



Funktionelle Analyse von patientenspezifischen Mutationen in IKZF1/3 als mögliche Resistenzmechanismen in der Therapie des refraktären und rezidierten multiplen Myeloms.

Functional analysis of patient-specific mutations in IKZF1/3 as possible resistance mechanisms in the therapy of refractory and relapsed multiple myeloma.

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades

der Graduate School of Life Sciences,

Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Klasse Klinische Wissenschaften

Vorgelegt von

Theresa Demler

aus

Füssen

Würzburg, April 2021



Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Christoph Otto

1. Betreuer: Prof. Dr. Ralf C. Bargou

2. Betreuer: Prof. Dr. Jürgen Löffler

3. Betreuer: Prof. Dr. Gernot Stuhler

4. Betreuer: Dr. Thorsten Stühmer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Monoklonale Gammopathien und multiples Myelom	1
1.1.1	Definition und Epidemiologie	1
1.1.2	Klinisches Bild	2
1.1.3	Diagnose	3
1.1.4	Stadieneinteilung und Prognose	5
1.1.5	Erstlinientherapie	6
1.1.6	Therapieoptionen des RRMM	8
1.2	Physiologische Entwicklung der B-Zelle.....	9
1.3	Pathogenese und Tumormikroumgebung.....	11
1.4	„Mutational landscape“ des RRMM	13
1.5	Sequenzierung mittels zielgerichteter Panels	14
1.6	Immunmodulierende Medikamente (IMiDs).....	15
1.6.1	Historische Entwicklung und Unterschiede der IMiDs.....	15
1.6.2	Wirkweise der IMiDs	17
1.6.3	IKZF1/3 als Hauptkomponenten im IMiD-CRBN Signalweg	18
1.6.4	Essenzielles Sequenzmotiv in IKZF1/3 für Lenalidomid-Sensitivität	19
1.6.5	Physiologische Funktion von Ikaros und Aiolos	21
1.6.6	Ikaros-Zinkfingerproteine und deren funktionelle Domänen	21
1.7	In Patienten identifizierte Mutationen in IKZF1/3.....	22
1.8	Fragestellungen der Arbeit	25
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Molekularbiologische Methoden.....	27
2.1.1	Primerdesign.....	27

2.1.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	28
2.1.3	DNA-Gelelektrophorese	30
2.1.4	Gelextraktion	31
2.1.5	Insertpräparation: DNA-Restriktionsverdau	31
2.1.6	Vektorpräparation	32
2.1.7	Ligation und Transformation in kompetente <i>E. coli</i> Bakterien	33
2.1.8	Selektion von ausgewählten Klonen durch PCR.....	33
2.1.9	Plasmidisolierung mittels Plasmid Kits	34
2.1.10	DNA-Sequenzierung	35
2.1.11	Mutagenese	35
2.1.12	Klonierung in das Sleeping Beauty Transposon System.....	37
2.2	Zellbiologische Methoden	38
2.2.1	Zelllinien.....	38
2.2.2	Kulturbedingungen	39
2.2.3	Zelldichtebestimmung.....	39
2.2.4	Kryokonservierung von Zellen	40
2.2.5	Transfektion durch Elektroporation	40
2.2.6	CD4 Δ Säulenaufreinigung und Optiprep	41
2.2.7	Selektion mit Antibiotika	42
2.2.8	Lenalidomid-Behandlung für funktionelle Analysen.....	43
2.2.9	Beurteilung von Zellviabilität: alamarBlue-Assay.....	44
2.2.10	Beurteilung von Zelltod: Durchflusszytometrie mit Annexin V-PI	44
2.2.11	Statistische Auswertung	45
2.3	Proteinbiochemische Methoden: Western Blot.....	46
2.3.1	Lenalidomid-Behandlung für Western Analysen.....	46

2.3.2	Ernte und Lyse der Zellen	46
2.3.3	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry	47
2.3.4	Gießen der SDS-Polyacrylamid Gele	47
2.3.5	Probenvorbereitung und Auftrennung mittels SDS-PAGE	47
2.3.6	Proteintransfer mittels Blotting und Blockierung	48
2.3.7	Immunhistochemische Färbung und Analyse von Proteinbanden	48
2.4	Materialienliste	49
3	Ergebnisse	63
3.1	Übersicht der methodischen Vorgehensweise	63
3.2	Vorversuche	65
3.2.1	Endogene Expression von Ikaros und Aiolos in Zelllinien	65
3.2.2	Western Analyse nach Lenalidomid-Inkubation	66
3.2.3	Funktionelle Analysen nach Lenalidomid-Inkubation	67
3.3	Ikaros (IKZF1)	70
3.3.1	Transiente Transfektion	70
3.3.2	Stabile Transfektion	71
3.3.3	Analyse mittels Western Blot	72
3.3.4	Funktionelle Analysen nach Lenalidomid-Inkubation	78
3.3.5	Nachgeschaltetes Ziel: c-MYC	81
3.3.6	Effekt der Mutationen auf die Glucocorticoid-Sensitivität	82
3.4	Aiolos (IKZF3)	85
3.4.1	Analyse mittels Western Blot	85
3.4.2	Funktionelle Analysen nach Lenalidomid-Inkubation	87
3.4.3	Transiente Transfektion: Vergleich der Expression von <i>IKZF1</i> - und <i>IKZF3</i> -cDNA	90

3.4.4	Subklonierung in eine CAG-Promotor getriebene Expressionskassette ..	91
3.4.5	Transiente Transfektion: <i>IKZF3</i> -cDNA in CAG- und CMV- Promotor getriebenen Expressionsvektoren	92
4	Diskussion.....	94
5	Zusammenfassung.....	111
6	Summary	113
7	Anhang	114
	Abkürzungsverzeichnis	
	Abbildungsverzeichnis	
	Tabellenverzeichnis	
	Literaturverzeichnis	
	Publikation.....	
	Danksagung	
	Lebenslauf.....	
	Eidesstattliche Erklärung	

1 Einleitung

1.1 Monoklonale Gammopathien und multiples Myelom

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Das multiple Myelom ist vorwiegend eine Erkrankung des Knochenmarks mit multiplen intramedullären Tumorabsiedlungen.¹ Es ist ein niedrig-malignes B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom, also eine bösartige klonale Neoplasie der Plasmazelle.² Plasmazellen sind terminal differenzierte B-Lymphozyten, die sich im Knochenmark und in den sekundären lymphatischen Organen aus hämatopoetischen Stammzellen durch Reifung entwickelten.³ Im Unterschied zu ihren Vorläufern, den B-Lymphozyten, sezernieren Plasmazellen Antikörper. Beim multiplen Myelom kommt es zur Entartung einer Plasmazelle und Ausbildung eines malignen Plasmazellklons, sodass es damit einhergehend meist zu einer Produktion monoklonaler Immunglobuline, auch Paraproteine oder M-Gradient genannt (IgG, IgA oder IgD), oder freier Leichtketten (kappa oder lambda) kommt.²⁻⁴ Je nach vorherrschendem Protein wird das multiple Myelom in verschiedene Typen eingeteilt.² Am häufigsten ist der IgG-Typ, etwas seltener sind der IgA-Typ und das Leichtketten-Myelom, das sogenannte Bence-Jones-Myelom.⁵ Der IgD-Typ, das asekretorische Myelom und das nicht zum multiplen Myelom gezählte Immunozytom (M. Waldenström, IgM-Typ) kommen hingegen kaum vor.^{2, 5} Solange es keine Endorganschäden durch die Ablagerung dieser monoklonalen Immunglobuline gibt, sondern sich die monoklonalen Plasmazellen auf Knochenmarkinfiltration und Sekretion monoklonaler Proteine beschränken, handelt es sich um eine monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS).³ Aus dieser asymptomatischen Vorstufe kann mit dem optionalen Zwischenschritt des schwelenden (smouldering) Myeloms (SMM) das multiple Myelom entstehen.⁶ Das multiple Myelom, die MGUS und das schwelende Myelom gehören zu den monoklonalen Gammopathien.³ Die MGUS ist ein häufiges Krankheitsbild mit einer Prävalenz von 3,5 % bei den 45- bis 75-jährigen in Deutschland.⁷ Das multiple Myelom ist hingegen seltener, es treten jährlich etwa 3600 Neuerkrankungen bei Männern und 2900 Neuerkrankungen bei Frauen in Deutschland auf.⁴ Ein leichter Anstieg der jährlichen Inzidenz und Mortalität ist zu verzeichnen.⁴ Dies

lässt sich mit dem Zuwachs der älteren Bevölkerung, der häufigeren Diagnosestellung durch verbesserte technische Möglichkeiten und des verstärkten Bewusstseins für die Erkrankung erklären.^{3, 4} Als häufigster Tumor von Knochenmark und Knochen in Deutschland und aufgrund der erhöhten Inzidenz bei älteren Personen in einer zunehmend alternden Gesellschaft werden das multiple Myelom und seine Vorstufen damit auch in Zukunft von Bedeutung sein.^{2, 4}

1.1.2 Klinisches Bild

Circa ein Fünftel der Patienten ist bei Diagnosestellung asymptomatisch.² Symptome entstehen durch die das Knochenmark infiltrierenden Myelomzellen und durch die Ablagerung monoklonaler Proteine, die Endorganschäden verursachen. Am häufigsten stellen sich die Patienten mit Rückenschmerzen vor, die typischerweise durch Bewegung ausgelöst werden.⁵ Myelomzellen können in die an das Knochenmark angrenzenden Knochen eindringen und dort knochenabbauende Osteoklasten stimulieren sowie knochenaufbauende Osteoblasten hemmen.^{1, 2} Dadurch kann es zu schmerzhaftem Knochenabbau, Knochenschäden und nachfolgend zu Osteoporose mit pathologischen Frakturen kommen.⁵ Durch die osteolytischen Läsionen kann ein pathologisch erhöhter Kalzium-Spiegel entstehen, der die Gefahr einer hyperkalzämischen Krise mit Polyurie, Erbrechen und Somnolenz birgt.² Des Weiteren treten oft unspezifische Symptome wie Erschöpfung, meist zusammenhängend mit Anämie, und Gewichtsverlust auf.⁵ Die Anämie lässt sich unter anderem erklären durch eine gehemmte Hämatopoese im Knochenmark und durch den Erythropoetin-Mangel bei häufig begleitender Nierenschädigung.⁵ Die Nephropathie zeigt sich durch einen erhöhten Kreatinin-Wert im Serum und ist oft bedingt und durch die sogenannte Myelomniere.⁸ Dabei überschreitet die übermäßige Produktion monoklonaler Leichtketten die Kapazität der Zellen im proximalen Tubulus diese Leichtketten zu resorbieren und zu verstoffwechseln.⁹ Daraufhin gelangen diese in den distalen Tubulus, wo sie einen Komplex mit Tamm-Horsfall-Proteinen eingehen können, was zur Obstruktion der Tubuli führen kann (Cast-Nephropathie).⁹ Bei noch intakten Glomeruli und abnormer Anzahl freier Leichtketten im Urin kommt es zur Bence-Jones-Proteinurie.⁸ Weitere klinische Symptome können auftreten: eine Hyperviskosität des Bluts mit möglichen zerebralen

Durchblutungsstörungen, ein Antikörpermangelsyndrom mit wiederholten bakteriellen Infekten und eine Leichtketten-bedingte AL-Amyloidose mit Schädigung von Nieren, Leber, Herz, Gastrointestinaltrakt oder peripherem Nervensystem.^{2, 10} In den USA vergingen zwischen 1992 und 2002 im Median 3,3 Monate von den ersten Beschwerden bis zur Diagnosestellung.¹¹ Bei Rückenschmerzen oder unklaren Anämien bei älteren Menschen ist daher das multiple Myelom als Differentialdiagnose in Betracht zu ziehen.¹²

1.1.3 Diagnose

Besteht bei einem Patienten der Verdacht auf ein multiples Myelom sollte zunächst eine Anamnese und klinische Untersuchung erfolgen.³ Im Labor sollte das Blutbild mit Differentialblutbild, Elektrolyte, GFR, Kreatinin, LDH, Gesamteiweiß, Albumin, β_2 -Mikroglobulin und freien Leichtketten im Serum bestimmt werden.³ Weiterhin sollte das Vorhandensein monoklonaler Proteine im Serum und (24 h-)Urin mittels Proteinelektrophorese festgestellt werden und der Typ und die Menge monoklonaler Proteine mittels Immunfixationselektrophorese ermittelt werden.³ Durch eine Knochenmarkspunktion wird der Anteil klonaler Plasmazellen untersucht und im Idealfall erfolgt eine zytogenetische Analyse mittels FISH zur Detektion von Chromosomenaberrationen, die als Hochrisiko-Myelom gelten.^{3,13} Des Weiteren soll zur Feststellung von Knochenläsionen eine Bildgebung erfolgen, idealerweise mittels low-dose CT oder PET-CT und bei manchen Fragestellungen mit MRT.^{3,13} Wenn die durch die Plasmazellerkrankung verursachten und nachfolgend genannten CRAB-Kriterien erfüllt werden, ist ein Patient symptomatisch.¹⁰ Dies ist unabhängig davon, ob der Patient klinisch an Symptomen leidet.¹⁰ 2014 wurde die Krankheitsdefinition des multiplen Myeloms aktualisiert, um validierte Biomarker zu berücksichtigen, die in absehbarer Zukunft fast unausweichlich zu CRAB-Merkmalen führen.¹⁰ Dies soll beim schwelenden Myelom vom Höchstisiko-Typ eine Therapieverzögerung verhindern und damit verbundene Endorganschäden durch eine verspätete Diagnosestellung minimieren.¹⁰ Denn das schwelende multiple Myelom weist im Durchschnitt ein Risiko von 10 % pro Jahr auf, innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung in ein multiples Myelom überzugehen.¹⁰ Darüber hinaus existieren Subgruppen, für die das Risiko noch höher

ist.¹⁰ Während das schwelende Myelom nicht immer auftritt, geht die asymptomatische Vorstufe der MGUS dem multiplen Myelom stets voraus.¹⁴ Die MGUS verfügt nur über eine durchschnittliche Progressionsrate zum multiplen Myelom von circa 1 % pro Jahr.¹⁵

Die Diagnose „multiples Myelom“ kann gestellt werden, wenn nachstehende Kriterien erfüllt sind („International Myeloma Working Group“ IMWG, 2014)¹⁰:

- ≥ 10 % klonale Plasmazellen im Knochenmark oder bioptischer Nachweis eines knöchernen oder extramedullären Plasmozytoms und ≥ 1 der folgenden Myelom-definierenden Ereignisse:
 - Endorganschäden durch Plasmazellproliferation (CRAB-Kriterien)
 - „HyperCalcaemia“ (Hyperkalzämie): Serumkalzium $>0,25$ mmol/l (>1 mg/dl) höher als der obere Normwert oder $>2,75$ mmol/l (>11 mg/dl)
 - „Renal insufficiency“ (Niereninsuffizienz): Kreatininclearance <40 ml/min oder Serumkreatinin >177 μ mol/l (>2 mg/dl)
 - „Anaemia“ (Anämie): Hämoglobinwert >20 g/l niedriger als der untere Normwert oder Hämoglobin <100 g/l
 - „Bone lesions“ (Knochenläsionen): ≥ 1 osteolytische Läsion in der radiologischen Bildgebung mittels Röntgen, CT oder PET-CT
 - ≥ 1 der folgenden Biomarker (Prädiktor für ≥ 80 % Risiko für Progress zum multiplen Myelom oder zu verwandten malignen Erkrankungen):
 - ≥ 60 % klonale Plasmazellinfiltration im Knochenmark
 - Verhältnis betroffener (überproduzierter) zu nicht-betroffenen freien Leichtketten im Serum ≥ 100
 - >1 fokale Läsion im MRT ≥ 5 mm

Definition der monoklonalen Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS)¹⁰:

- kein CRAB-Kriterium oder Amyloidose vorliegend **und**
- monoklonales Protein im Serum (non-IgM) <30 g/l **und**
- klonale Plasmazellinfiltration im Knochenmark <10 %

Definition des schwelenden (smouldering) multiplen Myeloms (SMM)¹⁰:

- keines der oben genannten Myelom-definierenden Ereignisse oder Amyloidose **und**

- monoklonales Protein im Serum (IgG/IgA) ≥ 30 g/l oder im Urin ≥ 500 mg pro 24 h und/oder klonale Plasmazellinfiltration im Knochenmark 10-60 %.

1.1.4 Stadieneinteilung und Prognose

Das multiple Myelom ist ein heterogenes Krankheitsbild, bei dem nicht nur die Diagnose nicht immer eindeutig gestellt werden kann, sondern auch die Verlaufsformen sehr unterschiedlich sein können. Um die klinische Prognose bei neu diagnostiziertem multiplen Myelom abschätzen zu können, wurden Klassifikationen zur Stratifizierung entwickelt.¹⁶ Die lange geltende Stadieneinteilung nach Durie und Salmon von 1975 wurde 2005 abgelöst durch das „International Staging System“ (ISS) und 2015 durch das „Revised International Staging System“ (R-ISS) (vgl. Tabelle 1 und Tabelle 2).¹⁶⁻¹⁸

Tabelle 1: Kriterien des „International Staging Systems“ (ISS), basierend auf Palumbo et al. (2015)¹⁶

ISS Stadium	Kriterium
I	Serum β_2 -Mikroglobulin $< 3,5$ mg/l, Serumalbumin $\geq 3,5$ g/dl
II	Weder Stadium I noch Stadium III
III	Serum β_2 -Mikroglobulin $\geq 5,5$ mg/l

Diese Stadieneinteilung wurde mit weiteren signifikanten Faktoren kombiniert, um die Prognose von neu diagnostizierten Myelom-Erkrankungen zuverlässiger und unabhängig von Alter und Therapie einzuschätzen (vgl. Tabelle 2).¹⁶

Tabelle 2: Kriterien des „Revised International Staging Systems“ (R-ISS), basierend auf Palumbo et al. (2015)¹⁶

R-ISS Stadium	Kriterium
I	ISS Stadium I und keine Hochrisikozytogenetik und normales LDH
II	Weder R-ISS Stadium I noch III
III	ISS Stadium III und entweder Hochrisikozytogenetik [del(17p), t(4;14), t(14;16)] oder erhöhtes Serum-LDH

Je nach R-ISS Stadium lässt sich damit eine unterschiedliche Prognose bei neu diagnostizierten multiplen Myelomen ableiten, die aktuell mit den in Kapitel 1.1.5 dargestellten IMiDs, Proteasomeninhibitoren und Chemotherapeutika therapiert

werden.¹⁶ Nach einem medianen Untersuchungszeitraum von 46 Monaten war die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate 82 % im R-ISS Stadium I, 62 % im Stadium II und 40 % im Stadium III.¹⁶ Darüber hinaus gibt es noch weitere Faktoren, die Einfluss auf die Prognose nehmen können und die das „Revised International Staging System“ von 2014 nicht berücksichtigt.³ Das Überleben des einzelnen Patienten kann somit im Bereich von einigen Monaten bis hin zu mehr als zehn Jahren liegen.¹⁶ Die absolute 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland liegt bei circa 40 %.⁴

1.1.5 Erstlinientherapie

Mit der Erfüllung der in Kapitel 1.1.3 genannten IMWG-Kriterien wird nicht nur die Diagnose multiples Myelom gestellt, sondern es besteht auch die Indikation zur Einleitung einer Therapie.¹⁰ Primäre Ziele einer Therapieeinleitung sind eine möglichst tiefe Remission mit Symptomkontrolle und kausale Behandlung von Komplikationen.⁴ Langfristig soll das progressionsfreie Überleben und die Gesamtüberlebenszeit verlängert werden mit zunehmendem Fokus auf Berücksichtigung der Verträglichkeit der Therapien und der Lebensqualität.^{3, 4} Zur Therapie des multiplen Myeloms gibt es eine Vielzahl möglicher Substanzen (vgl. Tabelle 3).

Tabelle 3: Zur Therapie des multiplen Myeloms einsetzbare Substanzen, basierend auf Kumar et al. (2017)³

Proteasomeninhibitoren:	Bortezomib
	Carfilzomib
	Ixazomib
Immunmodulierende Medikamente (IMiDs):	Thalidomid
	Lenalidomid (Len)
	Pomalidomid
Monoklonale Antikörper:	Daratumumab (anti-CD38)
	Isatuximab (anti-CD38)
	Elotuzumab (anti-SLAMF7)
Histondeacetylaseinhibitor:	Panobinostat
Alkylierende Substanzen:	Melphalan
	Cyclophosphamid

	Bendamustin
Andere:	Dexamethason
	Prednison
	Cisplatin
	Etoposid
	Doxorubicin
	Selinexor (Inhibitor eines nukleären Export-Proteins)

Carfilzomib, Pomalidomid, Panobinostat, Ixazomib, Elotuzumab, Daratumumab, Isatuximab und Selinexor wurden in den USA für die Behandlung des refraktären und rezidierten multiplen Myeloms (RRMM) zugelassen.¹³ Auch aktuell befinden sich einige neue Ansätze und Substanzen in der Entwicklung.³ Darunter sind beispielweise Checkpoint-Inhibitoren, neue monoklonale Antikörper und T-Zell basierte Behandlungsansätze wie CAR-T-Zell-Therapien und bispezifische Antikörper (BiTE).¹³ Auch onkolytische Viren sowie Impfungen im Rahmen von Immuntherapien werden untersucht.¹⁹

Die nach Diagnosestellung begonnene Therapie beruht aktuell primär darauf, ob der Patient für eine Hochdosistherapie mit Transplantation geeignet ist.³ Dies ist unter anderem abhängig von Alter, Komorbiditäten, Patientenwunsch und Risikokonstellation der Zytogenetik.³ Eine Behandlung, die eine autologe Stammzelltransplantation (ASCT) umfasst, hat einen größeren positiven Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit und das progressionfreie Überleben als Melphalan-Prednison-Lenalidomid allein.²⁰ Im Rahmen der ASCT-Therapie erfolgt bei Standardrisiko-Zytogenetik zunächst eine Induktion mit Bortezomib in Kombination mit Lenalidomid und Dexamethason (VRd), bei Hochrisikopatienten zusätzlich mit Daratumumab.^{3, 13} In Deutschland kann anstelle von Lenalidomid auch Cyclophosphamid oder Thalidomid on-label verwendet werden.⁴ Anschließend erfolgt nach Stammzellmobilisierung die Apherese von Stammzellen aus dem peripheren Blut und es wird eine myeloablative

Konditionierung durch Hochdosischemotherapie mit nachfolgender (Tandem-)ASCT durchgeführt.³ Es folgt eine Erhaltungstherapie meist mit Lenalidomid und/oder Bortezomib, je nach Risiko der Zytogenetik, für mindestens zwei Jahre.³

Wenn die Patienten nicht für eine Transplantation geeignet sind, wird eine medikamentöse Therapie eingeleitet.³ Die Erstlinientherapie der Wahl für die Induktion stellt Bortezomib, Lenalidomid und Dexamethason dar.³ Diese Kombination führt zu einer signifikanten Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit und des progressionsfreien Überlebens bei neu diagnostiziertem multiplen Myelom.²¹ Bei Patienten, die diese Dreierkombination beispielsweise wegen Alter oder Gebrechlichkeit nicht vertragen, ist eine Kombination aus Lenalidomid und Dexamethason eine Therapieoption.²² Standardtherapie der Studiengruppen in Deutschland im Jahr 2018 ist Bortezomib/Cyclophosphamid/Dexamethason.⁴ Insgesamt gesehen sind diverse Kombinationen der in Tabelle 3 aufgeführten Therapeutika möglich und sollten abhängig von den Patientencharakteristika gewählt werden. Auch für Erhaltungstherapien wird Lenalidomid allein oder in Kombination eingesetzt und verlängert signifikant progressionsfreies und zum Teil auch Gesamtüberleben.^{23, 24}

1.1.6 Therapieoptionen des RRMM

Insgesamt lässt sich sagen, dass sich das Überleben der Patienten mit multiplen Myelom in den letzten zwanzig Jahren deutlich verbessert hat.³ Maßgeblich ist dies bedingt durch therapeutische Optionen mit Proteasomen-Inhibitoren und IMiDs.²⁵ Dennoch bleibt das multiple Myelom eine bislang unheilbare Krankheit.²⁵ Bei der Mehrheit der Patienten kommt es letztlich zum Progress der Erkrankung und damit zu einem Bedarf an neuen Behandlungsansätzen.²⁵ Die Zeit von der Diagnosestellung bis zur Refraktärität auf Bortezomib/IMiDs betrug im Median 3,3 Jahre mit einer Gesamtüberlebenszeit nach Refraktärität von 10 Monaten.²⁵ Refraktär ist definiert als eine fortschreitende Erkrankung unter Therapie oder innerhalb von 60 Tagen nach Beendigung der Therapie.⁴ Ein klinisches Rezidiv und damit auch eine erneute Therapieindikation ist definiert durch das Vorhandensein direkter Indikatoren einer zunehmenden Erkrankung.^{3, 26} Dazu gehören neue Nachweise bislang nicht vorhandener CRAB-Kriterien bei zwei

aufeinanderfolgenden Untersuchungen oder das Neuauftreten bzw. die Ausweitung vorbestehender Knochenläsionen.²⁷ Eine ausschließlich biochemisch nachweisbare Progression bedingt nicht eine erneute Therapieeinleitung.³ Aktuell kann als Nachfolgetherapie nach Rezidiven je nach bisherigem Verlauf und Ansprechen sowie abhängig vom physischen Zustand des Patienten und dem zytogenetischen Risiko ein Wechsel der Substanzklasse erfolgen oder ein anderes Präparat derselben Substanzklasse versucht werden.^{3, 4} Es wird eine Triple-Therapie empfohlen, die mindestens zwei bisher nicht verwendete Substanzen enthält.¹³ Für die Zweit- und Drittlinientherapien sind hierfür auch eine größere Zahl an Substanzen zugelassen als in der Erstlinientherapie. Allogene oder autologe Stammzelltransplantationen sind weitere Therapieoptionen.⁴

1.2 Physiologische Entwicklung der B-Zelle

Aus hämatopoetischen Stammzellen entwickeln sich im Knochenmark Vorläufer-B-Zellen, die sich durch zufällige somatische VDJ-Rekombination zu unreifen B-Zellen ausbilden.^{1, 3, 28} Dabei werden „variable“ (V), „diversity“ (D), und „joining“ (J) Gen-segmente der Immunoglobulin (Ig) Gene rearrangiert und mit „constant“ (C) Genabschnitten kombiniert, sodass das primäre Immunoglobulin Repertoire entsteht.²⁹ Zunächst werden die Gene der schweren (H)-Ketten (*IGH*) umgruppiert, bestehend aus V, D, J und C Genabschnitten.^{28, 29} Anschließend folgt die Umordnung der Gene der leichten Ketten, bestehend aus V, J und C Genabschnitten, zunächst am Ig kappa Locus (*IGK*) und bei ausbleibendem Erfolg am Ig lambda Locus (*IGL*).^{28, 29} Der funktionelle Protein-Komplex aus leichten und schweren Ketten auf der Zelloberfläche wird B-Zell-Rezeptor genannt, eine Untereinheit davon ist IgM.²⁹ Diese Oberflächenstruktur ermöglicht dem unreifen B-Lymphozyten der Apoptose zu entgehen und weiter zu reifen, indem er das Knochenmark verlässt und zu sekundären lymphatischen Organen wie der Milz und den Lymphknoten wandert.^{1, 29} Insgesamt ergibt sich daraus, dass eine enorme Zahl von B-Zellen mit unterschiedlichsten Antikörper-Spezifitäten durch zufällige somatische Rekombination gebildet wird.²⁸ Nach initialem Kontakt mit einem

Antigen sind die B-Zellen aktiviert und produzieren zunächst stets IgM-Immunglobuline mit niedriger Affinität (Bindungsstärke).^{28, 29} Zur Affinitätssteigerung interagieren T-Zellen, B-Zellen und antigen-präsentierende dendritische Zellen miteinander in der Keimzentrumsreaktion in den Lymphknoten und es kommt zur klonalen Expansion.^{28, 29} Dabei teilt sich eine B-Zelle wiederholt und produziert Tochterzellen, die für dasselbe Antigen spezifisch sind.²⁸ Es treten somatische Hypermutation und Immunglobulin-Switch („class switch recombination“) auf.²⁹ Bei der somatischen Hypermutation werden in die umgelagerten Ig-Gene Punktmutationen in den sogenannten hypervariablen Regionen („complementary determining regions“) der H- und L-Ketten eingefügt.^{28, 29} Dies erlaubt die Selektion hochaffiner Antikörper, die spezifisch Antigene erkennen und binden können.^{28, 29} Durch den Immunglobulin-Switch kommt es zum Klassenwechsel der Immunglobuline.²⁹ Dadurch erlangen die B-Lymphozyten die Fähigkeit auch andere Immunglobulin-Klassen zu bilden und Antikörper der Isotypen IgA, IgE oder IgG zu produzieren.^{28, 29} Der mit 80 % am häufigsten vorkommende und stabilste Isotyp ist IgG, der zweithäufigste und am stärksten produzierte Isotyp ist IgA.²⁸ Dies entspricht auch den häufigsten Myelom-Typen. Terminal differenzieren B-Zellen dann zu B-Gedächtniszellen oder zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen.²⁹ Sie kehren aus dem Keimzentrum des Lymphknotens zurück in das Knochenmark und siedeln sich dort für Monate bis Jahre an oder wandern in lymphatisches Gewebe, beispielsweise des Darms.^{1, 28} Die physiologisch produzierten Antikörper bzw. Immunglobuline können membrangebunden oder gelöst im Blut vorkommen und haben eine essenzielle Rolle im adaptiven Immunsystem.²⁸ Insgesamt gesehen ermöglichen somatische Rekombination, Hypermutation und Immunglobulin-Switch zwar die enorme Vielfalt der Antikörper und sind unabdingbar für ein funktionierendes Immunsystem, jedoch kann durch diese Mechanismen überhaupt erst die MGUS und im Verlauf das multiple Myelom entstehen.

1.3 Pathogenese und Tumormikroumgebung

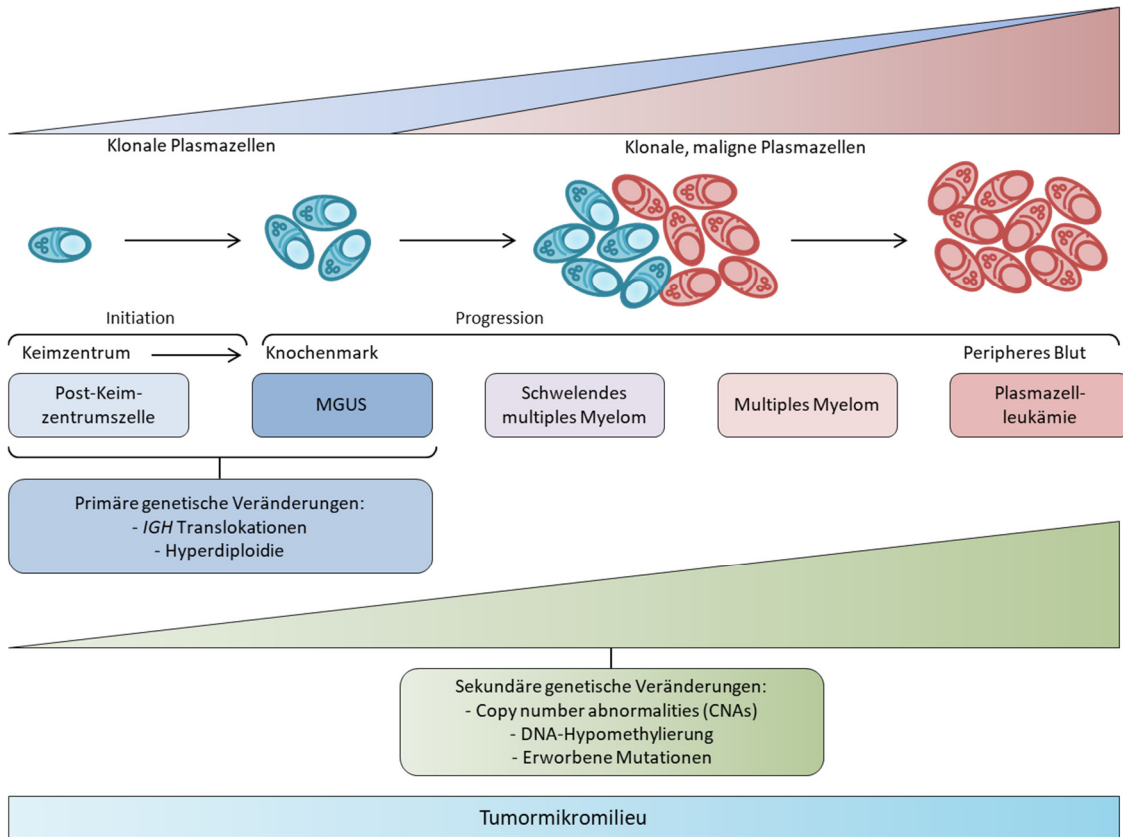


Abbildung 1: Pathogenese monoklonaler Gammopathien, modifiziert nach Kumar et al. (2017)³

Aus Post-Keimzentrums-B-Zellen kann sich in einem mehrstufigen Prozess durch den sequentiellen Erwerb genetischer Veränderungen mit den Zwischenstadien der MGUS und des schwelenden Myeloms schließlich das multiple Myelom entwickeln (vgl. Abbildung 1).^{3, 30} Dabei kommt es zu unnatürlichem Verhalten von Plasmazellen: zunächst zur Infiltration des Knochenmarks durch klonale Plasmazellen, die monoklonales Protein sezernieren, und dann zur Entartung dieser Plasmazellen bei der Entstehung des multiplen Myeloms.^{3, 30} Im weiteren Verlauf kann sich die Erkrankung zunehmend auch außerhalb des Knochenmarks ausbilden, also extramedullär z.B. in Blut oder Pleuraflüssigkeit.¹ Zuletzt ist auch die Plasmazellleukämie möglich, eine Erkrankung bei der anders als bei den zuvor genannten Krankheiten überwiegend das Blut betroffen ist und bei der die malignen Plasmazellen als losgelöst vom Knochenmark gesehen werden.¹

Bei der Myelom-Entstehung kommt es zunächst in den Keimzentren der Lymphknoten zu primären genetischen Ereignissen wie *IGH* Translokationen und Hyperdiploidie. Diese können eine pathologische Entwicklung zur MGUS initiieren, aber sind noch nicht ausreichend für die Entstehung maligner Plasmazellen.³ Erst durch sekundäre (epi)genetische Entwicklungen, der in das Knochenmark gewanderten und bereits primären genetischen Veränderungen unterworfenen Plasmazellen, kann sich das SMM oder multiple Myelom entwickeln.³ Dabei gibt es keine (epi)genetischen Veränderungen, die definierend für das multiple Myelom sind.³ Jedoch nimmt die Anzahl sekundärer Veränderungen, welche unabhängig von der B-Zell-Entwicklung sind, im Zuge der Myelom-Pathogenese deutlich zu.³ Dazu gehören „copy number abnormalities“ (CNAs), epigenetische Veränderungen, sekundäre Translokationen (häufig von *KRAS/NRAS* oder *MYC*) und erworbene Mutationen.^{3, 30} CNAs sind strukturelle Veränderungen einzelner Chromosomen wie Deletionen und Insertionen, hierzu gehört beispielsweise der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 1 (del(1p)).^{28, 31} Zu den epigenetischen Veränderungen werden eine veränderte DNA-Methylierung, eine veränderte Chromatinstruktur und eine miRNA Deregulierung gezählt.³ Erworbene Mutationen können ebenfalls sekundäre genetische Veränderungen sein, es sind jedoch keine universellen Treibermutationen beim multiplen Myelom identifizierbar.³ Stattdessen lassen sich sehr viele unterschiedliche Mutationen feststellen, die verschiedene Signalwege betreffen und in einzelnen Signalwegen und Genen clustern können.³ Jedoch ist keine häufig und die Mutationen treten nicht in allen klonalen Plasmazellen auf.³ Daher herrscht schon bei der MGUS eine große Mutationsvielfalt mit vielen Subklonen geringer Häufigkeit und es besteht eine ausgeprägte sub- und intraklonale Heterogenität.^{3, 30} Bei der Transformation vom SMM zum multiplen Myelom kommt es zu Veränderungen der subklonalen Zusammensetzung.³⁰ Diese klonale Progression kann als Schlüsselfaktor in der Pathogenese gesehen werden.³⁰ In der Summe ergibt sich trotz individuell verschiedenster Mutationen der malignen Plasmazellen schließlich der klinische Phänotyp des multiplen Myeloms.³

Die Pathogenese des multiplen Myeloms kann jedoch nicht isoliert betrachtet werden, sondern stets nur unter Berücksichtigung der Umgebung der Myelomzellen im

Knochenmark, des sogenannten Tumormikromilieus.³ Dies besteht aus Zellen des Immunsystems, Osteoklasten und Osteoblasten, Stromazellen des Knochenmarks und Endothelzellen.³ Die Interaktion der Myelomzellen mit ihrer Umgebung ist dabei sowohl relevant für die Pathogenese, als auch für den Krankheitsverlauf und die Therapie.³ Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das multiple Myelom sowohl klinisch als auch biologisch gesehen ein heterogenes Krankheitsbild darstellt.³

1.4 „Mutational landscape“ des RRMM

Ähnliche Veränderungen wie in der Pathogenese können auch beim rezidierten und refraktären multiplen Myelom eine Rolle spielen. Während in der Pathogenese nur ein natürlicher Selektionsdruck durch das Immunsystem herrscht sowie durch einen Wettkampf der Klone um Nischen im Knochenmark, kommt nach Behandlungsbeginn ein artifizieller Selektionsdruck durch therapeutische Substanzen hinzu und stellt einen Ansatz zur Erklärung des häufigen Auftretens von Rezidiven dar.^{30, 31} Initial besteht eine inter-, intra- und subklonale Heterogenität der Myelomzellen, welche unter Therapie eine Vielzahl zusätzlicher Eigenschaften, wie weitere Mutationen und epigenetische Veränderungen erwerben.^{3, 31} Diese unterschiedlichen Subklone konkurrieren dann miteinander im Sinne der Evolutionstheorie nach Darwin.³¹ Durch die Therapie werden zwar manche Subklone eradiziert, aber durch erworbene Mutationen in Subklonen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen kann es auch zu Apoptoseresistenz und zum Rezidiv kommen.³¹ Es werden letztlich solche Zellen selektiert, die die Kombinationstherapien überleben.³¹ Das zeitliche Muster der klonalen Entwicklung kann eingeteilt werden in genetisch stabil, linear und „branching“.³² Je nach Muster tritt keine Änderung der subklonalen Zusammensetzung auf oder es kommt zu linearer Entwicklung mit im Rezidiv ausschließlich neu erworbenen strukturellen Chromosomenveränderungen (CNAs).³² Die dritte Möglichkeit ist „branching“ mit Zugewinn und Verlusten von CNAs, also mit abwechselnd dominierenden Subklonen.³² „Branching“ scheint insgesamt das vorherrschende Verhalten der Subklone zu sein, welches Krankheitsprogression bedingt.³³ Moduliert wird diese dynamische Entwicklung

durch das Tumormikromilieu und dem Versuch der Klone dem Immunsystem zu entgehen.³³

1.5 Sequenzierung mittels zielgerichteter Panels

Das individuelle Mutationsprofil des Myeloms eines Patienten zu kennen und die klonale Evolution während der Therapie zu überwachen ist wichtig für die effektive Behandlung des Tumors mittels personalisierter Therapieansätze.³⁴ Dies wird ermöglicht durch „next-generation sequencing“ (NGS).³⁵ Bei soliden Tumoren und hämatologischen Erkrankungen werden derzeit meist zielgerichtete Panels verwendet.³⁵ Auch für das multiple Myelom wurde ein spezifisches Genmutationspanel entwickelt, mit dem ein klinisch orientiertes zielgerichtetes NGS gelingt: das „Multiple Myeloma Mutation Panel“ (M³P).^{34, 36} Dieses Sequenzierungspanel umfasst in der aktuellen Version (v3.0) 88 Gene.^{34, 36} Dabei handelt es sich um Gene, die typischerweise von Mutationen betroffen sind, Myelom-relevante Signalwege betreffen, mit Therapieresistenzen auf die meistverwendeten Substanzen in Verbindung gebracht werden oder mittels gezielter Therapie angegriffen werden könnten.³⁶ Eine Mutation gilt als positiv bestätigt und damit als vorhanden, wenn sie in $\geq 10\%$ bzw. bei bekannten tumorrelevanten Mutationen in $\geq 3\%$ der „variant reads“ auftritt.³⁴ Jedoch lässt sich anhand der „variant read frequency“ (VRF) noch keine Aussage über die klinische Relevanz treffen. Die anzunehmende Mutation kann eine Nonsense-Mutation sein, sie kann trotz gehäuften Vorkommens ohne Konsequenz sein oder auch trotz geringer VRF schon eine Therapieresistenz induzieren.³⁵ Mit M³P wird eine longitudinale Analyse durch Sequenzierung sequenzieller Tumorproben, also von Tumorproben bei Diagnosestellung und beispielsweise bei Rezidiven, technisch machbar. Es können wichtige Aussagen über die genetische Heterogenität des Tumors und seine therapieinduzierten Veränderungen getroffen werden.³⁶ Auch die zuvor beschriebenen Muster klonaler Evolution mit möglichen Zugewinnen und Verlusten von CNAs sind konsistent mit den Veränderungen, die mittels zielgerichtetem NGS feststellbar sind. Es kommt unter Therapie sowohl zur signifikanten Zunahme von CNAs, also zu

Veränderungen auf chromosomaler Ebene, als auch zur signifikanten Zunahme der Mutationsfrequenz, also zu Veränderungen auf Ebene der einzelnen Gene.^{3, 32, 37} Zudem sind vor Therapiebeginn die Mutationen noch über die kompletten Gene verteilt, während bei vorbehandelten Patienten eine Clusterung der Mutationen in Hotspots des Gens feststellbar ist.³⁷ Dies könnte hinweisend sein für die Auswirkungen dieser Mutationen auf klonale Selektion, Krankheitsprogression und Medikamentenresistenz. Die Gene des CRBN-Signalwegs waren in einer M³P-basierten Untersuchung bei 22 % der RRMM-Patienten mutiert und soweit bekannt waren diese Patienten alle IMiD-refraktär.³⁸ *IKZF1* war eines der Gene dieses Signalwegs, bei dem es zu einer relativen Häufung von Mutationen unter Therapie kam.³⁷ Die nachfolgend beschriebenen patientenspezifischen Punktmutationen wurden mittels des M³P-Protokolls identifiziert, das bei Barrio et al. (2018) und Barrio et al. (2020) nachgelesen werden kann.^{36, 37}

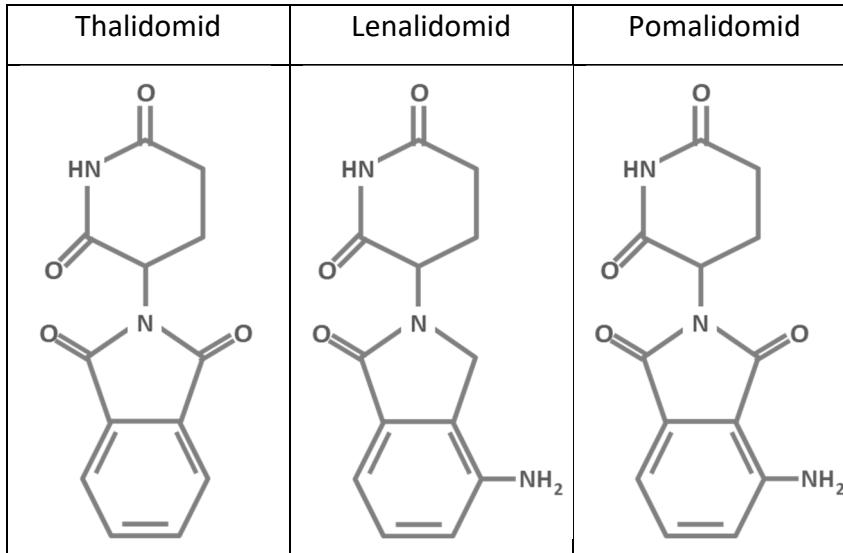
1.6 Immunmodulierende Medikamente (IMiDs)

1.6.1 Historische Entwicklung und Unterschiede der IMiDs

Immunmodulierende Medikamente stellen eine der Säulen in der Behandlung des multiplen Myeloms dar. Dazu gehören Thalidomid, Lenalidomid (Len) und Pomalidomid.³⁹ Thalidomid wurde im Jahr 1957 bei Unbedenklichkeit in Versuchen mit Mäusen ursprünglich mit dem Namen Contergan als nicht-verschreibungspflichtiges Sedativum und Mittel gegen Schwangerschaftserbrechen auf den Markt gebracht und in vielen Ländern verbreitet.^{6, 39} Da Thalidomid bei Einnahme im ersten Trimester zu gravierenden teratogenen Fehlbildungen führte und circa 10000 Kinder hiervon betroffen waren, wurde es mit dieser Zulassung vom Markt genommen.⁶ Jedoch wurden unter anderem Lepra, Morbus Behcet und HIV-assoziierte orale Ulcera in den folgenden Jahrzehnten damit behandelt.⁶ 1997 zeigte Thalidomid in einer Studie Ansprechraten bisher nicht gekanntes Ausmaßes bei der Therapie des multiplen Myeloms.⁶ 2006 wurde Thalidomid in der Erstlinientherapie des multiplen Myeloms von der FDA zugelassen.³⁹

Mit dem Erfolg von Thalidomid wurde in den 1990er Jahren begonnen Analoga zu entwickeln, die eine verbesserte Wirkung bei verringerter Toxizität aufweisen sollten.⁶

Tabelle 4: Chemische Struktur der IMiDs, basierend auf Holstein et al. (2017)³⁹



Lenalidomid ist hierbei ein 4-Amino-substituiertes Thalidomid-Analogon und gehört wie Thalidomid zur Klasse der IMiDs (vgl. Tabelle 4).⁶ Lenalidomid war auch wirksam bei rezidierten und refraktären multiplen Myelomen, die zuvor mit Thalidomid behandelt wurden, mit weniger Thalidomid-typischen Nebenwirkungen wie Müdigkeit und Neuropathie.⁴⁰ Die Überlegenheit von Lenalidomid konnte in mehreren Therapiestudien mit neu diagnostizierten und refraktären/rezidierten multiplen Myelomen bewiesen werden und das Medikament wurde für Erst- und Zweitlinientherapien zugelassen.³⁹ Inzwischen wird Thalidomid deutlich seltener verschrieben, während Lenalidomid als Einzel- oder Teil einer Kombinationstherapie ausgedehnte Verwendung findet in der Induktionstherapie neu diagnostizierter multipler Myelome, sowohl bei transplantationsgeeigneten als auch -ungeeigneten Patienten, in der Erhaltungstherapie und bei RRMM-Patienten.³⁹ Typische Nebenwirkungen von Lenalidomid sind die Myelosuppression mit Neutropenie, Anämie, Thrombozytopenie sowie Infektionen.⁴¹ 2013 erfolgte die FDA-Zulassung von Pomalidomid als Drittlinientherapeutikum beim RRMM.³⁹ Pomalidomid in Kombination mit Dexamethason zeigte auch bei Thalidomid- und Lenalidomid-refraktären Patienten ein Therapieansprechen.⁴² Nebenwirkungen

betreffen ebenfalls meist das hämatopoetische System, sowie Pneumonien und Fatigue.³⁹ Des Weiteren erhöhen IMiDs das Risiko für venöse und arterielle thromboembolische Komplikationen, wofür eine Prophylaxe erfolgen sollte.³⁹ Zudem muss eine Aufklärung der Patienten über teratogene Effekte erfolgen und eine wirksame Kontrazeption bei Einnahme eines IMiDs gewährleistet sein.⁴¹ Auch das Risiko für Zweitmalignome wird durch die Einnahme von Lenalidomid erhöht, insbesondere nach Transplantation oder in Kombination mit Melphalan.⁴¹

1.6.2 Wirkweise der IMiDs

Seit 1994 ist bekannt, dass IMiDs eine antiangiogene Wirkung haben.⁴³ Auch wusste man von entzündungshemmenden Eigenschaften, die auf die Inhibierung des von Monozyten ausgeschütteten Tumornekrosefaktors (TNF- α) zurückgeführt wurden.⁴⁴ Zudem hatte man immunmodulierende Effekte durch die Kostimulation von T-Zellen festgestellt, welche die Interleukin 2 (IL-2) vermittelte T-Zell Proliferation und die Interferon γ Produktion verstärken.⁴⁵ Die genaue Wirkweise der pleiotropen Effekte der IMiDs war bei Zulassung noch weitgehend unklar.³⁹ 2010 wurde Cereblon (CRBN) als Thalidomid-bindendes Protein identifiziert, das von dem Gen *CRBN* kodiert wird und Teil des E3 Ubiquitin Ligase Komplexes ist.⁴⁶ Durch Bindung von Thalidomid an diesen Komplex entstehen letztlich teratogene Effekte.⁴⁶ Als weitere Komponenten dieses E3 Ubiquitin Ligase Komplexes wurden DDB1 („damaged DNA binding protein 1“), CUL4 („cullin-4“) und ROC1 („regulator of cullins 1“) ermittelt.⁴⁶ Ein Jahr später wurde festgestellt, dass CRBN nicht nur an der Teratogenität von Thalidomid beteiligt ist, sondern auch erforderlich ist für die antitumoröse Wirkung der IMiDs beim Myelom.⁴⁷ Das Ausschalten von *CRBN* war zunächst zytotoxisch für die Myelomzellen, überlebende Myelomzellen mit persistierendem Verlust von *CRBN* zeigten eine deutliche Resistenz gegen Lenalidomid und Pomalidomid.⁴⁷

1.6.3 IKZF1/3 als Hauptkomponenten im IMiD-CRBN Signalweg

2014 fanden zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander heraus, dass die „Ikaros family zinc finger proteins“ Ikaros (IKZF1) und Aiolos (IKZF3) eine Schlüsselrolle im Signalweg der IMiD-CRBN Wirkung spielen.^{39, 48, 49}

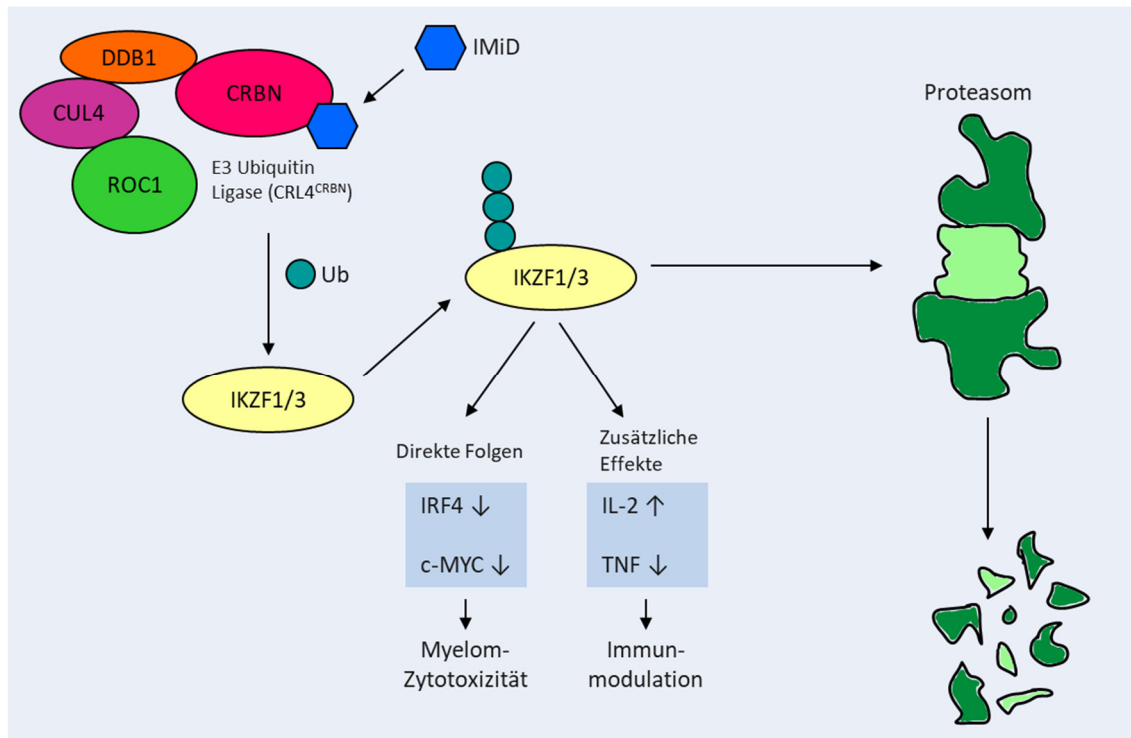


Abbildung 2: Wirkweise der IMiDs, modifiziert nach Stewart (2014)⁵⁰

Durch Massenspektrometrie wurde von Krönke et al. (2014) festgestellt, dass Lenalidomid analog zu Thalidomid an CRBN und DDB1 bindet und zusammen mit CUL4 und ROC1 den E3 Ubiquitin Ligase Komplex (CRL4^{CRBN}) bildet (vgl. Abbildung 2).⁴⁸ Bei Anwesenheit von Lenalidomid geht CRBN als Substratrezeptor eine verstärkte Bindung mit IKZF1/3 ein.⁴⁸ Bei IKZF1 (Ikaros) und IKZF3 (Aiolos) handelt es sich um lymphoide Transkriptionsfaktoren, die durch die Gene *IKZF1* bzw. *IKZF3* kodiert werden und eine wesentliche Rolle im multiplen Myelom spielen.⁴⁸ Die enzymatische Wirkung der CRL4^{CRBN} E3 Ubiquitin Ligase führt nachfolgend zur Markierung der Neo-Substrate IKZF1 und IKZF3 mit Ubiquitin, wodurch deren Proteolyse freigegeben wird.⁴⁸ Die proteasomale Degradation von IKZF1 und IKZF3 in Myelomzelllinien ist notwendig und ausreichend, damit Lenalidomid wirksam ist.⁴⁹ Ohne intaktes IKZF1/3 und intaktes CRBN zeigt Lenalidomid keinen Effekt.⁴⁹ Die IMiD-induzierte Abnahme von Aiolos und Ikaros

führt zu einer Herunterregulierung der im Signalweg weiter downstream gelegenen Transkriptionsfaktoren c-MYC und IRF4 („Interferon regulatory factor 4“).⁵¹ IRF4 wird als Faktor für das Überleben der Myelomzellen gesehen und c-MYC ist nicht nur beim Myelom wichtig für Zellwachstum und Proliferation.^{52, 53} Da beide ein Zielgen des jeweils anderen Transkriptionsfaktors sind, beeinflussen sie sich gegenseitig.⁵³ Die Herabregulation von c-MYC und IRF4 geht einher mit Zellzyklusarrest, Einleitung der Apoptose und letztlich Zelltod.^{51, 52} Auch für die zuvor schon festgestellten immunmodulierenden Effekte der IMiDs sind Ikaros und Aiolos von Bedeutung. Durch Abbau von IKZF3 wird die Hemmung der IL-2 Produktion der T-Zellen aufgehoben und die T-Zellen werden aktiviert.^{48, 54} Der Funktionsverlust von IKZF1/3 führt außerdem über Zwischenschritte zu einer erhöhten Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) beim multiplen Myelom.⁵⁵ Neben Aiolos und Ikaros wird auch Casein-Kinase 1 α (CK1 α) durch die Lenalidomid-bedingte veränderte Substratspezifität des E3 Ubiquitin Ligase Komplexes ubiquitinyliert und anschließend abgebaut.⁵⁶ Da das Gen für CK1 α (*CSNK1A1*) auf dem langen Arm von Chromosom 5 lokalisiert ist, stellt vor allem die Behandlung von del(5q) MDS (Myelodysplastisches Syndrom) mit Lenalidomid eine wirksame Therapieoption dar.⁵⁶ Auch beim multiplen Myelom spielt die Serin/Threonin-Kinase CK1 α eine Rolle. Ihre Funktion ist wesentlich für das Überleben maligner Plasmazellen.⁵⁷ Die zytotoxischen Effekte von Lenalidomid werden bei der Myelomtherapie durch Inaktivierung von CK1 α verstärkt.⁵⁷ Insgesamt haben IMiDs zytotoxische, anti-proliferative, anti-inflammatorische, anti-angiogenetische und immunmodulierende Effekte, die teilweise über den CRBN-Signalweg vermittelt werden. In manchen Studien wurde postuliert, dass *CRBN*, *IKZF1* und *IKZF3* einen prognostischen Wert bezüglich des Krankheitsverlaufs und des Überlebens beim RRMM haben oder prädiktiv für das Ansprechen auf IMiDs sein können, zum Teil mit widersprüchlichen Ergebnissen.⁵⁸⁻⁶¹ Von anderen Autoren wurde deren Aussagekraft im klinischen Setting hingegen angezweifelt.^{62, 63}

1.6.4 Essenzielles Sequenzmotiv in IKZF1/3 für Lenalidomid-Sensitivität

Für IKZF3 als ein enzymatisches Substrat des CRL4^{CRBN} Komplexes sollte ein Degron identifiziert werden, also ein Proteinabschnitt in IKZF3, das für den Proteinabbau und

damit für die Lenalidomid-Sensitivität verantwortlich ist.⁴⁸ Durch Schaffung verschiedener Mutanten mit Deletionen unterschiedlicher Position und Länge wurde eine 58 Aminosäuren lange Sequenz identifiziert, die ausreichend ist für die Lenalidomid-Sensitivität, wovon 30 Aminosäuren essenziell sind (vgl. Abbildung 3).⁴⁸

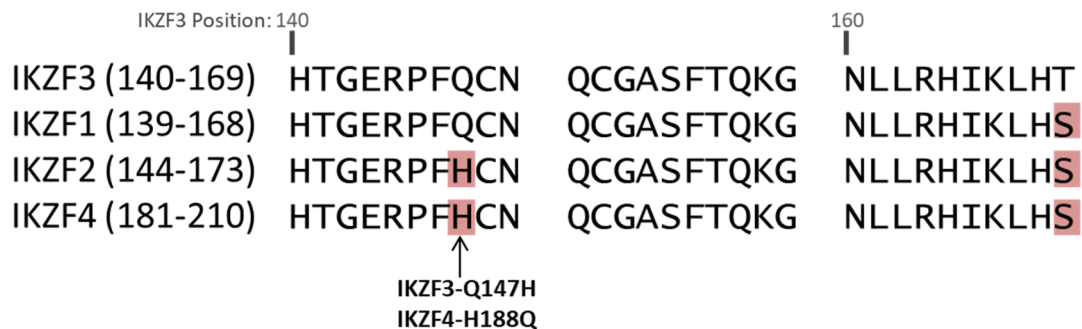


Abbildung 3: Essenzielle Sequenz für die Lenalidomid-Sensitivität, modifiziert nach Krönke et al. (2014)⁴⁸

Diese Sequenz liegt größtenteils innerhalb des N-terminalen Zinkfingerproteins 2, welcher bei Vorhandensein von mindestens zwei weiteren Zinkfingern funktionell ist und die DNA-Bindungsdomäne darstellt.^{48, 64} Dieser Bereich ist bei IKZF1 und IKZF3 annähernd identisch und auch sehr homolog zwischen den Mitgliedern der Ikaros-Familie, zu denen neben IKZF1/3 unter anderem noch IKZF2, 4 und 5 gehören.^{48, 65} IKZF2 und 4 unterscheiden sich von IKZF1 und 3 nur durch Austausch einer Aminosäure im mittleren Bereich dieses Degrons und weisen eine Unempfindlichkeit gegen Lenalidomid-induzierten Abbau auf.⁴⁸ Bei Austausch dieser abweichenden Aminosäure von IKZF4 durch die bei IKZF1/3 vorkommende Aminosäure ist IKZF4-H188Q in Western Analysen sensitiv für Lenalidomid und bei Austausch von IKZF1/3 mit der analog in IKZF2/4 vorkommenden Aminosäure ist IKZF3-Q147H bzw. IKZF1-Q146H resistent.^{48, 49} Weitere Analysen von MM1.S Zellen nach Transduktion von IKZF1-Q146H und IKZF3-Q147H mittels retro- bzw. lentiviraler Vektoren ergaben, dass diese Mutationen auch in durchflusszytometrischen Messungen und Zellproliferationsassays eine Resistenz vermitteln.^{48, 49} Daher reicht die Abweichung einer Aminosäure in diesem Degron-Abschnitt, um eine Resistenz auf Lenalidomid zu induzieren und damit die Zellwachstumsblockade aufzuheben.⁴⁸ Somit kann dieser 30 Aminosäuren lange Bereich als essenziell für die Lenalidomid-Sensitivität angesehen werden.⁴⁸

1.6.5 Physiologische Funktion von Ikaros und Aiolos

Physiologisch bedeutsam sind Aiolos (IKZF3) und Ikaros (IKZF1) für der Entwicklung und Differenzierung der Lymphozyten, sie beeinflussen gemeinsam die B- und T-Zell Entwicklung.^{64, 65} IKZF1 wird vor allem in der frühen Hämatopoese exprimiert und leitet die Entwicklung lymphoider Vorläuferzellen aus pluripotenten Stammzellen ein.⁶⁵ IKZF3-Expression dominiert hingegen bei der späteren Weiterentwicklung der B- und T-Zellen, insbesondere bei reiferen B-Lymphozyten, und könnte damit wichtig für deren Differenzierung sein.⁶⁵ IKZF3 ist bedeutsam für die Bildung langlebiger, hochaffiner Plasmazellen des Knochenmarks.⁶⁶

1.6.6 Ikaros-Zinkfingerproteine und deren funktionelle Domänen

Die verschiedenen Proteine der Ikaros-Familie können miteinander Komplexverbindungen eingehen.⁶⁷ Dadurch weisen sie eine deutlich verstärkte DNA-Affinität auf und können ihre Funktion als Transkriptionsfaktoren vermehrt ausüben.⁶⁷ Diese Komplexbildung geschieht durch Homo- bzw. Heterodimerisierung von Ikaros und Aiolos.^{67, 68} Die für die Dimerisierung verantwortliche Region und damit Grundlage für eine stabile DNA-Bindung ist die C-terminale Domäne.⁶⁷ Diese beinhaltet zwei Zinkfinger und ist annähernd identisch für die Mehrheit der Ikaros Proteine.^{65, 67} Auf der N-terminalen Seite der Ikaros Proteine befindet sich die DNA-Bindungsdomäne, die bei Aiolos und Ikaros je vier Zinkfinger mit annähernd übereinstimmenden Sequenzen aufweist.^{67, 69} Eine weitere von Sun et al. (1996) postulierte Domäne stellen die ersten 154 von Exon 7 kodierten Aminosäuren dar, welche starke Transaktivierungseigenschaften aufweisen würden.⁶⁷ Insbesondere die ersten 81 von Exon 7 kodierten Aminosäuren, also upstream der Dimerisierungsdomäne gelegen, seien eine Aktivierungsdomäne zur Expression von β -Galactosidase und *Leu2* Genen.⁶⁷ Für diese Aktivierungsdomäne wurde von Koipally et al. (2002) jedoch mittels verschiedener Punktmutationen und Deletionen gezeigt, dass diese bei Ikaros nicht notwendig sei.⁷⁰ Für die Aktivierung der Transkription sind nur intakte Dimerisierungs- und DNA-Bindungsdomänen notwendig.⁷⁰

1.7 In Patienten identifizierte Mutationen in IKZF1/3

In bisherigen Studien wurden ausschließlich artifizielle Mutationen eingefügt.^{48, 49, 67, 70} Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten nun Mutationen untersucht und in ihren funktionellen Effekten charakterisiert werden, die durch NGS-Techniken bei Patienten mit rezidiviertem/refraktärem multiplen Myelom gefunden wurden. Die Daten der Panel-Sequenzierung von vorbehandelten Patienten stammen aus verschiedenen Kohorten des in Kapitel 1.5 beschriebenen M³-Panels.^{34, 37, 38, 71, 72} Hierbei wurde unter Therapie eine Zunahme der Häufigkeit von Mutationen in mehreren Genen festgestellt, darunter Punktmutationen in *IKZF1* und *IKZF3*, die zu einem Austausch einer Aminosäure führten.³⁷ Mittels Analysen der Auswirkungen dieser sogenannten Missense-Mutationen auf die Form und Stabilität der entsprechenden Proteine wurden einzelne Mutationen ausgewählt, deren abweichend kodierte Aminosäuren nachfolgend aufgeführt sind (vgl. Tabelle 5).³⁷ Bei allen in der Tabelle enthaltenen Fällen handelt es sich um Patienten, die bereits eine Therapie erhalten hatten.

Tabelle 5: Patientenspezifische Mutationen in *IKZF1* und *IKZF3*, modifiziert nach Barrio et al. (2020)³⁷; AS: Aminosäure, Mut: Mutation, Len: Lenalidomid

Gen	Kohorte	IMiD-behandelt	IMiD-refraktär/rezidiert	Chromosom	VRF (%)	VRF (%) bei Diagnose	VRF bei Nachuntersuchung (%)	AS-Austausch	AS-Wildtyp	Mutierte AS	Mut in Len-Sequenz
IKZF1	M ³ P	Ja	Ja	Chr7	31	-	-	A152T	unpolar	polar	Ja
IKZF1	M ³ P	Unbekannt	Unbekannt	Chr7	4	-	-	A152T	unpolar	polar	Ja
IKZF1	M ³ P	Ja	Unbekannt	Chr7	28	-	37	E170D	sauer	sauer	In der Nähe
IKZF1	M ³ P	Unbekannt	Unbekannt	Chr7	4	-	-	Y413C	polar	polar	Nein
IKZF1	M ³ P	Nein	Nein	Chr7	4	-	-	R439H	basisch	basisch	Nein
IKZF3	M ³ P	Ja	Ja	Chr17	51	10	-	G159R	polar	basisch	Ja

Bei *IKZF1* traten an Position 152 bei zwei Patienten dieselbe Punktmutation auf, wodurch das unpolare Alanin durch das polare und mit einer funktionellen Gruppe versehene Threonin ersetzt wurde. Einer der Patienten wurde zuvor mit IMiDs behandelt und zeigte hierauf einen refraktären bzw. rezidivierten Verlauf. Die VRF von 31 % spricht dafür, dass diese Mutation in der Mehrzahl der MM Zellen vorliegt. Der andere Patient ist ebenfalls vorbehandelt, jedoch ist unbekannt mit welcher Substanz und ob eine IMiD-Refraktärität/Rezidiv vorlag. Die VRF von 4 % deutet darauf hin, dass

diese Mutation nur einen untergeordneten Teil der MM Zellen betrifft. Eine weitere Punktmutation bei IKZF1 trat an Position 170 auf mit Austausch von Glutaminsäure durch Asparaginsäure. Bei beiden handelt es sich um saure Aminosäuren. Dieser Patient wurde mit IMiDs vorbehandelt, ob es zu einem refraktären/rezidierten Verlauf kam, ist unbekannt. Die Abnahme der VRF auf zuletzt 28 %, während bei einer vorherigen Nachuntersuchung unter Therapie die VRF noch 37 % betrug, lässt auf einen sinkenden Anteil von MM Zellen mit dieser Mutation schließen und könnte tendenziell auf ein Therapieansprechen hinweisen. Im C-terminalen Bereich von IKZF1 traten nah beieinander gelegen bei zwei Patienten Mutationen auf. Zum einen an Position 413, bei dem es zu einem Ersatz des polaren Tyrosins durch das ebenfalls polare Cystein kam. Bei diesem Patienten ist nur bekannt, dass eine Vorbehandlung bestand, jedoch ist unbekannt welche Substanz verwendet wurde und ob eine IMiD-Refraktärität oder ein Rezidiv vorlag. Die VRF mit 4 % deutet darauf hin, dass diese Mutation nur in wenigen MM Zellen vorliegt. Die andere Mutation in diesem C-terminalen Bereich liegt an Position 439 mit einem Austausch des basischen Arginins durch das ebenfalls basische Histidin. Der Patient wurde zwar vorbehandelt, aber nicht mit IMiDs und war auch nicht IMiD-refraktär oder hatte ein Rezidiv unter IMiD-Therapie. Es ist daher nicht anzunehmen, dass sich diese Mutation durch Selektionsdruck unter IMiD-Therapie entwickelte. Aufgrund der VRF von 4 % ist ebenfalls zu vermuten, dass die Mutation im MM Holotumor nicht weit verbreitet ist.

Bei IKZF3 trat eine Mutation an Position 159 auf, wodurch das polare Glycin durch das basische Arginin ersetzt wurde. Der Patient wurde zuvor mit IMiDs behandelt und zeigte hierunter einen IMiD-refraktären Verlauf bzw. ein Rezidiv. Es waren sequenzielle Proben des Tumors vorhanden, die VRF war bei Diagnosestellung mit 10 % deutlich niedriger als am zuletzt analysierten Zeitpunkt (VRF von 51 % = klonal, also quasi in allen MM Zellen vorhanden). Folglich kam es zu einer Zunahme der Mutation unter Therapie, die auch (mit)verantwortlich an dem refraktären/rezidierten Verlauf gewesen sein könnte. Bei einem anderen, ebenfalls vorbehandelten Patienten aus der CoMMpass IA12 Studie trat an der gleichen Position eine Mutation auf und in deren Folge wurde Glycin durch Alanin

ersetzt. Eine Mutation an dieser Stelle könnte daher eine Rolle bei klonaler Evolution und Krankheitsprogression spielen.

Nur bei IKZF1-A152T und IKZF3-G159R treten neben modifizierten Eigenschaften der Seitenketten auch ein Wechsel der Polarität bzw. des Säuren- oder Basencharakters auf. Es ist davon auszugehen, dass diese bedeutsamen Änderungen ausgeprägtere Konsequenzen für die Tertiär- und Quartärstruktur und damit auf die räumliche Formation haben. Dies könnte wiederum zu einer veränderten Bindung des E3 Ubiquitin Ligase Komplexes an IKZF1/3 führen und sich letztlich auch auf die Lenalidomid-Sensitivität auswirken.

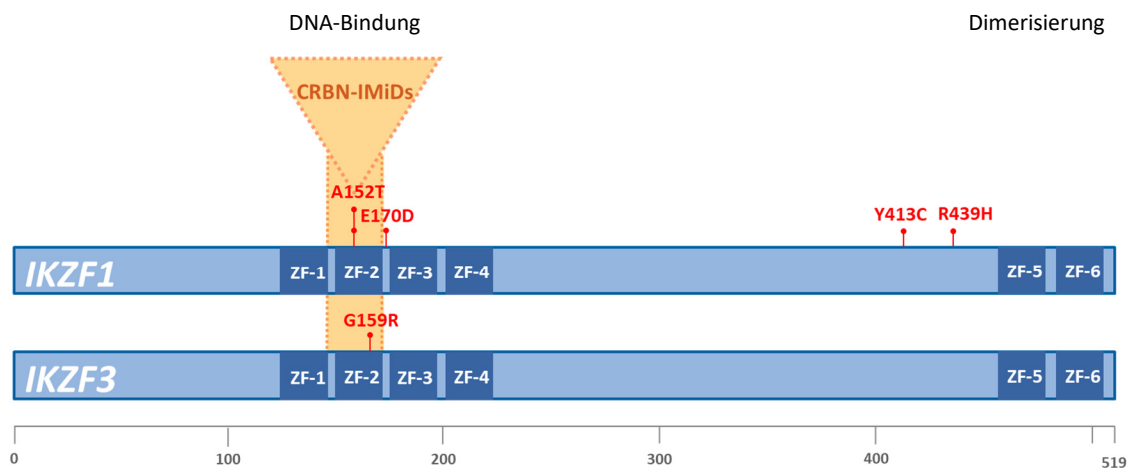


Abbildung 4: Lokalisationen der patientenspezifischen Mutationen in IKZF1/3, modifiziert nach Barrio et al. (2020)³⁷; ZF: Zinkfinger

Aus Payne (2011) wurden die Aminosäure-Sequenzen der Zinkfinger und aus Krönke et al. (2014) wurde die für die Lenalidomid-Sensitivität essenzielle Degron-Sequenz übernommen und mittels DNA-Analyse Software (SnapGene, GSL Biotech LLC, Chicago, USA) mit der Lage der patientenspezifischen Mutationen verglichen.^{48, 73} Bei IKZF3 ist die Mutation G159R im mittleren Bereich des als wesentlich definierten Degrons (IKZF3: 140-169) in Zinkfinger 2 lokalisiert (vgl. Abbildung 4). Bei IKZF1 lässt sich feststellen, dass es zu einer Clusterung der Mutationen kommt. Zum einen am N-Terminus in und um die von Krönke identifizierte Sequenz (IKZF1:139-168). So liegt die Mutation A152T mittig in diesem Abschnitt und in der vorderen Hälfte von Zinkfinger 2. Die Mutation E170D ist in dem Verbindungsstück zwischen Zinkfinger 2 und 3 lokalisiert und damit knapp außerhalb dieses Degrons, könnte jedoch in dem 58 Aminosäuren langen Bereich liegen,

der ausreichend sei für Lenalidomid-Sensitivität.⁴⁸ Diese Mutationen lassen daher einen Effekt erwarten, jedoch unklaren Ausmaßes. Zum anderen clustern die Mutationen C-terminal. Laut Sun et al. (1996) sind die C-terminalen Zinkfinger 5 und 6 wichtig für die Dimerisierung und Interaktion der Ikaros Proteine.⁶⁷ Die Mutationen Y413C und R439H sind jedoch weiter upstream lokalisiert und befinden sich vermutlich auch nicht in der von Sun et al. (1996) postulierten und nur fraglich existenten Aktivierungsdomäne.⁶⁷ Somit liegen diese beiden Mutationen in einem Bereich, der bei IKZF1 keine spezifische, eindeutige Funktion aufweist, soweit bisher beschrieben. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass diese Region beispielsweise durch destabilisierende Einflüsse oder Einschränkungen der Bindungsfähigkeit für die Entwicklung von Therapieresistenzen eine noch unbekanntere Bedeutung hat. Daher sollten im Folgenden auch die Mutationen in diesem Bereich durch proteomanalytische Methoden und funktionelle Messungen der Zellviabilität bzw. des Zelltods nach Lenalidomid-Behandlung untersucht werden. Dazu mussten Expressionsvektoren für die mutierten IKZF-Proteine hergestellt und in verschiedene Myelomzelllinien transfiziert werden.

1.8 Fragestellungen der Arbeit

- Haben die *in vivo* aufgetretenen Mutationen auch *in vitro* Implikationen für die Lenalidomid-Sensitivität und damit Einfluss auf mögliche Therapieresistenzen?
- Weisen die Mutationen IKZF1-A152T bzw. IKZF3-G159R eine Lenalidomid-Resistenz auf, wie es die Lokalisation in der von Krönke identifizierten Sequenz erwarten lässt?
- Hat die Mutation IKZF1-E170D, obwohl schon knapp außerhalb der essenziellen Degron-Sequenz, einen Einfluss auf die Lenalidomid-Sensitivität?
- Gibt es einen neuen C-terminalen Hotspot für Mutationen (IKZF1-Y413C bzw. IKZF1-R439H) upstream der Dimerisierungsdomäne, der Lenalidomid-Resistenz vermittelt?
- Welche Auswirkungen haben die Mutationen auf die IKZF Proteinexpression unter Lenalidomid-Behandlung?

- Bewirken die IKZF-Mutationen in funktionellen Analysen wie dem alamarBlue-Assay (Zellviabilitätsuntersuchung) und der Annexin V-PI Durchflusszytometrie (Zelltodassay) messbar veränderte IMiD-Sensibilität?

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Primerdesign

Anhand der in der Genbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) hinterlegten mRNA-Sequenzen von *IKZF1* und *IKZF3* wurden mit der Software SnapGene (GSL Biotech LLC, Chicago, USA) Standard-PCR-Primer und Mutationsprimer erstellt und anschließend bei Sigma-Aldrich bestellt (DNA Oligos in Tubes). Um die cDNA-Gene zu amplifizieren und anschließend zu klonieren, wurden in die PCR-Primer die Schnittstellen NheI (GCTAGC) bzw. NotI (GCGGCCGC) eingefügt. Zur besseren Stabilität und Spezifität wurden noch weitere komplementäre Basen angefügt, sodass die Primer circa 30 Nucleotide umfassten (vgl. Beispiel in Abbildung 5).

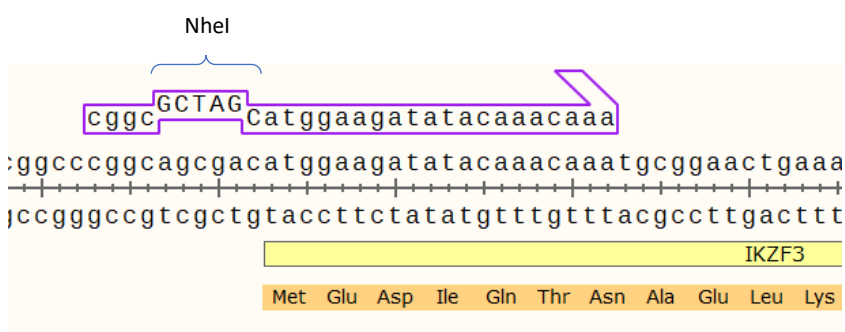


Abbildung 5: Vorwärts-Primer zur cDNA-Amplifikation von *IKZF3* mit leserastergerecht eingefügter Schnittstelle für NheI. Abbildung erstellt mittels SnapGene

Bei *IKZF1* zeigte sich, dass zunächst kein PCR-Produkt generiert werden konnte, sodass ein um fünf Basen verlängerter 5'-Primer (*IKZF1*-5pr-B) eingesetzt werden musste. Für die Mutationsprimer, die dem Einfügen von Punktmutationen in das Gen dienten, wurde eine Primerlänge von 35 Basen gewählt, mit jeweils 17 Basen vor und nach der auszutauschenden Base. Diese wurden HPLC gereinigt bestellt, was zu einer größeren Reinheit führen sollte, im Unterschied zu den nur entsalzten Standard-PCR-Primern. Die Sequenzen der einzelnen Primer können dem Abschnitt „Kolonie-PCR-, Klonierungs-, Mutations- und Sequenzierungsprimer“ des Kapitels „2.4 Materialienliste“ entnommen werden. Die DNA-Oligonukleotide wurden so in dH₂O gelöst, dass eine Stoffmengenkonzentration von 100 µM entstand.

2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können DNA-Sequenzen exponentiell vervielfältigt werden und gleichzeitig ist es durch das Primerdesign möglich, endständige Restriktionsschnittstellen einzufügen. Eine PCR besteht aus mehreren Zyklen und jeder Zyklus aus drei Phasen: Denaturierung, Anlagerung der Primer, Elongation. In der Phase der Denaturierung werden die Doppelstränge in die beiden Einzelstränge aufgetrennt, damit im nächsten Schritt die Primer spezifisch an die DNA anlagern können. In der Elongationsphase werden die Primer dann mittels DNA-Polymerasen verlängert, indem freie Nukleotide (dNTPs) komplementär zum Hauptstrang angefügt werden. Damit die Polymerase arbeiten kann, wurde noch ein entsprechender Puffer benötigt. Um diese Reaktionen zu ermöglichen, wurde der nachfolgende Ansatz verwendet.

25 µl Ansatz: 2,5 µl 10x DreamTaq Puffer
2,5 µl dNTPs (1,25 mM)
1 µl 5'-Primer (10 µM)
1 µl 3'-Primer (10 µM)
0,2 µl DreamTaq Polymerase
1 µl Template
16,8 µl dH₂O

Als Template wurden sowohl für die PCR von *IKZF1* als auch für *IKZF3* zunächst verschiedene cDNAs von Zelllinien verwendet wie L1236 (Hodgkin Lymphom Zelllinie), L-428 (Hodgkin Lymphom Zelllinie), HEK293 (embryonale Nierenzelllinie), JN-3 (Myelomzelllinie). Zudem wurde eine Leerkontrolle mit 1 µl dH₂O angesetzt. Dieser Ansatz wurde mit dem Vortexer gemischt, kurz zentrifugiert und anschließend wurde im Thermocycler eine PCR gestartet.

	Initiale Denaturierung:	2 min 94 °C
5x	Denaturierung:	1 min 94 °C
	Primeranlagerung:	1 min 55 °C (abhängig von Primerlänge und Spezifität)
	Elongation:	2 min 72 °C (30 sec je 500 bp)
35x	Denaturierung:	1 min 94 °C
	Primeranlagerung:	1 min 65 °C
	Elongation:	2 min 72 °C (30 sec je 500 bp)

Das Vorgehen mit zwei unterschiedlichen Primeranlagerungs-Temperaturen wurde verwendet, da eine niedrigere Temperatur zu Beginn die Hybridisierung der nicht perfekt matchenden Primer begünstigt, wenn auch mit dem Nachteil, dass es potenziell zu unspezifischen Anlagerungen kommen kann. In den 35 Zyklen mit der höheren Annealing-Temperatur binden die Primer dann als „perfect match“ an die neu synthetisierten Amplifikationsprodukte. Die relativ inkorrekt arbeitende, aber robuste Taq-Polymerase wurde gewählt, um initial zu prüfen, ob mit dem jeweiligen Template ein spezifisches PCR-Produkt mit der erwarteten Größe in der Agarose-Gelelektrophorese sichtbar sein würde. Für *IKZF3* war die L-428 cDNA am besten geeignet, da sie eine deutliche Bande auf der richtigen Höhe (circa 1550 bp) lieferte und somit als Template in einer PCR mit der teuren aber nahezu fehlerfrei arbeitenden Q5-Polymerase verwendet werden konnte. Bei *IKZF1* entstand trotz Variation verschiedener Parameter wie Primeranlagerungstemperatur, unterschiedlichen Templates, Herstellung frischer cDNA aus RNA etc. kein PCR-Produkt. Daher wurde als Matrize das Plasmid pMSCV-FLAG-hIKAROS-IRES-GFP von Addgene (Cambridge, USA) gekauft, welches von Ria Baumgrass zur Verfügung gestellt wurde.⁷⁴ Das Plasmid wurde in Bakterien transformiert im Agarstab geliefert, im Labor auf einer Agarplatte ausgestrichen, über Nacht im Brutschrank inkubiert, als DNA-Minipräparation isoliert (s. Kapitel 2.1.9) und auf eine Konzentration von circa 20 ng/μl verdünnt. Es wurde erneut eine PCR durchgeführt, wobei ein auf das Plasmid abgestimmter Vorwärtsprimer und eine Anlagerungstemperatur von 55 °C (20 Zyklen) gewählt wurden. Nun entstand ein PCR-Produkt in der richtigen Größe (ca. 1640 bp).

Da das zu klonierende *IKZF1* cDNA-Gen außer den später einzufügenden Punktmutationen keine Fehler aufweisen sollte, wurde die PCR wiederum mit der High-Fidelity Q5 Polymerase wiederholt.

25 µl Ansatz: 5 µl 5x Q5 Puffer
2 µl dNTPs (1,25 mM)
1,25 µl 5'-Primer (10 µM)
1,25 µl 3'-Primer (10 µM)
0,25 µl Q5 Polymerase
1 µl Template
14,25 µl dH₂O

Als Template für *IKZF1* wurde das Addgene-Plasmid verwendet (~20 ng/µl), für *IKZF3* die cDNA von L-428. Nach Mischen und kurzem Zentrifugieren wurde der Thermocycler mit folgenden Einstellungen gestartet:

Initiale Denaturierung: 30 sec | 98 °C

5x	{	Denaturierung:	30 sec 98 °C
		Primeranlagerung:	30 sec 51 °C (abhängig von Primerlänge und Spezifität)
		Elongation:	1 min 72 °C
30x	{	Denaturierung:	30 sec 98 °C
		Primeranlagerung:	30 sec 65 °C
		Elongation:	1 min 72 °C

dann 2 min | 72 °C

Es wurden Zyklenzahlen zwischen 25 und 43 Wiederholungen verwendet.

2.1.3 DNA-Gelelektrophorese

Nach jeder PCR wurde eine DNA-Gelelektrophorese durchgeführt, um die Produkte zu analysieren. Das Prinzip beruht auf der unterschiedlich schnellen Wanderung linearer DNA im elektrischen Feld in einem einprozentigen Agarose-Gel abhängig von der Größe

der negativ geladenen Nukleinsäuren. Zunächst wurde das Gel präpariert, indem 0,5 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und mit 2 µl HD Green DNA Dye (Intas Science Imaging, Göttingen) versetzt, in einer Kammer gegossen und mit eingebrachtem Geltaschenkamm ausgehärtet wurde. Das ausgekühlte Gel wurde in die mit TAE-Puffer befüllte Gelelektrophoreseapparatur gesetzt, und die PCR-Reaktionen wurden im Verhältnis 5:1 mit DNA loading dye gemischt und aufgetragen. Als Längenstandard wurde 2 µl eines DNA-Markers (GeneRuler™ 1kB DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Es wurde ein elektrisches Feld mit ~100 V angelegt. Zur DNA-Analyse wurde das Gel mit UV-Licht bestrahlt, sodass die fluoreszenzmarkierten DNA-Banden sichtbar wurden.

2.1.4 Gelextraktion

Wenn die DNA kloniert werden sollte, musste das PCR-Produkt aus dem Agarosegel isoliert werden. Dazu wurde es mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend mittels des Nucleospin Gel and PCR Clean-Up Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt. Das Gelfragment wurde in NTI Puffer mittels Wärme gelöst und dann auf eine Säule mit einer Silikamembran überführt und zentrifugiert. Dabei verblieben die Nukleinsäuren in der Säule, während der Durchlauf verworfen werden konnte. Nachfolgend wurde die Säule mit ethanolhaltigem NT3 Puffer gewaschen, um Kontaminationen zu entfernen, durch kurze Zentrifugation „getrocknet“ und zuletzt wurde die DNA mit 12-50 µl dH₂O (je nach gewünschter Konzentration) eluiert. Weitere Details können dem Handbuch des Herstellers entnommen werden.

2.1.5 Insertpräparation: DNA-Restriktionsverdau

Die Vektoren, in die die Gene kloniert werden sollten, besaßen eine Sequenz (MCS), die aus einer Reihe von singulären Restriktionsschnittstellen bestand. Im Rahmen des Primerdesigns mussten daher Primer hergestellt werden, die in das zu amplifizierende Gen (=Insert) die gleichen Schnittstellen einfügten, die auch in den Vektoren vorkamen, in die kloniert werden sollte. Für die vorliegende Arbeit wurden, wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, NheI und NotI gewählt. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mit FastDigest Enzymen von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) verdaut:

25/50 µl Ansatz: 0,5 µl FastDigest NheI
0,5 µl FastDigest NotI
2,5 µl/ 5 µl 10x FastDigest Puffer
>2000 ng des aufgereinigten PCR-Produkts
dH₂O

Die Ansätze wurden 45 Minuten bei 37 °C inkubiert und die Enzyme anschließend 30 Minuten bei 78 °C hitzedeaktiviert. Nach mehreren frustrierten Versuchen den Verdau mittels Ethanolfällung (50 µl Ansatz + 125 µl Ethanol 96 % + 5 µl Natriumacetat, mischen, 15 min bei -80 °C inkubieren, 20 min zentrifugieren, in dH₂O eluieren) aufzukonzentrieren, wurde stattdessen das Nucleospin Gel and PCR Clean-Up Kit (s. Kapitel 2.1.4) verwendet. Eluiert wurde mit 10-15 µl dH₂O und die DNA-Konzentration wurde mit dem Mikrovolumen-Spektralphotometer bestimmt. In manchen Fällen wurde auch ein Testverdau mit SacI und anderen Enzymen durchgeführt, um zu überprüfen, ob das Insert korrekt in das Plasmid integriert wurde und der Verdau zu dem erwarteten Bandenmuster führte.

2.1.6 Vektorpräparation

Auch die geschlossenen Vektoren mussten mit denselben Enzymen geschnitten werden wie die Inserts, damit Insert und linearisierter Vektor an genau diesen Stellen im nächsten Schritt wieder ligiert werden konnten. Der Restriktionsverdau erfolgte mittels des gleichen Ansatzes (s. Kapitel 2.1.5), allerdings wurde dem Ansatz nach der Inkubation bei 37 °C noch 1 µl SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) hinzugefügt und erneut für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert, bevor die Enzyme bei 78 °C hitzedeaktiviert und das Plasmid mittels Ethanol gefällt wurde. Die Dephosphorylierung der Plasmid-DNA senkt drastisch die Religationsrate des Plasmids, und somit auch den unproduktiven Hintergrund nach der Transformation.

2.1.7 Ligation und Transformation in kompetente *E. coli* Bakterien

Bei der Ligation, also der Integration des Inserts in den Vektor, wurde folgender Ansatz verwendet:

10 µl Ansatz: 1 µl 10x T4 DNA Ligase Puffer
1 µl Vektor: TST603A NheI NotI -P (27 ng/µl)
100-300 ng Insert: *IKZF1/3*
1 µl T4 DNA Ligase
Rest dH₂O

Bei dem Vektor handelte es sich um einen im Labor derivatisierten pBluescript-Vektor (d.h. er besaß eine NheI Schnittstelle in der MCS) mit einer Ampicillin-Resistenz (vgl. Vektorkarte im Anhang: Abbildung 31). Der Ansatz wurde circa eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Transformation wurden die im Labor mit dem Mix & Go! *E. coli* Transformation Kit and Buffer Set (Zymo Research, Irvine, USA) hergestellten kompetenten Zellen benutzt. Bei ausbleibendem Transformationserfolg wurden die kommerziell erhältlichen kompetenten Zellen von Zymo Research (Mix & Go Competent Cells JM109, Irvine, USA) verwendet, die eine 10- bis 100-fach höhere Transformationsrate boten. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 1-2 µl des Ligationsansatzes wurde hinzugegeben. Nach 2-3 Minuten auf Eis wurde das Gemisch direkt auf die vorgewärmten und beschrifteten ampicillinhaltigen Agarplatten überführt und ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.1.8 Selektion von ausgewählten Klonen durch PCR

Zur Identifikation von gelungenen Klonierungen wurden die gewachsenen Bakterienkolonien direkt als Template in einer PCR mit geeigneten Primern verwendet. Bei einem Einschluss des Inserts führte die PCR zu einem Produkt einer definierten Größe.

25 µl Ansatz: 2,5 µl 10x DreamTaq Puffer
 0,5 µl dNTPs (1,25 mM)
 0,1 µl 5'-Primer (100 µM)
 0,1 µl 3'-Primer (100 µM)
 0,1 µl DreamTaq Polymerase
 22 µl dH₂O

Für pBluescript-Vektoren wurden die T7-5' und T3-3' Primer benutzt. Für die Kolonie-PCR von Sleeping Beauty Vektoren wurden die Primer CMV-F (5'-Primer) und pT2-3pr sowie pT2-MCS-3pr gebraucht, für die CAG-Vektoren wurden CAG-fwd und CAG-rev verwendet. Die Sequenzen der Primer sind in Kapitel 2.4 aufgeführt. Die Kolonien wurden durchnummeriert, mit einem Zahnstocher gepickt und in den PCR-Ansatz überführt. Der Thermocycler wurde mit den folgenden Einstellungen gestartet:

	Initiale Denaturierung: 2 min 94 °C
30x	Denaturierung: 30 sec 94 °C
	Primeranlagerung: 30 sec 55 °C
	Elongation: 2 min 72 °C (30 sec je 500 bp)

2.1.9 Plasmidisolierung mittels Plasmid Kits

Wenn die Gelelektrophorese nach der Kolonie-PCR Banden in der richtigen Höhe zeigte, es also zu einer erfolgreichen Ligation und Transformation gekommen war, wurde die Plasmid-DNA vervielfältigt und aus den Bakterien isoliert. Dazu wurden mit Zahnstochern jene Kolonien gepickt, die in der PCR ein Produkt gebildet hatten. Die Zahnstocher wurden in LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) bei 37 °C im Schüttelinkubator als Übernacht-Kultur angelegt. Alle Inserts in pBluescript-Vektoren (vgl. Abbildung 32 und Abbildung 33 im Anhang) wurden als „Minipreps“ in Reagenzgläsern mit 3 ml LB-Medium mit Ampicillin angesetzt. Die Plasmidisolierung bei „Minipreps“ erfolgte mit dem innuPREP Plasmid Mini Kit (analytikjena, Jena)

entsprechend des Protokolls. Die anschließende Konzentrationsbestimmung wurde mit dem Mikrovolumen-Spektralphotometer durchgeführt.

2.1.10 DNA-Sequenzierung

Um sicherzugehen, dass die DNA-Polymerase während der PCR fehlerfrei gearbeitet hatte, wurden die isolierten Plasmide unter Hinzufügen/Angabe der entsprechenden Primer zum Sequenzieren zu LGC Genomics GmbH (Berlin) geschickt. Da *IKZF1* von einem bereits verfügbaren Plasmid amplifiziert wurde, entstand nur eine Variante des Gens. Der Angaben von Addgene (Cambridge, USA) zufolge handelt es sich um XM_011515058.1. Diese Sequenzversion wurde laut der Genbank des NCBI am 06.06.2016 durch die Referenzsequenz XM_011515058.2 ersetzt und kodiert die Isoform X1 von *IKZF1*. Diese besitzt im Vergleich zur Transkriptionsvariante 1, welche die längste physiologisch vorkommende Variante von Ikaros darstellt, ein 60 Basen langes Insert.⁶⁸ Bei *IKZF3* stellte sich in der Sequenzanalyse heraus, dass bei der PCR von *IKZF3* mit der cDNA von L-428 Zellen verschiedene Splicevarianten von *IKZF3* amplifiziert wurden. Für die weiteren Experimente wurde die Transkriptionsvariante 1 „Aio-1“ gewählt (NCBI Referenzsequenz: NM_012481.5), welche für die größte Variante des Aiolos-Proteins kodiert.⁷⁵

2.1.11 Mutagenese

Der nächste Schritt bestand aus der gezielten Einführung von Punktmutationen, die den bei Patienten identifizierten IKZF Mutationen entsprachen. Die Mutagenese wurde auf der Grundlage des QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) durchgeführt. Dabei wurde, wie bei einer PCR, zunächst die doppelsträngige Plasmid-DNA denaturiert. Die in Kapitel 2.4 aufgeführten 35mer langen Mutationsprimer, die mittig jene Base aufwiesen, durch die die Wildtyp-Base ersetzt werden sollte, lagerten sich zunächst an die Einzelstränge der Templates an. Die Mutationsprimer wurden verlängert und es entstand doppelsträngige DNA, jeweils bestehend aus dem ursprünglichen Strang ohne Mutation und dem neu synthetisierten Strang mit Mutation. Dies wiederholte sich bei jedem Zyklus, sodass immer mehr Einzelstränge, die die Mutation trugen, entstanden (lineare PCR-Amplifikation).

Der nachfolgende Ansatz wurde verwendet:

25 µl Ansatz: 2,5 µl 10x PfuUltra II Reaction Buffer
1,25 µl dNTPs (1,25 mM)
1 µl PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase
1 µl 5'-Mutationsprimer (12,5 µM)
1 µl 3'-Mutationsprimer (12,5 µM)
1 µl Template („Minipreps“ *IKZF1/3*, Ziel: 25 ng)
17,25 µl dH₂O

Der Ansatz wurde gemischt, kurz zentrifugiert und der Thermocycler mit folgenden Einstellungen gestartet:

	Initiale Denaturierung:	30 sec 95 °C
14 - 16x	Denaturierung:	50 sec 95 °C
	Primeranlagerung:	50 sec 50 °C
	Elongation:	6 min 68 °C

Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde 1 µl DpnI zugegeben, gemischt, kurz zentrifugiert und 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Restriktionsendonuklease DpnI erkennt methylierte und hemimethylierte DNA und verdaut deswegen ausschließlich die parenterale DNA, da die neu synthetisierten Stränge keine Methylierungen aufweisen. Im Reaktionsansatz verbleiben also revers komplementäre neusynthetisierte und somit mutierte Plasmid-Einzelstränge, die sich zu Doppelsträngen zusammenlagern können. Da die Mutationsprimer exakt überlappten, aber jeweils vom 3'-Ende her verlängert wurden, entstanden bei der Zusammenlagerung überlappende Enden, die zwar „staggered nicks“ aufwiesen, aber hinreichend stabil waren, um eine Transformation als zirkuläres doppelsträngiges Plasmid in kompetente *E. coli* Zellen zu erlauben, wo es anschließend als normales Plasmid weiter reproduziert wurde. Dafür wurde 1 µl des Reaktionsgemischs zu 30 µl kompetente Zellen von Zymo Research (Mix & Go Competent Cells JM109) gegeben, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Wenn

am nächsten Tag Kolonien zu sehen waren, erfolgte eine Plasmidisolierung mit anschließender Sequenzierung.

2.1.12 Klonierung in das Sleeping Beauty Transposon System

Das Sleeping Beauty Transposon System bietet die Möglichkeit definierte DNA-Sequenzen non-viral in das Wirtsgenom von Zellen zu integrieren. Dieser Einbau erfolgt fast zufällig, wodurch es zu einer stabilen Expression kommen kann, bei *IKZF1* in der vorliegenden Arbeit gelang dies zum Beispiel über Monate hinweg. Die Grundlage des hier verwendeten Sleeping Beauty Transposon Systems sind die Transposase und das Transposon.⁷⁶ Ein Transposon ist ein sogenanntes „springendes Gen“, eine DNA-Sequenz, die ihre Position im Genom wechseln kann. Diese Positionsänderungen werden katalysiert von dem Enzym Transposase. Das Transposon, in diesem Fall das Sleeping Beauty Plasmid, enthielt eine Expressionskassette mit CMV-Promoter, welcher in vielen Säugetierzelltypen zu einer starken Expression führt (vgl. Abbildung 34 und Abbildung 35 im Anhang). Des Weiteren wies das Plasmid neben der Ampicillin- auch eine Puromycin-Resistenz vermittelnde Sequenz auf. Theoretisch hätte die zuvor durchgeführte Mutagenese auch direkt im Sleeping Beauty Vektor umgesetzt werden können, doch ist dieser mit einer Größe von 5919 bp fast doppelt so groß wie der pBluescript-Vektor (2962 bp). Trotz der hohen Genauigkeit der PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) wären Fehler in der Nucleotidsequenz bei dieser Vektorgröße eher wahrscheinlich gewesen, und es muss ohnehin mit schlechteren Mutationseffizienzen bei größeren Plasmiden gerechnet werden, da nur vollständig synthetisierte mutierte Plasmidstränge nutzbringend sind. Der Restriktionsverdau der Wildtyp- und mutierten *IKZF1/3*-Sequenzen aus dem pBluescript-Vektor lief analog wie in Kapitel 2.1.5 beschrieben ab, statt der PCR-Produkte wurden die jeweiligen pBluescript-Vektoren mit Insert verdaut (vgl. Abbildung 32 und Abbildung 33 im Anhang). Erneut wurde mittels des Nucleospin Gel and PCR Clean-Up Kits aufgereinigt (s. Kapitel 2.1.4), mit 10-15 µl dH₂O eluiert und die Konzentration mit dem Mikrovolumen-Spektralphotometer bestimmt. Auch Ligation und Transformation wurden entsprechend der Beschreibung in Kapitel 2.1.7 vorgenommen. Wenn Kolonien auf der Agarplatte vorhanden waren, erfolgte

anschließend eine Kolonie-PCR (s. Kapitel 2.1.8). Bei positiver PCR wurden Übernachtskulturen als Midi-Präparationen in Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) angesetzt. Da die Sleeping Beauty Vektoren im Gegensatz zu den pBluescript-Vektoren per Elektroporation in Myelomzellen transfiziert werden sollten, wurden deutlich größere DNA-Mengen benötigt. Für die Plasmidisolierung wurde das Kit von Macherey-Nagel (NucleoBond Xtra Midi, Düren, Deutschland) gebraucht und das entsprechende Protokoll befolgt, ebenfalls mit anschließender Konzentrationsbestimmung.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zelllinien

Um die Experimente dieser Arbeit durchzuführen, wurden Myelomzelllinien herangezogen. Im Gegensatz zu Primärmaterial, das direkt aus dem Knochenmark von Patienten gewonnen wird und dessen Verwendung mit erheblichem logistischem und bürokratischem Aufwand einhergeht, können Myelomzelllinien kommerziell erworben werden. Einen weiteren Vorteil bieten die gleichbleibenden Ausgangsbedingungen, da die Zellkulturen in regelmäßigen Abständen von circa drei Monaten aus kryokonservierten Stockbanken neu in Kultur genommen wurden und die vorher verwendeten Zellkulturen daraufhin verworfen wurden. Dies gewährleistet, dass es beispielsweise zu keiner Selektion von mutierten Subklonen kommt, die einen wie auch immer gearteten Überlebensvorteil besitzen und möglicherweise die Ergebnisse verfälschen. Außerdem wird damit vermieden, dass sich etwaige Kreuzkontaminationen etablieren. Durch die hohe Teilungsrate und unbegrenzte Proliferation kann in kurzer Zeit eine große Anzahl von Zellen gewonnen werden, zum Beispiel für Transfektionen durch Elektroporation. Nachteile sind hierbei die ausschließlich von extramedullären Myelomen oder Plasmazelleukämien abstammende Herkunft der Zelllinien. Dabei handelt es sich um fortgeschrittene Tumorstadien mit entsprechenden genetischen Veränderungen, zudem sind Veränderungen während der Kultivierung möglich.¹ Einen weiteren Unterschied stellt die Tumormikroumgebung *in vivo* dar, die beim multiplen

Myelom eine bedeutende Rolle innehat und mittels Zelllinien in Kultur nicht repräsentiert werden kann.¹ Die hier verwendeten humanen Myelomzelllinien waren AMO-1, L-363, MM1.S und JIN-3. AMO-1, L-363 und JIN-3 stammen aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig). AMO-1 wurde 1984 aus der Aszitesflüssigkeit einer 64 Jahre alten Frau mit Plasmozytom (IgA-κ) isoliert. Die Zellen sind rund und wachsen in Suspension. L-363 stammt aus dem Jahr 1977 aus dem peripheren Blut einer 36-jährigen Patientin mit Plasmazelleukämie vom Typ IgG. Sie stellen sich einzeln, groß, rund oder oval in Suspension dar. JIN-3 wurde aus dem Knochenmark einer 57 Jahre alten Patientin mit IgA1-κ-Plasmazelleukämie bei Diagnose 1987 gewonnen und wachsen als runde bis ovale Zellen semiadhärent in Zellsuspension. Die Zelllinie MM1.S wächst semiadhärent, ist Glucocorticoid-sensibel und wurde 1989 aus einer 42-jährigen Patientin mit einem IgA-Myelom etabliert. Bezogen wurde diese Zelllinie von LGC-Standards, Wesel.

2.2.2 Kulturbedingungen

Die Zelllinien wurden in Kultur in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und in Nährlösung gehalten. Bei der Nährlösung handelte es sich um RPMI-1640 Medium, dem 10 % fetales Rinderserum (FBS), 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin hinzugefügt wurden. Die Zellkulturen wurden regelmäßig gesplittet, sodass die Zelldichte maximal 1x10⁶ pro ml betrug. Dabei wurde ein Teil der Zellen verworfen und den verbliebenen Zellen ausreichend frisches Medium zugeführt.

2.2.3 Zelldichtebestimmung

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurde in einer 96-Well-Platte 20 µl Trypanblaulösung vorgelegt. Dieser Farbstoff durchdringt ausschließlich die Zellmembran abgestorbener und perforierter Zellen und färbt diese blau, während lebende Zellen ungefärbt bleiben. Im Verhältnis 1:1 wurde die gleiche Menge Zellsuspension aus der Zellkulturflasche nach ausreichendem Durchmischen der Zellen beigemischt. In einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop wurde die Anzahl lebender Zellen pro Milliliter ermittelt.

2.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Zellen wurden kryokonserviert, um sie bei Bedarf wieder aufzutauen. Dafür wurden die Zellen gezählt und $2,5\text{-}5 \times 10^6$ Zellen entnommen, in Falcons überführt und mit 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Währenddessen wurde das Einfriermedium vorbereitet, für das pro einzufrierende Probe 0,9 ml FBS und 0,1 ml DMSO gemischt wurden. Nach dem Zentrifugieren wurde der Mediumüberstand verworfen und das Zellpellet in je 1 ml Einfriermedium resuspendiert und zügig in die beschrifteten Einfrierröhrchen überführt. Die Proben wurden in Isopropanolbehälter bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ tiefgefroren und nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert.

2.2.5 Transfektion durch Elektroporation

Da Myelomzellen schwer zu transfizieren sind, wurden die Plasmidvektoren mittels der Elektroporation in die Zellen eingebracht. Für das Vorgehen bei der Elektroporation und den nachfolgenden Aufreinigungsschritten mittels Microbead-Säule und Optiprep wurde das Protokoll von Steinbrunn et al. (2014) in leicht modifizierter Form angewandt.⁷⁷ Zunächst erfolgte nach der Zentrifugation (12000 rpm, 5 min) von 20×10^6 Zellen pro Ansatz, bei Voltreihen und Probetransfektionen auch weniger, die Resuspension in 1 ml frischem (kürzlich geöffnetem) Medium ohne Zusätze. Die zu transfizierenden Vektoren wurden dem jeweiligen Reaktionsgemisch in einer Konzentration von $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ dazugegeben und durch Pipettieren gemischt. Als Kontrolle wurde ein Expressionsplasmid für das grün fluoreszierende Protein eGFP (pEGFP-N3) in der Konzentration $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ hinzugefügt, um nach Zugabe von PI mittels Durchflusszytometrie (s. Kapitel 2.2.10) den Erfolg der Transfektion quantifizieren zu können. Für transiente Transfektionen, bei denen es zu keinem stabilen Einbau der Plasmide in das Genom der Zelle kommt, wurde außerdem ein Expressionsplasmid für CD4 Δ (pcDNA3.1-CD4 Δ) in der Konzentration $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ hinzugefügt, um die transfizierten Zellen am nächsten Tag aufzureinigen zu können. Bei stabilen Transfektionen, bei denen das Gen in das Genom der Zelle eingefügt werden sollte, wurde zusätzlich der Expressionsvektor für das Enzym Transposase in der Konzentration $30\text{ }\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Anschließend wurden je $500\text{ }\mu\text{l}$ Reaktionsgemisch in 4-mm-Elektroporationsküvetten überführt. Bei L-363 und MM1.S erfolgte die Transfektion mit

300 V mittels des GenePulsers (Bio-Rad Laboratories, München) bei einer Kondensatorkapazität von 960 μF , bei AMO-1 mit 310 V und bei JIN-3 mit 280 V. Um geeignete Spannungen für eine erfolgreiche Transfektion bei nicht übermäßig vielen toten Zellen zu ermitteln, wurde im Rahmen der Vorversuche eine Voltreihe durchgeführt unter Berücksichtigung der Erkenntnisse von Steinbrunn et al. (2014).⁷⁷ Unmittelbar nach dem einmaligen Stromimpuls wurden die Zellen aus den Küvetten in zuvor vorbereitete und vorgewärmte Falcons mit je 1 ml frischem Medium ohne Zusätze gegeben und für 10-20 Minuten im 37 °C warmen Wasserbad aufbewahrt. Nach dieser Zeit wurden die Zellen in 25 ml vorgewärmtes Medium mit Zusätzen aufgenommen und bei 37 °C inkubiert.

2.2.6 CD4 Δ Säulenaufreinigung und Optiprep

Bei transienten Transfektionen, bei denen im Gegensatz zu stabilen Transfektionen keine Selektion mittels Antibiotika erfolgte, wurde die CD4 Δ -Säulenaufreinigung gewählt. Das Ziel war den Anteil erfolgreich transfizierter Zellen zu maximieren und nicht-transfizierte Zellen zu entfernen. Wie in Kapitel 2.2.5 erwähnt, war die Voraussetzung hierfür das Hinzufügen des Expressionsplasmids von CD4 Δ zum Elektroporationsgemisch. Am Tag nach der Elektroporation wurde zunächst mittels Durchflusszytometrie (s. Kapitel 2.2.10) überprüft, welcher Anteil der lebenden Zellen das Expressionsplasmid eGFP aufgenommen hatte. Denn es wurde davon ausgegangen, dass die Transfektionsrate für eGFP auch das Transfektionsergebnis für alle anderen Plasmide widerspiegelte. Bei einer ausreichenden Transfektionsrate und einem begrenzten Anteil toter Zellen wurden die elektroporierten Zellen im nächsten Schritt mit eisgekühltem MACS-Puffer gewaschen, in 200 μl MACS-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. Nach Hinzufügen von 40 μl CD4 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) wurden die Zellen 15 Minuten im Kühlschrank bei 4 °C über Kopf rotiert, um eine Bindung der paramagnetischen Beads an die CD4 Δ -positiven Zellen zu erreichen. Währenddessen wurden die Säulen (Large cell columns, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) in einen Magneten gesetzt, mit Ethanol und eisgekühltem MACS-Puffer gespült und im Anschluss daran wurden die Zellen auf die Säule pipettiert. Es verblieben nur die an CD4 MicroBeads gebundenen Zellen in der

paramagnetischen Säule, also nur die Zellen, bei denen es zur Aufnahme der Vektoren bei der Elektroporation gekommen war. Nach der erneuten Spülung mit MACS-Puffer wurden die Säulen vom Magnet entfernt und die Zellen mit 3 ml Medium aus der Säule eluiert. Da sich nach der Säulenaufreinigung noch eine relevante Menge toter Zellen im Eluat befand, erfolgte eine Aufreinigung durch Optiprep-Dichtegradientenzentrifugation. Bei Optiprep handelt es sich um eine 60 %ige Lösung von Iodixanol in Wasser, deren Beimischung die Dichte des Mediums erhöht. In geeigneter Menge führt dies dazu, dass bei der Zentrifugation die toten Zellen und Trümmer sedimentieren, während die lebenden Zellen aufgrund ihrer intakten Zellmembranen eine geringere Dichte aufweisen und flottieren. Dazu wurden die Zellen nach der Säulenaufreinigung bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Währenddessen wurde die Optiprep-Mischung vorbereitet, bestehend aus 1 ml Medium und 300 µl Optiprep pro Ansatz. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in je 1,3 ml dieser Mischung resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und vorsichtig mit 200 µl PBS überschichtet. Nach der erneuten Zentrifugation bei 3500 rpm für 7 Minuten befanden sich die toten Zellen am Gefäßboden, während sich die lebenden Zellen an der Grenze zwischen PBS und Optiprep/Medium sammelten. Diese Zellen wurden abpipettiert, mit Vollmedium gewaschen, erneut 1200 rpm zentrifugiert und schließlich in 3 ml Medium resuspendiert.

2.2.7 Selektion mit Antibiotika

Bei stabilen Transfektionen wurde am Tag nach der Elektroporation der Anteil erfolgreich transfizierter Zellen mittels Durchflusszytometrie (s. Kapitel 2.2.10) ermittelt. Bei geeigneter Transfektionseffektivität wurde an Tag 2/3 nach Elektroporation die circa zweiwöchige Selektion mittels Antibiotika (Puromycin 1,25 µg/ml bei AMO-1, 0,75 µg/ml bei L-363 und MM1.S) begonnen. Das Überleben der Zellen wurde dabei ermöglicht durch den Einbau der im Sleeping Beauty Vektor enthaltenen Expressionskassette für ein Puromycin-Resistenzgen (vgl. Abbildung 34 und Abbildung 35 im Anhang). Bei Transfektionen der Zelllinien AMO-1 und L-363 wurde zuletzt noch der Anteil lebender Zellen mittels Optiprep-Aufreinigung (s. Kapitel 2.2.6) erhöht.

2.2.8 Lenalidomid-Behandlung für funktionelle Analysen

Lenalidomid wurde als repräsentative Substanz der IMiDs gewählt, da es aktuell die meiste klinische Verwendung findet. Lenalidomid wirkt in Zellkulturen hauptsächlich proliferationshemmend und ist dabei nicht notwendigerweise zytotoxisch. In Vorversuchen zeigte sich, dass Inkubationszeiten von 5 bis 7 Tagen notwendig sind, um einen messbaren Einfluss des Medikaments auf die gewählten MM Zellen mittels funktioneller Assays feststellen zu können. Zudem konnten wegen der langen Inkubationsdauer auch nur geringe Zellzahlen im 96-Well Format ausgesät werden, weil die Zellen in den Kontrollansätzen sonst überwachsen und das Ergebnis verfälscht würde. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, wurden 96-Well-Platten mit 100 µl frischem Vollmedium und Lenalidomid bzw. DMSO vorgelegt. Die Stammlösung von Lenalidomid (20 mM, in DMSO gelöst) wurde im Verhältnis 1:1000 mit Vollmedium verdünnt und bei den Kontrollen die entsprechende Menge DMSO verwendet. In jedes Well wurden dann 500-20000 Zellen, abhängig von der Proliferationsgeschwindigkeit der Zelllinien, in 100 µl frischem Vollmedium dazugegeben. Dadurch wurden die Lenalidomidansätze noch einmal 1:2 verdünnt, was einer finalen Stoffmengenkonzentration von 10 µM entsprach. Diese Konzentration wurde gewählt, da hierbei ein suffizienter Effekt in einem geeigneten Zeitrahmen bei allen sensitiven Myelomzelllinien zu erwarten war. Für die alamarBlue-Assays der stabil transfizierten Sublinien wurden jeweils Triplikate angesetzt, für die Annexin V-PI Messungen Duplikate. Zuletzt wurden bei alamarBlue noch zwei Triplikate mit jeweils 200 µl Vollmedium ohne Zellen angesetzt, um Blankwerte für die Messung zu erhalten. Die randständigen Wells wurden mit PBS befüllt, um die Verdunstung in der Platte über die Versuchsdauer hinweg möglichst gering zu halten. Die Platten wurden im Anschluss unter den üblichen Kulturbedingungen gehalten. Am Tag 3 oder 4 wurden die Zellen kurz suspendiert, um eine gleichmäßigere Verteilung auf dem Boden der Wells zu erreichen. Nach 5-7 Tagen erfolgte die alamarBlue bzw. Annexin V-PI Messung. Für die Ansätze mit Dexamethason wurde das gleiche Vorgehen gewählt, jedoch mit dem Unterschied, dass Dexamethason in aqua gelöst ist. Somit wurden die Zellen der Kontrollen unbehandelt gelassen. Die Dexamethason-Stammlösung in der Konzentration 25 mg/ml (Stoff-

mengenkonzentration 62,5 mM) wurde den Zellen in unterschiedlichen Verdünnungen hinzugefügt.

2.2.9 Beurteilung von Zellviabilität: alamarBlue-Assay

Bei alamarBlue handelt es sich um einen Viabilitätsassay für Proliferation, Metabolismus und Zytotoxizität. Dieser beruht darauf, dass nur lebende Zellen die Fähigkeit besitzen, die blaue Resazurin-basierte Lösung zu reduzieren. Dadurch kommt es zu einem allmählichen Farbumschlag von Blau (Resazurin) zu Rot (Resorufin). Die Herstellung der alamarBlue-Lösung erfolgte aus dem Natriumsalz von Resazurin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) im Labor. Die Versuche wurden wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben angesetzt. Nach 5-7 Tagen erfolgte die Zugabe von je 20 µl alamarBlue-Lösung pro Well und erneuter Inkubation der Platten für einige Stunden, abhängig von Zelllinie und Zellzahl. Mittels Mikroplattenreader wurde die Extinktion bei 570 nm und 600 nm gemessen. Mit dem Programm Excel (Microsoft, Redmond, USA) und der Formel aus dem Protokoll von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) wurde anhand der Mittelwerte der Duplikate bzw. Triplikate, sowie der Blank- und Kontrollwerte, der Anteil reduzierter Zellen wie folgt berechnet:

$$\% \text{ reduziert} = \frac{(\epsilon_{OX})\lambda_2 A\lambda_1 - (\epsilon_{OX})\lambda_1 A\lambda_2}{(\epsilon_{RED})\lambda_1 A'\lambda_2 - (\epsilon_{RED})\lambda_2 A'\lambda_1} \times 100$$

ϵ_{OX} = molarer Extinktionskoeffizient der oxidierten Form von alamarBlue (BLAU)

ϵ_{RED} = molarer Extinktionskoeffizient der reduzierten Form von alamarBlue (ROT)

A = Absorption der Test-Wells

A' = Absorption der Negativkontrollen (Medium + alamarBlue ohne Zellen)

λ_1 = 570nm

λ_2 = 600nm

Dieser Wert wurde jeweils für die Lenalidomid-behandelten Zellen und die entsprechenden DMSO-Lösungsmittelkontrollen ermittelt und anschließend in Relation gesetzt, um die Zellviabilität zu bestimmen.

2.2.10 Beurteilung von Zelltod: Durchflusszytometrie mit Annexin V-PI

Für die Zelltodmessung wurden die in Kapitel 2.2.8 beschriebenen Ansätze an Tag 5-7 in FACS-Röhrchen mit PBS überführt, für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und danach

der Überstand abgekippt. Im Anschluss daran erfolgte die Resuspension in je 200 µl kaltem Annexin V-Bindepuffer, 4 µl PI-Lösung und 1 µl Annexin V/FITC-Lösung pro Probe. Bei PI (Propidiumjodid) handelt es sich um einen roten Fluoreszenzfarbstoff, der die Zellwand lebender Zellen nicht durchdringt und damit ausschließlich an die DNA spätapoptotischer und nekrotischer Zellen bindet. Die Annexin V-Komponente aus Annexin V/FITC bindet an Phosphatidylserin, was sich in vitalen Zellen ausschließlich auf der Innenseite der Zellmembran befindet. Aber schon in frühen Stadien der Apoptose wird Phosphatidylserin externalisiert, weshalb Annexin V ein Indikator für Apoptose ist. Annexin V wurde im Labor hergestellt, wie es in dem Protokoll von Logue et al. (2009) beschrieben ist, und mit dem grün-fluoreszierenden Farbstoff Fluorescein-isothiocyanate (FITC, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gekoppelt.⁷⁸ Die FACS-Messungen erfolgten mit der Software CellQuest (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) und dem Durchflusszytometer FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg). Im Durchflusszytometer werden die Zellen einzeln durch Laserstrahlen erfasst. Je mehr Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) beim Passieren einer Zelle entsteht, desto größer ist das Volumen. Je mehr Licht im rechten Winkel gebrochen wird, was dem SSC (side scatter) entspricht, desto granulöser ist die Zelle aufgrund von Vesikeln und der Zellkernstruktur. Mittels des forward/sideward scatter sowie der Farbstoffe Annexin V/FITC und PI wurden die Analysen von Apoptose und Zelltod mit dem Programm FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, USA) durchgeführt. Hierbei wurde der prozentuale Anteil vitaler Zellen, also Annexin V/FITC-negativer und PI-negativer Zellen, jeweils für Lenalidomid-inkubierte Zellen und deren DMSO-Kontrollen ermittelt und die Werte miteinander ins Verhältnis gesetzt.

Mittels Durchflusszytometrie konnte durch Messung der eGFP-Grünfluoreszenz auch die Transfektionseffektivität abgeschätzt werden. Die Zellen wurden ebenfalls in PBS gewaschen, mit 200 µl PBS resuspendiert und 4 µl PI-Lösung in PBS wurden hinzugefügt.

2.2.11 Statistische Auswertung

Die weitere Auswertung der Primärdaten, die mittels den in Kapitel 2.2.9 und 2.2.10 beschriebenen funktionellen Assays erhoben wurden, erfolgte mit den Software-Programmen Excel (Microsoft, Redmond, USA) und GraphPad Prism (Graphpad

Software, La Jolla, USA). Die Analysen wurden von der Verfasserin dieser Doktorarbeit durchgeführt.

2.3 Proteinbiochemische Methoden: Western Blot

2.3.1 Lenalidomid-Behandlung für Western Analysen

Im Unterschied zu der Lenalidomid-Behandlung der Zellen im 96-Well-Format wurden für Western Analysen deutlich größere Zellmengen benötigt und die Ansätze wurden kürzer inkubiert. Es wurden in 6- und 12-Well-Platten in frischem Vollmedium 200.000 Zellen pro 500 µl für die Vorexperimente und 250.000 Zellen pro 500 µl für die Experimente mit den transfizierten Sublinien ausgesät. Lenalidomid (Stammlösung: 20 mM) wurde in der Verdünnung 1:2000 hinzugegeben, was einer finalen Stoffmengenkonzentration von 10 µM entsprach. Für jede Lenalidomid-behandelte Sublinie wurde auch mindestens eine entsprechende DMSO-Kontrolle mitgeführt.

2.3.2 Ernte und Lyse der Zellen

Bei der Ernte der Zellen wurden entweder die Ansätze gezählt und je 200.000 - 500.000 Zellen geerntet oder es wurde jeweils das gleiche Volumen, beispielsweise 1 ml, entnommen und anschließend eine „Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry“ (Kapitel 2.3.3) durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit PBS gewaschen, die Überstände mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellpellets umgehend bei -80 °C eingefroren, was zu einem ersten Zellaufschluss führte. Nach 15 Minuten bei -80 °C wurden die Zellpellets langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von Lysepuffer, Complete (Roche, Basel, Schweiz), Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 und 3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurde möglichst ohne Luftblasen resuspendiert. Im Rahmen der Lyse wurden die Zellen 25 Minuten auf Eis ruhen gelassen und anschließend für 20 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und die Überstände komplett in zuvor beschriftete Eppendorf-Gefäße überführt.

2.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Wenn die Zellen bei der Ernte nicht gezählt wurden, war eine Proteinkonzentrationsbestimmung notwendig, um eine gleichmäßige Beladung der Gele zu gewährleisten. Es wurden je zweimal 5 µl von jedem Standardwert (Doppelwerte) einer Standard-Reihe in eine 96-Well-Platte pipettiert. Von jeder Probe wurden ebenfalls 5 µl in die Platte gegeben (Einfachwerte). Zu den Standardwerten und Proben wurden je 25 µl Reagent A* pipettiert, angesetzt als 1 ml DC™ Protein Assay Reagent A (Bio-Rad Laboratories, München) mit 20 µl 10 % SDS. Nach Zugabe von je 200 µl DC™ Protein Assay Reagent B (Bio-Rad Laboratories, München) wurde die Platte 15 Minuten bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Die anschließende Messung erfolgte bei 655 nm mit dem Mikroplattenreader. Mittels Excel wurden anhand der ermittelten Werte die benötigten Mengen der Zelllysate berechnet, um je 10-15 µg Protein pro Probe auf das Gel zu geben. Die einzelnen Zelllysate wurden mit dH₂O eingestellt, um vergleichbare Volumina pro Probe zu erzielen.

2.3.4 Gießen der SDS-Polyacrylamid Gele

Es wurden 12 % Trenngele mit einem 15-Well-Kamm angefertigt. Nach Reinigung der Glasplatten mit Alkohol wurden die Bio-Rad Systeme für das Gießen der Gele zusammengesetzt. Trenn- und Sammelgele wurden entsprechend der Beschreibung in der Materialienliste (s. Kapitel 2.4) hergestellt, wobei Rotiphorese jeweils zuletzt zugegeben wurde. Die Mischung für das Trenngel wurde dann zügig 2/3 hoch in die Apparatur gegossen und mit 200 µl Isopropanol überschichtet, um eine glatte Kante zu erzeugen. Nach Polymerisierung des Gels wurde das Isopropanol entfernt. Mit dem Sammelgel-Gemisch wurde nach Zugabe von Rotiphorese die Apparatur randvoll befüllt und ein Kamm eingeschoben. Nach der Polymerisierung wurden die SDS-Polyacrylamid Gele direkt verwendet oder ggf. im Kühlschrank bis zu 2 Wochen aufbewahrt.

2.3.5 Probenvorbereitung und Auftrennung mittels SDS-PAGE

Mittels der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), welche auf einem von Laemmli (1970) entwickelten elektrophoretischen Verfahren basiert, können Proteine anhand ihrer Molekülmasse analysiert werden.⁷⁹ Durch das im

Laemmli-Puffer enthaltene SDS sind die Proteine erstens linear gestreckt und zweitens kollektiv mit hoher negativer Nettoladung versehen und werden daher abhängig von ihrer Masse durch Wanderung im elektrischen Feld in den Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Laemmlipuffer wurde entsprechend der Mengen der Proben hinzugefügt und für drei Minuten auf 98 °C erhitzt. Anschließend wurden die Wet-Blot-Kammern von Bio-Rad Laboratories (München) vorbereitet. Nach einem Vorlauf für 7 Minuten bei 150 Volt wurden die Gele mit den Proben sowie den Markern als Längenstandard beladen. Die Proben liefen bei 100 V durch das Sammelgel, bei Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf circa 160 V erhöht.

2.3.6 Proteintransfer mittels Blotting und Blockierung

Nach erfolgter Auftrennung der Proben im Trenngel wurden die Gele mit Blotting-Puffer-getränkten Filterpapieren und einer Nitrocellulosemembran luftblasenfrei in die Blotting-Apparatur (Wet-Blotting-System, Bio-Rad Laboratories) eingebaut. Die Kammer wurde mit Blottingpuffer befüllt und dann erfolgte das Blotten für 50 Minuten bei 110 V, um die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran zu übertragen. Mittels Ponceau-Rot Färbung konnte direkt im Anschluss die Qualität des Blotting und der Beladung überprüft werden. Danach wurde die Membran in Blockingpuffer (5 % Milchpulver in 1x TBS-T) für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur auf den Schüttler gestellt.

2.3.7 Immunhistochemische Färbung und Analyse von Proteinbanden

Um einzelne Proteinbanden auf der Membran zu detektieren und beispielsweise eine Veränderung in der Proteinexpression festzustellen, wurden Antikörper verwendet. Die Primärantikörper erkennen spezifisch ein Epitop im zu analysierenden Protein, was die Grundlage der Visualisierung als Signal auf dem Röntgenfilm bildet. So bindet der Ikaros Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich) an die Umgebung von Pro329 des menschlichen Ikaros-Proteins und der Aiolos Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich) an die Umgebung von Pro46 des menschlichen Aiolos-Proteins. Die in dieser Arbeit zu analysierenden patientenspezifischen Mutationen befanden sich nicht in diesen Bereichen und sollten

daher keinen Einfluss auf die Funktionalität der Antikörper haben. Die Antigen-Antikörper-Bindung wurde erreicht durch Inkubation der Membranen mit den Primärantikörpern auf dem Schüttler bei 4 °C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen der Membranen für jeweils 10 Minuten mit 1x TBS-T wurden die Membranen mit dem entsprechenden Sekundärantikörper auf dem Schüttler für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei den Sekundärantikörpern, welche an die Primärantikörper binden, handelte es sich um hrp-gekoppelte F(ab')₂ Fragmente, die spezifisch sind für rabbit bzw. mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Newmarket, Vereinigtes Königreich). Es folgte dreimaliges Waschen für je 10 Minuten mit 1x TBS-T. Zuletzt wurden die Membranen mit frisch angesetzter ECL-Reaktionslösung benetzt und direkt anschließend zur Belichtung von Röntgenfilmen verwendet.

2.4 Materialienliste

Geräte

Elektroporationsgerät (GenePulser)	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Western Blot Apparatur	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Mikroplattenreader Model 680	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
NanoDrop Mikrovolumen- Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Verbrauchsmaterial

Nitrocellulosemembran	GE Healthcare Life Science, Chalfont St Giles, Vereinigtes Königreich
-----------------------	--

Röntgenfilm	Fujifilm, Tokio, Japan
Elektroporationsküvetten	PEQLAB, jetzt VWR Life Science, Erlangen, Deutschland
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Software

Adobe Photoshop CS2	Adobe Systems, San José, USA
Canvas X	Canvas GFX, Fort Lauderdale, USA
CellQuest	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Endnote	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
FlowJo	FlowJo LLC, Ashland, USA
GraphPad Prism	Graphpad Software, La Jolla, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
SnapGene	GSL Biotech LLC, Chicago, USA

Chemikalien

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Albumin Fraktion V, proteasefrei (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Complete (Protease Inhibitor Cocktail)	Roche, Basel, Schweiz

DC™ Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
DC™ Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Dexamethasone water soluble, 25 mg/ml (#D2915)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (PCR)	Finzymes (Thermo Fisher Scientific), Waltham, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Essigsäure 100 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 96 %/ 70 %	Apotheke Universität Würzburg
Ethanol abs.	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fluorescein-isothiocyanate isomer (FITC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isopropanol	Apotheke Universität Würzburg
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lenalidomid	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Luminol, minimum 97 % HPLC	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LB-Medium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	Real, Mönchengladbach, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
p-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ponceau-S	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Propidiumjodid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Puromycin	Calbiochem (Merck), Darmstadt, Deutschland
Rotiphorese	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Resazurin sodium salt (#R7017, Lot #MKBZ0284V)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Zellkulturmedien und Zusätze

<i>Produkt</i>	<i>Menge/ Endkonzentration</i>	<i>Hersteller</i>
RPMI-1640 Medium		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Fetales Rinderserum (FBS)	10 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-Glutamin	2 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin/ Streptomycin	Pen: 100 U/ml, Strept: 100 µg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumpyruvat	1 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Lösungen und Puffer

Agarplatten	12,5 g LB-Medium 500 ml Aqua dest. 7,5 g Agar-Agar 0,1 mg/ml Ampicillin	Roth Roth Sigma-Aldrich
alamarBlue-Lösung	0,5 mM Resazurin sodium salt in PBS MW: 251,17 g/mol -> 40 mg gelöst mit 317 ml PBS, steril filtriert	Sigma-Aldrich
Annexin V-Bindepuffer (500 ml)	1,38 g HEPES (10 mM), HCl/NaOH: auf pH 7,4 4,097 g NaCl (140 mM) 0,184 g CaCl ₂ (2,5 mM)	Sigma-Aldrich Merck/Roth Roth Merck
Blottingpuffer (2 l)	400 ml Methanol 28,8 g Glycin 6 g TRIS Aqua dest.	Sigma-Aldrich Roth Roth
ECL-Lösung (10 ml)	10 ml TRIS pH 8,8 (100 mM final) 100 µl Luminol in DMSO (2,5 mM final)	Roth Sigma-Aldrich

	20 µl p-Coumarsäure (0,2 mM final) 3 µl H ₂ O ₂ (3 mM final)	Sigma-Aldrich Roth
Laemmli-Puffer (50 ml, 2x)	5 ml Glycerin 5 ml 20 % SDS-Lösung 3 ml TRIS pH 6,8 5 ml β-Mercaptoethanol Spatelspitze Bromphenolblau Aqua dest.	Merck Roth Roth Roth Sigma-Aldrich
LB-Medium (+Ampicillin)	25 g LB-Medium 1 l Aqua dest. 0,1 mg/ml Ampicillin	Roth Sigma-Aldrich
TBS-Waschpuffer (10x, 1 l) (Gebrauch als 1x TBS-T: 100 ml 10x Stock + 900 ml Aqua dest. + 1 ml Tween)	24,2 g TRIS 80 g NaCl Aqua dest. HCl: auf pH 7,6	Roth Roth Merck Applichem
TGS-Laufpuffer (10x, 2 l) (Gebrauch als 1x TGS: 100 ml 10x Stock + 900 ml Aqua dest.)	60 g TRIS 284 g Glycin 20 g SDS Aqua dest.	Roth Roth Roth
Phosphate Buffered Saline (PBS, 1x, 1 l)	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,78 g Dinatriumhydro- genphosphat-Dihydrat 0,27 g Kaliumdihydrogen- phosphat pH 7,4	Roth Roth Roth Merck

Lysepuffer (250 ml)	75 ml TRIS-Lösung pH 7,0 (300 mM final) 1,75 g NaCl (120 mM final) 25 ml Glycerin (10 % final) 2,5 ml Triton (1 % final) Für 500 µl frisch dazu: 20 µl Complete (1:25 final) Je 10 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail 2/3 (1:50 final)	Roth Roth Merck Sigma-Aldrich Roche Sigma-Aldrich
Ponceau-S-Rot (500 ml)	0,5 g Ponceau-S (0,1 %) 25 ml Essigsäure (5 %) 475 ml Aqua dest.	Applichem Roth
TAE-Puffer (50x, 1 l) Gebrauch als 1x TAE- Puffer: 20 ml 10x Stock + 980 ml Aqua dest.; 0,04 mM TRIS final; 0,2 mM EDTA final)	242 g TRIS 57,1 ml Essigsäure 100 % 37,2 g EDTA Aqua dest.	Roth Roth Sigma-Aldrich
TE-Puffer	10 mM TRIS-Lösung pH 8,0 1 mM EDTA	Roth Sigma-Aldrich
DNA loading dye	40 % Saccharose in TE-Puffer Prise Bromphenolblau	Roth Sigma-Aldrich
MACS-Puffer	EDTA (2,5 mM) FBS (0,5 %) PBS	Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich
Trypanblau	1 % Trypanblue in 0,9 % NaCl -> 1:5 verdünnt für Zellkultur	Sigma-Aldrich Roth

Sammelgelpuffer (500 ml, 4x)	30,3 g TRIS (0,5 M final)	Roth
	2,16 g SDS (0,015 M final)	Roth
	HCl: auf pH 6,8	Merck
Trenngelpuffer (500 ml, 4x)	90,75 g TRIS (1,5 M final)	Roth
	2,16 g SDS (0,015 M final)	Roth
	HCl: auf pH 8,8	Merck
10 % APS	0,5 g Ammoniumperoxodisulfat 5 ml Aqua dest.	Roth

SDS-Gele

Für 3 Gele:

Trenngel 12 %	Rotiphorese	4,7 ml
	Trenngelpuffer	2,9 ml
	Aqua dest.	4,1 ml
	10 % APS	195 µl
	TEMED	16,1 µl
Sammelgel	Rotiphorese	1,05 ml
	Sammelgelpuffer	1,3 ml
	Aqua dest.	2,9 ml
	10 % APS	63 µl
	TEMED	5,25 µl

Enzyme und Biochemika

Dream Taq Hot Start Polymerase	5 U/µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dream Taq Puffer	10x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

dNTP-Mix	720 µl Aqua dest. +20 µl dATP (100 mM) +20 µl dCTP (100 mM) +20 µl dGTP (100 mM) +20 µl dTTP (100 mM)	Fermentas (Thermo Fisher), Waltham, USA
Dpnl	200000 U/ml	New England Biolabs, Ipswich, USA
FastDigest Puffer	10x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mix and Go! Competent Cells JM109		Zymo Research, Irvine, USA
Mix and Go! E. coli Transformation Kit and Buffer Set DHSα		Zymo Research, Irvine, USA
HD Green DNA Dye		Intas Science Imaging, Göttingen, Deutschland
PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase		Agilent Technologies, Santa Clara, USA
PfuUltra II Reaction Buffer	10x	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Restriktionsenzyme - NheI - NotI - SacI etc.		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	1 U/µl	Fermentas (Thermo Fisher), Waltham, USA
T4 DNA Ligase	5 Weiss U/µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

T4 DNA Ligase Puffer	10x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	2000 U/ml	New England Biolabs, Ipswich, USA
Q5 Reaction Buffer	5x	New England Biolabs, Ipswich, USA
Q5 High GC Enhancer	5x	New England Biolabs, Ipswich, USA

Antikörper

Anti-Aiolos, anti-Ikaros und anti- β -Actin wurden 1:1000 in 10 ml 1x TBS-T Waschpuffer mit 0,1 % Natriumazid angesetzt. Für anti-c-MYC wurde 1 % BSA in 1x TBS-T gewählt.

<i>Primärantikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
anti-Aiolos (#15103S, Lot:1)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
anti-Ikaros (#14859S, Lot:1)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
anti-c-MYC (#ab32072)	Kaninchen	1:5000	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

anti- β -Actin (#A5316, Lot: 052M4793)	Maus	1:10000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>Sekundärantikörper</i>	in 10 ml 1x TBS-T Waschpuffer mit 5 % Milchpulver		
Kaninchen: Anti- Rabbit IgG (#111- 036-045)		1:20000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Newmarket, Vereinigtes Königreich
Maus: Anti-Mouse IgG (#115-036-072)		1:20000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Newmarket, Vereinigtes Königreich

Längenstandards

DNA-Marker (GeneRuler™ 1 kB DNA Ladder)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Protein Marker (PageRuler Unstained Protein Ladder)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Kolonie-PCR-, Klonierungs-, Mutations- und Sequenzierungsprimer

Primer (F: forward, R: reverse)	Sequenz (5'-3')
IKZF3-5pr	cggcGCTAGCatggaagatatacaaa
IKZF3-3pr	gagaGCGGCCGctcacttcagcagggctctgt
IKZF1-5pr	cctgGCTAGCatggatgctgatgaggggtca
IKZF1-5pr-B	cctgGCTAGCatggatgctgatgaggggtcaagaca
IKZF1-3pr	cgcgGCGGCCGcttagctcatgtggaagcgg
IKZF3-G159R-F	catcttttactcagaaa cg taacctcctccgccac
IKZF3-G159R-R	gtggcggaggaggttac g tttctgagtaaaagatg
IKZF1-A152T-F	agtgcaatcagtgcggg a acctcattcaccagaag
IKZF1-A152T-R	cttctgggtgaatgagg t cccgcactgattgcact
IKZF1-E170D-F	aagctgcattccgggga ca agcccttcaaagcca
IKZF1-E170D-R	tggcatttgaagggtt g tccccggaatgcagctt
IKZF1-Y413C-F	gcgagcgggtctcatct g cctgaccaaccacatcg
IKZF1-Y413C-R	cgatgtggttggtcagg ca gatgagaccgctgcgc
IKZF1-R439H-F	cgctacgacctgctgc a cgccgectccgagaact
IKZF1-R439H-R	agttctcggaggcggcg t gcagcaggtcgtaggcg

Bei den Mutationsprimern sind die Basen farblich hervorgehoben, die eine Base der Wildtyp-Sequenz ersetzen.

Primer Flexi Run LGC	Sequenz (5'-3')
T3	aattaaccctcactaaagg
T7prom	taatacgactcactatagg
CMV-F	gcaaatgggcggtaggcgt

Primer Labor	Sequenz (5'-3')
T3-3'	aattaaccctcactaaagg

T7-5'	taatacgactcactatagg
pT2-3pr	ctttccacacctgggtgc
pT2-MCS-3pr	caacaacaattgcattca
CAG-fwd	ttcggcttctggcgtgtga
CAG-rev	tcagatgctcaaggggcttca

Zelllinien

AMO-1	DMSZ, Braunschweig, Deutschland
JJN-3	DMSZ, Braunschweig, Deutschland
L-363	DMSZ, Braunschweig, Deutschland
MM1.S	LGC Standards, Wesel

Reaktionssets (Kits)

Nucelospin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
innuPREP Plasmid Mini Kit	analytikjena, Jena, Deutschland
NuceloBond Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

CD4 Δ Säulenaufreinigung und Optiprep

Optiprep	Progen Biotechnik, Heidelberg, Deutschland
CD4 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Large cell columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
pcDNA3.1-CD4 Δ Vektor (#V790-20)	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), Waltham, USA

pEGFP-N3 Vektor (#6080-1)	Clontech Laboratories (Takara Bio), Kalifornien, USA
---------------------------	---

Transposase Expressionsplasmid	
--------------------------------	--

Plasmide (modifizierte Plasmide: s. Vektorkarten im Anhang)

pMSCV-FLAG-hIKAROS-IRES-GFP (#74046)	Addgene, Cambridge, USA
---	-------------------------

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht der methodischen Vorgehensweise



Abbildung 6: Vorgehensweise zur funktionellen Analyse von patientenspezifischen Mutationen

Durch PCR wurden die kodierenden Bereiche für die Gene *IKZF1* und *IKZF3*, die eine wichtige Rolle im IMiD-CRBN Signalweg spielen, von einem kommerziell erworbenen Plasmid bzw. von Erststrang-cDNA der Hodgkin Lymphom Zelllinie L-428 amplifiziert (vgl. Abbildung 6) und dabei an den Enden mit den Schnittstellen NheI und NotI flankiert. Die PCR-Produkte (=Inserts) wurden in einen modifizierten pBluescript Vektor (vgl. Abbildung 31 im Anhang) kloniert und die Korrektheit der Sequenzen der Inserts mittels Sequenzierung bestätigt. Diese klonierten cDNA-Gene dienten als Grundlage für die anschließende Einfügung der Punktmutationen, die in Patienten mit refraktärem/rezidiertem multiplen Myelom identifiziert wurden. Die Mutationen wurden mittels Sequenzierung bestätigt.

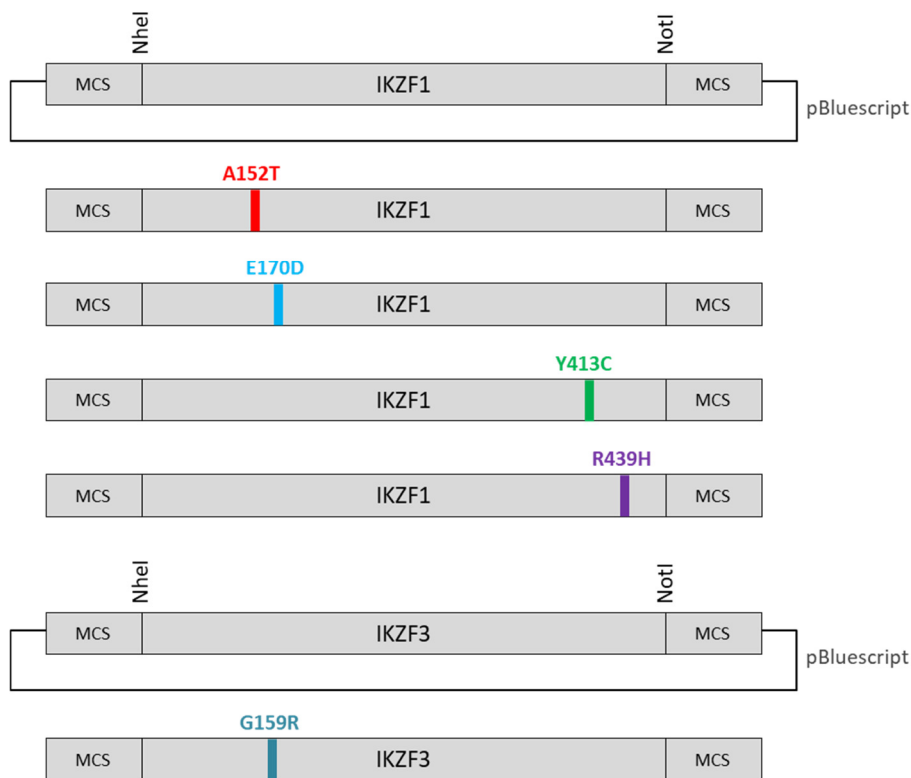


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Mutanten und des Wildtyps von IKZF1 und IKZF3

Anschließend erfolgte die Subklonierung der in Abbildung 7 dargestellten Wildtyp- und mutierten cDNA-Gene für Ikaros und Aiolos in einen Sleeping Beauty Vektor als finales Zielplasmid (vgl. Abbildung 34 und Abbildung 35 im Anhang), das aber aufgrund seiner Größe suboptimal für Mutagenesen gewesen wäre. Durch Elektroporation wurden drei humane Myelomzelllinien (AMO-1, L-363 und MM1.S) transfiziert und durch Antibiotikabehandlung auf stabil transponierte Zellen hin selektiert. Mit diesen polyklonalen Sublinien wurden verschiedene proteinbiochemische (Western Blots) und funktionelle Assays zur Beurteilung von Zelltod (Annexin V-PI Durchflusszytometrie) und Zellviabilität (alamarBlue) durchgeführt, um einen möglichen Einfluss dieser patientenspezifischen Mutationen auf die Entwicklung von Resistenzen bei der Lenalidomid-Therapie des multiplen Myeloms zu ermitteln.

3.2 Vorversuche

3.2.1 Endogene Expression von Ikaros und Aiolos in Zelllinien

Zunächst sollten für nachfolgende Analysen geeignete Zelllinien identifiziert werden, die *IKZF1* und *IKZF3* exprimieren können. Dafür wurde das endogene Vorkommen der Proteine Ikaros (IKZF1) und Aiolos (IKZF3) in verschiedenen humanen Myelomzelllinien mittels Western Blotting untersucht.

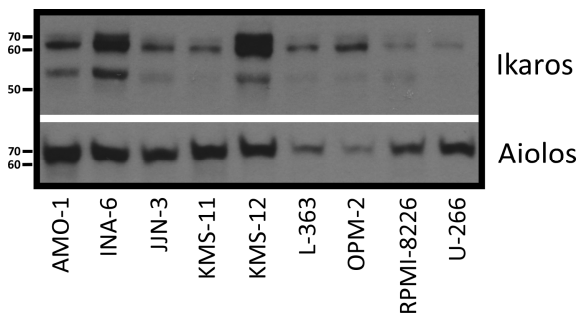


Abbildung 8: Endogene Expression von Ikaros und Aiolos in MM Zelllinien

Beide Proteine wurden in allen getesteten Zelllinien detektiert (vgl. Abbildung 8). Bei allen Zelllinien wurde die gleiche Menge Lysat aus jeweils 0,5 Mio. geernteten Zellen aufgetragen. Somit variieren die Expressionsspiegel der beiden Proteine stark zwischen den einzelnen Myelomzelllinien. Darüber hinaus ist festzustellen, dass bei den einzelnen Zelllinien die Expressionsspiegel von Ikaros und Aiolos nicht miteinander zusammenhängen, da die Muster deutlich voneinander abweichen.

Aus mehreren Publikationen war bekannt, dass es sich bei AMO-1, L-363, MM1.S und U-266 um Lenalidomid-sensitive Zelllinien handelt.^{49, 59, 80} JJN-3, KMS-12, INA-6 und RPMI-8226 sind hingegen relativ resistent gegen Lenalidomid *in vitro*.^{49, 59, 80} Für KMS-11 gab es unterschiedliche Angaben und für OPM-2 waren keine Informationen vorhanden.^{49, 59, 80} Um einen möglichen Unterschied der Mutationen auf das Lenalidomid-Ansprechen erkennen zu können, wurden für die vorliegende Arbeit die Lenalidomid-sensitiven Zelllinien AMO-1, L-363 und MM1.S ausgewählt. Denn Lenalidomid-Sensitivität bedeutet, dass das Zellwachstum gehemmt wird durch die Behandlung mit Lenalidomid.⁸¹ In Abgrenzung dazu werden die Zellen als Lenalidomid-

resistent definiert, wenn die Inkubation mit Lenalidomid die Zellviabilität bzw. Zellproliferation nicht beeinflusst.⁸¹

3.2.2 Western Analyse nach Lenalidomid-Inkubation

Anhand der Erkenntnisse von Krönke et al. (2014) und Eichner et al. (2016) bezüglich der Expression von *IKZF1* und *IKZF3* in MM1.S Zellen, ließ sich der zeitliche Rahmen einer Lenalidomid-Inkubation, während dem eine Abnahme der Proteinlevel zu erwarten ist, auf drei Stunden bis maximal vier Tage eingrenzen.^{48, 80} Zur Einschätzung der IMiD-Wirkung wurden daher Zeitreihen für mehrere Zelllinien bestimmt, wobei nach 0, 4, 8, 24 und 32 Stunden Behandlung mit Lenalidomid (10 µM), bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle, Proben genommen und die Degradation von Aiolos und Ikaros mittels Western Blot untersucht wurde. Als Startwert (0 h) wurde die Zugabe von Lenalidomid definiert und zu diesem Zeitpunkt erfolgte auch die erste Ernte.

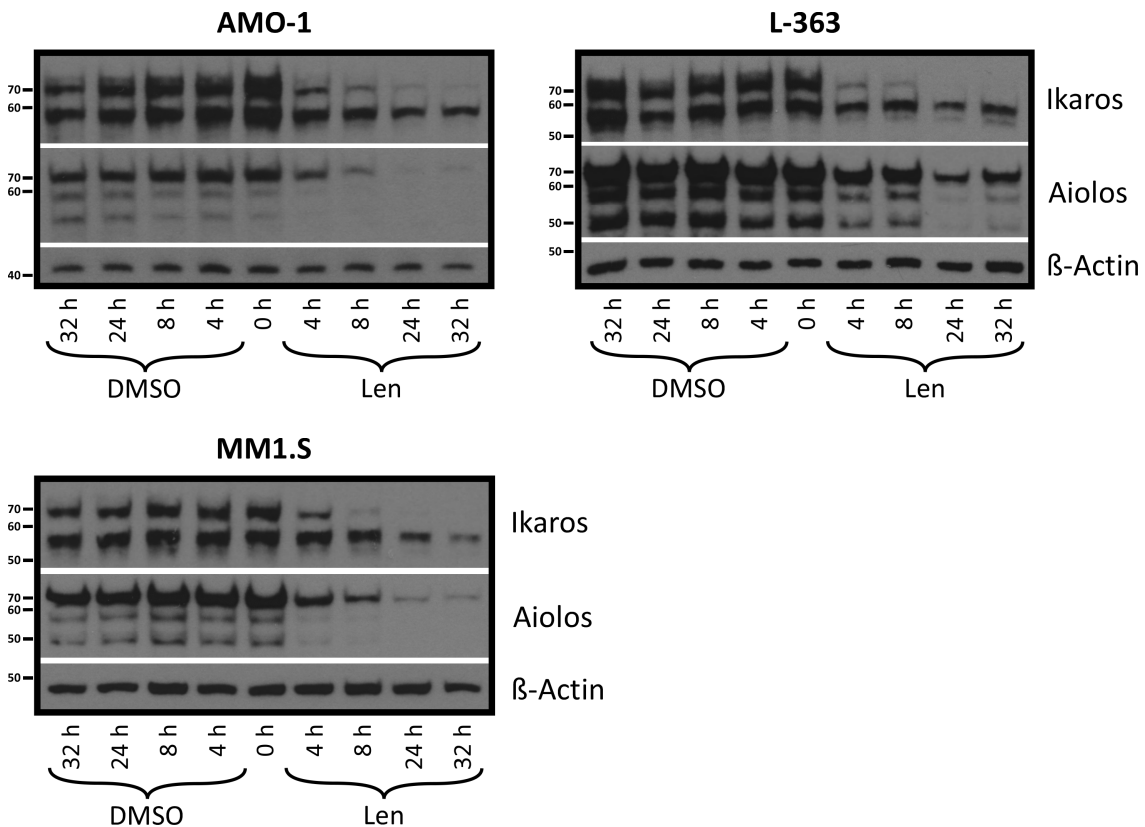


Abbildung 9: Degradation von Ikaros und Aiolos nach Lenalidomid-Behandlung (10 µM)

Laut des Herstellers (Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich) erkennt der Ikaros-Antikörper Banden bei 50-70 kDa, der Aiolos-Antikörper bei 50, 58

und 65 kDa. Die in diesen Western Analysen durch den Ikaros-Antikörper detektierte obere Bande wies eine Degradierung innerhalb von vier- bis achtstündiger Lenalidomid-Behandlung auf (vgl. Abbildung 9). Auch bei dem von Gandhi et al. (2013) verwendeten Ikaros-Antikörper wurde die Bande bei 65 kDa für die Isoform 1, die die längste Isoform darstellt, stärker reduziert als die untere Bande einer vermutlich weiteren Isoform von 57 kDa.⁵⁴ Diese verschiedenen Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen des primären *IKZF1*-Transkripts.⁶⁸ Bei IKZF3 waren die vom Aiolos-Antikörper detektierten unteren Banden stärker durch die Lenalidomid-Behandlung betroffen als die obere, wobei sich aber Unterschiede zwischen den Zelllinien feststellen lassen. Auch Aiolos degradierte in AMO-1 und MM1.S Zellen innerhalb der ersten acht Stunden nach Zugabe von Lenalidomid (10 µM), bei L-363 Zellen schien dieser Vorgang etwas verzögerter abzulaufen (vgl. Abbildung 9). Die hier dargestellte Abnahme der endogenen Proteinlevel ist eine Folge des von Krönke et al. (2014) beschriebenen Signalwegs: durch IMiDs geht der E3 Ubiquitin Ligase Komplex eine verstärkte Bindung mit IKZF1/3 ein und in der Folge werden IKZF1/3 ubiquitinyliert und abgebaut.⁴⁸ Neben der Überprüfung des Wirkmechanismus sollten mit diesem Experiment vor allem die Zeitfenster für die weiteren Experimente festgelegt werden.

3.2.3 Funktionelle Analysen nach Lenalidomid-Inkubation

Um zu ermitteln, inwiefern Lenalidomid auch in funktionellen Analysen einen Effekt hat, wurden Assays zur Bestimmung der Zellviabilität (alamarBlue) und des Zelltods (Annexin V-PI Durchflusszytometrie) durchgeführt. Zunächst wurden verschiedene Zellzahlen mit Lenalidomid (10 µM) und als Kontrolle mit DMSO inkubiert. Die mit der jeweiligen Methode ermittelten Werte für die Lenalidomid-Ansätze wurden in Relation zu den entsprechenden DMSO-Kontrollen (= 100%) gesetzt und mit GraphPad Prism (Graphpad Software, La Jolla, USA) Mittelwerte und eine Standardabweichung als Fehlerbalken abgebildet. Es sollten geeignete Zellzahlen gefunden werden, die einerseits eine Auswertung der behandelten Proben erlauben, aber andererseits aufgrund der langen Inkubationszeit nicht zu Kontrollenverfälschung durch Überwachsen führen.

3.2.3.1 Viabilitätsassay: alamarBlue

Die Zellviabilität wurde mittels alamarBlue-Assay nach 5 bzw. 7 Tagen gemessen, um für die Lenalidomid-Wirkungen notwendige Zeitrahmen und Zellzahlen zu identifizieren.

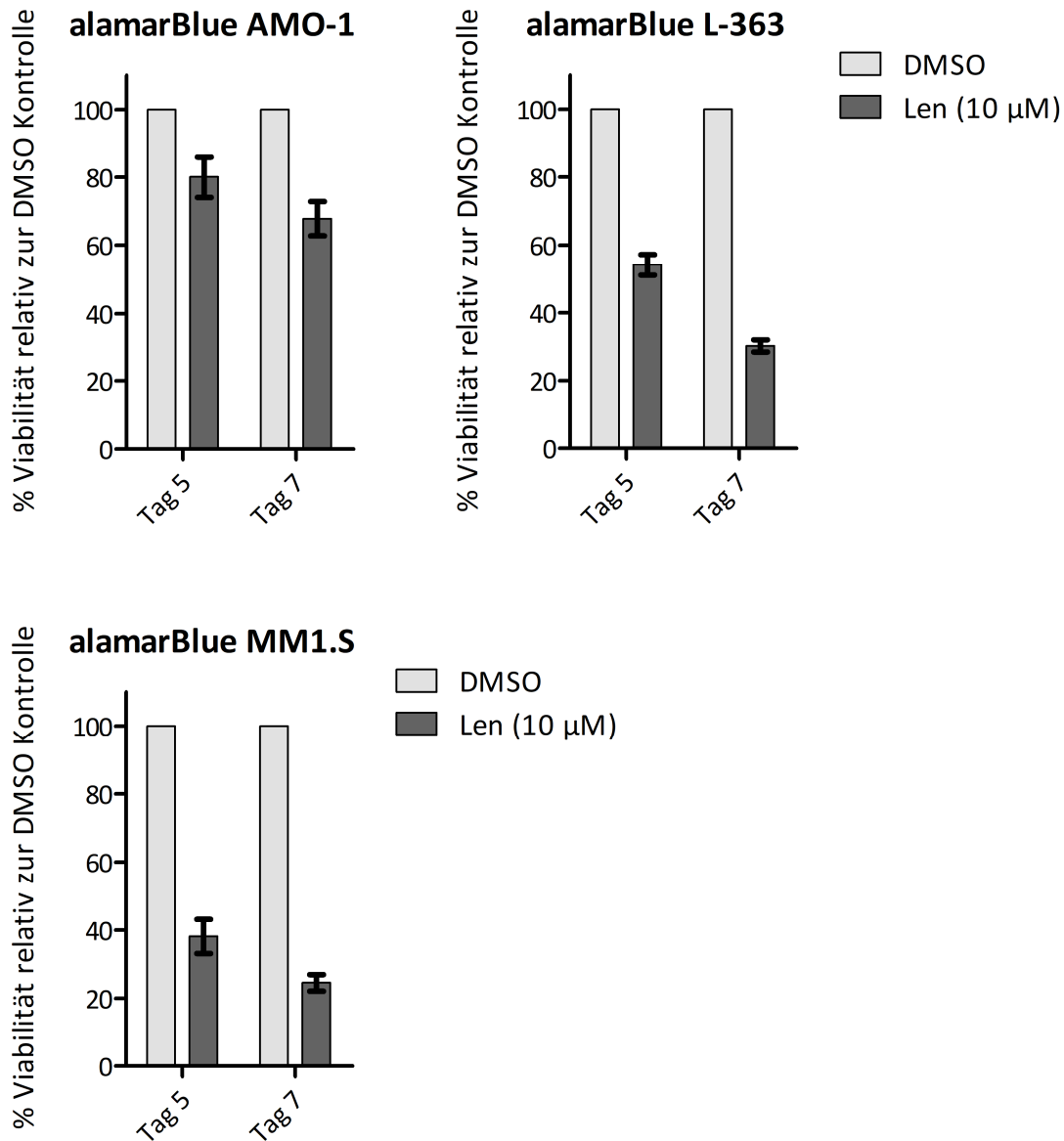


Abbildung 10: Zellviabilitätsassay für Myelomzelllinien nach fünf-/siebentägiger Lenalidomid-Inkubation, $n=2$ für AMO-1 und L-363, $n=3$ für MM1.S

Es zeigte sich, dass AMO-1-Zellen mit der geringsten Abnahme der Zellviabilität auf die Lenalidomid-Behandlung reagierten, während L-363 und MM1.S deutlich stärker betroffen waren (vgl. Abbildung 10). Zur Untersuchung der funktionellen Relevanz mutierter Gene wurde deshalb der alamarBlue-Assay im Folgenden ausschließlich mit

L-363 und MM1.S Zellen durchgeführt, wobei eine Behandlungsdauer von 5-7 Tagen in beiden Fällen angemessen war.

3.2.3.2 Zelltodassay: Annexin V-PI Durchflusszytometrie

Zusätzlich zur Messung der Zellviabilität wurde die Lenalidomid-vermittelte Zelltodinduktion mittels des Annexin V-PI Assays untersucht. Auch hier waren die Ziele den zeitlichen Rahmen, sowie die Stärke eines etwaigen Lenalidomideffekts für die einzelnen Zelllinien zu bestimmen.

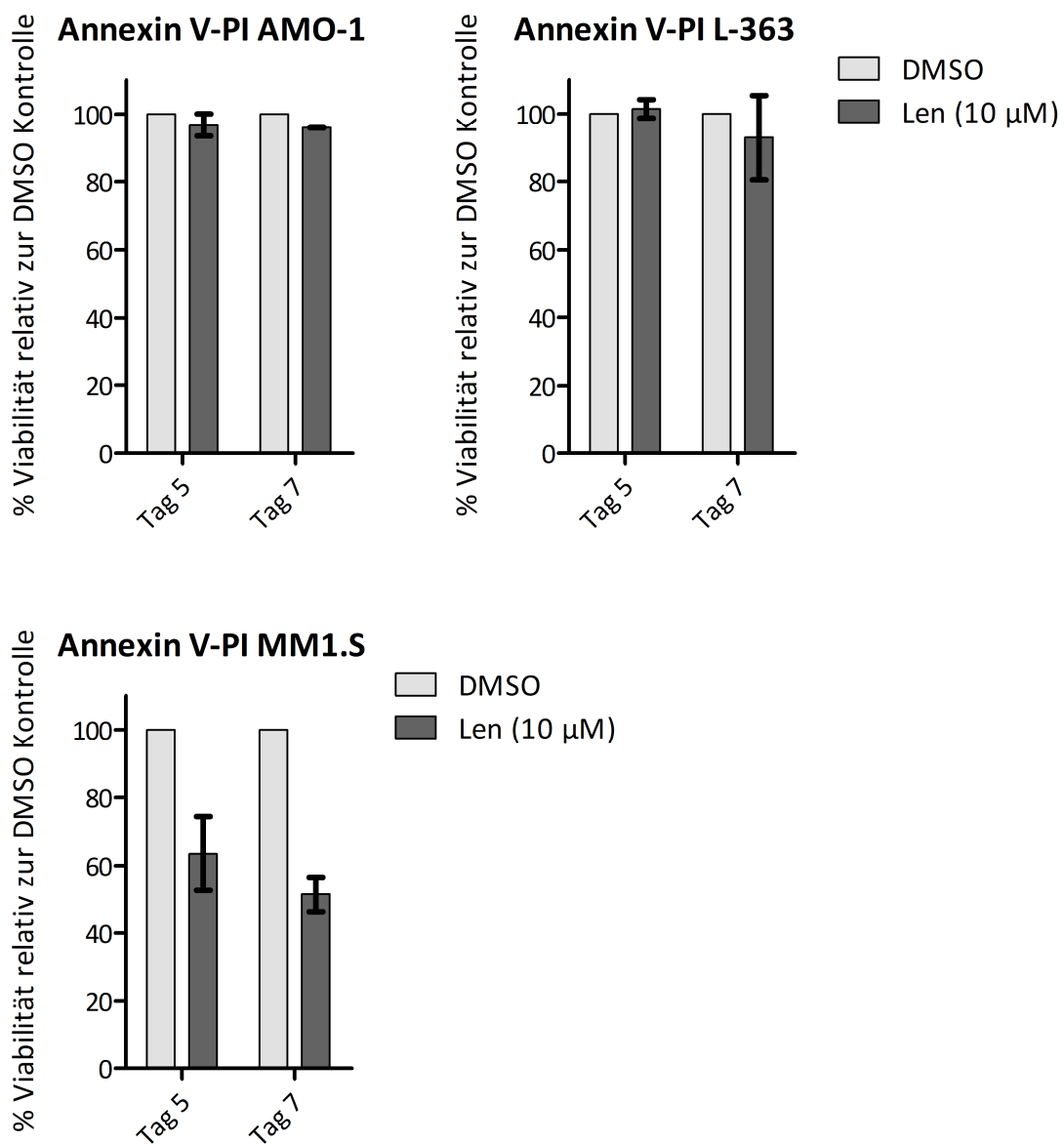


Abbildung 11: Zelltodassay der Myelomzelllinien nach fünf-/siebentägiger Lenalidomid-Inkubation, n=2 für AMO-1 und L-363, n=4 für MM1.S

Da sich in diesem Experiment kein Effekt auf das Überleben von AMO-1 und L-363 Zellen durch die Inkubation mit Lenalidomid nachweisen ließ (vgl. Abbildung 11), wurde auf weitere Annexin V-Messungen dieser Zelllinien verzichtet. Bei MM1.S war dagegen eine deutliche Zunahme apoptotischer Zellen unter Lenalidomid festzustellen. In der Zusammenfassung sind somit die Zelllinien L-363 und MM1.S für den alamarBlue-Assay geeignet, während MM1.s auch für den Annexin V-Assay verwendet werden kann. Dies legt nahe, dass die Lenalidomid-Wirkung in L-363 Zellen vor allem anti-proliferativ ist, während sie in MM1.S Zellen zusätzlich auch Apoptoseinduktion bewirkt. 1500 Zellen pro Well für L-363, sowie 15000 Zellen pro Well für MM1.S wurden für die nachfolgenden Versuche als geeignet ausgewählt.

3.3 Ikaros (IKZF1)

3.3.1 Transiente Transfektion

Nach der erfolgreichen Klonierung des Sleeping Beauty Vektors ohne Insert (Leervektor) sowie von Wildtyp-Ikaros und der Ikaros-Transkripte mit den eingefügten Punktmutationen in die Sleeping Beauty Vektoren, erfolgte eine transiente Transfektion (s. Kapitel 2.1.11, 2.1.12, 2.2.5 und Vektorkarten im Anhang: Abbildung 34 und Abbildung 35). Da stabile Transfektionen aufgrund der mindestens zwei Wochen dauernden Phase bis zur Einsatzbereitschaft der neuen Zellkulturen relativ zeitaufwändig sind, sollte die Funktion des IKZF1-Wildtyp-Expressionsvektors zunächst in L-363 Zellen durch transiente Transfektion validiert werden.

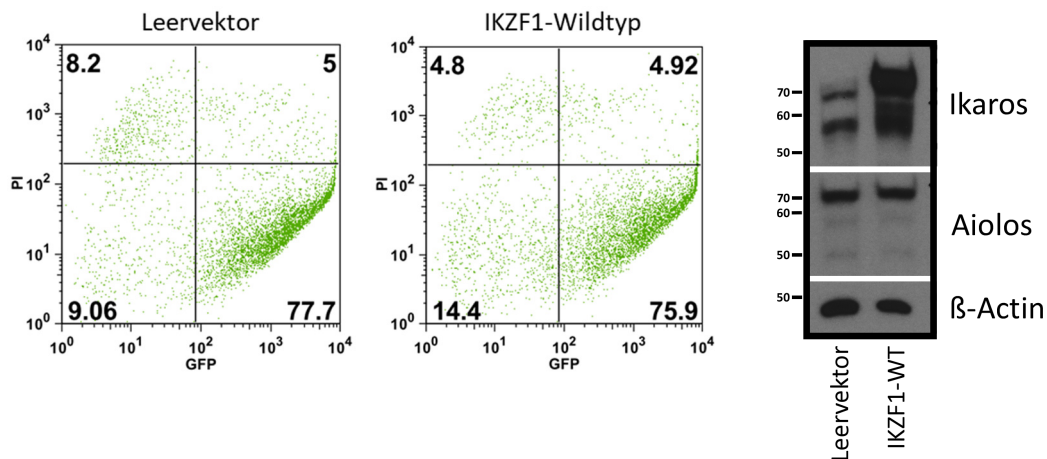


Abbildung 12: Durchflusszytometrische eGFP und PI Messung von L-363 Zellen sowie Western Analyse von Leervektor und Expressionsvektor für IKZF1-Wildtyp-Protein (IKZF1-WT), jeweils am Folgetag der transienten Transfektion durchgeführt

Die selektiv angereicherten, stark transfizierten Zellen (siehe Kapitel 2.2.6 und Abbildung 12) wurden am Tag nach der Elektroporation einer Western Analyse unterzogen. Wie erhofft, zeigte sich eine starke Überexpression von Ikaros bei unbeeinflusstem Aiolos-Proteinspiegel.

3.3.2 Stabile Transfektion

Aufgrund des zufriedenstellenden Ergebnisses der transienten Ikaros-Expression, wurden im nächsten Schritt die Zelllinien AMO-1, L-363 und MM1.S stabil mit Expressionskassetten für die verschiedenen Ikaros-Varianten transfiziert. Durch Elektroporation wurden die Sleeping Beauty Expressionsvektoren für Wildtyp-Ikaros und die Ikaros-Mutanten in die Zellen eingebracht. Auch ein Leervektor als Negativkontrolle wurde transfiziert, um als Bezugskontrolle für elektroporierte und nachfolgend antibiotisch selektionierte Zellen zu dienen. Am Folgetag erfolgte die durchflusszytometrische Messung von eGFP und PI zur Messung der Transfektionseffektivität.

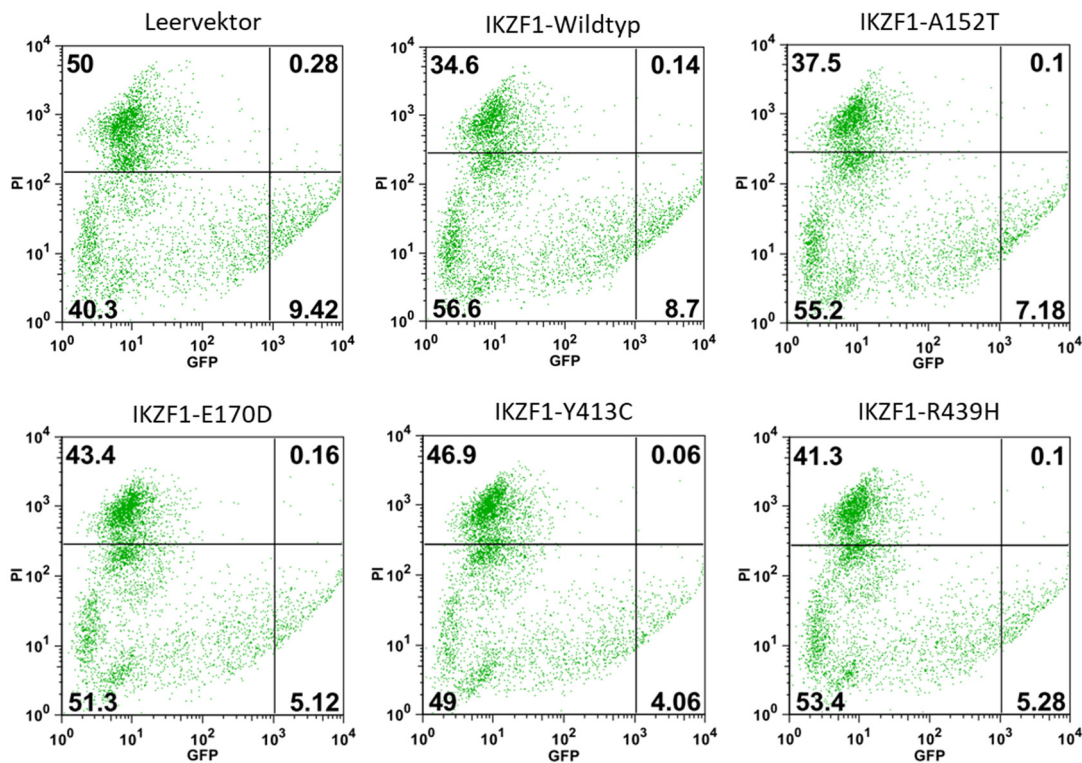


Abbildung 13: Durchflusszytometrische eGFP und PI Messung als Frühtest zur Eignung der Ansätze für die stabile Transfektion der Ikaros-Expressions-kassetten am Beispiel von AMO-1-Zellen (Erläuterung im Text)

Wenn der Anteil stark transfizierter (eGFP >10³) und lebendiger (PI niedrig) Zellen bei ≥ 4 % lag (vgl. Abbildung 13), wurde die Selektion mittels Antibiotika begonnen, da dies nach Erfahrungswerten früherer Experimente für ein erfolgreiches zeitnahes Herauswachsen stabil transfizierter Kulturen ausreicht (Thorsten Stühmer, mdl.).

3.3.3 Analyse mittels Western Blot

3.3.3.1 Vergleich der IKZF1-Grundspiegel

Im nächsten Schritt sollten Western Analysen durchgeführt werden, um den Ikaros-Expressionsspiegel bezüglich Stärke und Kongruenz in den stabil transfizierten Sublinien zu untersuchen.

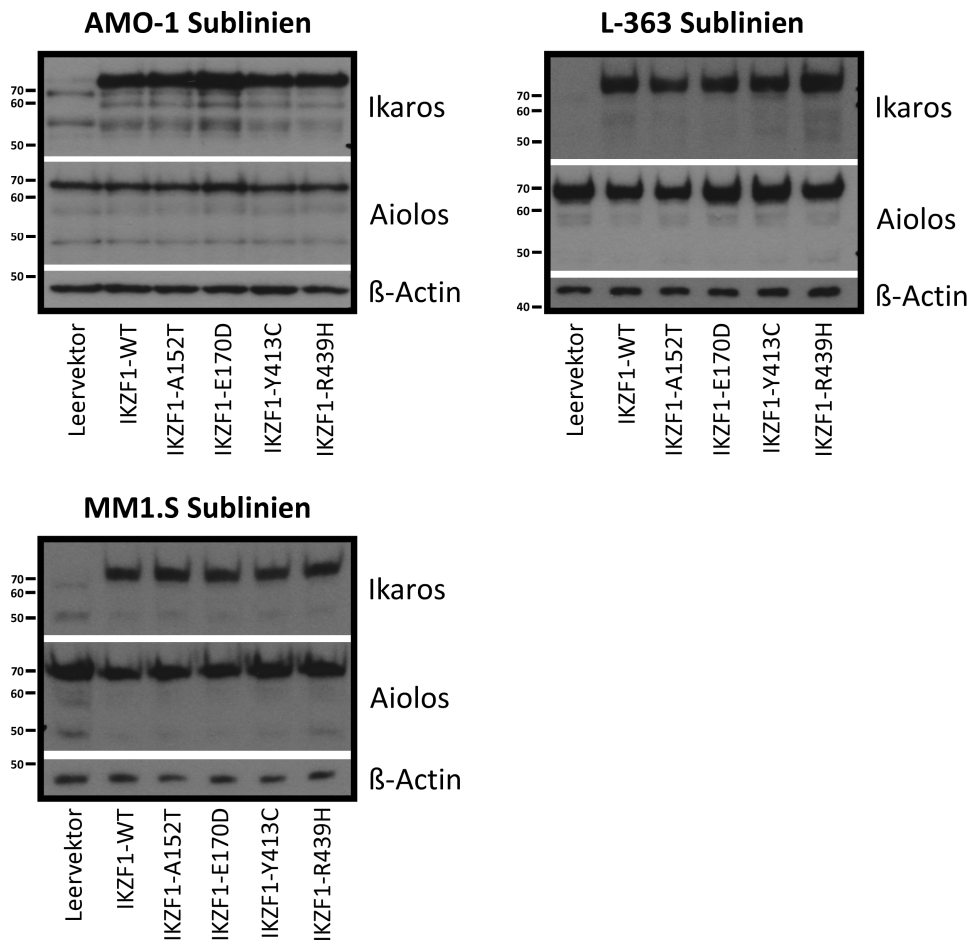


Abbildung 14: Vergleich der Expression des exogenen Ikaros im Vergleich zum Leervektor und zu Aiolos in verschiedenen stabil transfizierten MM Zelllinien

In der stabilen Expression der verschiedenen Versionen des *IKZF1* cDNA-Gens wurde die längste Isoform von Ikaros in allen getesteten MM Zelllinien deutlich überexprimiert im Vergleich zum Leervektor (vgl. Abbildung 14). Die Stärke der Expression war bei Wildtyp (IKZF1-WT) und Mutanten (IKZF1-A152T, -E170D, -Y413C, -R439H) praktisch identisch. Die Expressionsspiegel von Aiolos wurden durch die langfristige exogene IKZF1-Überexpression nicht beeinflusst.

Auch mehr als zwei Monate nach der Elektroporation war IKZF1 in stabil transfizierten Zellen noch in konstanter Weise überexprimiert (vgl. Abbildung 15). Es war daher trotz längerer Verwendung der polyklonalen Sublinien nicht von einer Abnahme des IKZF1-Spiegels auszugehen.

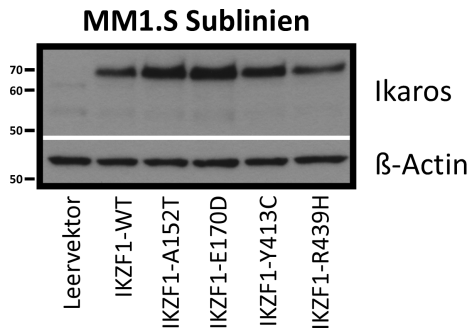


Abbildung 15: Anhaltende Überexpression von Ikaros im Langzeitexperiment

3.3.3.2 Reaktion der IKZF1-Spiegel auf Behandlung mit Lenalidomid

Um das Ausmaß und die ungefähre Zeitkinetik einer Abnahme des stark überexprimierten IKZF1 unter Lenalidomid-Behandlung zu untersuchen, wurden stabil transfizierte MM Zellen (Leervektor bzw. IKZF1-Wildtyp) mit 10 μ M Lenalidomid behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben für eine Western Analyse entnommen.

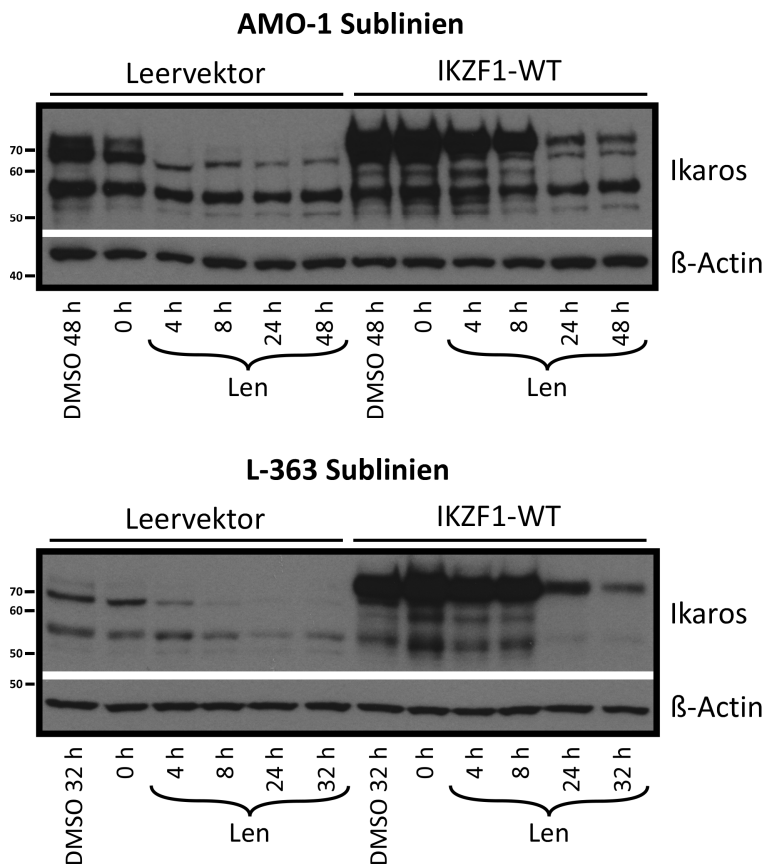
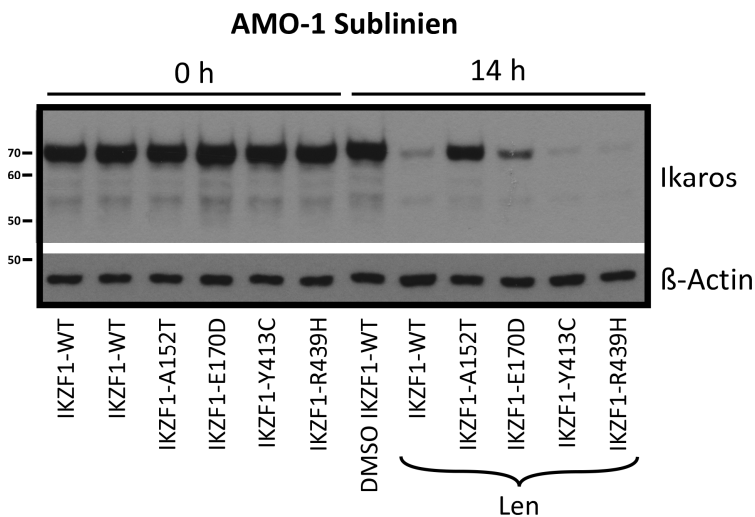


Abbildung 16: Zeitreihen der IKZF1-Proteinspiegel von Leervektor bzw. Wildtyp-IKZF1 stabil transfizierter MM Zelllinien nach Lenalidomid-Inkubation (10 μ M)

Die Zeitspanne bis zur deutlich sichtbaren Abnahme des überexprimierten IKZF1 war etwas länger als bei Leervektor-transfizierten Zelllinien, welche nur endogenes IKZF1 synthetisieren (vgl. Abbildung 16, gezeigt für AMO-1, L-363). Dennoch bewirkte die IMiD-Behandlung in allen drei untersuchten MM Zelllinien innerhalb von 24 Stunden eine weitestgehende Degradation auch des überexprimierten Ikaros, sodass dieses Modellsystem als geeignet zur funktionellen Beurteilung von potenziell protektiven Mutationen angesehen werden kann.

3.3.3.3 Auswirkung der IKZF1-Mutationen auf die Lenalidomid-induzierte Degradation

Nach Überprüfung des Modells auf Einsetzbarkeit und Aussagekraft wurde durch Western Analysen ermittelt, ob die eingefügten *IKZF1* cDNA-Mutationen den Abbau von Ikaros-Protein nach Lenalidomid-Behandlung beeinflussen im Vergleich zu Wildtyp-*IKZF1* und zur DMSO-Lösungsmittelkontrolle.



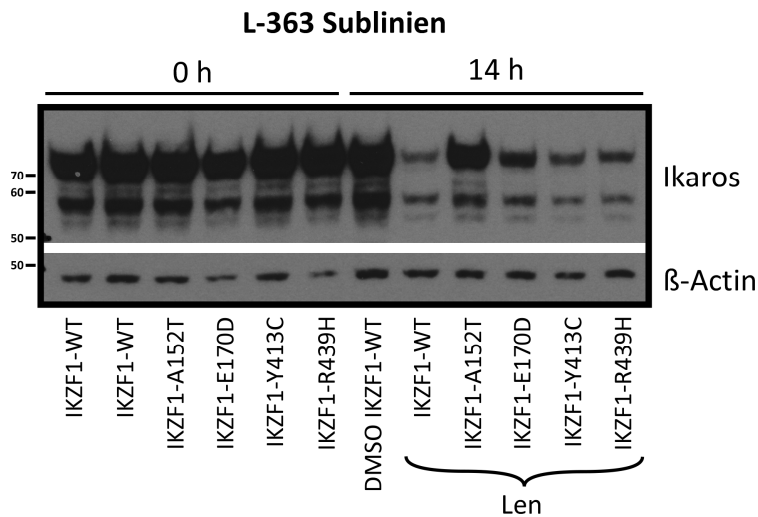


Abbildung 17: Vergleich der IKZF1-Proteinspiegel von Wildtyp-IKZF1 und Mutanten stabil transfizierter MM Zelllinien nach 14-stündiger Lenalidomid-Inkubation (10 μ M) am Beispiel von AMO-1 und L-363 Zellen

Nach vierzehnstündiger Behandlung mit Lenalidomid zeigte sich bei Wildtyp-IKZF1 transfizierten Sublinien eine ausgeprägte Degradierung des überexprimierten Ikaros (vgl. Abbildung 17). Auch die Mutanten Y413C und R439H reagierten mit einer analogen Abnahme des Ikaros-Proteinlevels. Daher ist davon auszugehen, dass sich diese Mutationen nicht resistenzvermittelnd auswirken. Die Mutation A152T hingegen wies nach 14 Stunden unter Lenalidomid einen Expressionsspiegel auf, der praktisch unverändert zum Ausgangswert (0 h) war. Es ist bemerkenswert, dass Lenalidomid bei A152T keinen Effekt auf das Ikaros-Proteinlevel hatte. Der in allen anderen Versuchen zu beobachtende und in Kapitel 1.6.3 beschriebene Wirkmechanismus der IMiDs war in diesem Experiment bei dieser Mutation aufgehoben. Und auch bei der E170D-Sublinie war eine reduzierte Lenalidomid-induzierte Degradation von Ikaros messbar, jedoch in geringerem Ausmaß.

Um die Zeitkinetik und die Stärke des Lenalidomid-vermittelten Proteinabbaus in den einzelnen Sublinien genauer zu untersuchen, wurde eine Western Blot-Zeitreihe mit stabil transfizierten MM1.S Zellen durchgeführt.

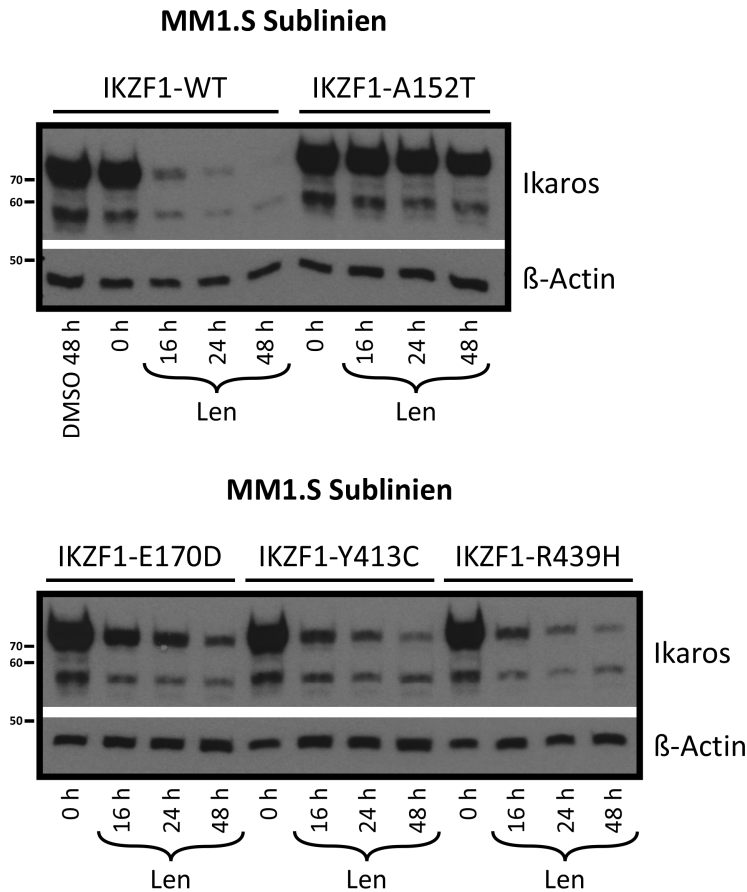


Abbildung 18: Zeitreihe der IKZF1-Proteinspiegel von Wildtyp-IKZF1 und Mutanten stabil transfizierter MM Zelllinien nach Lenalidomid-Inkubation (10 μ M) am Beispiel von MM1.S

Die Ergebnisse dieses Experiments mit MM1.S entsprachen jenen der zuvor analysierten Zelllinien: deutlich verminderter Expressionsspiegel von Ikaros bei stabil transfiziertem Wildtyp-IKZF1 sowie den Mutanten Y413C und R439H und keine Abnahme der Ikaros-Expression der A152T-Sublinie (vgl. Abbildung 18). Selbst nach 48 Stunden wurde Ikaros noch wie zum Ausgangszeitpunkt überexprimiert, es war ein anhaltend starker Effekt der Mutation A152T ersichtlich. Der Mutant E170D ließ auch in dieser Western Analyse ein leicht vermindertes Ansprechen auf Lenalidomid vermuten, was sich an geringfügig höheren Ikaros-Proteinlevels nach 16, 24 und 48 Stunden im Vergleich zu den Mutanten Y413C und R439H zeigte. Es ist anzunehmen, dass die Mutationen A152T und E170D Einfluss auf den Wirkmechanismus von Lenalidomid nehmen können: die Mutation A152T, welche innerhalb der als essenziell identifizierten Sequenz für die Lenalidomid-Sensitivität liegt, mit einem drastischem Effekt und die Mutation E170D, welche unmittelbar neben dieser Sequenz lokalisiert ist, mit weniger, aber messbarem Effekt.

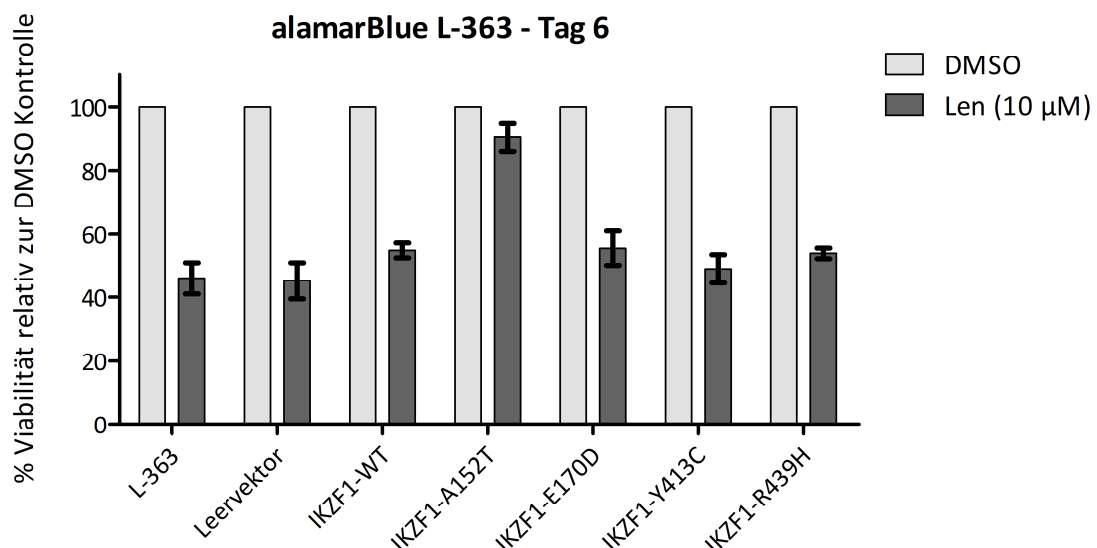
Dies traf zumindest auf die proteinbiochemischen Auswirkungen in Western Analysen zu. Um Aussagen über die Bedeutung der Mutationen für das Zellüberleben machen zu können, waren weitere und nachfolgend beschriebene Experimente notwendig.

3.3.4 Funktionelle Analysen nach Lenalidomid-Inkubation

Nachdem die Effekte der mutierten Gene auf die Proteinexpression ermittelt wurden, sollte nun die funktionelle Relevanz der IKZF1-Mutationen analysiert werden. Die Versuche erfolgten als drei voneinander unabhängige biologische Replikate, bei denen wiederum für jedes einzelne Experiment die stabil transfizierten Zellen mit Lenalidomid (10 μ M) und als Kontrolle mit DMSO als Duplikate (Annexin V-PI) bzw. Triplikate (alarBlue) bestimmt wurden. Mittels GraphPad Prism (Graphpad Software, La Jolla, USA) wurden Mittelwerte und eine Standardabweichung als Fehlerbalken dargestellt.

3.3.4.1 Viabilitätsassay: alamarBlue

Mittels des alamarBlue-Assays wurde nach sechstägiger Lenalidomid-Behandlung die Zellviabilität der polyklonalen Sublinien von L-363 und MM1.S gemessen, um einen möglichen Überlebensvorteil von Ikaros-Mutanten im Vergleich zu Wildtyp- und Leervektor-transfizierten sowie untransfizierten Zellen festzustellen.



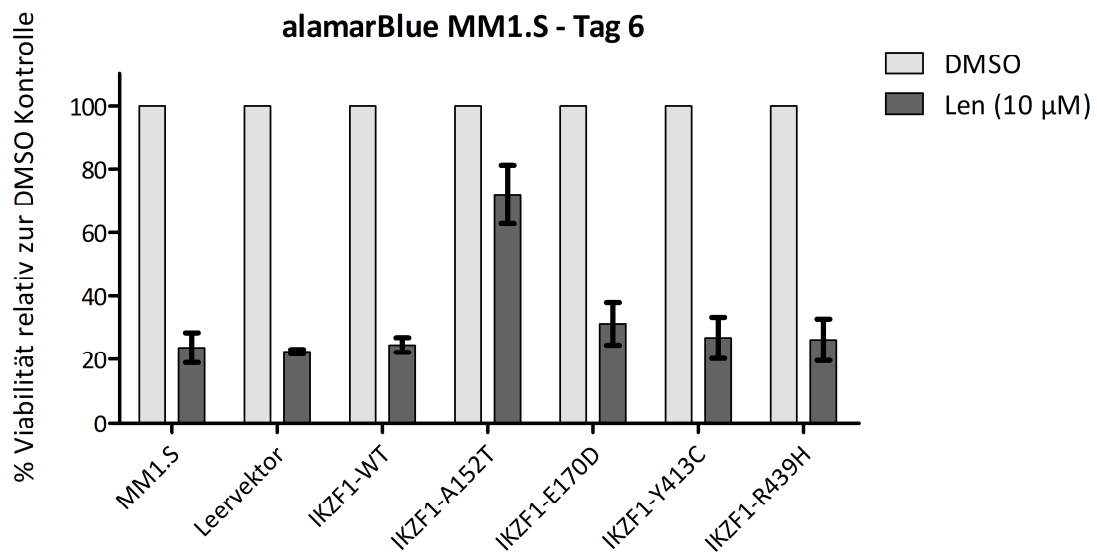


Abbildung 19: Zellviabilitätsassay der polyklonalen Sublinien von L-363 und MM1.S nach sechstägiger Lenalidomid-Inkubation, n=3 für jede Zelllinie

Wie erwartet zeigte sich, dass die Lenalidomid-Behandlung der Degron-mutierten A152T-Sublinie kaum einen Unterschied auf deren Zellviabilität bewirkte und diese ein deutlich stärkeres Überleben aufwies (vgl. Abbildung 19). Bei den anderen Sublinien war hingegen eine weitgehend gleiche Verringerung der Zellviabilität erkennbar, wobei der Degron-flankierenden Mutante E170D noch am ehesten ein kleiner Viabilitätsvorteil unter IMiD-Behandlung zugebilligt werden konnte. Dieses Ergebnis war unabhängig davon, welche andere IKZF1-Mutation vorlag, ob Ikaros wie bei den Leervektor-transfizierten Zellen nur endogen exprimiert wurde oder ob der Prozess der stabilen Transfektion und antibiotischer Selektion gar nicht durchlaufen wurde, wie bei den Ausgangszelllinien L-363 bzw. MM1.S. Während also erwartungsgemäß die antiproliferative Wirkung von Lenalidomid auf die Zellen durch die Mutation A152T analog zu Krönke et al. (2014) deutlich geschwächt wurde, konnte für die anderen hier untersuchten patientenspezifischen Ikaros Mutationen kein deutlicher Protektionseffekt nachgewiesen werden.⁴⁸

3.3.4.2 Zelltodassay: Annexin V-PI Durchflusszytometrie

Ob die Mutation A152T neben der Zellviabilität auch für die Zelltodinduktion bei Lenalidomid-Inkubation bedeutsam ist, wurde mittels des Annexin V-PI Assays der stabil transfizierten polyklonalen Kulturen von MM1.S ermittelt.

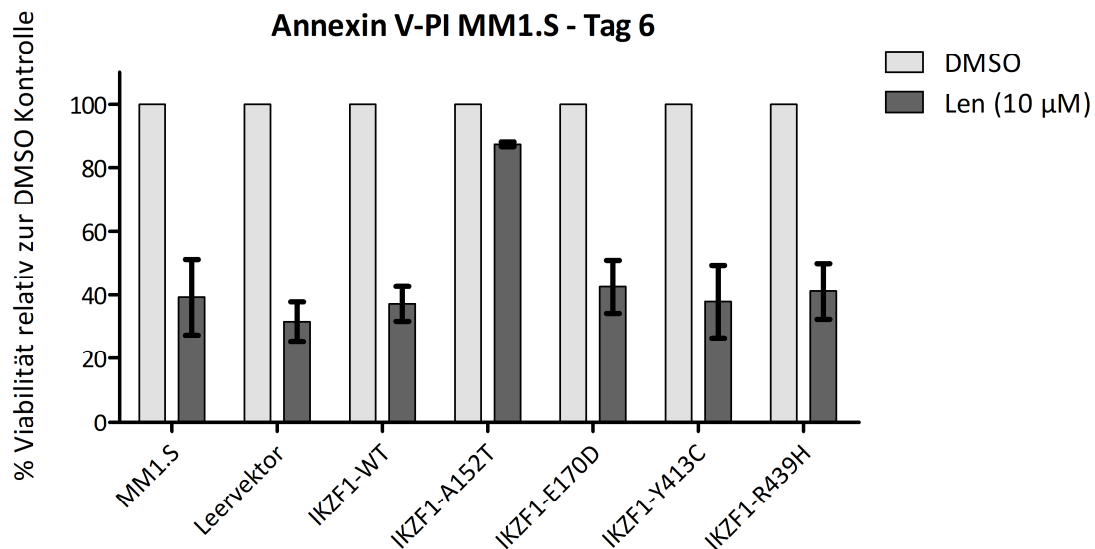


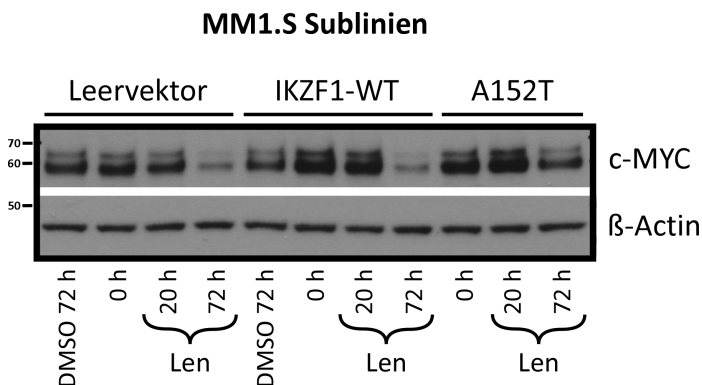
Abbildung 20: Zelltodassay der polyklonalen Sublinien von MM1.S nach sechstägiger Lenalidomid-Inkubation, n=3

Die Annexin V-Messungen ergaben bei allen Sublinien außer A152T einen ähnlich hohen Anteil apoptotischer Zellen unter Lenalidomid-Behandlung (vgl. Abbildung 20). Es kam somit zu einer vergleichbaren Induktion von programmiertem Zelltod, nur die Mutation A152T bewies erwartungsgemäß eine weitgehende Protektion gegen die Lenalidomid-induzierte Apoptose. Diese deutliche Abschwächung der Lenalidomid-Wirkung in Zellviabilitäts- und Zelltodassays lässt den Schluss zu, dass die Mutation IKZF1-A152T, welche innerhalb der für die Lenalidomid-Sensitivität als essenziell identifizierten Sequenz lokalisiert ist, einen ausgeprägten resistenzvermittelnden Einfluss hat. Dieser Effekt zeigte sich nicht nur in Western Analysen mit verringerter Ikaros-Degradierung des A152T-Mutanten, sondern war auch, wie hier gezeigt, in den funktionellen Assays messbar und ist entscheidend für einen Überlebensvorteil dieser Sublinie. Für die Mutation E170D, die direkt neben der als essenziell definierten Sequenz liegt, war im Unterschied zu den Western Analysen bestenfalls ein geringer Effekt in den Zellviabilitäts- und kein Effekt in den Zelltodassays messbar. Die anderen untersuchten

Mutanten konnten nicht mit einem konkreten Resistenzeffekt gegen IMiDs in Verbindung gebracht werden.

3.3.5 Nachgeschaltetes Ziel: c-MYC

Um einen möglichen Signalweg der resistenzvermittelnden Mutationen zu untersuchen, der eine Verbindung zwischen den Ergebnissen der proteinbiochemischen Methoden mit einer verminderten Lenalidomid-induzierten Degradation von IKZF1/3 und der funktionellen Assays mit höherem Zellüberleben darstellen könnte, wurde im Folgenden der Transkriptionsfaktor c-MYC näher betrachtet. Wie im Kapitel 1.6.3 beschrieben, stellt c-MYC einen im IMiD-CRBN-Signalweg downstream von IKZF1/3 gelegenen Transkriptionsfaktor dar. Der proteasomale Abbau von Ikaros und Aiolos führt zur Herunterregulierung von IRF4 und c-MYC und ist in der Folge antiproliferativ und apoptoseinduzierend.⁵¹ Von Zhu et al. (2014) wurde beschrieben, dass bei MM1.S Zellen nach Lenalidomid-Inkubation (10 μ M) die Abnahme von c-MYC in Western Analysen deutlich später als die Herabregulation von IKZF1/3 auftritt.⁵⁹ Bei Ikaros und Aiolos ist nach drei bis sechs Stunden ein deutlicher Effekt zu sehen, während es bei c-MYC bis zu 24 Stunden dauert.⁵⁹ Um zu untersuchen, ob die IKZF1-Mutationen auch einen Einfluss auf das nachgeschaltete Ziel c-MYC haben, wurden die MM1.S Sublinien mit Lenalidomid (10 μ M) und mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Entsprechend der Ergebnisse von Zhu et al. (2014) wurden die Inkubationszeiten mit 72 Stunden deutlich länger gewählt als bei den Analysen der Ikaros- und Aiolos-Expression.⁵⁹



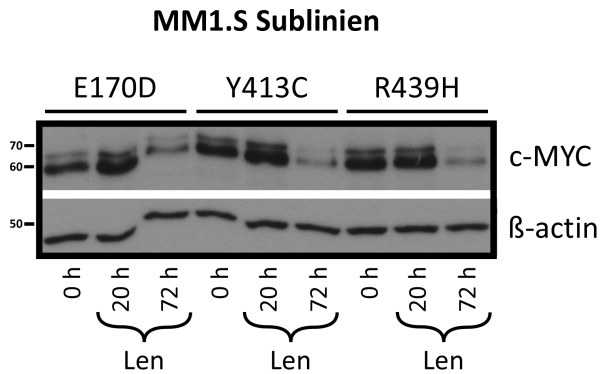


Abbildung 21: Expression von c-MYC in MM1.S Sublinien nach 20- und 72-stündiger Lenalidomid-Behandlung (10 μ M)

Nach 72 Stunden unter Lenalidomid war bei den mit Leervektor, Wildtyp-IKZF1, Y413C- und R439H-IKZF1-Mutationen stabil transfizierten Zelllinien eine deutliche Abnahme der c-MYC Expressionsspiegel festzustellen (vgl. Abbildung 21). Bei der Mutation E170D ließ sich ein Effekt auf die c-MYC Expression nicht sicher ermitteln. Die Sublinie mit der *IKZF1* cDNA-Mutation A152T wies hingegen nach 72 Stunden ein im Vergleich höheres c-MYC-Proteinlevel auf: die Expression von c-MYC wurde weniger stark herabgesetzt durch Lenalidomid. Die durch die A152T-Mutation stark eingeschränkten antiproliferativen bzw. apoptoseinduzierenden Effekte in den funktionellen Analysen können demzufolge unter anderem durch c-MYC vermittelt werden.

3.3.6 Effekt der Mutationen auf die Glucocorticoid-Sensitivität

Nachdem Auswirkungen der patientenspezifischen *IKZF1*-Mutationen auf das Ansprechen der Zellen auf Lenalidomid festgestellt wurden, stellte sich die Frage, ob möglicherweise auch die Wirksamkeit einer Glucocorticoid-Behandlung, welche ebenfalls sehr häufig beim multiplen Myelom Anwendung findet, beeinflusst werden könnte. Denn *IKZF1* nimmt auch bei der B-Vorläufer akuten lymphatischen Leukämie (BCP-ALL) ebenfalls auf vielfältige Weise Einfluss auf die Krankheitsentstehung und den Verlauf.⁶⁸ Verschiedene Signalwege und Glucocorticoid-Zielgene von *IKZF1* werden diskutiert, durch die es zur Glucocorticoid-Resistenz bei BCP-ALL kommen kann.⁶⁸ Ein resistenzvermittelnder Mechanismus ist der mittels Knockdown induzierte Funktionsverlust von *IKZF1* in BCP-ALL Zelllinien.⁸² Auch zeigen Patienten mit BCP-ALL, bei denen *IKZF1* eine Deletion oder Mutation aufweist, ein höheres Überleben unter Glucocorticoid-Therapie.⁸² Um einen möglichen Mutations-bedingten Effekt auf das

Glucocorticoid-Ansprechen in den Zellviabilitäts- und Zelltodassays zu messen, sollte zunächst eine geeignete Dexamethason-Dosis identifiziert werden. Dafür wurden Glucocorticoid-sensitive MM1.S Zellen mit verschiedenen Dexamethason-Konzentrationen inkubiert und nach sieben Tagen Annexin V-PI Assays durchgeführt.

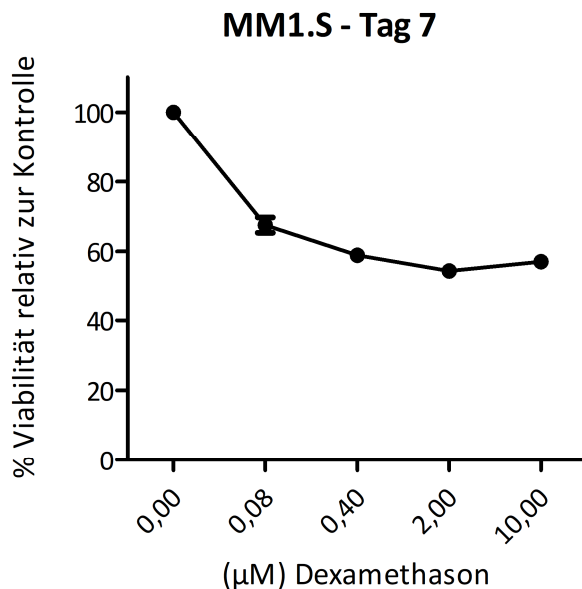


Abbildung 22: Zelltodassay der Myelomzelllinie MM1.S nach siebentägiger Inkubation mit verschiedenen Dexamethason-Konzentrationen, n=2

Während sich der Anteil apoptotischer Zellen bei 0,08 µM Dexamethason noch etwas geringer zeigte, trat bei 0,4 µM, 2 µM und 10 µM eine Apoptoseinduktion vergleichbarer Stärke auf (vgl. Abbildung 22). In der Folge wurde die Konzentration 0,5 µM gewählt, da hierbei ein messbarer Effekt ohne übermäßige Zytotoxizität erwartet wurde. Im nächsten Experiment sollten mittels funktioneller Analysen die Auswirkungen der Dexamethason-Behandlung auf die einzelnen MM1.S Sublinien ermittelt werden. Im Unterschied zu den Experimenten mit Lenalidomid wurden hierbei für den alamarBlue-Assay nur Duplikate für eine einfache Messung inkubiert und bei den wie üblich angesetzten Duplikaten des Annexin V-PI Assays erfolgten nur zwei durchflusszytometrische Messungen. Mit diesem Versuch sollte lediglich grob abgeschätzt werden, ob Dexamethason einen Einfluss haben könnte.

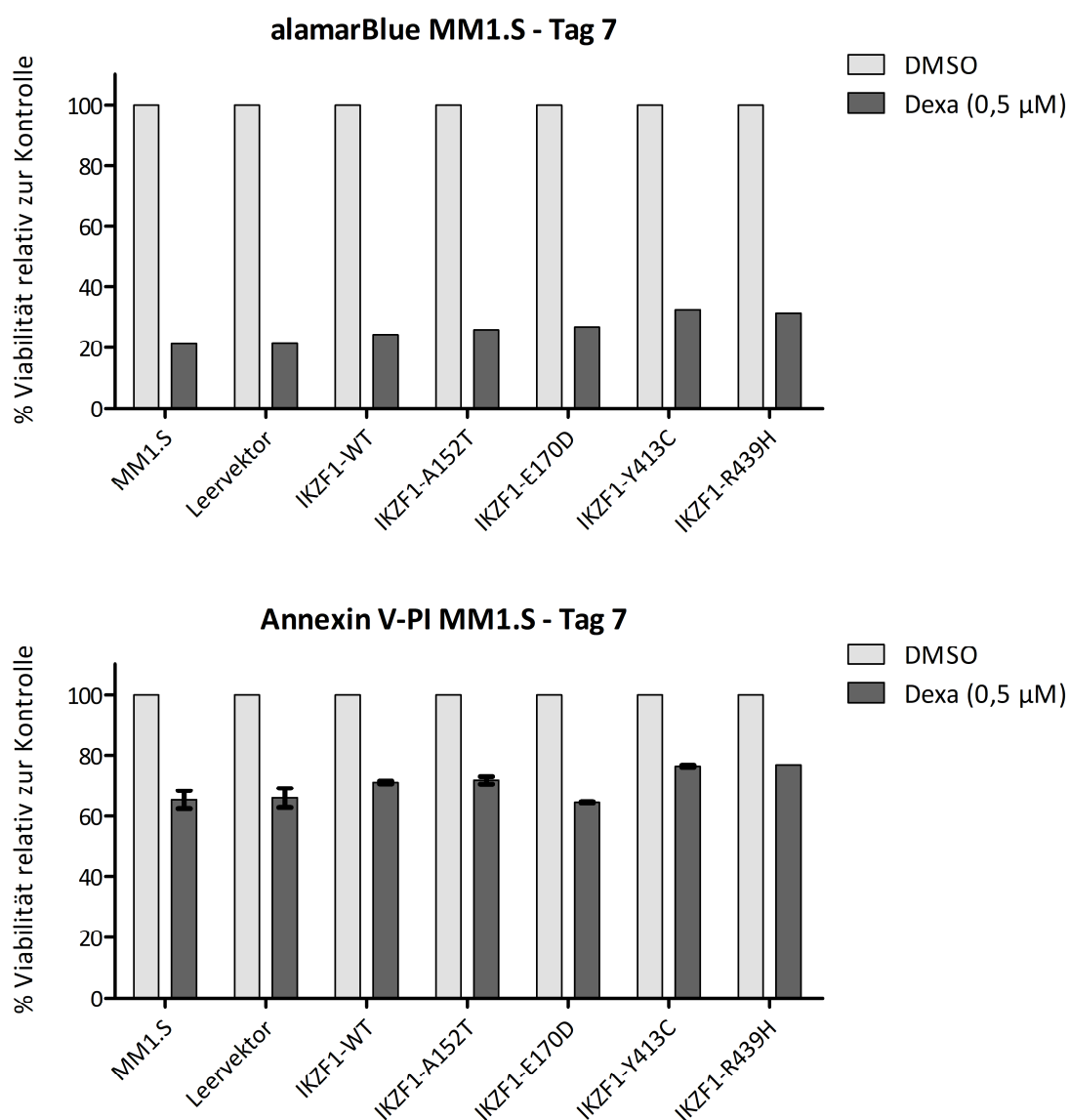


Abbildung 23: Funktionelle Assays der MM1.S Sublinien nach siebentägiger Dexamethason-Inkubation (0,5 µM), alamarBlue: n=1, Annexin V-PI: n=2

In beiden funktionellen Assays wiesen alle Sublinien eine gleichartige Abnahme der Zellviabilität bzw. einen vergleichbaren Anteil apoptotischer Zellen auf (vgl. Abbildung 23). Überexprimiertes bzw. mutiertes Ikaros war nicht einschränkend für die Wirkung von Dexamethason. So können Glucocorticoide beim multiplen Myelom zytotoxisch und apoptoseinduzierend sein über eine Vielzahl von Signalwegen.⁸³ Für die Entwicklung von Glucocorticoid-Resistenzen bei der Behandlung des multiplen Myeloms wurde eine Reihe von Mechanismen beschrieben, der CRBN-Signalweg wurde bislang jedoch nicht als relevant dafür genannt.⁸³ Darüber hinaus haben Glucocorticoide vielfältige

Wirkmechanismen, unter anderem antiinflammatorische und immunsuppressive Effekte.⁸³ Zusammenfassend ist nicht anzunehmen, dass durch diese patientenspezifischen *IKZF1* cDNA-Mutationen Resistenzen bei Therapien mit Glucocorticoiden vermittelt werden.

3.4 Aiolos (IKZF3)

Ein weiteres Gen, bei dem mittels NGS-Techniken Mutationen bei Patienten mit RRMM identifiziert wurden, ist *IKZF3*. Zur Untersuchung einer dieser Mutationen erfolgte eine stabile Transfektion (s. Kapitel 2.2.5) der Myelomzelllinien L-363 und MM1.S mit in Sleeping Beauty Vektoren klonierter cDNA für Wildtyp-Aiolos (IKZF3-WT) und für die mutierte Aiolos-Variante (IKZF3-G159R), bei der an Position 159 eine Aminosäure ausgetauscht wurde (vgl. Abbildung 35 im Anhang). Darüber hinaus diente ein Sleeping Beauty Vektor ohne Insert, ein sogenannter Leervektor, als Negativkontrolle und wurde ebenfalls transfiziert. Auf AMO-1 wurde in diesem Fall verzichtet, da sich bei den IKZF1-Analysen mit dieser Zelllinie keine zusätzlichen Informationen gewinnen ließen. Nach der Elektroporation erfolgte eine antibiotische Behandlung, um die Zellen zu selektionieren, bei denen es zum anhaltenden Einbau des Plasmids in das Genom gekommen war (s. Kapitel 2.2.7). Mit diesen Sublinien sollten nun Experimente analog zu IKZF1 umgesetzt werden.

3.4.1 Analyse mittels Western Blot

3.4.1.1 Vergleich der IKZF3-Grundspiegel

Mittels Western Analysen sollte festgestellt werden, ob es durch die stabile Transfektion der Zelllinien mit Proteinexpressionsvektoren für Wildtyp-IKZF3 und IKZF3-G159R zu einer Überexpression von Aiolos kommt. Zudem sollten die Expressionsspiegel der Sublinien bezüglich einer Varianz in der Stärke der Aiolos-Expression betrachtet werden und verifiziert werden, dass die mögliche Aiolos-Überexpression das Proteinlevel von Ikaros nicht betrifft.

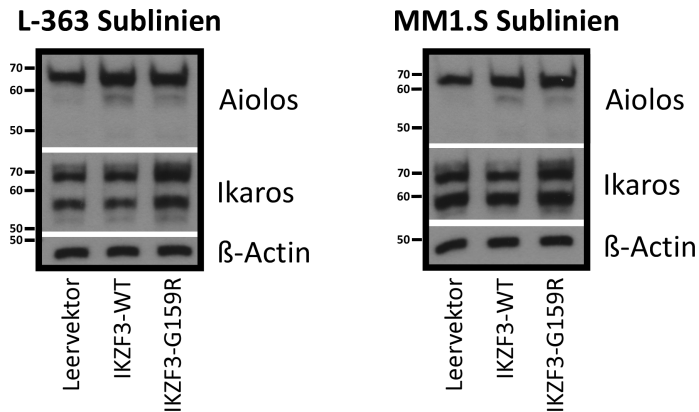
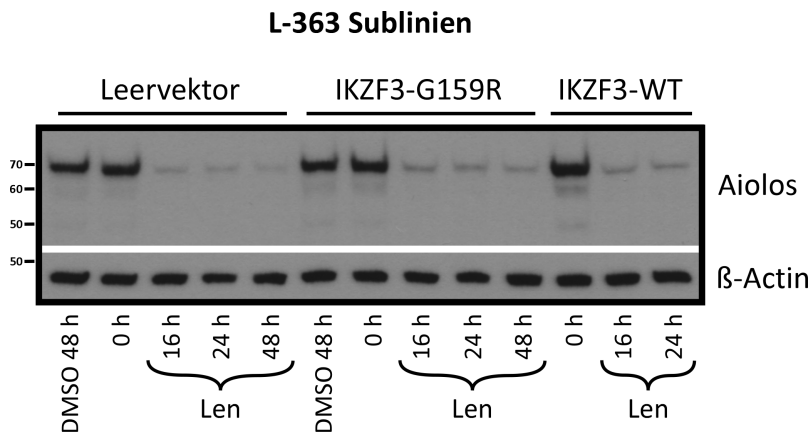


Abbildung 24: Vergleich der Expression des exogenen Aiolos im Vergleich zum Leervektor und zu Ikaros in zwei stabil transfizierten MM Zelllinien

Bei IKZF3-Wildtyp und G159R-Mutant war ein vergleichbar niedriges Proteinlevel von Aiolos erkennbar (vgl. Abbildung 24). Relativ zum Leervektor mit ausschließlich endogen synthetisiertem IKZF3 gesehen, induzierten die Sleeping Beauty Vektoren mit dem (mutierten) *IKZF3* cDNA-Gen kaum eine vermehrte Expression von Aiolos: exogenes IKZF3 wurde in diesen Sublinien praktisch nicht synthetisiert. Eine Beeinflussung der Expressionsspiegel von Ikaros trat nicht auf.

3.4.1.2 Reaktion der IKZF3-Spiegel auf die Behandlung mit Lenalidomid

Um trotz des höchstens minimal überexprimierten Aiolos einen Effekt der Mutation auf die Degradierung von IKZF3 unter Lenalidomid nicht zu übersehen, wurden Western Analysen durchgeführt. Es erfolgte eine Inkubation der Sublinien mit 10 μ M Lenalidomid und als Lösungsmittelkontrolle mit DMSO, sowie Zellernten zu verschiedenen Zeitpunkten.



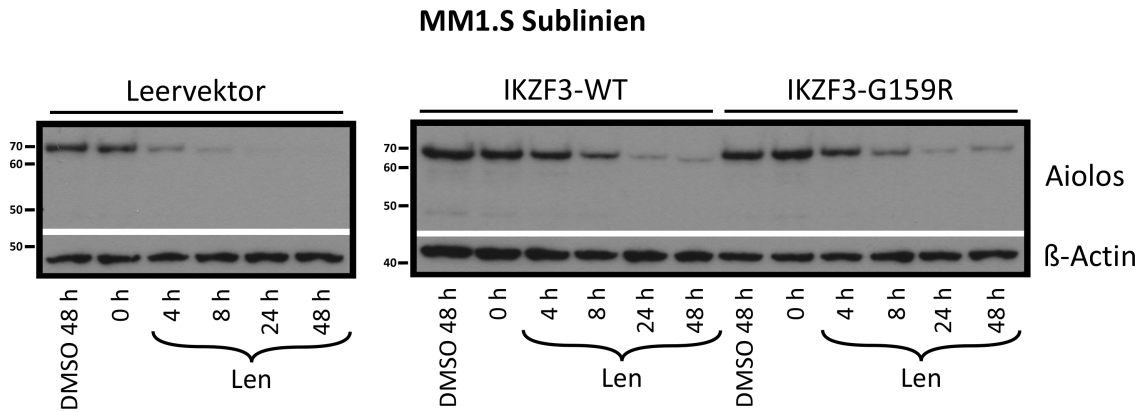


Abbildung 25: Vergleich der IKZF3-Proteinspiegel von Leervektor, Wildtyp und Mutant in L-363 und MM1.S nach Lenalidomid-Inkubation (10 μ M) zu verschiedenen Zeitpunkten

Nach sechzehnständiger Lenalidomid-Behandlung war die Proteinexpression von Aiolos bei allen L-363 Sublinien kaum noch vorhanden, unabhängig davon, ob der transfizierte Sleeping Beauty Vektor ein *IKZF3* cDNA-Insert enthalten hatte oder nicht (vgl. Abbildung 25). Auch bei MM1.S traten innerhalb von acht Stunden nach Zugabe von Lenalidomid synchron abnehmende *IKZF3*-Proteinspiegel bei Mutant und Wildtyp auf. Ähnlich verhielt sich auch das bei den Leervektor-transfizierten MM1.S Zellen ausschließlich endogen vorkommende Aiolos. Somit kam es durch Lenalidomid zu einer umfassenden und gleichmäßigen Degradation von Aiolos, bei der sich *IKZF3-G159R*, *IKZF3-WT* und Leervektor nicht voneinander unterschieden. Es ließ sich in Western Analysen bei kaum vorhandener Überexpression von Aiolos kein Effekt nachweisen, sodass es nicht möglich war eine Aussage über resistenzvermittelnde Auswirkungen der Mutation auf proteinbiochemischer Ebene zu treffen.

3.4.2 Funktionelle Analysen nach Lenalidomid-Inkubation

Obwohl keine der Western Analysen bisher aussagekräftige Ergebnisse geliefert hatte, wurden dennoch auch funktionelle Assays durchgeführt, um Einflüsse der Mutation auf Zellviabilität und Zelltod nicht zu versäumen. Die Versuche wurden entsprechend Kapitel 2.2.8 - 2.2.10 und 3.3.4 angesetzt, mit dem Unterschied, dass die Zellen für die folgenden Assays jeweils sieben Tage mit Lenalidomid (10 μ M) inkubiert wurden, während der Zeitraum bei den Untersuchungen von *IKZF1* nur sechs Tage betrug. Damit sollte auch ein gering ausgeprägter Effekt, wenn dieser vorhanden war, erkannt werden.

3.4.2.1 Viabilitätsassay: alamarBlue

Die Messungen der Zellviabilität mittels alamarBlue-Assay erfolgten nach sieben Tagen unter Lenalidomid mit dem Ziel, eine etwaige Überlegenheit bezüglich des Überlebens der IKZF3-G159R-mutierten Sublinie bei L-363 und MM1.S Zellen zu identifizieren.

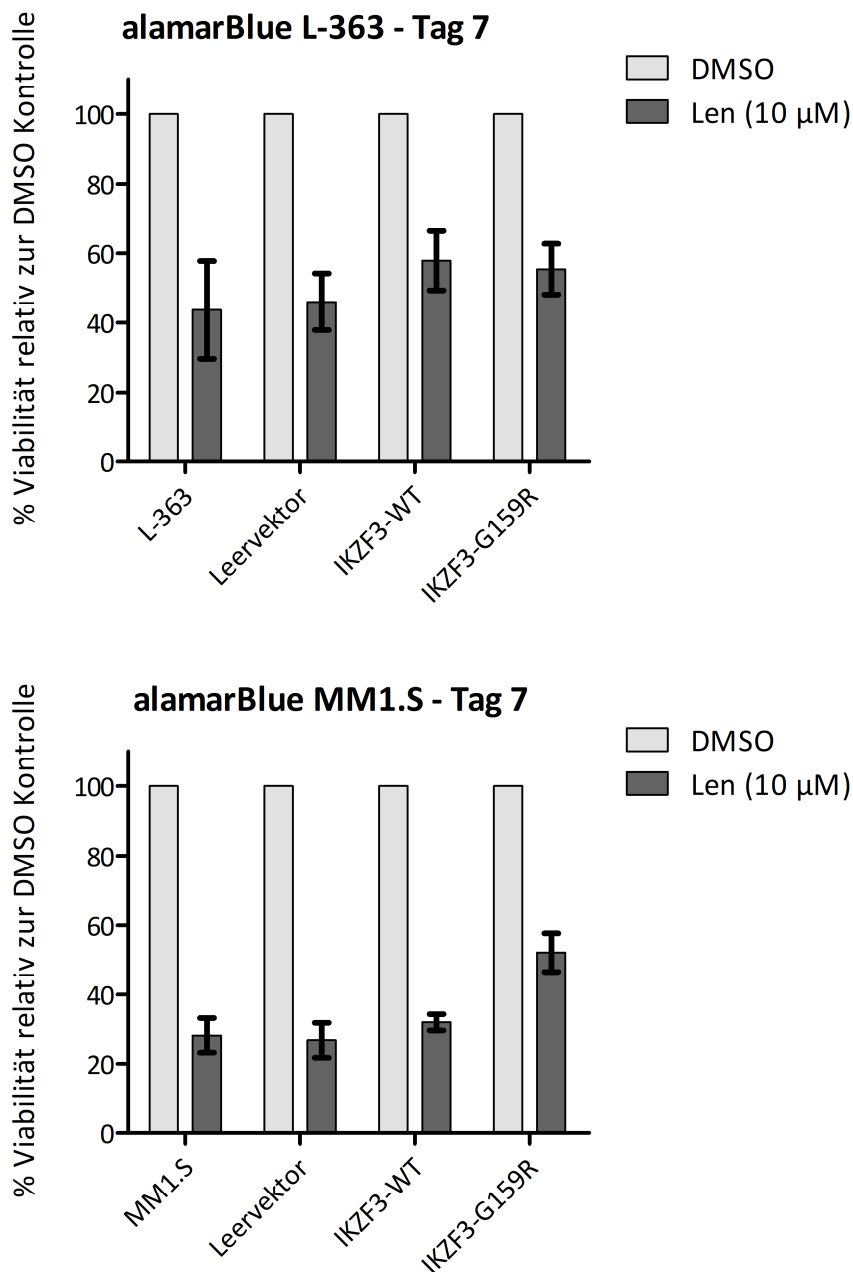


Abbildung 26: Zellviabilitätsassay der polyklonalen Sublinien von L-363 und MM1.S nach siebentägiger Lenalidomid-Inkubation, n=2 für L-363, n=3 für MM1.S

Bei L-363 wiesen sowohl die untransfizierte als auch die mit Leervektor, Wildtyp-IKZF3 oder G159R-Mutation transfizierten Sublinien eine ähnliche Abnahme der Zellviabilität unter Lenalidomid auf (vgl. Abbildung 26). Bei MM1.S kann der geringere Anteil apoptotischer Zellen des Mutanten aufgrund seiner eher schwachen Ausprägung als eingeschränkt analysierbar gewertet werden. Zudem war nach der Transfektion und Selektion mit Antibiotika ein visuell spärlicheres Wachstum der G159R-Sublinie bei MM1.S aufgefallen, wodurch die Diskrepanz mit den Ergebnissen der L-363 Zellen erklärt werden könnte. Diese Mutation beeinflusst die antiproliferative Wirkung von Lenalidomid auf die Zellen somit nicht, zumal bei L-363 keinerlei Effekt festzustellen war.

3.4.2.2 Zelltodassay: Annexin V-PI Durchflusszytometrie

Als weiterer funktioneller Assay, um Effekte der Mutation auf das Zellüberleben zu ermitteln, wurde nach siebentägiger Lenalidomid-Behandlung der Annexin V-Assay bei den MM1.S Sublinien durchgeführt.

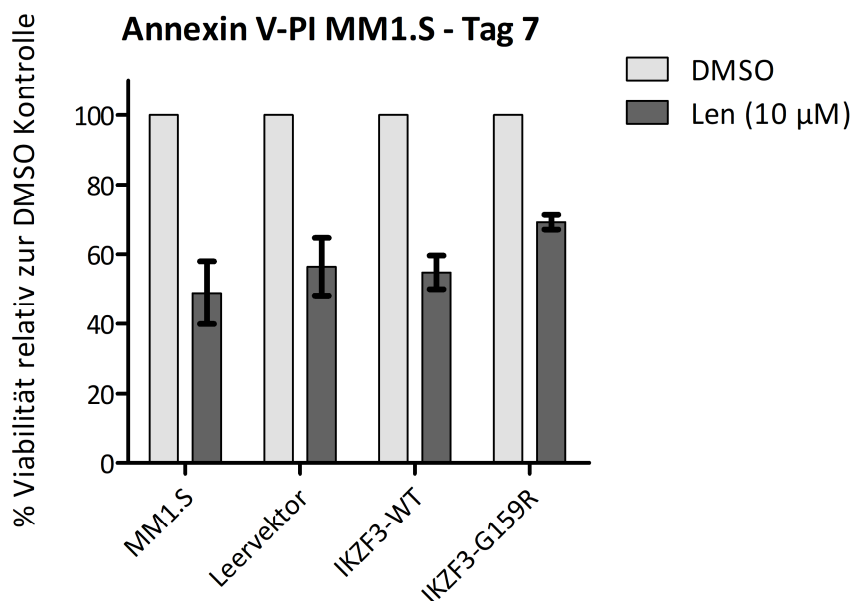


Abbildung 27: Zelltodassay der polyklonalen Sublinien von MM1.S nach siebentägiger Lenalidomid-Inkubation, n=3

In der durchflusszytometrischen Messung von Annexin V/FITC und PI waren die Zellen des Mutanten geringfügig weniger durch den Apoptose-induzierenden Effekt von Lenalidomid betroffen (vgl. Abbildung 27). Die anderen Sublinien reagierten mit einer ähnlich starken Zunahme ihrer apoptotischen Zellen unter Lenalidomid. Neben der

G159R-Mutation selbst könnten auch wieder die weniger proliferierenden Zellen, insbesondere der DMSO-Lösungsmittelkontrolle, ein Faktor für das geringgradig höhere Zellüberleben dieser mutierten Sublinie sein. Insgesamt zeigte sich weder in Western Analysen noch in funktionellen Assays zur Untersuchung von IKZF3 ein eindeutiges Ergebnis mit dem bislang verwendeten Modellsystem für IKZF3. Die mangelnde Überexpression von Aiolos kann hierbei als eine mögliche Ursache gesehen werden.

3.4.3 Transiente Transfektion: Vergleich der Expression von *IKZF1*- und *IKZF3*-cDNA

In Zusammenschau der bisher erhobenen Daten zu *IKZF3* lässt sich eine unzureichende stabile Expression dieses Gens feststellen. Wegen des Erfolgs der stabilen Transfektion von identisch aufgebauten Sleeping Beauty Vektoren mit den verschiedenen Varianten des *IKZF1* cDNA-Gens als Insert, wurde bei *IKZF3* auf eine Vorab-Expressionsuntersuchung nach transienter Transfektion verzichtet. Von dieser lässt sich zwar nicht uneingeschränkt auf das Ausmaß der Proteinsynthese der stabil transfizierten Zelllinien schließen, aber die prinzipielle Eignung der Expressionsvektoren zur Überexpression von Aiolos hätte durchaus beurteilt werden können. Aus diesem Grund und um den Expressionsspiegel dieses Vektors unmittelbar mit dem für seine starke Ikaros-Überexpression aus Kapitel 3.3.1 bekannten Plasmid vergleichen zu können, wurden die Sleeping Beauty Vektoren für IKZF1-Wildtyp (IKZF1-WT) und IKZF3-Wildtyp (IKZF3-WT) mittels Elektroporation transient in L-363 Zellen eingebracht. Anschließend wurden Western Analysen der selektiv angereicherten und stark transfizierten Zellen durchgeführt.

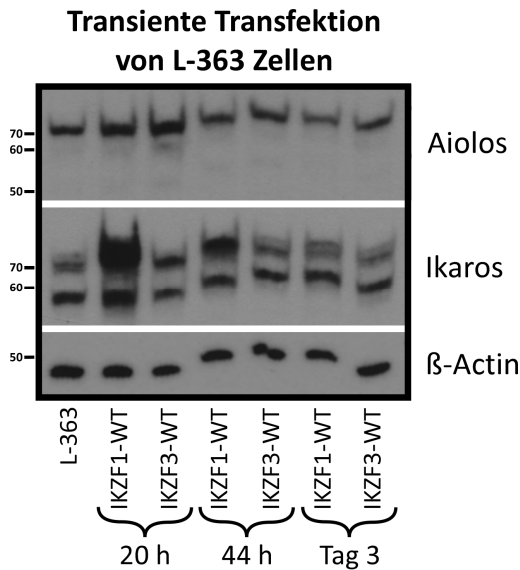


Abbildung 28: Western Analyse der Expressionsvektoren für IKZF1- und IKZF3-Wildtyp-Proteine 20 Stunden, 44 Stunden und 3 Tage nach transienter Transfektion von L-363 Zellen im Vergleich zur endogenen Expression der L-363 Zelllinie

Wie erwartet, zeigte sich eine deutliche Überexpression von Ikaros bei IKZF1-WT zwanzig Stunden nach Elektroporation (vgl. Abbildung 28). Diese hielt auch in geringerem Maße nach 44 Stunden noch an. Bei IKZF3-WT war hingegen nur eine marginale Überexpression von Aiolos zwanzig Stunden nach Elektroporation feststellbar und nach 44 Stunden überhaupt nicht mehr nachweisbar. Dieses Proteinlevel entspricht auch dem zuvor ermittelten Ergebnis der stabilen Transfektion (s. Abbildung 24), und die verwendeten Sleeping Beauty Aiolos Expressionskonstrukte konnten somit als ungeeignet bestätigt werden.

3.4.4 Subklonierung in eine CAG-Promotor getriebene Expressionskassette

Der bislang verwendete Sleeping Beauty Vektor weist eine CMV-Promoter getriebene Expressionskassette auf. Es sollte daher getestet werden, ob eine CAG-Promoter gesteuerte Expressionskassette eher für eine Überexpression von Aiolos geeignet ist. Beide Kassetten unterscheiden sich nicht nur im Promotor, sondern auch in den nach dem Stopcodon angefügten 3'-untranslatierten Bereichen, die die Stabilität der synthetisierten mRNA beeinflussen können. Dafür wurde die cDNA für Wildtyp-Aiolos aus dem bisherigen Vektor mittels DNA-Restriktionsverdau herauspräpariert und analog zum Vorgehen in Kapitel 2.1.12 in ein CAG-Promoter getriebenes Plasmid subkloniert.

Bei erfolgreicher Aiolos Expression in der transienten Transfektion sollte entsprechend für das G159R-mutierte *IKZF3* cDNA-Gen verfahren werden.

3.4.5 Transiente Transfektion: *IKZF3*-cDNA in CAG- und CMV-Promotor getriebenen Expressionsvektoren

Im Rahmen der transienten Transfektion sollte der Vektor mit CAG-Promoter getriebener Expressionskassette für *IKZF3*-Wildtyp (*IKZF3*-CAG) von JIN-3 Zellen durch Elektroporation aufgenommen werden (vgl. Abbildung 36 im Anhang). Als weiteres Plasmid wurde der bisher eingesetzte CMV-Promoter getriebene Expressionsvektor für *IKZF3*-Wildtyp (*IKZF3*-CMV) transfiziert (vgl. Abbildung 35 im Anhang). Damit kann durch direkten Vergleich der beiden Vektoren ein möglicher höherer Expressionsspiegel von *IKZF3*-CAG in der Western Analyse ermittelt, sowie dessen Stärke beurteilt werden.

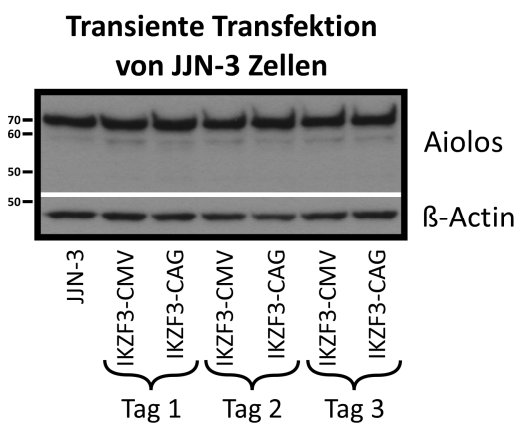


Abbildung 29: Vergleich der Expression des exogenen Aiolos bei CMV- und CAG-Promoter getriebenen Expressionskassetten einen, zwei und drei Tage nach transienter Transfektion von JIN-3 Zellen

Am Tag nach der Elektroporation war durch die transiente Transfektion keine Überexpression von exogenem *IKZF3* feststellbar, weder bei dem CAG-Promoter noch bei dem CMV-Promoter getriebenen Vektor (vgl. Abbildung 29). Es ließ sich bei CAG-*IKZF3* keine stärkere Proteinsynthese von Aiolos als bei CMV-*IKZF3* erkennen. Das Proteinlevel von Aiolos war zu jedem betrachteten Zeitpunkt bei beiden transfizierten Sublinien auf einem ähnlichen Level wie bei der untransfizierten Zelllinie JIN-3, welche nur endogenes Aiolos synthetisiert. Daher wurde auf eine stabile Transfektion von CAG-Promoter getriebenen Expressionsvektoren für *IKZF3* cDNA und auf weitere Analysen des G159R-Mutanten verzichtet.

Mit beiden verwendeten Expressionskassetten konnte Aiolos leider nicht überexprimiert werden, sodass die im Rahmen dieser Doktorarbeit ermittelten funktionellen Ergebnisse für die *IKZF3* Mutante keine belastbaren Aussagen zu einer möglichen Resistenzwirkung gegenüber Lenalidomid bei MM Zellen erlauben. Dafür wären weitere Untersuchungen mit einem geeigneten Modell notwendig (s. Diskussion).

4 Diskussion

Mit NGS-Techniken kann die Dynamik und Komplexität im Genom des multiplen Myeloms in der Pathogenese und Tumorprogression dargestellt werden. Denn die bei Diagnose vorhandene intratumorale Heterogenität der Myelomzellen unterliegt einem Selektionsdruck durch therapeutische Substanzen.³¹ Nach Behandlungsbeginn kann es neben erfolgreich eradizierten und nicht mehr nachweisbaren Subklonen auch zu einer Selektion von Subklonen kommen, die Therapieresistenzen und einen Überlebensvorteil aufweisen.³¹ Dies kann durch Veränderungen auf chromosomaler Ebene oder durch das Auftreten von Mutationen bedingt sein. In einer Metaanalyse von M³P-Kohorten war im Vergleich von unbehandelten zu vorbehandelten Patienten ein signifikanter Anstieg an somatischen Mutationen sowie deren Clusterung in Hotspots zu verzeichnen.³⁷ Ein von dieser Zunahme der Mutationsfrequenz betroffenes Gen stellte *IKZF1* dar.³⁷ Neben *IKZF1* war *IKZF3* ein weiteres Gen, dessen mutierte cDNA-Variante bezüglich resistenzvermittelnder Einflüsse auf das Lenalidomid-Ansprechen in dieser Doktorarbeit untersucht wurde. Die Mutationen wurden bei Patienten mit rezidiviertem und refraktärem multiplen Myelom mittels NGS-Techniken identifiziert und im Rahmen dieser Arbeit als Proteinexpressionsvektorkonstrukte kloniert. Nach der stabilen Transfektion der *IKZF1* cDNA-Gene in die drei humanen Myelomzelllinien AMO-1, L-363 und MM1.S überexprimierten alle Sublinien die Ikaros-Varianten vergleichbar stark (vgl. Abbildung 14). Bei den Mutationen *IKZF1*-A152T und *IKZF1*-E170D gelang der Nachweis eines verminderten Abbaus von Ikaros nach Lenalidomid-Behandlung mit Western Analysen (vgl. Abbildung 17 und Abbildung 18). Für E170D war der Effekt geringer ausgeprägt als für die Mutation A152T, bei welcher der Ikaros-Proteinspiegel komplett unbeeinflusst von der Lenalidomid-Zugabe blieb. Auch in den funktionellen Analysen hob die Mutation A152T die Lenalidomid-Wirkung praktisch auf und führte zu einem deutlich stärkeren Überleben der IMiD-sensitiven Zelllinien L-363 und MM1.S (vgl. Abbildung 19 und Abbildung 20). Es wird geschlussfolgert, dass eine Lenalidomid-Resistenz nur durch jene *IKZF1*-Mutationen vermittelt wird, welche eine Lokalisation innerhalb (A152T) oder zumindest in der unmittelbaren Nähe (E170D) von der als essenziell identifizierten Sequenz für Lenalidomid-Sensitivität aufweisen. Für *IKZF3* ließ

sich trotz Verwendung von Sleeping Beauty Vektoren mit unterschiedlichen Expressionskassetten (CMV-Promotor getrieben, CAG-Promotor getrieben) keine eindeutige Überexpression induzieren (vgl. Abbildung 24 und Abbildung 29), sodass die Ergebnisse nur begrenzt interpretiert werden können.

Wie in Kapitel 1.6.4 beschrieben, identifizierten Krönke et al. (2014) durch die Analyse von IKZF-Deletionsmutanten eine für die Lenalidomid-Wirkung essenzielle Degron-Sequenz.⁴⁸ Der Austausch einer einzelnen Aminosäure von IKZF3 in diesem Bereich kann reichen, dass Myelomzelllinien resistent gegen Proteinabbau und Zellwachstumshemmung durch Lenalidomid werden.⁴⁸ Neben IKZF1-Q146H und IKZF3-Q147H, also bei Austausch der einzigen Degron-Aminosäure, die zwischen den IMiD-sensitiven (IKZF1/3) und -insensitiven (IKZF2/4) Proteinen differiert, wurden weitere Mutationen von Ikaros und Aiolos untersucht: die innerhalb der Degron-Sequenz gelegenen Mutationen IKZF3-Q150H und IKZF3-L161R/L162R zeigten ebenfalls keinen Lenalidomid-induzierten Proteinabbau und die von Lu et al. (2014) analysierten Mutationen IKZF1-H176P/L177F, welche fast zehn Aminosäuren von diesem Degron entfernt liegen, wiesen nach Lenalidomid-Inkubation in Western Analysen ähnliche Proteinlevel wie Wildtyp-IKZF1 auf und damit keine Resistenz.^{48, 49} Im Gegensatz zu den bislang untersuchten Mutationen wurden in der vorliegenden Arbeit Mutationen proteinbiochemisch und funktionell analysiert, die *in vivo* bei MM Patienten aufgetreten waren.

Für IKZF1 konnte belegt werden, dass es nach Elektroporation und antibiotischer Selektion zu konstant hoher Expression der Ikaros-Proteinexpressionsvektoren in allen stabil transfizierten Sublinien kam, unabhängig von der verwendeten *IKZF1* cDNA-Version (vgl. Abbildung 14). Darüber hinaus trat trotz dieser massiven *IKZF1*-Überexpression eine Lenalidomid-induzierte Degradierung von Ikaros auf, wenn auch geringfügig verzögert (vgl. Abbildung 16). Dies indiziert, dass das verwendete System für IKZF1 funktioniert und damit auch die Beurteilbarkeit der weiteren Experimente gegeben war. Zudem kann die in dieser Arbeit untersuchte patientenspezifische

Mutation IKZF1-A152T, die innerhalb der Degron-Sequenz lokalisiert ist, als weitere Probe der Relevanz dieses Degrons für die Lenalidomid-Sensitivität gesehen werden. Dies wird durch die resistenzvermittelnden Folgen dieser Mutation bestätigt, denn sowohl in Western Analysen als auch in Zellviabilitäts- und Zelltodassays war eine durch Lenalidomid unbeeinflusste Proteinexpression bzw. keine Abnahme der Viabilität feststellbar (vgl. Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 20). In den Western Analysen zeigten die IKZF1-A152T überexprimierenden Zellen nach dreitägiger Lenalidomid-Inkubation zudem höhere Expressionsspiegel von c-MYC als die anderen Sublinien (vgl. Abbildung 21). Die Herunterregulierung der Expression von IRF4 und c-MYC wird generell als ein möglicher Mechanismus gesehen, wie die Degradierung von IKZF1/3 zu Wachstumshemmung und Apoptose führt.⁵¹ Jedoch kann die Überexpression von c-MYC oder IRF4 einen Mangel an Ikaros nicht aufwiegen und der Verlust von c-MYC und IRF4 ist keine Voraussetzung für den durch *IKZF1/3*-Deletion auftretenden Zelltod.⁸⁴ Daher wird vermutet, dass bei der Sublinie A152T c-MYC zwar als Mediator zwischen dem trotz Lenalidomid unveränderten Ikaros-Expressionsspiegel in den Western Analysen und der kaum eingeschränkten Zellviabilität in den funktionellen Assays gesehen werden kann. Allerdings sind vermutlich auch andere Signalwege als die IRF4-MYC-Achse an den ausbleibenden wachstumshemmenden und apoptotischen Effekten von Lenalidomid bei der Mutation A152T beteiligt. Neben der Lokalisation der Mutation IKZF1-A152T innerhalb der von Krönke et al. (2014) identifizierten Sequenz für Lenalidomid-Sensitivität könnte auch die ausschließlich bei IKZF1-A152T und IKZF3-G159R auftretende veränderte Polarität bzw. Azidität der ausgetauschten Aminosäure als Ursache gesehen werden.⁴⁸ Obwohl diese Mutationen sicherlich stärker die räumliche Struktur beeinflussen, war auch bei der Mutation IKZF1-E170D, bei der die saure Glutaminsäure durch die ebenfalls saure Asparaginsäure ersetzt wurde, in den Western Analysen ein abgeschwächter Ikaros-Abbau unter Lenalidomid im Vergleich zu Wildtyp-IKZF1 feststellbar (vgl. Abbildung 17 und Abbildung 18). Diese in der vorliegenden Arbeit ebenfalls analysierte patientenspezifische IKZF1-E170D Mutation liegt unmittelbar neben dem als essenziell für Lenalidomid-Sensitivität definierten Degron und damit wohl in dem Bereich, den Krönke et al. (2014) als ausreichend für

Lenalidomid-Ansprechen beschrieb.⁴⁸ Trotz der verminderten Ikaros-Degradierung in den Western Analysen, blieb in den Zellviabilitäts- und Zelltodassays ein messbarer Effekt aus (vgl. Abbildung 19 und Abbildung 20). Es ist möglich, dass der durch die Mutation E170D im Vergleich zu A152T geringfügiger verringerte Ikaros-Expressionsspiegel unter Lenalidomid nicht ausreichend war, um sich auch in den funktionellen Analysen zu manifestieren. Diese umfassten mit sechs Tagen bislang allerdings nur einen kurzen Zeitraum. Um einen möglicherweise nur schwach ausgeprägten Effekt der E170D Mutation durch längere Inkubationszeiten aufzudecken, wurde ein „Clonal Competition Assay“ (CCA) durchgeführt. Da auch 2,5 Monate nach Elektroporation noch eine deutliche Überexpression von Ikaros feststellbar war (vgl. Abbildung 15), wurden die polyklonalen Sublinien als geeignet für ein Langzeitexperiment angesehen. Die im Rahmen dieser Arbeit kryokonservierten stabil transfizierten L-363 Sublinien wurden von Nicole Müller aufgetaut und mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Proteinen (eGFP bzw. RFP) stabil markiert. Kokulturen bestehend aus 90 % Wildtyp-IKZF1 (IKZF1-WT-eGFP) und 10 % mutierter Version von IKZF1 (A152T-, E170D- und R439H-RFP) wurden für circa 50 Tage inkubiert, jeweils eine Kokultur mit mäßiger Lenalidomid-Konzentration (2,5 μ M) und eine als Referenz ohne Pharmakon.³⁷ Das Verhältnis von eGFP zu RFP wurde mittels Durchflusszytometrie alle 4-10 Tage gemessen und anhand dessen auf die Anteile der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp geschlossen.³⁷

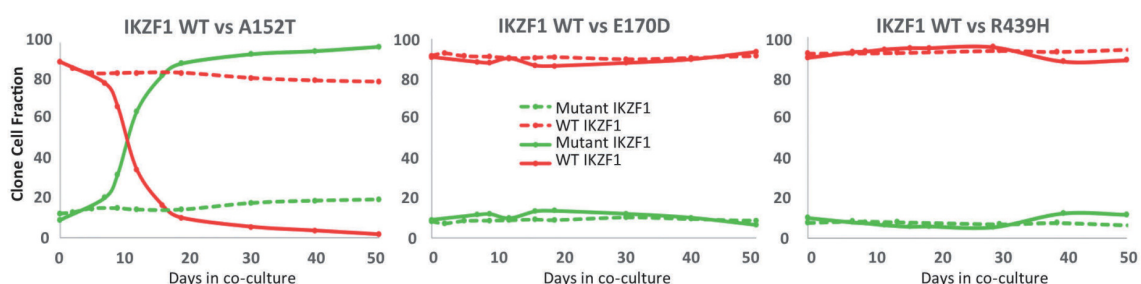


Abbildung 30: „Clonal Competition Assay“ (CCA) von IKZF1-WT (rot) im Vergleich zu den Mutanten A152T, E170D und R439H (grün). Gestrichelte Linie: ohne Pharmakon, durchgezogene Linie: mit 2,5 μ M Lenalidomid. WT: Wildtyp. Aus Barrio et al. (2020)³⁶, mit freundlicher Genehmigung von Haematologica.

Wie erwartet, wies die Sublinie A152T auch im CCA-Langzeitexperiment einen deutlichen Überlebensvorteil auf.³⁷ Nach 21 Tagen war eine komplette Umkehr der initial bestehenden Verhältnisse aufgetreten: 90 % A152T und 10 % IKZF1-WT.³⁷ Bei den

Mutanten E170D und R439H dominierte die Wildtyp-Sublinie weiterhin unverändert und die Anteile der Sublinien in den Kokulturen blieben auf dem Ausgangswert konstant.³⁷ Somit ist ein Effekt der IKZF1-E170D-Mutation auf die Proteinlevel in Western Analysen beschränkt ohne sich in Analysen von Zellviabilität, Zelltod und Zellwachstum niederzuschlagen. Die weiteren patientenspezifischen C-terminalen Mutationen IKZF1-Y413C und IKZF1-R439H, die in dieser Arbeit untersucht wurden, unterschieden sich weder in Western Analysen noch in funktionellen Assays von mit Wildtyp-IKZF1 oder mit Leervektor transfizierten Zellen (vgl. Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 20). Ein neuer Hotspot für resistenzvermittelnde Mutationen upstream der Zinkfinger beinhaltenden Dimerisierungsdomäne kann somit nicht festgestellt werden. Auch von Koipally et al. (2002) wurde neben der Dimerisierungsdomäne, welche Interaktionen zwischen den Ikaros-Proteinen vermittelt und Voraussetzung für die DNA-Bindung durch die N-terminal gelegenen Zinkfinger ist, kein weiterer Bereich als notwendig für die Funktion von Ikaros ermittelt.⁷⁰ Somit kann angenommen werden, dass der Austausch der Aminosäuren an Position 413 bzw. 439 sich nicht auf die Fähigkeit zur Homo- bzw. Heterodimerisierung oder anderweitig funktionseinschränkend auswirkt und diese Mutationen die Lenalidomid-Wirkung nicht verringern.

Aufgrund der bei IKZF1 erzielten positiven Ergebnisse, wurde bei IKZF3 unmittelbar eine stabile Transfektion der Zellen durchgeführt, unter Verzicht auf eine transiente Test-Transfektion, wie sie bei IKZF1 erfolgte (Abbildung 12). Doch damit gelang praktisch keine Überexpression von Aiolos in Western Analysen (vgl. Abbildung 24). Auch deutlich modifizierte Aiolos-Expressionsspiegel nach Lenalidomid-Behandlung von mit IKZF3-Wildtyp bzw. mit G159R-Mutation im Vergleich zu Leervektor transfizierten Sublinien waren nicht erkennbar (vgl. Abbildung 25). Die Zelltod- und Zellviabilitätsassays wurden in der Folge zwar durchgeführt, sind dadurch jedoch kaum interpretierbar (vgl. Abbildung 26 und Abbildung 27). Selbst bei einer nachgeholt transienten Transfektion wies der für das *IKZF3* cDNA-Gen verwendete Expressionsvektor zwanzig Stunden nach Elektroporation nur ein geringfügig höheres Level von Aiolos auf als die untransfizierte

Zelllinie, deren Aiolos-Protein ausschließlich endogenen Ursprungs war (vgl. Abbildung 28). Dagegen induzierte der quasi baugleiche Expressionsvektor des *IKZF1* cDNA-Gens im unmittelbaren Vergleich eine massive Überexpression von Ikaros. Da frühere Erfahrungen mit Ras- und SGK3-Expressionsvektoren gezeigt hatten, dass die Verwendung einer CAG-getriebenen Expressionskassette zu besseren Expressionsspiegeln führen kann, wurden auch solche Expressionskonstrukte verfertigt und in analoger Weise untersucht.^{85,86} Doch für *IKZF3* waren auch auf diese Weise keine erhöhten Expressionsspiegel zu erreichen (vgl. Abbildung 29). Bei initialer Durchführung einer transienten Transfektion wäre deutlich geworden, dass es sich nicht lohnt, die Plasmide mit dem *IKZF3* cDNA-Gen stabil zu transfizieren. Daher kann im Nachhinein die stabile Transfektion als verzichtbar angesehen werden. Als weitere Ursache für die mangelnde *IKZF3*-Überexpression wurde in Betracht gezogen, dass die in dieser Arbeit verwendete *IKZF3*-cDNA der Transkriptionsvariante 1 („Aio-1“) nicht die passende Wahl für das multiple Myelom gewesen sein könnte. Diese Frage der Transkriptionsvariante stellte sich bei *IKZF1* hingegen nicht, weil sich bei der Amplifikation von *IKZF1* trotz Variation verschiedener Parameter kein PCR-Produkt bildete und der Rückgriff auf das Plasmid pMSCV-FLAG-hIKAROS-IRES-GFP von Addgene (Cambridge, USA) erfolgte (vgl. Kapitel 2.1.2). Die von diesem Plasmid kodierte *IKZF1*-Transkriptionsvariante X1 weist ein 60 Basen langes N-terminales Insert im Vergleich zur Variante 1 auf, welche für die längste physiologische Isoform von Ikaros kodiert. Doch da die Mutanten stets mit der Wildtyp-Version dieser Isoform verglichen wurden, hatte das Insert keine Folgen für die Aussagekraft der Analysen. Für die Amplifikation von *IKZF3* wurde als PCR-Template allerdings die Erststrang-cDNA der Hodgkin Lymphom Zelllinie L-428 verwendet, da diese das beste PCR-Ergebnis lieferte im Vergleich zu cDNAs von anderen Zelllinien (vgl. Kapitel 2.1.2). Das weitere Vorgehen erfolgte wie in Kapitel 2.1.2 bis 2.1.7 beschrieben und in der Klonierungs-PCR (vgl. Kapitel 2.1.8) waren in mehr als der Hälfte der Fälle Kolonien mit Banden in der richtigen Höhe entstanden. Davon wurden sechs Kolonien als „Minipreps“ angelegt (vgl. Kapitel 2.1.9) und sequenziert (vgl. Kapitel 2.1.10). Neben den üblicherweise auftretenden stillen und Missense-Mutationen bei einzelnen „Minipreps“, wurden mittels BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) auch

verschiedene Transkriptionsvarianten identifiziert. Bei drei der „Minipreps“ wurde die *IKZF3*-Transkriptionsvariante 1 vom 3'- und 5'-Ende bestätigt. Daneben kamen noch die Transkriptionsvarianten 4 und 14 vor. Diese wiesen jedoch eine Deletion bzw. ein weiter downstream gelegenes Startcodon auf. Daher wurde für die weitere Klonierung und Mutagenese die Isoform 1 („Aio-1“) gewählt. Diese exprimiert die ganze Länge von Aiolos und ist die am häufigsten vorkommende Isoform, zumindest bei Zelllinien basierend auf einem Burkitt-Lymphom und bei einer Zelllinie mit aus B-Lymphozyten entstandenen lymphoblastischen Zellen.⁷⁵ Allerdings könnte diese beim multiplen Myelom nicht die hauptsächlich relevante Isoform und daher ungeeignet für die durchgeführten Analysen gewesen sein. Um herauszufinden, welche Varianten von *IKZF3* bei Lu et al. (2014) verwendet wurden, erfolgte mittels der Software SnapGene und BLAST eine Analyse der von Addgene (Cambridge, USA) zu dieser Publikation verfügbaren Vektoren, u.a. plenti-CAG-*IKZF3*-FLAG-IRES-GFP (#107388) und plenti-UbcP-*IKZF3*-3xHA-pGK-Pur (#69053).⁴⁹ In diese Plasmide wurde die *IKZF3* Transkriptionsvariante 1 kloniert.⁴⁹ Ebenso wie bei dem „Entry Clone“ ORF000952.1_s304c1 für *IKZF3*, dessen Sequenz der Datenbank des BROAD Instituts entnommen wurde und mit dem Krönke et al. (2014) eine Überexpression von *IKZF3* mit HA-Tag gelang.⁴⁸ Somit wurden bei Krönke et al. (2014) und Lu et al. (2014) dieselbe Isoform wie in dieser Arbeit verwendet und es ist anzunehmen, dass die Transkriptionsvariante 1 durchaus brauchbar ist.^{48, 49} Dem *IKZF3* cDNA-Gen wurde jedoch bei Krönke et al. (2014) und Lu et al. (2014) am C-Terminus noch eine Sequenz für Protein-Tags (V5/HA/FLAG) hinzugefügt, wobei ein Einfluss dieser Tags auf die Proteinsynthese und -funktion von *IKZF3* zwar sehr unwahrscheinlich scheint, aber nicht ausgeschlossen werden kann. Darüber hinaus waren keine untranslatierten Regionen (UTR) bei den Plasmiden dieser Publikationen vorhanden, sodass eine Instabilität der mRNA von Aiolos im künstlichen Vektorsystem durch das Fehlen von 5'- oder 3'-UTR ebenfalls unwahrscheinlich, wenngleich nicht völlig ausgeschlossen ist. Die Vektoren von Lu et al. (2014) und Krönke et al. (2014) enthielten nur zusätzliche attB1/2-Stellen am N- und C-Terminus der *IKZF3* cDNA-Sequenz, die für die Klonierung benötigt wurden. Im Unterschied zu dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sleeping Beauty

Transposon System, gelang in deren Publikationen die Überexpression von Aiolos durch die Infektion der Zellen mit lenti- bzw. γ -retroviralen Vektoren.^{48,49} Mit viralen Vektoren kann eine stabile Transduktionseffizienz von mehr als 90 % erreicht werden, jedoch verbunden mit einigen Nachteilen.⁷⁶ Ein lenti- oder retrovirales System könnte daher eventuell geeigneter sein, um eine Überexpression von IKZF3 in Zelllinien zu erreichen. Doch das Sleeping Beauty Transposon System kann beim stabilen Gentransfer durchaus eine Effizienz erlangen, die an virale Vektoren heranreicht und die in dieser Arbeit präsentierte problemlose Expression und funktionelle Analyse der praktisch baugleichen IKZF1 Varianten bestätigte dies ja auch eindrucksvoll.⁷⁶ Zudem bietet das Sleeping Beauty System einige Vorteile, darunter das Arbeiten auf der niedrigsten biologischen Sicherheitsstufe sowie geringere mutagene Effekte im Genom der Zielzellen.^{76, 87} Das Sleeping Beauty Transposon System ermöglicht das Einbringen von Transgenen in Chromosomen durch einen „Cut-and-paste“ Mechanismus.⁷⁶ Die Möglichkeit, dass das Zielgen *IKZF3* nicht integriert wurde und es deswegen zu keiner verstärkten Proteinexpression von Aiolos kam, kann aufgrund der strikten Kopplung der IKZF3- und Resistenzgen-Expressionskassetten ausgeschlossen werden (Thorsten Stühmer, mdl.). Nach der Elektroporation wuchsen unter Selektion mit Puromycin (s. Kapitel 2.2.7) polyklonale Kulturen von L-363 in 10 Tagen und von MM1.S in 23 Tagen heran, für IKZF1 betrug der Zeitraum bei L-363 13 Tage und bei MM1.S 21 Tage. Dies sind völlig normale Werte für die Etablierung von Sleeping Beauty modifizierten polyklonalen Sublinien und für ein Wachstum in dem hier aufgetretenen Zeitraum unter antibiotischer Selektion müssen Zellen die im Sleeping Beauty Vektor enthaltene Expressionskassette des Puromycin-Resistenzgens und damit auch des *IKZF3* cDNA-Gens (Wildtyp/G159R) aufgenommen haben (Thorsten Stühmer, mdl.). Letztlich bleibt also unklar, warum es nicht zu einer Überexpression von IKZF3 kam. Weitere Strategien wären das Anhängen eines Protein-Tags an die *IKZF3* cDNA, um bei erneuter Transfektion den Unterschied in den Expressionsspiegeln von endogenem und exogenem Aiolos in den Western Analysen genauer beurteilen zu können oder aber der Versuch einer Transduktion mittels viraler Vektoren.

Auch wenn sich IKZF3 durch künstliche Vektorsysteme praktisch nicht überexprimieren ließ, konnte mit IKZF1-A152T gezeigt werden, dass patientenspezifische Mutationen im Modellsystem durchaus eine Lenalidomid-Resistenz bedingen können. Ob sich derartige Mutationen auch auf weitere Interaktionen von Ikaros und Aiolos auswirken, bedarf zusätzlicher Analysen. So könnten die untersuchten Mutationen beispielsweise auch einen Einfluss haben auf den Lenalidomid-vermittelten, CRBN-abhängigen Proteinabbau von IKZF1/3, der durch die „Runx-related“ Transkriptionsfaktoren 1 und 3 (RUNX1 und RUNX3) gehemmt wird.⁶⁹ Denn RUNX1 konkurriert mit CRBN um die Interaktion mit IKZF1, wodurch Ikaros unempfindlicher für die Ubiquitylierung und Degradierung durch IMiDs wird.⁶⁹ Wenn RUNX1/3 hingegen nicht vorhanden ist, um einen Komplex mit IKZF1/3 zu bilden, wird IKZF1/3 nach der Lenalidomid-Behandlung verstärkt proteasomal abgebaut, woraus eine höhere Lenalidomid-Sensitivität resultiert.⁶⁹ Die Deletion der ersten drei N-terminalen Zinkfinger (Aminosäuren 1-181) führt zu einer aufgehobenen IKZF3-RUNX1 Interaktion. Insbesondere Zinkfinger 2 ist maßgeblich für das Zusammenspiel dieser Transkriptionsfaktoren.⁶⁹ Da die N-terminalen Zinkfinger von IKZF1 und IKZF3 sehr homolog sind und in Zinkfinger 2 sogar identische Aminosäuren aufweisen, ist ein ähnliches Bindungsverhalten von Aiolos und Ikaros mit RUNX zu erwarten.^{48, 69} Da in Zinkfinger 2 bei IKZF1 die Mutation A152T und bei IKZF3 die Mutation G159R lokalisiert ist (vgl. Abbildung 4), könnten diese Mutationen beispielsweise eine verminderte Bindungsfähigkeit von Ikaros und Aiolos an RUNX bedingen. Durch eine ausbleibende RUNX-IKZF-Komplexbildung wäre die Degradation von IKZF1/3 durch Lenalidomid allerdings nicht eingeschränkt und würde weiterhin auftreten. In der vorliegenden Arbeit führte die A152T-Mutation hingegen zu einem aufgehobenen Abbau von Ikaros. Folglich spielt die IKZF1-A152T für diese Interaktion wohl keine Rolle. Als ein weiteres mit IKZF3 interagierendes Protein wurde Blimp-1 mittels Massenspektrometrie entdeckt.⁸⁸ Das „transcriptional repressor B lymphocyte-induced maturation protein-1“ (Blimp-1) ist wichtig für die Differenzierung von Plasmazellen und das Überleben von Myelomzellen.⁸⁸ Blimp-1 und Aiolos binden zusammen als Transkriptionsfaktoren an Gene, die an Apoptose beteiligt sind und supprimieren diese.⁸⁸ Durch Lenalidomid kommt es zum proteasomalen Abbau von

Blimp-1 und daraufhin zur Herunterregulierung von IKZF3, unter anderem vermittelt durch CUL4A, einem Bestandteil des CRL4^{CRBN}-Komplexes.⁸⁸ Daraus resultiert letztlich Apoptose der Myelomzellen. Die Blimp-1/Aiolos Achse kann dementsprechend das Ansprechen auf Lenalidomid in Myelomzellen steuern.⁸⁸ Die ersten N-terminalen 119 Aminosäuren von IKZF3 genügen, damit Blimp-1 mit Aiolos interagieren und Aiolos die transkriptionelle Repression von Blimp-1 fördern kann.⁸⁸ Diese Sequenz liegt upstream der IKZF3-Mutation G159R, die sich in Zinkfinger 2 befindet, während für die Blimp-1-Interaktion der Bereich vor den Zinkfingern benötigt wird.⁸⁸ Daher ist nicht zu erwarten, dass die Primärstruktur von Aiolos, die für diese Komplexbildung benötigt wird, von der Mutation G159R betroffen ist. Inwiefern sich die räumliche Formation des IKZF3-Proteins durch die Mutation verändert und wie der zur Anti-Myelom-Wirkung von Lenalidomid beitragende Blimp-1/Aiolos Signalweg dadurch beeinträchtigt wäre, bedarf weiterer Analysen. Demzufolge lassen sich andere resistenzvermittelnde Effekte der Mutationen, die beispielsweise aufgrund von geänderten Bindungspartnern entstehen könnten, nicht unmittelbar ausmachen. Jedoch ist ein modifiziertes Bindungsverhalten von mutiertem Ikaros und Aiolos vorstellbar. So wurden von Sperling et al. (2019) bekannte Substrate der CRL4^{CRBN} Ubiquitin Ligase, darunter IKZF3, ZFP91, ZNF692, CK1 α , RNF166 und GSPT2, mittels zielgerichteter Massenspektrometrie quantitativ gemessen.⁸⁹ Nach Gabe von IMiDs konkurrieren diese Substrate um Bindung und Abbau durch die begrenzt vorhandene CRL4^{CRBN} E3 Ligase.⁸⁹ Es ist denkbar, dass die resultierende kompetitive Hemmung von Substraten mit Anti-Myelom-Wirkung durch Substrate, die für die IMiD-Wirkung unbedeutend sind, zu einer Resistenzentwicklung führt.⁸⁹ Ob mutiertes Aiolos und Ikaros in diesem Wettkampf einen Vorteil hätten und stärker oder länger an den CRL4^{CRBN} Ligase Komplex binden würden, kann mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht beantwortet werden, ist aber vorstellbar. Aber auch Mechanismen, die zu Lenalidomid-Resistenz führen, ohne Beteiligung der CRL4^{CRBN} Ubiquitin Ligase können auftreten. So etablierte Zhu et al. (2019) resistente Zelllinien durch Inkubation mit steigenden IMiD-Dosen.⁹⁰ In drei der vier resistenten Myelomzelllinien war die Unempfindlichkeit gegen IMiDs auf Funktionseinschränkungen von CRBN durch genetische Veränderungen zurückzuführen.

Daraus resultierte eine abgeschwächte Degradierung von IKZF1/3 und in der Folge auch von IRF4 und c-MYC, vergleichbar mit den Auswirkungen der IKZF1-A152T Mutation.⁹⁰ Bei einer Zelllinie lag indes eine Resistenzentwicklung ohne Beteiligung von CRBN vor, sondern bedingt durch die autokrine Produktion von IL-6 und Aktivierung von STAT3.⁹⁰ Dadurch wurde die Apoptoseinduktion durch IKZF1/3-Degradation und IRF4 Herunterregulierung antagonisiert.⁹⁰ Demzufolge entstand die IMiD-Resistenz in dieser Zelllinie unabhängig von dem in Kapitel 1.6.3 dargestellten CRBN-Signalweg.

Es gibt zahllose weitere Optionen wie Lenalidomid-Wirkungen und -Resistenzen zustande kommen können.⁹¹⁻⁹³ Diese können im Folgenden nur ausschnittsweise erläutert werden und der Fokus wurde daher auf IKZF1/3- oder CRBN-vermittelte Wege gelegt, da diese als am relevantesten für die vorliegende Arbeit erachtet wurden. Eine Option, wie IKZF1/3 bedeutsam für die Einflussnahme der IMiDs sein kann, jedoch mit fraglicher Konsequenz durch die Mutationen, stellt der folgende dar: Lenalidomid und Pomalidomid binden und inaktivieren die „p53-related“ Proteinkinase (TP53RK), wodurch deren nachgeschaltetes Ziel p53 gehemmt und letztlich Apoptose der Myelomzellen induziert wird.⁹⁴ Durch Knockdown von *TP53RK* wird über die p53-c-MYC Achse die Expression von IKZF1/3 herunterreguliert.⁹⁴ Demzufolge ist nicht nur, wie zuvor beschrieben, c-MYC neben IRF4 ein downstream Ziel von IKZF1/3, sondern wurde selbst als Regulator der Expression von IKZF1/3 charakterisiert.^{51, 94} Somit scheinen sich die Transkriptionsfaktoren auch gegenseitig zu beeinflussen, wobei unter anderem laut Xu et al. (2016) die Degradierung von IKZF1/3 eigentlich sehr schnell innerhalb von Stunden nach Lenalidomid-Gabe einsetzt.⁹⁵ Da die zytotoxischen Effekte indes erst nach Tagen auftreten, wurden alternative Substrate zu IKZF1/3 gesucht.⁹⁵ Argonaute 2 wurde als Cereblon-Bindungspartner ermittelt, welcher bedeutsam für die Reifung und Funktion von miRNA ist und durch Inkubation mit Lenalidomid abnimmt.⁹⁵ Neben der zum IMiD-induzierten Zelltod passenden zeitlichen Dynamik führt auch das Ausschalten von Argonaute 2 in IMiD-sensitiven und IMiD-resistenten Zelllinien zum massiven Zelltod. Daher wurde Argonaute 2 als Möglichkeit zur Überwindung der Resistenz betrachtet.⁹⁵ Möglicherweise könnten damit auch zytotoxische Effekte auf die Zellen der resistenten IKZF1-A152T Sublinie generiert werden. Einen weiteren CRBN-abhängigen

Wirkmechanismus von Lenalidomid beschrieb Sebastian et al. (2017): die Inhibierung der Peroxidase, die für den H₂O₂-Abbau verantwortlich ist.⁹⁶ Der aus der intrazellulären Erhöhung von H₂O₂ entstehende oxidative Stress führt bei Zellen mit hoher antioxidativer Kapazität zu einer ausbleibenden Apoptoseinduktion.⁹⁶ Bei Zellen mit geringer ausgeprägter antioxidativer Fähigkeit kommt es hingegen H₂O₂-vermittelt zum Abbau von IKZF1/3 und letztlich auch zur Apoptose.⁹⁶ Das Ansprechen von Patienten auf Lenalidomid soll anhand eines Assays vorhergesagt werden, der die Fähigkeit der Zellen misst, auf die durch Lenalidomid erhöhten H₂O₂-Level zu reagieren. Da der Abbau von IKZF1/3 nur eine Folge des oxidativen Stresses und deren Degradation nicht zwingend erforderlich ist für die apoptoseinduzierende IMiD-Wirkung, wären die Konsequenzen der patientenspezifischen Mutationen für derartige Assays fraglich und Gegenstand weiterer Experimente.⁹⁶ Darüber hinaus wurde eine Ubiquitin-unabhängige Chaperon-ähnliche Funktion von CRBN identifiziert, wodurch CRBN die Reifung der Proteine CD147 und MCT1 fördert.⁸⁰ IMiDs erzielen Anti-Myelom-Wirkungen in IMiD-sensitiven Zelllinien durch Störung der Bildung und Aktivierung und letztlich der Destabilisierung des CD147–MCT1 Transmembrankomplexes. Dadurch wird der Laktatexport gehemmt und die anaerobe Glykolyse beeinträchtigt, auf die die Myelomzellen als Energielieferant angewiesen sind.⁸⁰ In der Folge kommt es unabhängig von Aiolos und Ikaros zu verminderter Proliferation, Angiogenese und Invasion.⁸⁰ Damit wurden mehrere Möglichkeiten aufgezeigt, wie Lenalidomid zu Apoptose in Myelomzellen führen kann. Diese sind CRBN-abhängig, jedoch IKZF1/3-unabhängig und damit vermutlich unbeeinflusst von den zuvor beschriebenen Mutationen. Vielmehr könnten diese Signalwege alternativ zu Aiolos und Ikaros eine Lenalidomid-Wirksamkeit vermitteln.

Wie in den Kapiteln 1.6.2 und 1.6.3 ausgeführt, sind neben den apoptoseinduzierenden Wirkungen von Lenalidomid auch vielfältige immunmodulierende Effekte bekannt. Diese werden zum Teil durch IKZF1/3 vermittelt, sodass es nach IMiD-Gabe zur Derepression des IL-2 Promoters und daraufhin zur T-Zell-Aktivierung kommt.⁵⁴ Des Weiteren können Ikaros und Aiolos auch zu einer verstärkten NK-Zell Aktivität führen.⁹⁷ Diese Immunmodulation scheint auch bei Lenalidomid-refraktären Patienten noch vorhanden zu sein: bei zusätzlicher Gabe von Lenalidomid waren die Therapieergebnisse

besser als bei alleiniger Gabe von Cyclophosphamid und Prednison.⁹⁸ Auch *in vitro* konnte mittels Lenalidomid die durch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes verursachte Zytotoxizität in Lenalidomid-resistenten Zelllinien verstärkt werden.⁹⁸ Da sich mit Zelllinien nicht die komplexen Abläufe des Immunsystems darstellen lassen, ist ungewiss, inwiefern sich die patientenspezifischen Mutationen darauf auswirken würden. Es ist in Betracht zu ziehen, dass trotz der Mutationen die immunmodulierenden Effekte noch uneingeschränkt vorhanden sind und Lenalidomid *in vivo* bei Patienten zumindest noch partiell wirksam ist.

Neben dem Immunsystem ist auch die in Kapitel 1.3 erläuterte Tumormikroumgebung ein relevanter Faktor für die Pharmakon-Wirksamkeit und kann eine Resistenzentwicklung gegen IMiDs bedingen. So kann es zum Beispiel aufgrund von Adhäsionen an Stromazellen des Knochenmarks bei Sauerstoffmangel zur Beeinflussung der Expression von IKZF1 in Myelomzellen kommen.⁹⁹ Dadurch ist eine Veränderung des Ansprechens auf IMiDs möglich.⁹⁹ Auch die Mikroumgebung des Knochenmarks ist mittels der in dieser Arbeit verwendeten humanen Myelomzelllinien nicht nachgebildet, aber könnte dennoch relevant für die Auswirkungen der Mutationen *in vivo* sein. Ein weiterer, nicht berücksichtigter Aspekt sind epigenetische Veränderungen: bei erworbener IMiD-Resistenz tritt eine erschwerte Zugänglichkeit von Chromatin und eine verstärkte DNA-Methylierung auf.¹⁰⁰ Daneben kann auch aufgrund von räumlicher Heterogenität des Myeloms je nach Ort der Probenentnahme die Bedeutung einiger Mutationen für den Gesamttumor über- oder unterschätzt werden.¹⁰¹ Insgesamt sind Limitationen des Modellsystems festzustellen, insbesondere in Hinblick auf Generalisierbarkeit. Um die Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit zu untersuchen kann es dennoch als angemessen und effektiv angesehen werden.

Ein generelles Problem bei Patienten, die ein Rezidiv oder einen Progress ihrer Erkrankung unter laufender Therapie erleiden, ist die Unklarheit, welche der angewandten Medikamente in weiteren Therapielinien noch ein Ansprechen bewirken werden.¹⁰² Aufgrund der im klinischen Setting üblicherweise eingesetzten Zwei- oder Dreifachkombinationen und u.a. bedingt durch den Mangel an validen Biomarkern, lässt sich vor Therapieumstellung nur schwer einschätzen, auf welche der verwendeten

Substanzen ein Patient mit RRMM eine Resistenz entwickelte.¹⁰² Auch in der vorliegenden Arbeit wurde nur der spezifische Effekt von Lenalidomid in der Verwendung als Einzelsubstanz untersucht. So wurde für die Kombination von Lenalidomid und Bortezomib ein synergistischer Effekt bei der Degradierung von Ikaros und nachfolgender Apoptoseinduktion beobachtet.¹⁰³ Dieser ist nicht CRL4^{CRBN}-vermittelt, sondern läuft über einen Kalzium-induzierten Calpain-Signalweg bei gemeinsamer Gabe beider Substanzen ab.¹⁰³ Auch durch die Ergänzung von IMiDs mit dem monoklonalen CD38-Antikörper Daratumumab können Synergismen erzielt werden: durch Proteolyse von IKZF1/3 fällt deren hemmende Wirkung auf die Expression von Interferon-stimulierten Genen weg.⁸⁴ Dadurch kommt es u.a. zur Überexpression von CD38 auf der Oberfläche von Myelomzellen.⁸⁴ In der Folge kann Daratumumab, vermittelt durch NK-Zellen, zytotoxisch auf die Myelomzellen wirken.⁸⁴ In welcher Hinsicht die in dieser Arbeit untersuchten resistenzvermittelnden Mutationen Implikationen haben für das Therapieansprechen bei Kombination von Lenalidomid mit weiteren in der Myelomtherapie üblichen Pharmaka, würde zusätzliche Experimente erforderlich machen.

Eine klinische Alternative zu Lenalidomid stellt Pomalidomid dar: dieses in Kapitel 1.6.1 dargestellte Pharmakon wurde für das RRMM zugelassen und zeigt auch im Lenalidomid-refraktären Zustand noch Wirksamkeit.¹³ Inwiefern die patientenspezifischen Mutationen auch die Sensitivität für Pomalidomid beeinflussen, bleibt im Rahmen dieser Arbeit unbeantwortet. Die Behandlung mit Pomalidomid führt wie Lenalidomid zu einer deutlichen Abnahme der Expressionsspiegel von Ikaros und Aiolos in Western Analysen.⁴⁹ Durch Pomalidomid kommt es jedoch zu einer schnelleren und stärkeren Substratdegradierung als durch Lenalidomid.⁸⁹ Da sich die Pharmaka allerdings nicht in ihrer Affinität zu CRBN unterscheiden, wurden andere Substrate von CRL4^{CRBN} nach Bindung von Pomalidomid vermutet.¹⁰⁴ So wurde neben den in Kapitel 1.6.3 beschriebenen IKZF1/3 und CK1 α mit ARID2 ein weiteres Neo-Substrat von CRL4^{CRBN} identifiziert, welches Pomalidomid-induziert an der Regulierung einiger Gene, darunter *MYC* und *IRF4*, beteiligt ist.^{105, 106} In der Folge bewirkt Pomalidomid auch bei

Lenalidomid-resistenten Zelllinien eine Wachstumshemmung.¹⁰⁵ Es lässt sich nicht vorhersagen, ob die patientenspezifischen Mutationen, deren Folgen für das Ansprechen auf Lenalidomid in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, auch die Zellviabilität und Zellproliferation unter Pomalidomid-Behandlung beeinflussen würden. Bei Ziccheddu et al. (2020) zeigten zwei Patienten, die refraktär gegen IMiDs und Proteasomeninhibitoren waren und eine Mutation in *CRBN* bzw. in *IKZF3* aufwiesen, ein Ansprechen auf Pomalidomid.¹⁰⁷ Die im IMiD-CRBN Signalweg festgestellten Mutationen waren in dieser Studie sehr selten und nur auf subklonalem Level messbar, daher wurde die Refraktärität der Patienten nicht auf einen Hauptklon als Ursache zurückgeführt.¹⁰⁷ Anstelle von Punktmutationen in Zielgenen von IMiDs und Proteasomeninhibitoren wurde vielmehr vermutet, dass es sich um eine polyklonal bedingte Resistenz handelte, die durch eine zunehmend komplexere, genetisch heterogene Tumorevolution von Subklonen entsteht.¹⁰⁷ Von Kortüm et al. (2016) wurde hingegen ein Patient beschrieben, der bei Diagnosestellung eine *CRBN* Mutation (N316K) neben dem IMiD-bindenden Bereich des Proteins aufwies.³⁸ Dieser Patient sprach in der Behandlung weder auf Lenalidomid noch auf Pomalidomid an, daher wurde eine resistenzvermittelnde Funktion dieser Mutation angenommen.³⁸ *CRBN* war zwar nur selten (in einer von 349 Proben) betroffen, doch kann in diesem Fall die Mutation im IMiD-CRBN-Signalweg als Ursache für die Resistenz vermutet werden.³⁸ Von Dimopoulos et al. (2019) wurde ebenfalls die grundsätzliche Relevanz von Mutationen im IMiD-CRBN-Signalweg für die Resistenzentwicklung angezweifelt.⁶² Als ein Grund wurden die fehlenden Mutationen in den Proteinen des *CRBN*-Signalwegs bei Knochenmarkuntersuchungen aufgeführt, diese umfassten jedoch nur eine kleine Probenzahl.⁶² Auch bei Tachita et al. (2020) waren mittels zielgerichteter Sequenzierung von 25 sequentiellen Analysen vor und nach Lenalidomid-Dexamethason-Behandlung außer einer Mutation in *IKZF3*, die bisher nicht beschrieben wurde und deren klinische Bedeutung unklar ist, keine weiteren Mutation im *CRBN*-Signalweg identifizierbar.¹⁰⁸ Die Autoren führten dies auf eine kürzere Behandlungsdauer und den fast ausschließlichen Einsatz von Lenalidomid-Dexamethason zurück.¹⁰⁸ Wohingegen bei Kortüm et al. (2016) Proben von 50 refraktären Myelom-Patienten, die mindestens zwei verschiedene, auch

intensivere, Therapieregime erhalten hatten, nach deutlich längeren Behandlungszeiträumen untersucht wurden.³⁸ Bei 22 % der Patienten traten Mutationen in den Genen des CRBN-Signalwegs auf, wozu *CRBN* (12 %), *CUL4B* (6 %), *IRF4* (4 %) und *IKZF1* (2 %) gehörten.³⁸ Bei drei der longitudinalen Analysen waren *CRBN*-Mutationen bei Diagnosestellung im IMiD-sensitiven Zustand noch nicht nachweisbar, diese traten erst später im IMiD-refraktären Zustand auf.³⁸ Mittels lentiviraler Vektoren wurden die mutierten CRBN Proteine in Myelomzelllinien überexprimiert und diese Mutationen führten zu einer Lenalidomid-Resistenz.³⁸ Dieses *in vitro*-Ergebnis stützt die Vermutung einer Kausalität zwischen diesen Mutationen und dem klinisch ausbleibenden Therapieansprechen.³⁸ Insgesamt ist weiterhin anzunehmen, dass Lenalidomid-Resistenz durchaus bedingt sein kann durch Punktmutationen in *IKZF1* und *IKZF3*. Dies mag zwar nur in Einzelfällen zutreffen, aber wenn derartige Mutationen vor Therapieeinleitung oder bei einem Rezidiv bekannt wären, könnte ein Regime ohne Lenalidomid gewählt werden. Darüber hinaus bestünde die Möglichkeit, die Selektion von mutationstragenden Klonen durch die Therapie, mit nachfolgend negativen Auswirkungen für den Patienten, zu vermeiden. Daher können solche resistenzvermittelnden Mutationen als relevant für klinische Therapieentscheidungen betrachtet werden.

Des Weiteren könnte die Wirkung der sich aktuell in Entwicklung befindenden CRBN E3 Ligase modulierenden Substanzen, wie CC-122 („Avadomide“), CC-220 („Iberdomide“), CC-885 und CC-92480, ebenfalls von patientenspezifischen Mutationen beeinflusst sein.^{109, 110} Diese sogenannten CELMoDs werden zum Teil auch schon im Rahmen klinischer Studien untersucht und sollen auch im Lenalidomid- und Pomalidomid-refraktären Zustand wirksam sein.^{97, 110} So führen CC-220 und CC-92480 schneller zu einer stärkeren Degradation von Aiolos bzw. Ikaros als Lenalidomid oder Pomalidomid.^{110, 111} Die Implikationen von Resistenzen für die Sensitivität auf diese Substanzen bedarf weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es im Rahmen dieser Arbeit gelang, einen kausalen Zusammenhang zwischen in Patienten identifizierten Mutationen und *in vitro* ermittelten Resistenzen herzustellen. Für Patienten wäre es von großer Bedeutung, dass man vor Therapieumstellung das Ansprechen auf die einzelnen Substanzen abschätzen könnte, um beim RRMM gezielter behandeln zu können. Daher ist es weiterhin relevant, wie es auch das Ziel dieser Arbeit war, Resistenzmechanismen zu untersuchen und die klinische Bedeutung der mannigfaltig auftretenden genetischen Veränderungen zu ermitteln. Letztlich in der Absicht, Möglichkeiten zur Überwindung von Resistenzen aufzuzeigen oder diese im Vorfeld entsprechend berücksichtigen zu können.

5 Zusammenfassung

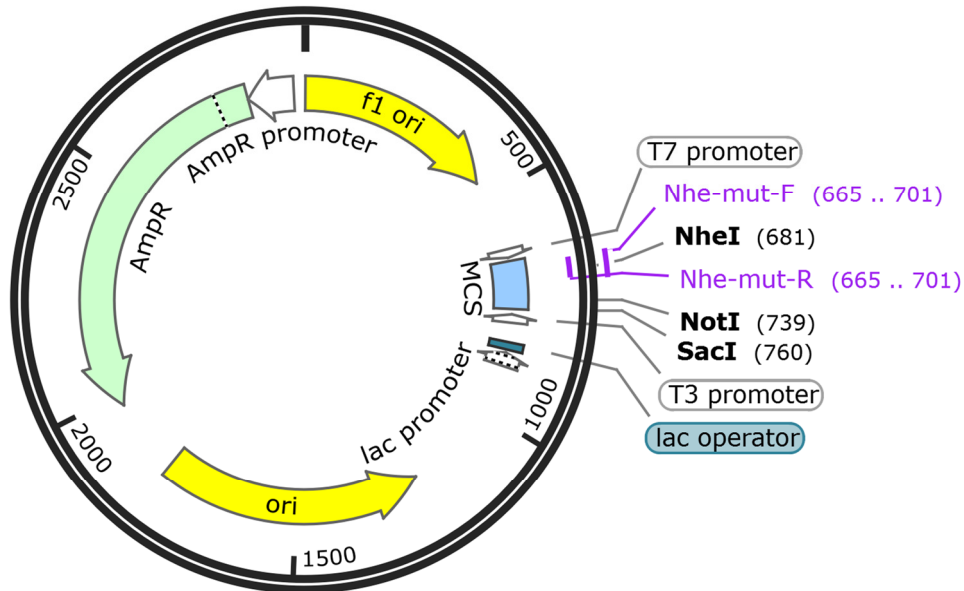
Trotz einer Vielzahl neuer Therapieansätze in den letzten Jahren, die ein längeres Überleben der Patienten ermöglichen, stellt das multiple Myelom weiterhin eine unheilbare Krankheit dar. Der Großteil der Patienten entwickelt letztlich ein rezidiviertes oder refraktäres multiples Myelom (RRMM). Bei Erstdiagnose und bei RRMM sind immunmodulierende Medikamente (IMiDs), wie Lenalidomid, eine bedeutende Therapieoption. Durch die Bindung von Lenalidomid an den CRL4^{CRBN} Ligase Komplex entwickelt dieser eine modifizierte Substratspezifität: die Transkriptionsfaktoren IKZF1 (Ikaros) und IKZF3 (Aiolos) werden ubiquitinyliert und proteasomal abgebaut. Von Krönke et al. (2014) wurde eine 30 Aminosäuren lange Sequenz (Degron) am N-Terminus von IKZF1/3 definiert, die essenziell für die Lenalidomid-Sensitivität ist. Durch Next Generation Sequencing (NGS)-Technologien wurde ein signifikanter Anstieg der Mutationsfrequenz unter Therapie verzeichnet und vier Missense-Mutationen in *IKZF1* und eine in *IKZF3* bei Patienten mit RRMM identifiziert. Die Mutationen IKZF1-A152T und IKZF3-G159R sind innerhalb der Degron-Sequenz lokalisiert, IKZF1-E170D liegt unmittelbar daneben und IKZF1-Y413C bzw. IKZF1-R439H befinden sich am C-Terminus des Proteins. Für diese mutierten IKZF-Proteine wurden im Rahmen dieser Arbeit Expressionsvektoren kloniert und stabil in humane Myelomzelllinien transfiziert. Durch Western Analysen und funktionelle Assays der Zellviabilität (alamarBlue) bzw. des Zelltods (Annexin V-PI) wurden diese polyklonalen Sublinien bezüglich ihrer Implikationen für die Lenalidomid-Sensibilität untersucht. Nur die IKZF1-Mutationen A152T und E170D führten zu einer verminderten, bei A152T geradezu aufgehobenen, Degradierung von Ikaros nach Lenalidomid-Behandlung. In den funktionellen Analysen führte A152T ebenfalls zu stark verminderter Lenalidomid-Aktivität und zu deutlich höherem Überleben. Obwohl Sleeping Beauty Vektoren mit unterschiedlichen Expressionskassetten für Aiolos eingesetzt wurden, war keine eindeutige Überexpression von IKZF3 feststellbar, daher sind diese Ergebnisse nur eingeschränkt zu verwerten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *in vivo* bei Patienten aufgetretene und *in vitro* analysierte Mutationen, gezeigt an der in der Degron-Sequenz lokalisierten

Mutation IKZF1-A152T, im Zellmodell eine Resistenz vermitteln und damit Einfluss auf mögliche Therapieresistenzen haben können.

6 Summary

Numerous therapeutic approaches were developed in recent years and have made a longer survival of patients possible. Nevertheless, multiple myeloma still is an incurable disease, and most patients progress to relapsed and refractory multiple myeloma (RRMM). Immunomodulatory drugs (IMiDs) such as lenalidomide are an important therapeutic option in the treatment of RRMM and newly diagnosed multiple myeloma. Lenalidomide binds to the CRL4^{CRBN} ubiquitin ligase complex and modifies its substrate specificity. As a result, ubiquitination and degradation of the neo-substrates IKZF1 (Ikaros) and IKZF3 (Aiolos), both transcription factors, is induced. Krönke et al. (2014) defined a 30 amino acid sequence (termed degron) at the N-terminal end of IKZF1/3 that is essential for lenalidomide sensitivity. A significant increase in the mutation frequency during therapy was shown through next-generation sequencing (NGS) diagnostics and four missense mutations in *IKZF1* and one in *IKZF3* in patients with RRMM were identified. The mutations IKZF1-A152T and IKZF3-G159R are located within the degron sequence described by Krönke, IKZF1-E170D lies close to the border of this region and the position of IKZF1-Y413C and IKZF1-R439H is C-terminal. In this thesis, expression vectors were cloned for these mutated IKZF proteins and then stably transfected in human myeloma cell lines. The implications of these identified mutations for their sensitivity to lenalidomide were examined using Western blotting and functional assays: alamarBlue (cell viability assay) and Annexin V-PI (cell death assay). Only the IKZF1 mutations A152T and E170D led to a reduced, for A152T even abrogated, degradation of Ikaros following lenalidomide-incubation. In the functional analyses A152T also strongly diminished lenalidomide activity and caused a considerably higher survival in this subline. Although Sleeping Beauty vectors with different expression cassettes for IKZF3 were used, no distinct overexpression of Aiolos was achieved, and the results obtained for IKZF3 are therefore of limited interpretability. In summary, it was shown that mutations that occurred in patients, namely IKZF1-A152T located within the degron sequence, can confer resistance to lenalidomide-treatment in cell models and implications for therapy resistances are possible.

Created with SnapGene®



TST-603A-pBluescript II SK- NheI

2962 bp

Abbildung 31: Vektorkarte TST-603A-pBluescript II SK- NheI

Modifizierter pBluescript-Vektor in dessen MCS (Multiple Cloning Site) die Schnittstelle NheI kloniert wurde. Ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) ermöglicht das Wachstum erfolgreich transfizierter Bakterienkolonien auf ampicillinhaltigen Agarplatten. Dieser von der Arbeitsgruppe derivatisierte Vektor stellte die Grundlage für die weiteren Klonierungen dar.

Nachfolgend sind die Vektorkarten der im Rahmen dieser Doktorarbeit neu klonierten Vektoren abgebildet. Als Ansprechpartner für Fragen und als Bezugsquelle kann Dr. Thorsten Stühmer kontaktiert werden.

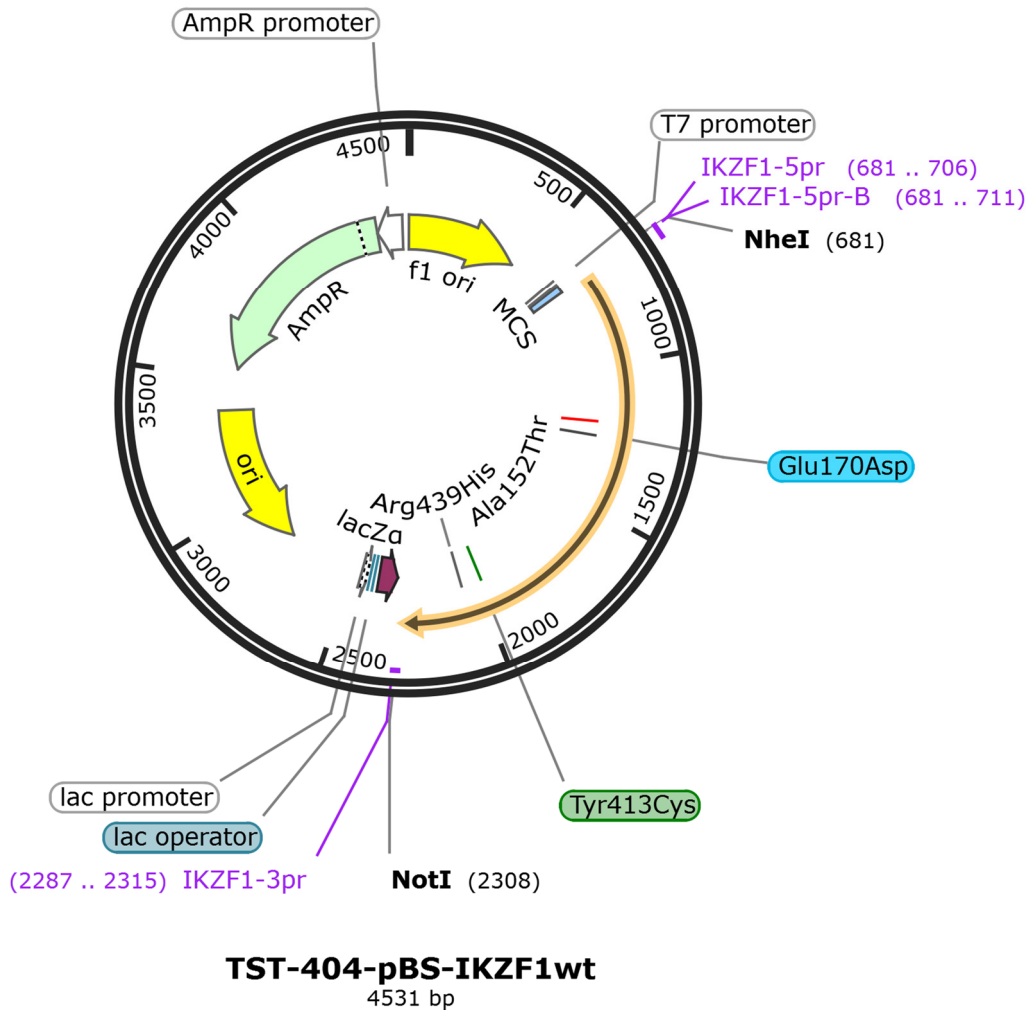


Abbildung 32: Vektorkarte TST-404-pBS-IKZF1wt

In den pBluescript-Vektor kloniertes cDNA-Gen für Wildtyp-IKZF1 unter Verwendung der Restriktionsenzyme NheI und NotI.

Durch Mutagenese erfolgten folgende Punktmutationen:

TST-406-pBS-IKZF1-A152T: Punktmutation an Position 152, Austausch Alanin durch Threonin

TST-407-pBS-IKZF1-E170D: Punktmutation an Position 170, Austausch Glutaminsäure durch Asparaginsäure

TST-408-pBS-IKZF1-Y413C: Punktmutation an Position 413, Austausch Tyrosin durch Cystein

TST-409-pBS-IKZF1-R439H: Punktmutation an Position 439, Austausch Arginin durch Histidin

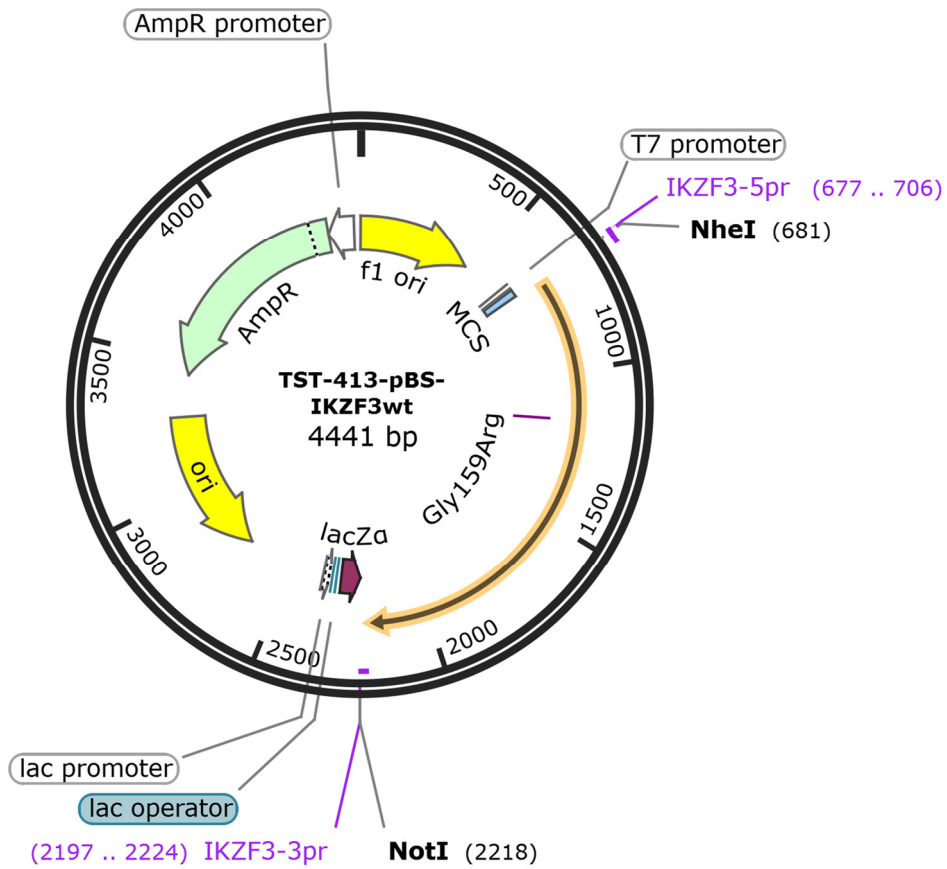
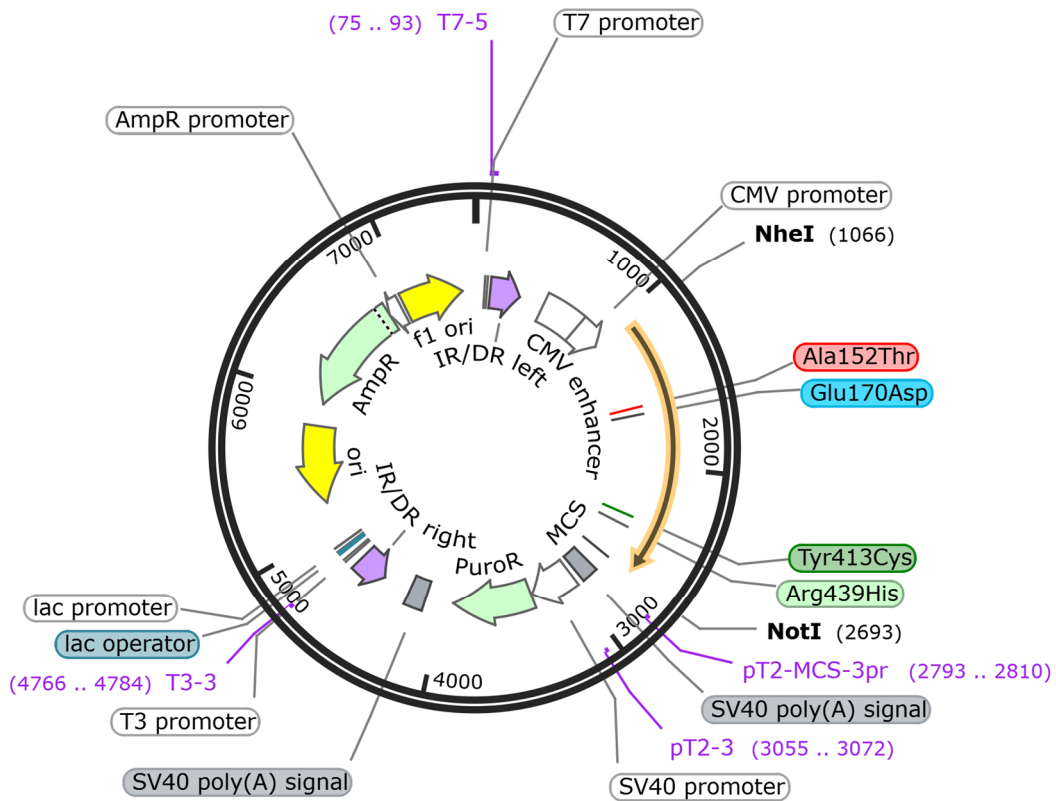


Abbildung 33: Vektorkarte TST-413-pBS-IKZF3wt

In den pBluescript-Vektor kloniertes cDNA-Gen für Wildtyp-IKZF3 unter Verwendung der Restriktionsenzyme NheI und NotI.

Durch Mutagenese erfolgte folgende Punktmutation:

TST-414-pBS-IKZF3-G159R: Punktmutation an Position 159, Austausch Glycin durch Arginin



TST-261-pT2-CMVpuro-IKZF1wt
7505 bp

Abbildung 34: Vektorkarte TST-261-pT2-CMVpuro-IKZF1wt

Sleeping Beauty Proteinexpressionsvektor für Wildtyp-Ikaros. In den Sleeping Beauty Vektor kloniertes *IKZF1* cDNA-Gen unter Verwendung der Restriktionsenzyme NheI und NotI. Die *IKZF1* cDNA wurde zuvor mittels der gleichen Restriktionsenzyme aus dem pBluescript-Vektor herausgeschnitten. Die Proteinexpression erfolgt CMV-Promoter getrieben. Durch ein Puromycin-Resistenzgen (PuroR) können stabil transponierte Zellen antibiotisch selektioniert werden.

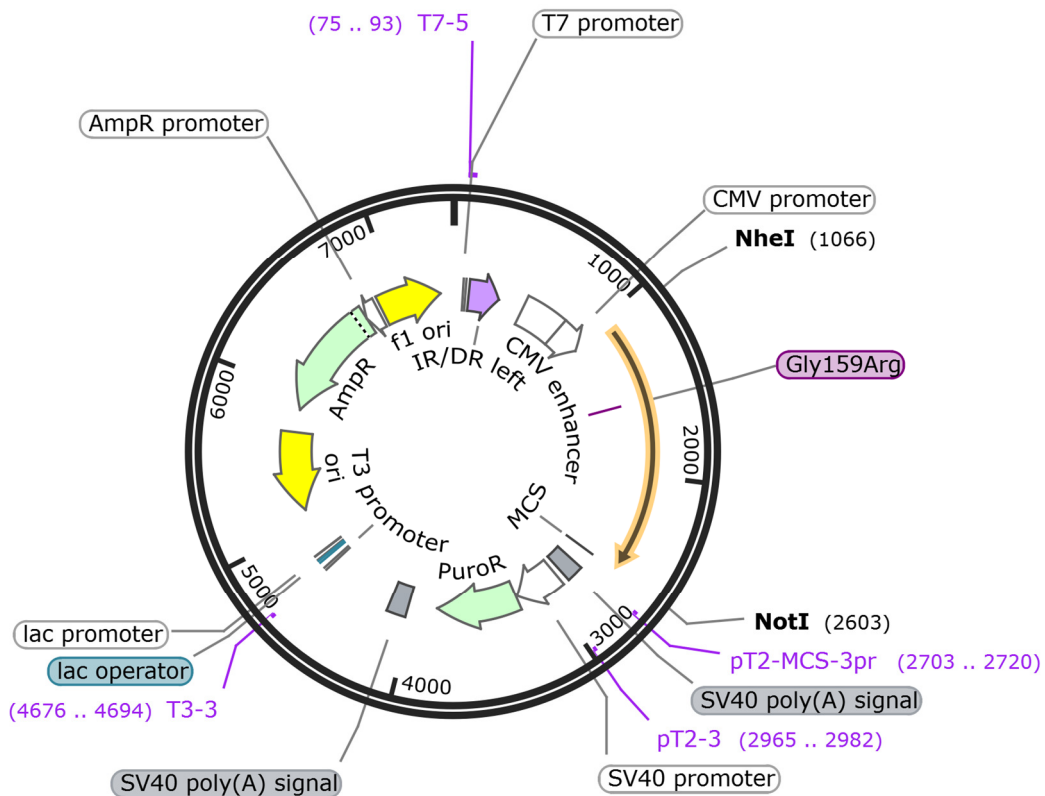
Analoges Vorgehen für die mutierten Versionen des *IKZF1* cDNA-Gens:

TST-262-pT2-CMVpuro-IKZF1-A152T: Sleeping Beauty Proteinexpressionsvektor für den *IKZF1*-Mutant A152T

TST-263-pT2-CMVpuro-IKZF1-E170D: Sleeping Beauty Proteinexpressionsvektor für den *IKZF1*-Mutant E170D

TST-264-pT2-CMVpuro-IKZF1-Y413C: Sleeping Beauty Proteinexpressionsvektor für den
IKZF1-Mutant Y413C

TST-265-pT2-CMVpuro-IKZF1-R439H: Sleeping Beauty Proteinexpressionsvektor für den
IKZF1-Mutant R439H



TST-266-pT2-CMVpuro-IKZF3wt
7415 bp

Abbildung 35: Vektorkarte TST-266-pT2-CMVpuro-IKZF3wt

Sleeping Beauty Proteinexpressionsvektor für Wildtyp-Aiolos. In den Sleeping Beauty Vektor kloniertes *IKZF3* cDNA-Gen unter Verwendung der Restriktionsenzyme NheI und NotI. Die *IKZF3* cDNA wurde zuvor mittels der gleichen Restriktionsenzyme aus dem pBluescript-Vektor herausgeschnitten. Die Proteinexpression erfolgt CMV-Promoter getrieben. Durch ein Puromycin-Resistenzgen (PuroR) können stabil transponierte Zellen antibiotisch selektiert werden.

Analoges Vorgehen für die mutierte Version des *IKZF3* cDNA-Gens:

TST-267-pT2-CMVpuro-IKZF3-G159R: Sleeping Beauty Proteinexpressionsvektor für IKZF3-G159R

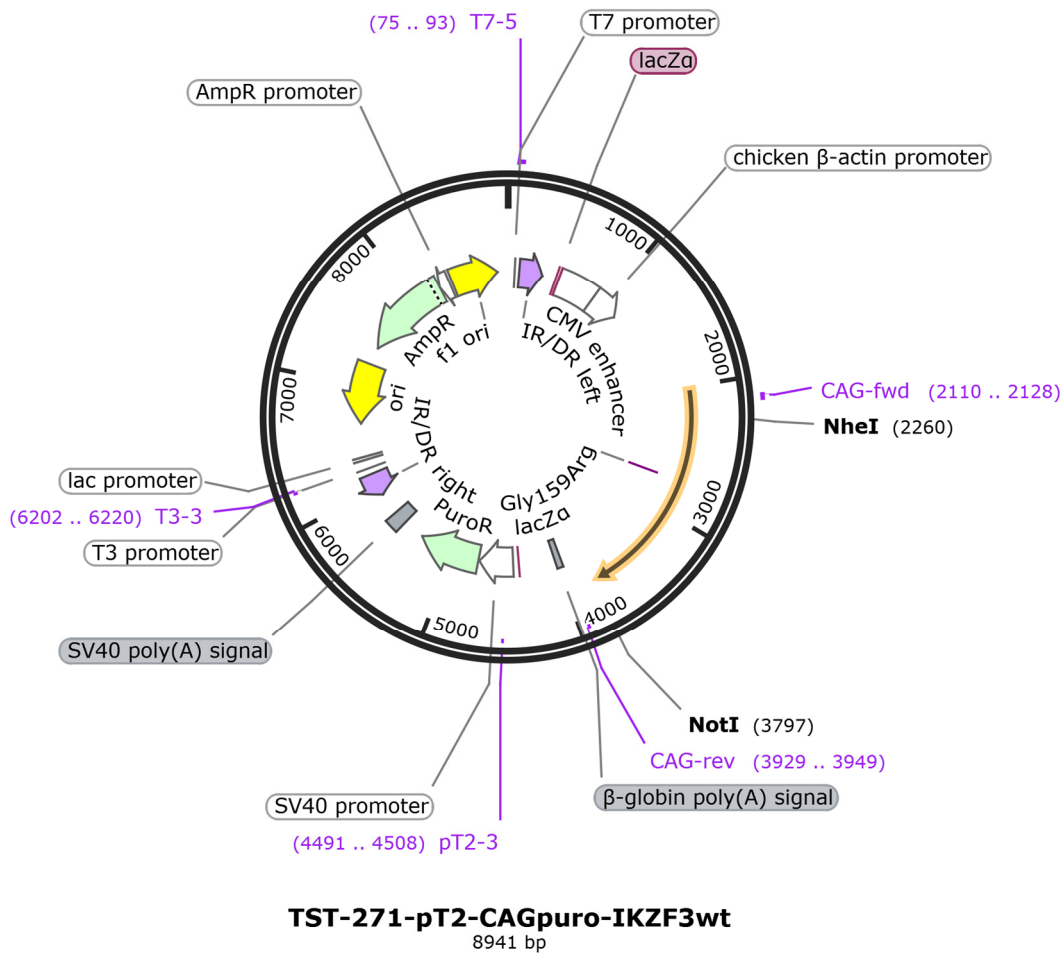


Abbildung 36: Vektorkarte TST-271-pT2-CAGpuro-IKZF3wt

CAG-Promoter getriebener Proteinexpressionsvektor für Wildtyp-Aiolos. Das *IKZF3* cDNA-Gen wurde unter Verwendung der Restriktionsenzyme *NheI* und *NotI* in den pT2-Vektor kloniert. Dieser weist eine Expressionskassette auf, die durch einen CAG-Promoter gesteuert wird. Die *IKZF3* cDNA wurde zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen aus dem entsprechenden pBluescript-Vektor (TST-413-pBS-IKZF3wt) herausgeschnitten. Durch ein Puromycin-Resistenzgen (*PuroR*) können stabil transponierte Zellen antibiotisch selektioniert werden.

Bis auf den in diesem Fall verwendeten Sleeping Beauty Proteinexpressionsvektor für *IKZF3*-G159R (TST-267-pT2-CMVpuro-IKZF3-G159R) als Substrat des Restriktionsverdau mit *NheI* und *NotI* erfolgte ein analoges Vorgehen für die mutierte Version des *IKZF3* cDNA-Gens:

TST-272-pT2-CAGpuro-IKZF3-G159R: CAG-Promoter getriebener Proteinexpressionsvektor für IKZF3-G159R

Abkürzungsverzeichnis

BCP-ALL	B-Vorläufer akute lymphatische Leukämie
Blimp-1	B-lymphocyte-induced maturation protein-1
CCA	Clonal Competition Assay
CK1 α	Casein-Kinase 1 α
CNAs	Copy number abnormalities
CRBN	Cereblon
CUL4	Cullin-4
DDB1	Damaged DNA binding protein 1
eGFP	Expressionsplasmid für grün fluoreszierendes Protein
FBS	Fetales Rinderserum
IKZF1	Ikaros family zinc finger protein 1 (Ikaros)
IKZF3	Ikaros family zinc finger protein 3 (Aiolos)
IKZF3-CAG	CAG-Promoter getriebene Expressionskassette für IKZF3-Wildtyp
IKZF3-CMV	CMV-Promoter getriebene Expressionskassette für IKZF3-Wildtyp
IL-2	Interleukin 2
IMiDs	Immunmodulierende Medikamente
IMWG	International Myeloma Working Group
IRF4	Interferon regulatory factor 4
ISS	International Staging System
Len	Lenalidomid
M ³ P	“Multiple Myeloma Mutation Panel”
MCS	Multiple Cloning Site
MGUS	Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
MM	Multiples Myelom
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next-generation sequencing

NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PI	Propidiumjodid
R-ISS	Revised International Staging System
ROC1	Regulator of cullins 1
RRMM	Refraktäres/rezidiertes multiples Myelom
RUNX1/RUNX3	Runt-related transcription factors 1 and 3
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SMM	Schwelendes (smouldering) multiples Myelom
TP53RK	p53-related protein kinase
UTR	Untranslatierte Region
VRF	Variant read frequency
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathogenese monoklonaler Gammopathien.....	11
Abbildung 2: Wirkweise der IMiDs	18
Abbildung 3: Essenzielle Sequenz für die Lenalidomid-Sensitivität	20
Abbildung 4: Lokalisationen der patientenspezifischen Mutationen in IKZF1/3	24
Abbildung 5: Vorwärts-Primer zur cDNA-Amplifikation von IKZF3	27
Abbildung 6: Vorgehensweise zur funktionellen Analyse von patientenspezifischen Mutationen.....	63
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Mutanten und des Wildtyps von IKZF1 und IKZF3	64
Abbildung 8: Endogene Expression von Ikaros und Aiolos in MM Zelllinien	65
Abbildung 9: Degradation von Ikaros und Aiolos nach Lenalidomid-Behandlung.....	66
Abbildung 10: Zellviabilitätsassay für Myelomzelllinien nach fünf-/siebentägiger Lenalidomid-Inkubation	68
Abbildung 11: Zelltodassay der Myelomzelllinien nach fünf-/siebentägiger Lenalidomid-Inkubation.....	69
Abbildung 12: Durchflusszytometrische eGFP und PI Messung von L-363 Zellen sowie Western Analyse von Leervektor und Expressionsvektor für IKZF1-Wildtyp-Protein ...	71
Abbildung 13: Durchflusszytometrische eGFP und PI Messung als Frühtest zur Eignung der Ansätze für die stabile Transfektion der Ikaros-Expressionskassetten	72
Abbildung 14: Vergleich der Expression des exogenen Ikaros im Vergleich zum Leervektor und zu Aiolos in verschiedenen stabil transfizierten MM Zelllinien.....	73
Abbildung 15: Anhaltende Überexpression von Ikaros im Langzeitexperiment.....	74
Abbildung 16: Zeitreihen der IKZF1-Proteinspiegel von Leervektor bzw. Wildtyp-IKZF1 stabil transfizierter MM Zelllinien nach Lenalidomid-Inkubation.....	74
Abbildung 17: Vergleich der IKZF1-Proteinspiegel von Wildtyp-IKZF1 und Mutanten stabil transfizierter MM Zelllinien nach 14-stündiger Lenalidomid-Inkubation	76
Abbildung 18: Zeitreihe der IKZF1-Proteinspiegel von Wildtyp-IKZF1 und Mutanten stabil transfizierter MM Zelllinien nach Lenalidomid-Inkubation	77

Abbildung 19: Zellviabilitätsassay der polyklonalen Sublinien von L-363 und MM1.S nach sechstägiger Lenalidomid-Inkubation	79
Abbildung 20: Zelltodassay der polyklonalen Sublinien von MM1.S nach sechstägiger Lenalidomid-Inkubation	80
Abbildung 21: Expression von c-MYC in MM1.S Sublinien nach 20- und 72-stündiger Lenalidomid-Behandlung.....	82
Abbildung 22: Zelltodassay der Myelomzelllinie MM1.S nach siebentägiger Inkubation mit verschiedenen Dexamethason-Konzentrationen	83
Abbildung 23: Funktionelle Assays der MM1.S Sublinien nach siebentägiger Dexamethason-Inkubation	84
Abbildung 24: Vergleich der Expression des exogenen Aiolos im Vergleich zum Leervektor und zu Ikaros in zwei stabil transfizierten MM Zelllinien	86
Abbildung 25: Vergleich der IKZF3-Proteinspiegel von Leervektor, Wildtyp und Mutant in L-363 und MM1.S nach Lenalidomid-Inkubation	87
Abbildung 26: Zellviabilitätsassay der polyklonalen Sublinien von L-363 und MM1.S nach siebentägiger Lenalidomid-Inkubation.....	88
Abbildung 27: Zelltodassay der polyklonalen Sublinien von MM1.S nach siebentägiger Lenalidomid-Inkubation	89
Abbildung 28: Western Analyse der Expressionsvektoren für IKZF1- und IKZF3-Wildtyp-Proteine	91
Abbildung 29: Vergleich der Expression des exogenen Aiolos bei CMV- und CAG-Promoter getriebenen Expressionskassetten	92
Abbildung 30: „Clonal Competition Assay“ (CCA)	97
Abbildung 31: Vektorkarte TST-603A-pBluescript II SK- NheI	114
Abbildung 32: Vektorkarte TST-404-pBS-IKZF1wt.....	115
Abbildung 33: Vektorkarte TST-413-pBS-IKZF3wt.....	116
Abbildung 34: Vektorkarte TST-261-pT2-CMVpuro-IKZF1wt	117
Abbildung 35: Vektorkarte TST-266-pT2-CMVpuro-IKZF3wt	119
Abbildung 36: Vektorkarte TST-271-pT2-CAGpuro-IKZF3wt.....	120

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kriterien des „International Staging Systems“ (ISS)	5
Tabelle 2: Kriterien des „Revised International Staging Systems“ (R-ISS).....	5
Tabelle 3: Zur Therapie des multiplen Myeloms einsetzbare Substanzen.....	6
Tabelle 4: Chemische Struktur der IMiDs	16
Tabelle 5: Patientenspezifische Mutationen in IKZF1 und IKZF3	22

Literaturverzeichnis

1. Kuehl, W.M. and P.L. Bergsagel, *Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(3): p. 175-187.
2. Herold, G., *Innere Medizin*. 2019.
3. Kumar, S.K., et al., *Multiple myeloma*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17046.
4. DHGO, *Leitlinie Multiples Myelom (2018)*, Zugriff am 02.12.2020, URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/multiples-myelom/@@guideline/html/index.html>.
5. Kyle, R.A., et al., *Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma*. Mayo Clin Proc, 2003. **78**(1): p. 21-33.
6. Kyle, R.A. and S.V. Rajkumar, *Multiple myeloma*. Blood, 2008. **111**(6): p. 2962-2972.
7. Eisele, L., et al., *Prevalence and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance and light-chain MGUS in Germany*. Annals of Hematology, 2011. **91**(2): p. 243-248.
8. Dimopoulos, M.A., et al., *Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma*. Leukemia, 2008. **22**(8): p. 1485-1493.
9. Goldschmidt, H., et al., *Multiple myeloma and renal failure*. Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(3): p. 301-304.
10. Rajkumar, S.V., et al., *International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma*. The Lancet Oncology, 2014. **15**(12): p. e538-e548.
11. Friese, C.R., et al., *Diagnostic delay and complications for older adults with multiple myeloma*. Leuk Lymphoma, 2009. **50**(3): p. 392-400.
12. Röllig, C., S. Knop, and M. Bornhäuser, *Multiple myeloma*. The Lancet, 2015. **385**(9983): p. 2197-2208.
13. Rajkumar, S.V., *Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management*. Am J Hematol, 2020. **95**(5): p. 548-567.
14. Landgren, O., et al., *Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study*. Blood, 2009. **113**(22): p. 5412-5417.
15. Kyle, R.A., et al., *A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance*. N Engl J Med, 2002. **346**(8): p. 564-569.
16. Palumbo, A., et al., *Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group*. J Clin Oncol, 2015. **33**(26): p. 2863-2869.
17. Durie, B.G. and S.E. Salmon, *A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival*. Cancer, 1975. **36**(3): p. 842-854.
18. Greipp, P.R., et al., *International staging system for multiple myeloma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(15): p. 3412-3420.
19. Minnie, S.A. and G.R. Hill, *Immunotherapy of multiple myeloma*. J Clin Invest, 2020. **130**(4): p. 1565-1575.

20. Palumbo, A., et al., *Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(10): p. 895-905.
21. Durie, B.G.M., et al., *Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial*. *The Lancet*, 2017. **389**(10068): p. 519-527.
22. Benboubker, L., et al., *Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(10): p. 906-917.
23. Facon, T., et al., *Final analysis of survival outcomes in the phase 3 FIRST trial of up-front treatment for multiple myeloma*. *Blood*, 2018. **131**(3): p. 301-310.
24. Palumbo, A., et al., *Continuous Therapy Versus Fixed Duration of Therapy in Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma*. *Journal of Clinical Oncology*, 2015. **33**(30): p. 3459-3466.
25. Kumar, S.K., et al., *Risk of progression and survival in multiple myeloma relapsing after therapy with IMiDs and bortezomib: a multicenter international myeloma working group study*. *Leukemia*, 2012. **26**(1): p. 149-157.
26. Kumar, S., et al., *International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma*. *The Lancet Oncology*, 2016. **17**(8): p. e328-e346.
27. Durie, B.G., et al., *International uniform response criteria for multiple myeloma*. *Leukemia*, 2006. **20**(9): p. 1467-1473.
28. Löffler, G.P., P.E., *Biochemie und Pathobiochemie*. 2014.
29. González, D., et al., *Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma*. *Blood*, 2007. **110**(9): p. 3112-3121.
30. Walker, B.A., et al., *Intraclonal heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms*. *Leukemia*, 2014. **28**(2): p. 384-390.
31. Weinhold, N., et al., *Clonal selection and double-hit events involving tumor suppressor genes underlie relapse in myeloma*. *Blood*, 2016. **128**(13): p. 1735-1744.
32. Keats, J.J., et al., *Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma*. *Blood*, 2012. **120**(5): p. 1067-1076.
33. Furukawa, Y. and J. Kikuchi, *Molecular basis of clonal evolution in multiple myeloma*. *Int J Hematol*, 2020. **111**(4): p. 496-511.
34. Kortum, K.M., et al., *Longitudinal analysis of 25 sequential sample-pairs using a custom multiple myeloma mutation sequencing panel (M(3)P)*. *Ann Hematol*, 2015. **94**(7): p. 1205-1211.
35. Strom, S.P., *Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing*. *Cancer Biol Med*, 2016. **13**(1): p. 3-11.
36. Barrio, S., et al., *Protocol for M(3)P: A Comprehensive and Clinical Oriented Targeted Sequencing Panel for Routine Molecular Analysis in Multiple Myeloma*. *Methods Mol Biol*, 2018. **1792**: p. 117-128.

37. Barrio, S., et al., *IKZF1/3 and CRL4(CRBN) E3 ubiquitin ligase mutations and resistance to immunomodulatory drugs in multiple myeloma*. Haematologica, 2020. **105**(5): p. e237-e241.
38. Kortum, K.M., et al., *Targeted sequencing of refractory myeloma reveals a high incidence of mutations in CRBN and Ras pathway genes*. Blood, 2016. **128**(9): p. 1226-1233.
39. Holstein, S.A. and P.L. McCarthy, *Immunomodulatory Drugs in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Clinical Experience*. Drugs, 2017. **77**(5): p. 505-520.
40. Richardson, P.G., et al., *Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma*. Blood, 2002. **100**(9): p. 3063-3067.
41. Ludwig, H., et al., *Prevention and management of adverse events of novel agents in multiple myeloma: a consensus of the European Myeloma Network*. Leukemia, 2018. **32**(7): p. 1542-1560.
42. Lacy, M.Q., et al., *Pomalidomide (CC4047) plus low-dose dexamethasone as therapy for relapsed multiple myeloma*. J Clin Oncol, 2009. **27**(30): p. 5008-5014.
43. D'Amato, R.J., et al., *Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 4082-4085.
44. Sampaio, E.P., et al., *Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes*. J Exp Med, 1991. **173**(3): p. 699-703.
45. Haslett, P.A., et al., *Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset*. J Exp Med, 1998. **187**(11): p. 1885-1892.
46. Ito, T., et al., *Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity*. Science, 2010. **327**(5971): p. 1345-1350.
47. Zhu, Y.X., et al., *Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide*. Blood, 2011. **118**(18): p. 4771-4779.
48. Kronke, J., et al., *Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells*. Science, 2014. **343**(6168): p. 301-305.
49. Lu, G., et al., *The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins*. Science, 2014. **343**(6168): p. 305-309.
50. Stewart, A.K., *Medicine. How thalidomide works against cancer*. Science, 2014. **343**(6168): p. 256-257.
51. Bjorklund, C.C., et al., *Rate of CRL4(CRBN) substrate Ikaros and Aiolos degradation underlies differential activity of lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma cells by regulation of c-Myc and IRF4*. Blood Cancer J, 2015. **5**: p. e354.
52. Lopez-Girona, A., et al., *Lenalidomide downregulates the cell survival factor, interferon regulatory factor-4, providing a potential mechanistic link for predicting response*. Br J Haematol, 2011. **154**(3): p. 325-336.
53. Shaffer, A.L., et al., *IRF4 addiction in multiple myeloma*. Nature, 2008. **454**(7201): p. 226-231.

54. Gandhi, A.K., et al., *Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4(CRBN.)*. Br J Haematol, 2014. **164**(6): p. 811-821.
55. Fionda, C., et al., *The IMiDs targets IKZF-1/3 and IRF4 as novel negative regulators of NK cell-activating ligands expression in multiple myeloma*. Oncotarget, 2015. **6**(27): p. 23609-23630.
56. Kronke, J., et al., *Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1alpha in del(5q) MDS*. Nature, 2015. **523**(7559): p. 183-188.
57. Manni, S., et al., *Inactivation of CK1 α in multiple myeloma empowers drug cytotoxicity by affecting AKT and β -catenin survival signaling pathways*. Oncotarget, 2017. **8**(9): p. 14604-14619.
58. Schuster, S.R., et al., *The clinical significance of cereblon expression in multiple myeloma*. Leuk Res, 2014. **38**(1): p. 23-28.
59. Zhu, Y.X., et al., *Identification of cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma*. Blood, 2014. **124**(4): p. 536-545.
60. Kronke, J., et al., *IKZF1 expression is a prognostic marker in newly diagnosed standard-risk multiple myeloma treated with lenalidomide and intensive chemotherapy: a study of the German Myeloma Study Group (DSMM)*. Leukemia, 2017. **31**(6): p. 1363-1367.
61. Pourabdollah, M., et al., *High IKZF1/3 protein expression is a favorable prognostic factor for survival of relapsed/refractory multiple myeloma patients treated with lenalidomide*. J Hematol Oncol, 2016. **9**(1): p. 123.
62. Dimopoulos, K., et al., *Expression of CRBN, IKZF1, and IKZF3 does not predict lenalidomide sensitivity and mutations in the cereblon pathway are infrequent in multiple myeloma*. Leuk Lymphoma, 2019. **60**(1): p. 180-188.
63. Franssen, L.E., et al., *Cereblon loss and up-regulation of c-Myc are associated with lenalidomide resistance in multiple myeloma patients*. Haematologica, 2018. **103**(8): p. e368-e371.
64. Molnár, A. and K. Georgopoulos, *The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(12): p. 8292-8303.
65. Morgan, B., et al., *Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation*. Embo j, 1997. **16**(8): p. 2004-2013.
66. Cortes, M. and K. Georgopoulos, *Aiolos is required for the generation of high affinity bone marrow plasma cells responsible for long-term immunity*. J Exp Med, 2004. **199**(2): p. 209-219.
67. Sun, L., A. Liu, and K. Georgopoulos, *Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development*. Embo j, 1996. **15**(19): p. 5358-5369.
68. Marke, R., F.N. van Leeuwen, and B. Scheijen, *The many faces of IKZF1 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*. Haematologica, 2018. **103**(4): p. 565-574.

69. Zhou, N., et al., *RUNX proteins desensitize multiple myeloma to lenalidomide via protecting IKZFs from degradation*. *Leukemia*, 2019. **33**(8): p. 2006-2021.
70. Koipally, J., et al., *Unconventional potentiation of gene expression by Ikaros*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(15): p. 13007-13015.
71. Kortuem, K.M., et al., *Panel sequencing for clinically oriented variant screening and copy number detection in 142 untreated multiple myeloma patients*. *Blood Cancer J*, 2016. **6**: p. e397.
72. Kortüm, K.M., et al., *Targeted sequencing using a 47 gene multiple myeloma mutation panel (M3P) in -17p high risk disease*. *British Journal of Haematology*, 2015. **168**(4): p. 507-510.
73. Payne, M.A., *Zinc finger structure-function in Ikaros* Marvin A Payne. *World J Biol Chem*, 2011. **2**(6): p. 161-166.
74. Gabriel, C.H., et al., *Identification of Novel Nuclear Factor of Activated T Cell (NFAT)-associated Proteins in T Cells*. *J Biol Chem*, 2016. **291**(46): p. 24172-24187.
75. Caballero, R., et al., *Combinatorial effects of splice variants modulate function of Aiolos*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 15): p. 2619-2630.
76. Izsvak, Z., et al., *Efficient stable gene transfer into human cells by the Sleeping Beauty transposon vectors*. *Methods*, 2009. **49**(3): p. 287-297.
77. Steinbrunn, T., et al., *Efficient transient transfection of human multiple myeloma cells by electroporation--an appraisal*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e97443.
78. Logue, S.E., M. Elgendy, and S.J. Martin, *Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells*. *Nat Protoc*, 2009. **4**(9): p. 1383-1395.
79. Laemmli, U.K., *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
80. Eichner, R., et al., *Immunomodulatory drugs disrupt the cereblon-CD147-MCT1 axis to exert antitumor activity and teratogenicity*. *Nat Med*, 2016. **22**(7): p. 735-743.
81. Lopez-Girona, A., et al., *Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide*. *Leukemia*, 2012. **26**(11): p. 2326-2335.
82. Marke, R., et al., *Tumor suppressor IKZF1 mediates glucocorticoid resistance in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 2016. **30**(7): p. 1599-1603.
83. Burwick, N. and S. Sharma, *Glucocorticoids in multiple myeloma: past, present, and future*. *Ann Hematol*, 2019. **98**(1): p. 19-28.
84. Fedele, P.L., et al., *IMiDs prime myeloma cells for daratumumab-mediated cytotoxicity through loss of Ikaros and Aiolos*. *Blood*, 2018. **132**(20): p. 2166-2178.
85. Hausmann, S., et al., *Loss of serum and glucocorticoid-regulated kinase 3 (SGK3) does not affect proliferation and survival of multiple myeloma cell lines*. *PLoS One*, 2015. **10**(4): p. e0122689.

86. Steinbrunn, T., et al., *Mutated RAS and constitutively activated Akt delineate distinct oncogenic pathways, which independently contribute to multiple myeloma cell survival*. *Blood*, 2011. **117**(6): p. 1998-2004.
87. Fink, S., et al., *A simple approach for multi-targeted shRNA-mediated inducible knockdowns using Sleeping Beauty vectors*. *PLoS One*, 2018. **13**(10): p. e0205585.
88. Hung, K.H., et al., *Aiolos collaborates with Blimp-1 to regulate the survival of multiple myeloma cells*. *Cell Death Differ*, 2016. **23**(7): p. 1175-1184.
89. Sperling, A.S., et al., *Patterns of substrate affinity, competition, and degradation kinetics underlie biological activity of thalidomide analogs*. *Blood*, 2019. **134**(2): p. 160-170.
90. Zhu, Y.X., et al., *Identification of lenalidomide resistance pathways in myeloma and targeted resensitization using cereblon replacement, inhibition of STAT3 or targeting of IRF4*. *Blood Cancer J*, 2019. **9**(2): p. 19.
91. Mogollon, P., et al., *Biological Background of Resistance to Current Standards of Care in Multiple Myeloma*. *Cells*, 2019. **8**(11).
92. Pinto, V., et al., *Multiple Myeloma: Available Therapies and Causes of Drug Resistance*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(2).
93. Harding, T., et al., *The future of myeloma precision medicine: integrating the compendium of known drug resistance mechanisms with emerging tumor profiling technologies*. *Leukemia*, 2019. **33**(4): p. 863-883.
94. Hideshima, T., et al., *p53-related protein kinase confers poor prognosis and represents a novel therapeutic target in multiple myeloma*. *Blood*, 2017. **129**(10): p. 1308-1319.
95. Xu, Q., et al., *Expression of the cereblon binding protein argonaute 2 plays an important role for multiple myeloma cell growth and survival*. *BMC Cancer*, 2016. **16**: p. 297.
96. Sebastian, S., et al., *Multiple myeloma cells' capacity to decompose H₂O₂ determines lenalidomide sensitivity*. *Blood*, 2017. **129**(8): p. 991-1007.
97. Hideshima, T., et al., *Immunomodulatory drugs activate NK cells via both Zap-70 and cereblon-dependent pathways*. *Leukemia*, 2020.
98. Franssen, L.E., et al., *Lenalidomide combined with low-dose cyclophosphamide and prednisone modulates Ikaros and Aiolos in lymphocytes, resulting in immunostimulatory effects in lenalidomide-refractory multiple myeloma patients*. *Oncotarget*, 2018. **9**(74): p. 34009-34021.
99. Kikuchi, J., et al., *Myeloma Cells Are Activated in Bone Marrow Microenvironment by the CD180/MD-1 Complex, Which Senses Lipopolysaccharide*. *Cancer Res*, 2018. **78**(7): p. 1766-1778.
100. Dimopoulos, K., et al., *Dual inhibition of DNMTs and EZH2 can overcome both intrinsic and acquired resistance of myeloma cells to IMiDs in a cereblon-independent manner*. *Mol Oncol*, 2018. **12**(2): p. 180-195.
101. Rasche, L., et al., *Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing*. *Nat Commun*, 2017. **8**(1): p. 268.
102. Mountjoy, L., et al., *Prediction of immunomodulatory drugs (IMiDs) sensitivity in myeloma via determination of baseline anti-oxidative stress capacity*. *Leukemia*, 2020. **34**(11): p. 3060-3063.

103. Ganesan, S., et al., *Combination Lenalidomide/Bortezomib Treatment Synergistically Induces Calpain-Dependent Ikaros Cleavage and Apoptosis in Myeloma Cells*. *Mol Cancer Res*, 2020. **18**(4): p. 529-536.
104. Fischer, E.S., et al., *Structure of the DDB1-CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide*. *Nature*, 2014. **512**(7512): p. 49-53.
105. Yamamoto, J., et al., *ARID2 is a pomalidomide-dependent CRL4(CRBN) substrate in multiple myeloma cells*. *Nat Chem Biol*, 2020. **16**(11): p. 1208-1217.
106. Petzold, G., E.S. Fischer, and N.H. Thoma, *Structural basis of lenalidomide-induced CK1alpha degradation by the CRL4(CRBN) ubiquitin ligase*. *Nature*, 2016. **532**(7597): p. 127-130.
107. Ziccheddu, B., et al., *Integrative analysis of the genomic and transcriptomic landscape of double-refractory multiple myeloma*. *Blood Adv*, 2020. **4**(5): p. 830-844.
108. Tachita, T., et al., *Expression, mutation, and methylation of cereblon-pathway genes at pre- and post-lenalidomide treatment in multiple myeloma*. *Cancer Sci*, 2020. **111**(4): p. 1333-1343.
109. Gao, S., S. Wang, and Y. Song, *Novel immunomodulatory drugs and neo-substrates*. *Biomark Res*, 2020. **8**: p. 2.
110. Hansen, J.D., et al., *Discovery of CRBN E3 Ligase Modulator CC-92480 for the Treatment of Relapsed and Refractory Multiple Myeloma*. *J Med Chem*, 2020. **63**(13): p. 6648-6676.
111. Matyskiela, M.E., et al., *A Cereblon Modulator (CC-220) with Improved Degradation of Ikaros and Aiolos*. *J Med Chem*, 2018. **61**(2): p. 535-542.

Publikation

Barrio, S., Munawar, U., Zhu, Y. X., Giesen, N., Shi, C. X., Viá, M. D., Sanchez, R., Bruins, L., **Demler, T.**, Müller, N., Haertle, L., Garitano, A., Steinbrunn, T., Danhof, S., Cuenca, I., Barrio-Garcia, C., Braggio, E., Rosenwald, A., Martinez-Lopez, J., Rasche, L., Raab, M. S., Stewart, A. K., Einsele, H., Stühmer, T., Kortüm, K. M., IKZF1/3 and CRL4(CRBN) E3 ubiquitin ligase mutations and resistance to immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Haematologica*, 2020. 105(5): p. e237-e241.

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei Prof. Dr. Ralf C. Bargou für die Ermöglichung dieser Arbeit am Comprehensive Cancer Center Mainfranken bedanken. Der Übernahme des Erstgutachtens und der wertvollen Ratschläge durch seine fachliche Kompetenz gilt ebenfalls mein Dank.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Thorsten Stühmer für die hervorragende Betreuung. Seine Unterstützung während des experimentellen Teils dieser Doktorarbeit mit seinen umfassenden methodischen Kenntnissen und auch bei der Überarbeitung der vorliegenden Doktorarbeit haben wesentlich zur Qualität dieser Arbeit beigetragen.

Dr. Santiago Barrio gilt mein Dank für die Bereitstellung der Daten auf denen diese Arbeit beruht.

Prof. Dr. Jürgen Löffler und Prof. Dr. Gernot Stuhler danke ich für die kontinuierliche Betreuung als Mitglieder des Promotionskomitees. Bei Prof. Dr. Jürgen Löffler möchte ich mich außerdem für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Mein Dank geht auch an Dr. Daniela Brännert und Dr. Umair Munawar für ihre hilfreichen Ratschläge zur Durchführung der Experimente und beim Umgang mit verschiedenen Software-Programmen.

Ebenso danke ich Evelyn Brandt für die gründliche Einarbeitung in die Methodik und für die Beantwortung meiner im Verlauf auftretenden Fragen.

Bei der ganzen Arbeitsgruppe Bargou möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre mit fachlichem und persönlichem Austausch im Labor bedanken.

Der Graduate School of Life Sciences der Universität Würzburg danke ich für die finanzielle Unterstützung und für die Möglichkeit der Teilnahme am umfangreichen Programm- und Seminarangebot.

Bei meiner Familie möchte ich mich für ihre Geduld und Unterstützung und bei meinem Freund für die gegenseitige Motivation im Home-Office bedanken.

Lebenslauf

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Funktionelle Analyse von patientenspezifischen Mutationen in IKZF1/3 als mögliche Resistenzmechanismen in der Therapie des refraktären und rezidierten multiplen Myeloms“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg,

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Functional analysis of patient-specific mutations in IKZF1/3 as possible resistance mechanisms in the therapy of refractory and relapsed multiple myeloma” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg,

Place, Date

Signature