT01297764
161	Myelodysplastic Syndromes	vorinostat (+ decitabine)	II	NCT01593670

No.	Entity	HDACi	Phase	clinicalTrials.gov Identifier
162	Embryonal Tumors of the Central Nervous System	vorinostat (+ isotretinoin + chemotherapy)	-	NCT00867178
163	Solid Tumors with HIV+ Infection	vorinostat (+ paclitaxel + carboplatin)	I	NCT01249443
164	Non-Small Cell Lung Cancer	vorinostat (+ radiosurgery)	I	NCT00946673
165	Diffuse Large B-Cell Lymphoma	vorinostat (+ rituximab + chemotherapy)	I/II	NCT00972478
166	Acute Myeloid Leukemia	vorinostat (+ sorafenib +bortezomib)	I/II	NCT01534260
167	Advanced Malignancies	vorinostat (+ pazopanib)	I	NCT01339871
168	Acute Myelogenous Leukemia or Myelodysplastic Syndrome	vorinostat (+ azacitidine)	II	NCT00948064
169	Myelodysplastic Syndromes or Acute Myeloid Leukemia	vorinostat (+ azacitidine)	I/II	NCT00392353
170	Non-Hodgkin Lymphoma	vorinostat (+ bortezomib)	II	NCT00992446
171	Non-Small Cell Lung Cancer	vorinostat (+ carboplatin + paclitaxel + bevacizumab)	I	NCT00702572
172	Multiple Myeloma	vorinostat (+ lenalinomide + dexamethasone)	I/II	NCT01502085
173	Recurrent Lymphoid Malignancies	vorinostat (+ niacinamide + etoposide)	I	NCT00691210
174	Solid Tumors or Lymphoma	vorinostat (+ ridaforolimus)	I	NCT01169532
175	Advanced Solid Tumors	vorinostat (+ carboplatin or paclitaxel)	-	NCT01281176
176	Non Small Cell Lung Cancer	vorinostat (+ chemoradiation)	I	NCT01059552
177	Acute Leukemia	vorinostat (+ fludarabine + clofarabine + busulfan)	I	NCT02083250
178	Lymphoid Malignancies	vorinostat (+ gemcitabine + busulfan + melphalan)	I	NCT01421173

No.	Entity	HDACi	Phase	clinicalTrials.gov Identifier
179	Glioblastoma Multiforme	vorinostat (+ isotretinoin + temozolomide)	I/II	NCT00555399
180	Advanced Cancer	vorinostat (+ temsirolimus)	I	NCT01087554
181	Prostate Cancer	vorinostat (+ temsirolimus)	I	NCT01174199
182	Multiple Myeloma	vorinostat (+ thalidomide + lenalidomide + bortezomib)	III	NCT01554852
183	Myelodysplastic Syndromes	vorinostat (+ azacitidine)	II	NCT01748240
184	Multiple Myeloma	vorinostat (+ bortezomib + doxorubicin + dexamethasone)	I/II	NCT01394354
185	Non Small Cell Lung Cancer	vorinostat (+ bortezomib)	II	NCT00798720
186	Multiple Myeloma	vorinostat (+ bortezomib)	III	NCT00773747
187	Kidney Cancer	vorinostat (+ bortezomib)	I/II	NCT00324870
188	Metastatic or Recurrent Gastric Cancer	vorinostat (+ capecitabine + cisplatin)	I/II	NCT01045538
189	Advanced Sarcoma	vorinostat (+ gemcitabine + docetaxel)	Ib/II	NCT01879085
190	Multiple Myeloma	vorinostat (+ lenalidomide)	I	NCT00729118
191	Relapsed or Refractory Lymphoma	vorinostat (+ carfilzomib)	I	NCT01276717
192	Hodgkin Lymphoma, B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma, or Peripheral T-Cell Lymphoma	vorinostat (+ alisertib)	I	NCT01567709
193	Advanced Solid Tumors	vorinostat (+ hydroxychloroquine)	I	NCT01023737
194	Advanced Cancer	vorinostat (+ hydroxychloroquine)	I	NCT01266057
195	Refractory Solid Tumors	vorinostat (+ etoposide)	I/II	NCT01294670
196	Non Small Cell Lung Cancer	vorinostat (+ gefintinib)	I/II	NCT01027676

No.	Entity	HDACi	Phase	clinicalTrials.gov Identifier
197	Diffuse Large B-Cell Lymphoma	vorinostat (+ cyclophosphamide + etoposide + prednisone + rituximab)	I/II	NCT00667615

13. Danksagung

Bedanken möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. med. Reinhard Büttner für die Überlassung dieses hoch interessanten Themas und die wissenschaftliche Förderung sowie die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Köln schreiben zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. rer. nat. Sabine. Merkelbach-Bruse für die unermüdliche fachliche Unterstützung und Betreuung meiner Dissertation. Danke für dein entgegengebrachtes Vertrauen und auch für die umfassende Ausbildung in der molekularpathologischen Diagnostik und im Qualitätsmanagement. Danke auch für dein persönliches Engagement und deine wissenschaftliche Förderung.

Prof. Dr. med. H.U. Schildhaus danke ich für die außerordentliche Hilfe bei allen histologischen Fragestellung, für die jederzeit vorhandene Hilfsbereitschaft und für die wissenschaftliche Betreuung des HR23b Projektes. Danke für „HR23b- was sonst“!

Besonders herzlich möchte ich mich bei meinen Weggefährten Dr. rer. medic Carina Heydt und Dipl. Mol. Biomed. Helen Künstlinger für die tolle Zusammenarbeit, die kritischen Gedankenaustausche, die Motivation und für all die schönen, gemeinsamen Stunden im Labor und im Büro bedanken. Danke das ihr da ward und seid!

Danke auch an Dr. rer. nat. J. Fassunke, die mich in den ersten Monaten der Dissertation hervorragend betreut hat und mir bei allen Fragestellungen zur Seite stand.

Dem ganzen Team der Abteilung „molekularpathologische Diagnostik“ danke ich für die teils jahrelange Unterstützung, die angenehme Arbeitsatmosphäre. Theresa, Ellen, Elke, Nicole, Claudia, Anna, Jan, Anke, Sarah, Sebastian, Wiebke, dank euch bin ich jeden Tag gerne zur Arbeit gekommen.

Magdalene Fielenbach danke ich für die schönen Paraffinschnitte und die HR23b Färbung der TMAs der klinischen Sarkom- und GIST-Proben.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Institute für Pathologie am Universitätsklinikum Bonn und Köln für die freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die mich die ganze Zeit tatkräftig unterstützt haben. Danke an meinen Vater, der der Auslöser für meinen beruflichen Lebensweg ist. Danke an meine Mutter, die mich trotz einiger Zweifel liebevoll unterstützt. Danke Björn für deine nicht wissenschaftlichen Fragen und Kommentare, die mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen zurück geholt haben. Danke Heidrun und Michael für eure Geduld, die dazu geführt hat, dass das jetzt doch mal ein Ende nimmt. Danke auch an Jessica für die Korrektur dieser Arbeit und die unbegrenzte Freundschaft.

Aber vor allem danke ich meinem Ehemann Thomas, der die ganze Zeit an mich geglaubt hat und mich mit unendlicher Liebe unterstützt und motiviert hat. Ich bin so dankbar, dass es dich gibt.

14. Aktive Konferenzbeiträge

- 15.-18.02.2015 Molecular Medicine TRI-CON Conference 2015, San Francisco, Poster zum Thema „**HR23b is expressed in sarcomas and gastrointestinal stromal tumors and is associated with response to HDAC inhibitor treatment in a wide range of sarcoma cell lines**“ mit Hilfe eines Studentenstipendiums.
- 23.-26.05.2013 97. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Heidelberg, Präsentation zum Thema „**HR23b als prädiktiver Biomarker für die Histon-Deacetylase Inhibitor basierte Therapie in Weichgewebssarkomen**“.
- 07.-10.03.2013 The 1st International Congress on Controversies in Personalized Oncology Treatment, Barcelona, Poster zum Thema „**Evaluation molekularer Nachweismethoden zur Mutationsanalyse des BRAF-Gens**“.
- 31.05-03.06.2012 96. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Pathologie, Berlin, Präsentation zum Thema „**Evaluation molekularer Nachweismethoden zur Mutationsanalyse des BRAF-Gens**“.
- 28.01.2012 Tagung der Arbeitsgemeinschaft der Rheinisch-Westfälischen Pathologien/innen, Essen: Präsentation zum Thema „**MicroRNAs miR-221 and miR-222 induzieren Apoptose in gastrointestinalen Stromatumoren**“.
- 16.-19.06.2011 95. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Pathologie, Leipzig, Poster zum Thema „**MicroRNAs miR-221 und miR-222 induzieren Apoptose in GIST**“, wurde als eines der besten prämiert und in einem Kurzvortrag erneut vorgestellt.

15. Publikationen

1. Ihle M.A., Merkelbach-Bruse S., Hartmann W., Bauer S., Ratner N., Sonobe H., Nishio J., Larsson O., Åman P., Pedetour F., Taguchi T., Wardelmann E., Buettner R., Schildhaus H.U., **HR23b expression is a potential predictive biomarker for HDAC inhibitor treatment in mesenchymal tumors and is associated with response to vorinostat.** *J Pathol Clin Res*, CJP-2015-07-0016, Acceptable, subject to major revision.
2. Ihle M.A., Trautmann M., Künstlinger H., Huss S., Heydt C., Fassunke J., Wardelmann E., Bauer S., Schildhaus H.U., Buettner R., Merkelbach-Bruse S., **miRNA-221 and miRNA-222 induce apoptosis via the KIT/AKT signalling pathway in gastrointestinal stromal tumours.** *Mol Oncol.* (Impact factor 2014: 5.331), 2015 Aug;9(7):1421-33.
3. Michels S., Scheel A.H., Scheffler M., Schultheis A.M., Gautschi O., Aebersold F., Diebold J., Pall G., Rothschild S., Bubendorf L., Hartmann W., Heukamp L., Schildhaus H.U., Fassunke J., Ihle M.A., Künstlinger H., Heydt C., Fischer R., Nogová L., Mattonet C., Hein R., Adams A., Gerigk U., Schulte W., Lüders H., Grohé C., Graeven U., Müller-Naendrup C., Draube A., Kambartel K.O., Krüger S., Schulze-Olden S., Serke M., Engel-Riedel W., Kaminsky B., Randerath W., Merkelbach-Bruse S., Büttner R., Wolf J., **Clinicopathological characteristics of RET translocated lung cancer in European patients – a brief report.** *JTO* (Impact factor 2013: 5.800), Acceptable, subject to major revision.
4. Kuenstlinger H., Fassunke J., Schildhaus H.U., Brors B., Heydt C., Ihle M.A., Mechttersheimer G., Wardelmann E., Buettner R., Merkelbach-Bruse S., **FGFR2 is overexpressed in myxoid liposarcoma and inhibition of FGFR signaling impairs tumor growth *in vitro*.** *Oncotarget* (Impact factor 2014: 6.627), 2015 Aug 21;6(24):20215-30.
5. Heydt C., Kumm N., Fassunke J., Kuenstlinger H., Ihle M.A., Scheel A., Schildhaus H.U., Haller F., Buettner R., Odenthal M., Wardelmann E., Merkelbach-Bruse S., **Sensitive methods for the detection of minor subclones in tissue samples prior to tyrosine kinase inhibitor therapy.** *BMC Cancer* (Impact factor 2013: 3.319), 2015 Apr 15;15:291.
6. Schmitz K., Koeppen H., Binot E., Fassunke J., Kuenstlinger H., Ihle M.A., Heydt C., Wardelmann E., Buettner R., Merkelbach-Bruse S., Rüschoff J., Schildhaus H.U., **MET gene copy number alterations and expression of MET and hepatocyte growth factor are potential biomarkers in angiosarcomas and undifferentiated pleomorphic sarcomas.** *PLoS One*, (Impact factor 2013/2014: 3.534), 2015 Apr 6;10(4):e0120079.
7. Koenig K., Peifer M., Fassunke J., Ihle M.A., Künstliner H., Heydt C., Stamm K., Ueckerth F., Vollbrecht C., Bos M., Gardizi M., Scheffler M., Nogova L., Leenders F., Albus K., Meder L., Becker K., Florin A., Rommerscheidt-Fuss U., Altmüller J., Kloth M., Nürnberg P., Henkel T., Bikar S.E., Sos M.L., Geese W.J., Strauss L., Ko Y.D., Gerigtk U.,

- Odenthal M., Zander T., Thomas R.K., Wolf J., Merklebach-Bruse S., Büttner R., Heukamp L.C., **Implementation of amplicon parallel sequencing leads to improvement of diagnosis and therapy in lung cancer patients.** *JTO* (Impact factor 2013: 5.800), 2015 Jul;10(7):1049-57.
8. Scheffler, M., M. Bos, M. Gardizi, K. König, S. Michels, J. Fassunke, C. Heydt, H. Kunstlinger, M. Ihle, F. Ueckerth, K. Albus, M. Serke, U. Gerigk, W. Schulte, K. Topelt, L. Nogova, T. Zander, W. Engel-Riedel, E. Stoelben, Y.D. Ko, W. Randerath, B. Kaminsky, J. Panse, C. Becker, M. Hellmich, S. Merklebach-Bruse, L.C. Heukamp, R. Buttner, and J. Wolf, **PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): Genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies.** *Oncotarget* (Impact factor 2014: 6.627), 2015, 6:1315-1326.
9. Heydt, C., J. Fassunke, H. Kunstlinger, M.A. Ihle, K. König, L.C. Heukamp, H.U. Schildhaus, M. Odenthal, R. Buttner, and S. Merklebach-Bruse, **Comparison of Pre-Analytical FFPE Sample Preparation Methods and Their Impact on Massively Parallel Sequencing in Routine Diagnostics.** *PLoS One* (Impact factor 2013/2014: 3.534), 2014. 9(8).
10. Seidel D., Zander T., Heukamp L.C., Peifer M., Bos M., Fernandez-Cuesta L., Leenders F., Lu X., Ansen S., Gardizi M., Nguyen C., Berg J., Russell P., Wainer Z., Schildhaus H.U., Rogers T.M., Solomon B., Pao W., Carter S.L., Getz G., Hayes D.N., Wilkerson M.D., Thunnissen E., Travis W.D., Perner S., Wright G., Brambilla E., Buttner R., Wolf J., Thomas R.K., Gabler F., Wilkening I., Müller C., Dahmen I., Menon R., König K., Albus K., Merklebach-Bruse S., Fassunke J., Schmitz K., Kuenstlinger H., Kleine M.A., Binot E., Querings S., Altmüller J., Bossmann I., Numberg P., Schneider P.M., Bogus M., Buttner R., Perner S., Russell P., Thunnissen E., Travis W.D., Brambilla E., Soltermann A., Moch H., Brustugun O.T., Solberg S., Lund-Iversen M., Helland A., Muley T., Hoffmann H., Schnabel P.A., Chen Y., Groen H., Timens W., Sietsma H., Clement J.H., Weder W., Sanger J., Stoelben E., Ludwig C., Engel-Riedel W., Smit E., Heideman D.A.M., Sniijders P.J.F., Nogova L., Sos M.L., Mattonet C., Topelt K., Scheffler M., Goekkurt E., Kappes R., Kruger S., Kambartel K., Behringer D., Schulte W., Galetke W., Randerath W., Heldwein M., Schlesinger A., Serke M., Hekmat K., Frank K.F., Schnell R., Reiser M., Hunerliturkoglu A.N., Schmitz S., Meffert L., Ko Y.D., Litt-Lampe M., Gerigk U., Fricke R., Besse B., Brambilla C., Lantuejoul S., Lorimier P., Moro-Sibilot D., Cappuzzo F., Ligorio C., Damiani S., Field J.K., Hyde R., Validire P., Girard P., Muscarella L.A., Fazio V.M., Hallek M., Soria J.C., Carter S.L., Getz G., Hayes D.N., Wilkerson M.D., Achter V., Lang U., Seidel D., Zander T., Heukamp L.C., Peifer M., Bos M., Pao W., Travis W.D., Brambilla E., Buttner R., Wolf J., Thomas R.K., **A genomics-based classification of human lung tumors.** *Sci Transl Med* (Impact factor 2013/2014: 14.414), 2013. 5(209).
11. Ihle, M.A., Fassunke J., König K., Grunewald I., Schlaak M., Kreuzberg N., Tietze L., Schildhaus H.U., Buttner R., and Merklebach-Bruse S., **Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and**

immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer* (Impact factor 2013: 3.319), 2014. 14.

12. Huss, S., Kunstlinger H., Wardelmann E., Kleine M.A., Binot E., Merkelbach-Bruse S., Rudiger T., Mittler J., Hartmann W., Buttner R., and Schildhaus H.U., **A subset of gastrointestinal stromal tumors previously regarded as wild-type tumors carries somatic activating mutations in KIT exon 8 (p.D419del).** *Mod Pathol* (Impact factor 2013: 6.364), 2013.

13. Kunstlinger, H., Huss S., Merkelbach-Bruse S., Binot E., Kleine M.A., Loeser H., Mittler J., Hartmann W., Hohenberger P., Reichardt P., Buttner R., Wardelmann E., and Schildhaus H.U., **Gastrointestinal stromal tumors with KIT exon 9 mutations: Update on genotype-phenotype correlation and validation of a high-resolution melting assay for mutational testing.** *Am J Surg Pathol*, 2013 (Impact factor 2013: 4.602). 37(11): p. 1648-59.

14. Huss, S., Nehles J., Binot E., Wardelmann E., Mittler J., Kleine M.A., Kunstlinger H., Hartmann W., Hohenberger P., Merkelbach-Bruse S., Buettner R., and Schildhaus H.U., **beta-catenin (CTNNB1) mutations and clinicopathological features of mesenteric desmoid-type fibromatosis.** *Histopathology*, 2013, (Impact factor 2013: 3.301). 62(2): p. 294-304.

15. Zander T., Heukamp L., Bos M., Gardizi M., Scheffler M., Albus K., Koenig K., Schildhaus H.U., Schmitz K., Merkelbach-Bruse S., Fassunke J., Kleine M., Binot E., Nogova L., Mattonet C., Goekkurt E., Schlesinger A., Kappes R., Kambartel K., Schnell R., Schulz H., Reiser M., Behringer D., Gerigk U., Schulte W., Galetke W., Diet F., Randerath R., Brettner S., Engel-Riedel W., Brockmann M., Stoelben E., Ko Y.D., Buchenroth M., Benz J., Severin K., Schmitz S., Steinmetz T., Mainka D., Dietze L., Serke M., Bernards P., Schulte P., Laskowski U., Stier S., Sieber M., Heintges T., Frank K., Hekmat K., Heldwein M., Thomas R., Büttner R., Wolf J., und Network Genomic Med Lung Cancer. **Implementation of real-time genetic diagnostics and personalized treatment on non-small cell lung cancer (NSCLC) in a regional screening network.** *Onkologie* (Impact factor 2013: 0.835), 2012. 35:138.

16. Gardizi M., Scheffler M., Bos M., Heukamp L., Nogova L., Schildhaus H.U., Schmitz K., Merkelbach-Bruse S., Fassunke J., Binot E., Albus K., Künstlinger H., Kleine M., Mattonet C., Goekkurt E., Schlesinger A., Kappes R., Geist T., Kambartel K., Schnell R., Schulz H., Behringer D., Gerigk U., Schulte W., Galetke W., Diet F., Randerath W., Kaminsky B., Brettner S., Engel-Riedel W., Brockmann M., Stoelben E., Ko Y.D., Buchenroth M., Benz J., Severin K., Schmitz S., Steinmetz T., Mainka D., Dietze L., Serke M., Bernards P., Schulte P., Laskowski U., Reiser M.C.A., Katay I., Stier S., Sieber M., Heintges T., Huenerlituerkoglu A., Frank K.C.A., Toepelt K., Hekmat K., Heldwein M., Thomas R., Büttner R., Wolf J., Zander T., und Netzwerk Genomische Med. Lungenkrebs, **Frequency and clinical characterization of NSCLC patients harbouring PIK3CA mutations screened in the Network Genomic Medicine Lung Cancer.** *Onkologie* (Impact factor 2013: 0.835), 2012.35:37

17. Bos M.C.A., Gardizi M., Scheffler M., Heukamp L., Nogova L., Albus K., Koenig K., Schildhaus H.U., Schmitz K., Merkelbach-Bruse S., Fassunke J., Binot E., Mattonet C., Künstlinger H., Kleine M., Goekkurt E., Schlesinger A., Kappes R., Geist T., Kambartel K., Schnell R., Schulz H., Reiser M., Katay I., Behringer D., Gerigk U., Schulte W., Galetke W., Diet F., Randerath W., Brettner S., Engel-Riedel W., Brockmann M., Stoelben E., Ko Y.D., Buchenroth M., Benz J., Severin K., Mainka D., Schmitz S., Steinmetz T., Dietze L. Serke M., Bernards P., Schulte P., Laskowski U., Stier S., Sieber M., Heintes T., Huenerlituerkoglu A.N., Frank K., Hekmat K., Heldwein M., Thomas R., Büttner R., Wolf J., Zander T., und Netzwerk Genomische Medizin, **Evaluation of the clinical characteristics and narural history of patients with FGFR1 amplified squamous cell lung carcinoma.** *Onkologie* (Impact factor 2013: 0.835), 2012.