

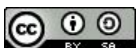
Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

Modellierung klonaler Evolution beim Multiplen Myelom

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Nicole Müller
aus Berlin

Würzburg, Februar 2024



Referentenblatt

Referent: Prof. Dr. Martin Kortüm

Koreferent: Prof. Dr. Andreas Rosenwald

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2024

Die Promovendin ist Ärztin

Überarbeitung vom Februar 2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Definition	1
1.2	Epidemiologie	2
1.3	Diagnose.....	3
1.4	Diagnostik	7
1.4.1	Erstdiagnostik.....	7
1.4.2	Staging.....	10
1.5	Therapie.....	11
1.5.1	Erstlinientherapie.....	11
1.5.2	Supportive Therapie	14
1.5.3	Rezidivtherapie.....	15
1.5.4	Arzneimittelklassen	16
1.6	Pathogenese.....	18
1.6.1	Zytogenetik und pathogenetische Vorgänge im Multiplen Myelom	18
1.6.2	Wirkmechanismus IMiDs (Lenalidomid) und Resistenzbildung	21
2	Material	25
3	Methoden.....	33
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	33
3.1.1	Klonierung.....	33
3.1.2	Gelelektrophorese.....	34
3.1.3	Ligation.....	35
3.1.4	Transformation	35
3.1.5	Anzucht von Bakterienkulturen.....	36
3.1.6	Kolonie-PCR	37
3.1.7	DNA-Aufreinigung.....	38
3.1.8	DNA-Quantifizierung.....	38
3.1.9	Sequenzierung	38
3.2	Methoden in der Zellkultur	39
3.2.1	Auftauen von Zellen	39
3.2.2	Kultivierung von Zelllinien	39
3.2.3	Qualitative und quantitative Zellzählung.....	39
3.2.4	Elektroporation	40
3.2.5	Ansetzen einer Co-Kultur.....	41
3.3	Spezifische Methoden	42
3.3.1	Grundkomponenten des Zelllinien-Vektorsystems	42

3.3.2	Fluoreszierende Proteine	44
3.3.3	Vektorsysteme	49
3.3.4	Elektroporation der Sublinien mit Einzelfarben-Vektoren	61
3.3.5	Ansetzen der Co-Kulturen mit Lenalidomid	62
4	Ergebnisse	67
5	Diskussion	92
6	Zusammenfassung	96
7	Literaturverzeichnis	98

1 Einleitung

1.1 Definition

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne lymphoproliferative B-Zell-Erkrankung, die auch Morbus Kahler genannt wird. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifiziert das Multiple Myelom zu den B-Non-Hodgkin-Lymphomen (Goldschmidt, 2011). Definiert wird das Multiple Myelom durch eine Vermehrung von monoklonalen Plasmazellen. Es kommt zu einer Vermehrung im Knochenmark und somit zu einer Verdrängung der gesunden Blutbildung und zur Zytopenie. Die neoplastischen Zellen sezernieren monoklonale Immunglobuline (Paraproteine, M-Gradient) oder deren Leichtketten (Fairfield et al., 2016; Schulz, 2017). Leichtketten können sich in den Nierentubuli als sogenannte ‚Casts‘ ablagern und einen Verlust der Nierenfunktion nach sich ziehen.

Durch die Aktivierung von Osteoklasten kommt es zur osteolytischen Knochenschädigung (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2018; National Cancer Institute, o.J.). Bei Vorliegen einer sogenannten extramedullären Erkrankung infiltrieren die neoplastischen Plasmazellen Organe außerhalb der Knochenmarksnische (Kyle & Rajkumar, 2009). Die neoplastischen Zellen charakterisieren sich durch die Sekretion von monoklonalen Immunglobulinen (Paraproteine, M-Gradient) oder deren Leichtketten (Fairfield et al., 2016; Schulz, 2017).

Führt dies zu dem Vorliegen von SLiM-CRAB Kriterien, ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Organkomplikationen, sogenannten ROTI – related organ or tissue impairment so hoch, dass die Einleitung einer Therapie empfohlen wird. Als Indikation für einen Therapiebeginn ist das Erfüllen eines der unten genannten Kriterien ausreichend (Tabelle 1). Weitere Indikationen für einen Therapiebeginn sind unter anderem Myelom-bedingte Schmerzen, B-Symptomatik, Hyperviskositätssyndrom, sowie rezidivierende Infektionen (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2018; International Myeloma Working Group, 2003).

Tabelle 1: SLiM-CRAB Kriterien

Hyperkalzämie (C)	Calcium $>2,75$ mmol/l ($>10,5$ mg/dl) oder $>0,25$ mmol/l oberhalb des oberen Normwertes
Niereninsuffizienz (R)	Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) <40 ml/min oder Kreatinin $\geq 2,0$ mg/dl (>173 μ mol/l)
Anämie (A)	Hämoglobin $<10,0$ g/dl ($<6,21$ mmol/l) oder $\geq 2,0$ g/l ($>1,24$ mmol/l) unterhalb des unteren Normwertes
Knochenbeteiligung (B)	Nachweis einer osteolytischen Knochenläsion
Biomarker	
Knochenmarkinfiltration (Sixty)	$> 60\%$ klonaler Plasmazellanteil im Knochenmark (zytologisch und histologisch)
freie Leichtketten (Light chain)	freier Leichtkettenquotient im Serum >100 (betroffene/nicht betroffene Leichtkette)
MRT	>1 fokale Läsion $>0,5$ cm in der Magnetresonanztomographie (MRT) Bildgebung

Quelle: (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2018; International Myeloma Working Group, 2014)

1.2 Epidemiologie

Das Multiple Myelom ist die zweithäufigste hämatologische maligne Erkrankung in Deutschland. Jedoch hat das Multiple Myelom im Vergleich zu anderen Neoplasien eine relativ geringe Prävalenz (National Cancer Institute, o.J.). 2017 wurden in Deutschland 6855 Neuerkrankungen verzeichnet (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021). Das Multiple Myelom umfasst ca. 10 % der hämatologischen Malignome (Mateos & San Miguel, 2017) und ca. 1-1,8 % aller Krebserkrankungen weltweit (Dimopoulos et al., 2021; Kehler et al., 2017). In der epidemiologischen Verteilung dieser Erkrankung zeigt sich ein Unterschied in der Verteilung je nach Ethnie, als Hinweis auf eine genetische

Prädisposition, Alter und Geschlecht. Im Zeitraum von 2012-2016 erkrankten pro 100.000 Einwohnern¹ in den USA unabhängig der ethnischen Herkunft 8,7 Männer und 5,6 Frauen. In Bezug auf die ethnische Herkunft ist das Multiple Myelom am meisten bei Afro-Amerikanern verbreitet. Es bestehen keine bekannten Risikofaktoren, welche die Entwicklung einer multiplen Myelom Erkrankung begünstigen oder auslösen können (Alexander et al., 2007). Die geringste Anzahl an Neuerkrankungen findet man in der Gruppe weiblicher Asiaten (3,0 pro 100.000). Dieses Verteilungsmuster zeichnet sich ebenso in der Anzahl an Sterbefällen ab. Die meisten Sterbefälle werden bei männlichen Afroamerikanern (7,4 pro 100.000) gemessen, im Vergleich zu Asiatinnen, welche die geringsten Sterbefälle aufweisen (1,2 pro 100.000) (National Cancer Institute, o.J.). Die meisten Neuerkrankungen treten im Alter von 65 bis 74 Jahren auf. Die Inzidenz wie auch die Prävalenz nimmt aufgrund einer alternden Gesellschaft und längeren Lebenszeit der Patienten in Deutschland zu. Bis 2040 ist mit einem Anstieg der Fallzahlen um bis zu 25 % auszugehen (Kortüm, 2021). Das mittlere Sterbealter liegt zwischen 75 und 84 Jahren. Patienten, welche eine Autotransplantation als Therapie erhalten, haben eine mittlere Überlebenszeit von ca. 10 Jahren (Schürch et al., 2019; Watanabe et al., 2013). Die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate betrug im Jahr 2016 in Deutschland bei männlichen Myelom Patienten 55,7 %, bei Myelom Patientinnen 57,3 %. Im Vergleich zu der relativen Fünf-Jahres-Überlebensrate von 2005 zeigt sich eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit. Im Jahr 2005 betrug die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate bei Myelom Patienten 47,0 %, bei Myelom Patientinnen 47,3 % (GEKID-atlas, o.J.). Insgesamt zeigt sich ein individuell stark unterschiedlicher Verlauf bei Multiplen Myelom Erkrankten.

1.3 Diagnose

2014 veröffentlichte die International Myeloma Working Group neue Diagnosekriterien für das symptomatische Multiple Myelom und das schwelende Myelom (SMM – smouldering myeloma).

¹ Aufgrund der besseren Lesbarkeit wird im Text das generische Maskulinum verwendet. In dieser Arbeit sind jedoch stets alle Geschlechter ausdrücklich einbezogen.

Die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) gilt als Präkanzerose, die jeder Myelomerkrankung vorausgeht (Landgren et al., 2009). Die Gesamtprävalenz ist altersabhängig und beträgt in der Bevölkerung ≥ 50 Jahren ca. 3 % (Merlini, 2014). Vor dem 50. Lebensjahr ist die MGUS sehr selten. Das Risiko einer Progression von einem MGUS zu dem Multiplen Myelom ist individuell unterschiedlich. Das Risiko eines Progresses eines MGUS zur Entwicklung eines Multiplen Myeloms beträgt innerhalb eines Jahres 1 %. Risikofaktoren für einen Progress sind eine nicht Immunglobulin G (IgG) MGUS sowie insbesondere die Anfangskonzentration des M-Gradienten im Serum. Das Auftreten von monoklonaler Leichtketten im Urin stellen keinen Risikofaktor für einen Progress dar. (International Myeloma Working Group, 2014; Kyle et al., 2002; Rajkumar, 2012; Weiss et al., 2009). Es bestehen mehrere MGUS Varianten (IgG, IgA, IgM, IgD), mit unterschiedlicher Häufigkeitsverteilung, sowie unterschiedlicher Transformationshäufigkeit. Die meisten Myelom-Diagnosen entwickeln sich aus einem MGUS mit nicht-IgM-Immunglobulinen (80 %), seltener mit 20 % aus einem inkompletten (Leichtketten) Immunglobulin MGUS (International Myeloma Working Group, 2014). Die Diagnose MGUS ist häufig ein Zufallsbefund und wird anhand folgender Kriterien gestellt (International Myeloma Working Group, 2014; Mateos & Landgren, 2016):

Tabelle 2: Diagnosekriterien für MGUS

1)	Nachweis von klonalen Plasmazellen im Knochenmark < 10%
2)	Monoklonales Protein im Serum < 30g/L
3)	Monoklonales Protein im Urin < 500 mg innerhalb 24 Stunden
4)	Kein Nachweis von Endorganschäden (CRAB-Kriterien)

Das schwelende Myelom gilt als klinisches Zwischenstadium zwischen dem MGUS und dem Multiplen Myelom (International Myeloma Working Group, 2014). Das Risiko, dass sich ein SMM innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnose zu einem Multiplen Myelom weiter entwickelt beträgt 10 % innerhalb eines Jahres (Mateos et al., 2020; Rajkumar, 2012). Die International Myeloma Working Group hat 2014 die Kriterien für die Diagnose SMM neu festgelegt. Für die Diagnose eines schwelenden Myeloms müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

Tabelle 3: Diagnosekriterien für das schwelende Multiple Myelom

1)	Kein Nachweis von Endorganschäden (CRAB Kriterien)
2)	Nachweis eines oder mehrere der folgenden Kriterien:
a)	Monoklonales Protein im Serum (IgG oder IgA) ≥ 30 g/L
b)	Monoklonales Protein im Urin ≥ 500 mg innerhalb 24 Stunden
c)	Nachweis klonaler Plasmazellen im Knochenmark von 10-60%

Aktuell werden Patienten mit der Diagnose MGUS oder SMM in regelmäßigen Abständen klinisch überwacht, erhalten jedoch keine spezifische Therapie, solange kein Nachweis für klinische Symptome vorliegt (Rajkumar, 2012).

Für das SMM wurde ein Risikostratifizierungsmodell entwickelt, welches die Identifizierung von SMM-Patienten mit hohem Risiko eines Fortschreitens der Erkrankung ermöglicht. Für dieses 2/20/20-Modell wurden drei Risikofaktoren festgelegt, welche das Progressionsrisiko innerhalb der folgenden zwei Jahre beeinflussen (Mateos et al., 2020) (Tabelle 4).

Tabelle 4: Risikofaktoren des 2/20/20 des Risikostratifizierungsmodell bei SMM

1.	M-Protein im Serum > 2 g/dL
2.	Verhältnis freier Leichtkettenquotient im Serum > 20 (betroffene/nicht betroffene Leichtkette)
3.	Nachweis von klonalen Plasmazellen im Knochenmark von $> 20\%$

Quelle: (Mateos et al., 2020)

Mit diesem Risikostratifizierungsmodell konnten drei Kategorien mit steigendem Risiko eines Progresses innerhalb zwei Jahren entwickelt werden.

Tabelle 5: Risikokategorien und 2-Jahres-Progressionsrisiko des SMM

Risikokategorien	2-Jahres-Progressionsrisiko in Prozent
Niedriges Risiko (keine Risikofaktoren)	6 %
Mittleres Risiko (ein Risikofaktor erfüllt)	18 %
Hohes Risiko (zwei bis drei Risikofaktoren erfüllt)	44 %

Quelle: (Mateos et al., 2020)

Gemäß der aktuellen Diagnosekriterien müssen für die Diagnose eines Multiples Myeloms folgende Kriterien erfüllt sein müssen:

Tabelle 6: Diagnosekriterien für das symptomatische Multiple Myelom

1.	Nachweis von klonalen Plasmazellen im Knochenmark von $\geq 10\%$
und/oder	Monoklonaler Proteine im Serum
und/oder	Monoklonaler Proteine im Urin
und	Endorganschäden nachweisbar
2.	Nachweis von klonalen Plasmazellen im Knochenmark von $\geq 60\%$
oder	Verhältnis freier Leichtkettenquotient im Serum >100 (betroffene/nicht betroffene Leichtkette)
oder	> 1 fokale Läsion in der MRT Bildgebung

Im Folgenden werden Sonderformen des Multiplem Myeloms erläutert.

▪ **Solitäres Plasmozytom:**

Das solitäre Plasmozytom charakterisiert sich durch einen isolierten Plasmazelltumor ohne Nachweis einer systemischen Beteiligung. In der Knochenmarkpunktion finden sich keine monoklonalen Plasmazellen (Kehrer et al., 2017). Das solitäre Plasmozytom ist zumeist in Knochen lokalisiert. Hier erfolgt als Therapiemaßnahme eine Bestrahlung und keine systemische Therapie (Dimopoulos et al., 2000). Ein weiteres Merkmal ist das vergleichsweise hohe Progressionsrisiko von ca. 50 % für die Entwicklung eines Multiplen Myeloms in den nächsten drei Jahren (International Myeloma Working Group, 2014; Weber, 2005).

▪ **Plasmazell-Leukämie:**

Die Plasmazell-Leukämie ist eine sehr seltene, jedoch zumeist sehr aggressive Form des Multiplen Myeloms. Daher ist eine schnelle Diagnostik zur Einleitung einer Therapie notwendig. Als Diagnosekriterien galt jahrelang der Nachweis von mehr als 20 % Plasmazellen im Differenzialblutbild und / oder eine absolute Plasmazellanzahl von mehr als $2 \times 10^9/L$ im peripheren Blut. Durch Fernández de Larrea et al. (2021) wurde jedoch gezeigt, dass bereits der Nachweis von mehr als 5 % Plasmazellen im Differenzialblutbild ähnliche prognostische Auswirkungen bedingt. Die Diagnosekriterien wurden aufgrund dieser Erkenntnisse angepasst. Eine primäre Plasmazell-Leukämie ist durch das Vorhandensein von mehr als 5 % Plasmazellen im Differenzialblutbild bei symptomatischen Patienten definiert (Fernández de Larrea et al., 2021). Es wird eine primäre von einer sekundären Plasmazell-Leukämie unterschieden. Bei der primären Plasmazell-Leukämie bestand bereits bei Diagnose eine Leukämie. Hingegen stellt die sekundären Plasmazell-Leukämie einen leukämischen Verlauf eines refraktären oder rezidivierenden Myeloms dar (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2018; Mina et al., 2017).

1.4 Diagnostik

1.4.1 Erstdiagnostik

Die Symptome, die zu Untersuchungen und somit zur Erstdiagnose Multiples Myelom führen, sind vielfältig. Häufige Symptome bei Erstdiagnose sind Knochenschmerzen

mit 58 % unter allen Patienten, Fatigue bei 32 %, eine unklare Anämie bei 73 %, welche teilweise die Fatigue bedingt (Kyle et al., 2003), und eine eingeschränkte Nierenfunktion bei 48 % aller Patienten. Jedoch präsentieren sich ca. 25 % der Patienten bei der Diagnosestellung beschwerdefrei (Kortüm, 2021; Michels & Petersen, 2017). Als Standarddiagnostik bei dem Verdacht auf ein Multiples Myelom sind folgende Untersuchungen durchzuführen (Tabelle 7):

Tabelle 7: Erstdiagnostik bei Multiplem Myelom

Untersuchung	Beschreibung
Körperliche Untersuchung und Anamnese	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Knochenschmerzen ▪ Fatigue ▪ Gewichtsverlust ▪ Anämiezeichen ▪ Hinweise für eine gestörte Nierenfunktion
Laborparameter im Serum	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Differentialblutbild, Blutausstrich ▪ Kalzium ▪ Kreatinin ▪ Serumalbumin ▪ Leber- und Nierenwerte ▪ Laktatdehydrogenase (LDH) ▪ beta₂-Mikroglobulin (β₂M) ▪ quantitative Bestimmung der Immunglobuline ▪ Serumproteinelektrophorese zur Bestimmung des M-Gradienten ▪ Bestimmung der freien Leichtketten ▪ Immunfixationselektrophorese
Laborparameter im Urin	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 24-h-Sammelurin (Proteinurie, Leichtketten-Proteinurie) ▪ Immunfixationselektrophorese ▪ Proteinelektrophorese
Knochenmarkdiagnostik	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Histologie, Zytologie (Nachweis Plasmozytose, Monoklonalität) ▪ Zytogenetik mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) und Chromosomenanalyse zur Detektion Hochrisiko Aberrationen [t(4;14), t(14;16), t(11;14) und del17p ▪ Next Generation Sequencing + Next Generation Flow Cytometry zum Nachweis klonaler Plasmazellen
Bildgebende Diagnostik	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Low-dose-Ganzkörpercomputertomographie zum Ausschluss von Osteopenien und Osteolysen ▪ ggf. Ganzkörper-Magnetresonanztomographie, PET-CT

Quelle: (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2018; Dimopoulos et al., 2021; Kehrer et al., 2017; Michels & Petersen, 2017)

1.4.2 Staging

Um Patienten mit dem Multiplen Myelom klassifizieren zu können, wurde 2005 von der International Myeloma Working Group das International Staging System (ISS) veröffentlicht. Diese löst die bisherige Klassifikation nach Salmon und Durie ab, welche keine prognostische Aussagekraft hat und unter anderem auf konventionellen Röntgenaufnahmen basiert. Für die dreistufige Einteilung des ISS werden einfach verfügbare Serumparameter, Serumalbumin und beta₂-Mikroglobulin (β₂M) bestimmt. Mit Hilfe dieser Werte werden die Patienten in drei prognostische Gruppen eingeteilt (Greipp et al., 2005). 2016 gab es eine Erweiterung dieser Einteilung. In das Staging System wurden die Laktatdehydrogenase (LDH) und zytogenetische Aberrationen zusätzlich aufgenommen. Die zytogenetischen Aberrationen können anhand der Klassifikation des Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) in verschiedene Risikogruppen mit prognostischer Relevanz eingeteilt werden. Zu den Hochrisiko-Aberrationen zählen del(17p), t(4,14), (14,16) sowie (14,20) (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2018; Mikhael et al.). Das dreistufige Staging System mit prognostischer Aussage wird in Tabelle 8 dargestellt (Palumbo et al., 2015):

Tabelle 8: Internationales Staging System und Prognose

ISS-Stadium	Kriterien	Prognose	
		5-Jahres-Überlebensrate in %	Progressionsfreie 5-Jahres-Überlebensrate in %
Stadium I	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Serum-beta2-Mikroglobulin < 3,5 mg/L ▪ Serumalbumin ≥ 3,5 g/dL ▪ Zytogenetisches Standardrisiko ▪ LDH ≤ Normwert 	82	55
Stadium II	Weder Stadium I oder III	62	36
Stadium III	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Serum-beta2-Mikroglobulin ≥ 5,5 mg/L ▪ Zytogenetisches Hochrisiko oder ▪ LDH > oberem Normwert 	40	24

Quelle: (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2018; Palumbo et al., 2015)

1.5 Therapie

1.5.1 Erstlinientherapie

Bei Vorliegen der in Abschnitt 1.1 genannten Therapieindikationen stellt die rasche Symptomkontrolle und die Normalisierung myelombedingter Organeinschränkung das Therapieziel in der Behandlung von Patienten mit der Erstdiagnose eines Multiplen Myeloms dar. Längerfristiges Ziel ist das Erreichen einer möglichst langanhaltenden und tiefen Remission. Es stehen hierfür unterschiedliche Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung. Zunächst erfolgt eine Einschätzung, ob der Patient gesundheitlich in der Lage für eine Melphalan-Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation ist. Für diese Einteilung wird weniger das numerische, sondern das biologische Alter herangezogen. Des Weiteren werden Komorbiditäten und Organfunktionen bewertet und mit möglichen Nebenwirkungen abgewogen (Dimopoulos et al., 2021; Merz et al., 2016). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass das Patientenalter von über 65 Jahren kein klar limitierender Faktor hinsichtlich des Erfolges der Stammzelltransplantation darstellt (Shah et al., 2015).

1.5.1.1 Therapieschema mit Hochdosistherapie und autologer Stammzelltransplantation

Die Erstlinientherapie wird in verschiedene Therapieabschnitte unterteilt. Diese sind die Induktion, Hochdosischemotherapie (HDT) mit autologer Stammzelltransplantation (ASCT), Konsolidierungs- und Erhaltungsphase (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2018; Dimopoulos et al., 2021). In Abbildung 1 ist die Behandlungsübersicht zur Erstlinientherapie bei dem Multiplen Myelom dargestellt.

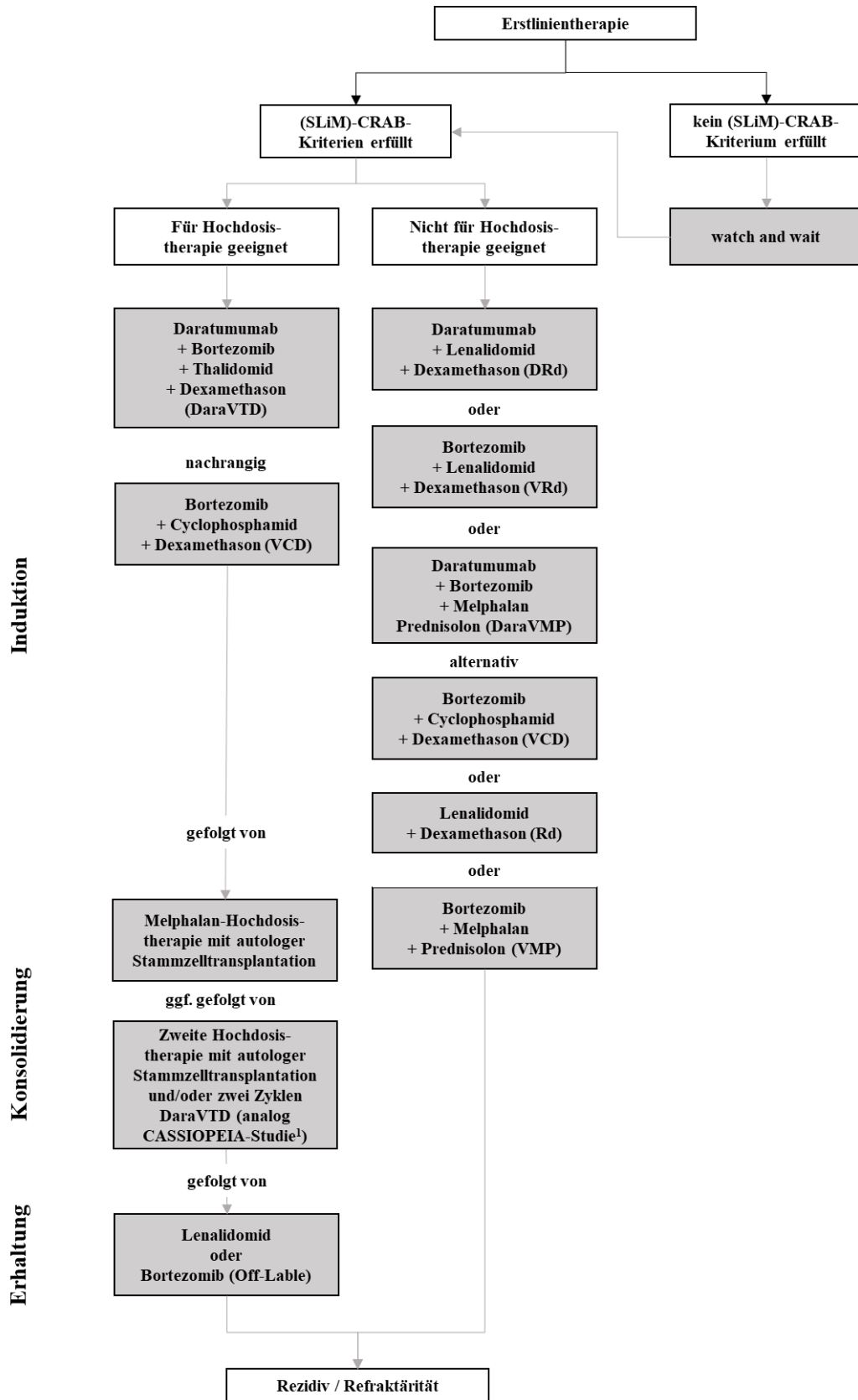


Abbildung 1: Behandlungsübersicht der Erstlinientherapie des Multiplen Myeloms
 Quelle: modifiziert nach (Kortüm, 2021), ¹CASSIOPEIA-Studie (Moreau et al., 2021)

Für die Induktionstherapie gibt es aktuell verschiedene empfohlene Kombinationsschemata (Dimopoulos et al., 2021).

Im Anschluss an die Induktionsphase folgt die Hochdosistherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation. Der Zeitpunkt der Stammzellsammlung wird üblicherweise nach drei Zyklen durchgeführt. (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2018). Die Stammzelltransplantation erhöht die Wahrscheinlichkeit einer kompletten Remission, verlängert die rezidivfreie Überlebenszeit, sowie die Gesamtüberlebenszeit (Kumar et al., 2003).

In der Hochdosistherapie wird als Standard die Gabe von Melphalan angesehen. Hier wird eine Dosis von 200 mg pro Quadratmeter Körperoberfläche angewandt. Bei älteren Patienten kann eine dosisreduzierte Gabe von 140 mg Quadratmeter Körperoberfläche erwogen werden (Dimopoulos et al., 2021; Kyle & Rajkumar, 2004).

Die autologe Stammzelltransplantation kann als Einzel- oder Tandemtransplantation durchgeführt werden. Bei der Tandemtransplantation unterziehen sich die Patienten einer geplanten zweiten Stammzelltransplantation, nachdem sie sich von der ersten Transplantation erholt haben (Kyle & Rajkumar, 2004). In einer großen Metaanalyse von vier europäischen Kooperationsgruppen (Intergrupe Francophone du Myélome - IFM, Gruppo Italiano Malattie EMatologiche dell'Adulto - GIMEMA, spanische Myelom Gruppe - PETHEMA, German-Speaking Myeloma Multicenter Group - GMMG) wurde die Einzel- mit der Tandemstammzelltransplantation verglichen. Hierbei zeigte sich ein positiver Einfluss der Tandemtransplantation auf die Gesamtüberlebenszeit und die progressionsfreie Überlebenszeit bei Patienten mit erhöhtem genetischem Risiko (Mateos & San Miguel, 2017; Shah et al., 2015).

Nach einer Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation kann eine Konsolidierungsphase folgen. Diese kann mit denselben Kombinationsschemata wie in der Induktionsphase durchgeführt werden. Über den Nutzen der Konsolidierungsphase existieren uneinheitliche Daten aus verschiedenen randomisierten Studien (Mateos & San Miguel, 2017; Sonneveld et al.; Stadtmauer et al.).

In der CASSIOPEIA Studie, einer randomisierten Phase III Studie, wird gezeigt, dass eine Erhaltungstherapie mit Daratumumab über zwei Jahre das Risiko für eine

Krankheitsprogression im Vergleich zu einer reinen Beobachtung signifikant reduziert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Kombinationstherapie aus Daratumumab mit Bortezomib, Thalidomid und Dexamethason als Induktions- und Konsolidierungstherapie vor einer autologen Stammzelltransplantation zu einer verbesserten Remission und längerer progressionsfreier Überlebenszeit führt (Moreau et al., 2021).

1.5.1.2 Therapieschema ohne Hochdosistherapie und ohne autologe Stammzelltransplantation

Patienten, welche primär nicht für eine autologe Stammzelltransplantation geeignet sind, können gegebenenfalls nach Ansprechen auf eine Therapie einen transplantationsfähigen Zustand erreichen. Allerdings gibt es ebenso Patienten, bei denen verschiedene Kontraindikationen für eine Stammzelltransplantation vorhanden sind, wie zum Beispiel Komorbiditäten. Wichtig ist vor Beginn der Therapie diese Einteilung zu treffen, da dies verschiedene Behandlungskonzepte bedingt. Kommt eine Stammzelltransplantation nicht in Frage, kann die Induktion auch als Erstlinientherapie mit Melphalan durchgeführt werden (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2018). Dieses wird in Kombination mit bis zu zwei weiteren Arzneimitteln eingesetzt. Eine Alternative stellt die kontinuierliche Therapie aus der Zweifach-Kombination Lenalidomid und Dexamethason dar (Mateos & San Miguel, 2017). Es bestehen mehrere Therapiekombinationen, welche aktuell als Induktionstherapie ohne Hochdosistherapie und autologer Stammzelltransplantation empfohlen werden (Dimopoulos et al., 2021).

1.5.2 Supportive Therapie

Die supportive Therapie beinhaltet die Behandlung myelombedingter Komplikationen, sowie die Behandlung möglicher Nebenwirkungen durch Therapiemaßnahmen. Einen großen Stellenwert nehmen Bisphosphonate ein. Diese reduzieren das Auftreten Skelett-bezogener Ereignisse, wie beispielsweise pathologische Frakturen (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2018). Neben der Reduktion von Knochenschmerzen, Skelett-bezogener Ereignisse und Wirbelkörperfrakturen gibt es Hinweise auf eine verlängerte Gesamtüberlebenszeit durch Zoledronat (Mhaskar et al., 2012). Bisphosphonate haben als seltene

Nebenwirkung die Bisphosphonat-assoziierte-Kiefernekrose. Zur Prävention dieser Nebenwirkung sollte vor der Erstgabe eine zahnärztliche Untersuchung mit eventuell nötigen Sanierungen erfolgen, sowie eine Unterweisung der Patienten zu einer konsequenten Mundhygiene. Im Verlauf der Bisphosphonatgabe sollten regelmäßige zahnärztliche Kontrollen stattfinden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2017)). Ein weiterer großer Bestandteil der supportiven Therapie ist die Schmerzbehandlung. Die medikamentöse analgetische Therapie soll anhand des Stufenschemas der Weltgesundheitsorganisation WHO durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2017)).

1.5.3 Rezidivtherapie

Mit einer Rezidivbehandlung wird begonnen, wenn sich ein klinisches oder ein signifikantes Paraprotein Rezidiv darstellt (Dimopoulos et al., 2011).

Die International Myeloma Working Group hat das klinische Rezidiv definiert. Es sind eine oder mehrere der folgenden direkten Indikationen und/oder eine neu aufgetretene Endorganschädigung, welche auf die proliferative Störung der Plasmazellen zurückzuführen ist, erforderlich (Durie et al., 2006) (Tabelle 9).

Tabelle 9: Definition des klinischen Rezidivs

1)	Entwicklung neuer Weichteilplasmozytome oder neuer Knochenläsionen
2)	Deutliche Vergrößerung bestehender Knochenläsionen und Plasmozytome (definiert als eine Zunahme um 50% und mindestens ein Zentimeter)
3)	Anstieg des Serumkreatinin ≥ 2 mg/dL
4)	Hyperkalzämie $> 411,5$ mg/dL
5)	Abnahme des Hämoglobinwertes um mehr als 2 g/dL oder insgesamt niedriger als 10 g/dL

Das ebenfalls eine Rezidivbehandlung bedingende signifikante Paraproteinrezidiv wird von der International Myeloma Workshop Consensus Panel 1 folgendermaßen definiert (Rajkumar et al., 2011) (Tabelle 10):

Tabelle 10: Definition des signifikanten Paraproteinrezidivs

1)	Verdopplung der M-Proteine in zwei aufeinander folgenden Diagnostiken, die weniger als zwei Monate auseinander liegen
<i>oder</i>	
2)	Erhöhung des absoluten Serum-M-Protein Spiegels um $\geq 1\text{g/dL}$
<i>oder</i>	
3)	Erhöhung des Urin-M-Proteins um $\geq 500\text{mg}$ pro 24 Stunden
<i>oder</i>	
4)	Erhöhung des Spiegels der freien Leichtketten um $\geq 20\text{ mg/dL}$

Die Wahl der Rezidivtherapie wird von vielen Faktoren beeinflusst und ändert sich aufgrund der Verfügbarkeit neuer Substanzen aktuell dynamisch. Wichtig für die Therapieentscheidung sind Tumoreigenschaften wie beispielsweise das zytogenetische Risikoprofil, Patienteneigenschaften wie Komorbiditäten und Knochenmarksreserven, sowie Wirksamkeit und Verträglichkeit der Erstlinientherapie. Die immer breiteren Informationen über die Genetik und Biologie des Multiplen Myeloms führen zu einer Vielzahl von neuen Arzneimitteln, die auch in der Rezidivtherapie angewandt werden (Nijhof et al., 2018). Patienten, die als Erstlinientherapie eine autologe Stammzelltransplantation erhalten haben und daraufhin mehr als zwei Jahre rezidivfrei waren, können von einer zweiten autologen Stammzelltransplantation profitieren.

1.5.4 Arzneimittelklassen

Mittlerweile stehen für die Behandlung des Multiplen Myeloms mehrere Arzneimittelklassen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zur Verfügung (Moreau, 2017; Nijhof et al., 2018). Im Folgenden ist ein Überblick über aktuelle Arzneimittel in der Therapie des Multiples Myelom aufgezeigt:

- **Glukokortikoide:** Dexamethason, Prednison/Prednisolon

Glukokortikoide wirken unter anderem immunsuppressiv. Diese Wirkung bedingt viele relevante Nebenwirkungen (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2018).

- **Alkylantien:** Cyclophosphamid, Melphalan, Bendamustin

Die zytotoxische Wirkung von Alkylantien führt zu kovalenten Bindungen von Alkylgruppen an Desoxyribonukleinsäuren (DNA), dies beeinträchtigt DNA-Prozesse wie beispielsweise die Transkription (Pönisch et al.; Puyo et al., 2014).

- **Immunmodulatoren (IMiDs):** Lenalidomid, Thalidomid, Pomalidomid

IMiDs charakterisieren sich durch eine immunmodulatorische und antiangiogene Wirkung. Außerdem besitzen sie eine direkte Antitumoraktivität, was beispielsweise zu einem Wachstumsstopp der Tumorzellen führt. Eine weitere Wirkung ist die Stimulation der Interleukin-2 Produktion aus T-Zellen (Krönke et al., 2014). Eine detaillierte Erläuterung des Wirkmechanismus von Lenalidomid erfolgt im Abschnitt 1.6.2.

- **Proteasom-Inhibitoren (PIs):** Bortezomib, Carfilzomib, Ixazomib

Durch die Hemmung der Proteasomen kommt es zu einem Zellzyklusstillstand, dies führt zu einem Wachstumsstillstand und Apoptose in den Myelomzellen (Jackson et al., 2005). Ixazomib wird oral appliziert und wird in Kombination mit Lenalidomid und Dexamethason eingesetzt. Hierunter zeigt sich gegenüber der Zweifachkombination mit Lenalidomid und Dexamethason eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens. Eine Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit konnte nicht gezeigt werden (Moreau et al., 2016).

- **Selektive Inhibitoren des Nuklearexports (SINE):** Selinexor

Selinexor hemmt insbesondere das Exportin-1-Protein (XPO-1). XPO-1 ist ein nukleärer Exportproteinfaktor, der im Multiplen Myelom häufig überexprimiert wird (Podar et al., 2020).

- **Histon-Deacetylase-Inhibitor (DACIs):** Panobinostat

DACIs führen zu einer erhöhten Acetylierung von Histonen. Diese regulieren die Genexpression von onkogenen Proteinen und Transkriptionsfaktoren (Nijhof et al., 2018).

- **Monoklonale Antikörper (mAbs):** Daratumumab, Elotuzumab

Die Antikörpertherapie zeichnet sich durch die Option unterschiedlicher Angriffspunkte aus. Diese führt durch Aktivierung oder Hemmung von Zielmolekülen zu einer direkten Induktion der Apoptose oder richtet sich gegen zelluläre Bestandteile, was unter anderem zu einer Hemmung der Produktion von Wachstumsfaktoren und der Angiogenese führt (Nijhof et al., 2018).

- **B-Cell Maturation Antigen (BCMA) - gerichtete Therapien**

BCMA ist ein spezifisches Oberflächenprotein auf den Myelomzellen, das als Zielstruktur verwendet wird. Die Präsenz des Zielantigens auf den Zellen des Multiplen Myeloms ist entscheidend für zielgerichtete Immuntherapien. Es stehen verschiedene Therapieansätze in der BCMA - gerichteten Therapie zur Verfügung (Sanchez et al., 2021; Zhou et al., 2022):

- **Antibody-Drug-Conjugate (ADC):** Belantamab Mafodotin
- **Chimäre-Antigen-Rezeptor-T-Zellen (CAR-T):** Idecabtagene Vicleucel (Ide-cel)
- **Bispezifische Antikörper:** Teclistamab

1.6 Pathogenese

1.6.1 Zytogenetik und pathogenetische Vorgänge im Multiplen Myelom

Das multiple Myelom ist eine genetisch heterogene Neoplasie, welche aus mehreren genomischen Ereignissen resultiert. Diese führen zu einer Tumorentwicklung und Progression der Erkrankung (Manier et al., 2017). Für die Entstehung eines Multiplen Myeloms prädisponierend sind primäre genetische Ereignisse, die bereits im MGUS Stadium nachweisbar sind (Maura et al., 2019). Anhand dieser primären genetischen Ereignisse wird das Multiple Myelom in Subtypen aufgeteilt. Ein Subtyp des Multiplen Myeloms beinhaltet den Erwerb von Hyperdiploidie, welches durch Trisomien der Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21 gekennzeichnet ist. Außerdem weist das hyperdiploide Myelom keine wiederkehrenden Immunglobulin-Gentranslokationen auf (Chesi & Bergsagel, 2013; Manier et al., 2017). Ein zweiter Subtyp stellt das nicht-hyperdiploide Multiple Myelom dar. Dies ist durch den Erwerb von IgH

Translokationen charakterisiert (t(4; 14), t(14; 16), t(14; 20), t(6; 14) und t(11; 14)). Die Verteilung dieser beiden Subtypen entspricht ungefähr einem Verhältnis von jeweils 50% (Manier et al., 2017).

Sekundäre Ereignisse, die zum Fortschreiten der Erkrankung führen, stellen später erworbene genomische Aberrationen dar, wie somatische Mutationen, epigenetische Veränderungen und chromosomale copy number Varianten (CNVs).

Unterschiedliche Sequenzierungsstudien zeigen, dass das Multiple Myelom bereits bei der Diagnose eine heterogene subklonale Struktur und eine Vielzahl an wiederkehrenden mutierten Genen mit pathogenetischer Bedeutung aufweist. Zu diesen gehören *BRAF*, *FAM46C*, *TP53*, *NRAS* und *KRAS* (Bolli et al., 2014). In einer multi-tissue transcriptome-wide association study (TWAS) wurden 108 Gene in 13 unabhängigen Regionen gefunden, welche mit einem Myelomrisiko assoziiert sind (Went et al., 2019). In weiteren genome-wide association studies (GWAS) wurden 23 Regionen entdeckt, welche mit einem Myelomrisiko verbunden sind, allerdings ist über die zugrunde liegenden Gene wenig bekannt (Went et al., 2018).

Die bekannte Zytogenetik und frühe Studien zur Sequenzierung des gesamten Genoms zeigen, dass sich Mutationen in Tumoren mit der Zeit verändern. Zudem konnte gezeigt werden, dass beim Multiplen Myelom eine Vielzahl vom Erkrankungsklonen mit zum Teil divergenter genetischer Ausstattung vorliegen und konkurrieren (Keats et al., 2012).

Diese komplexen dynamischen Veränderungen beschreibt Keats et al. (2012) anhand eines Hochrisiko-t(4;14)-Myelompatienten. Es wurden mehrere Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung, von Diagnosestellung bis zur Entwicklung einer Plasmazell-Leukämie entnommen. Mit Hilfe einer Array-vergleichenden genomischen Hybridisierung (aCGH) wird die relative Häufigkeit jedes Klons gemessen, dies wird durch acht Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung Assays dargestellt. Die begleitenden aCGH-Analysen zeigen wechselnde Dominanzen zwischen den beiden Hauptsubklonen und deren Klonnachkommen. Die Suppression und das Wiederauftreten verschiedener Klone scheinen in einem Zusammenhang mit der Sensitivität und Resistenz gegenüber den Arzneimitteln zu stehen. Eine Erklärung dafür ist unter anderem eine therapeutische Selektion (Keats et al., 2012). Resistenzen

entwickeln sich aus dem Reservoir unterschiedlicher Subklone. Die Subklone sind beispielsweise Zellen, welche die Therapie aufgrund zufälliger oder erworbener Faktoren überleben. Gründe hierfür können genetische Veränderungen sein, welche zu einer primären Resistenz führen, sowie Zellen, die durch die Therapie eine Mutation oder epigenetische Veränderungen entwickeln. Basierend auf dieser Beobachtung wurde ein Modell erstellt, welches die Entwicklung des Multiplen Myeloms als verzweigt evolutionär beschreibt (branching evolutionary pattern) (Pawlyn & Morgan, 2017).

Neue Studienergebnisse zeigen eine Erweiterung dieses Modells auf, welches Progress der Erkrankung und Resistenzentwicklung gegenüber verschiedenen Therapien erklärt. Wie bereits oben beschrieben, wird von einem primären initialen Ereignis ausgegangen, welches die Voraussetzung zur Entwicklung eines Multiplen Myeloms bildet (Manier et al., 2017). Sekundäre Ereignisse wie beispielsweise Punktmutationen, welche in einer Überlegenheit gegenüber anderen Klonen resultieren, führen zu einer selektiven Ausbreitung. Rasche et al. (2017) beschreiben diese weitere Stufe in der Erkrankung als regionale Evolution mit der Folge einer räumlichen Heterogenität der Klone. Sind alle verfügbaren Nischen des Knochenmarks durch überlegene Klone besetzt, wird eine systemische Ausbreitung eingeschränkt. In dieser Phase kommt es daher eher zu einer regional begrenzten Evolution und regionalen Progressereignissen.

Rasche et al stellen die Vermutung auf, dass dieser Selektionsdruck zu einer Selektion von Klonen mit geringer Abhängigkeit vom Knochenmarkmilieu führt, und daher das Wachstum an extramedullärer Stelle ermöglicht wird. Dementsprechend enthalten Tumorzellen in fokalen Läsionen oftmals lokal ‚private‘ genetische Veränderungen, wie beispielsweise auch für den Krankheitsverlauf prognostisch relevante chromosomale Ereignisse. Dieses Modell der gebietlichen Heterogenität stellt eine große Herausforderung für eine gezielten Therapie dar (Rasche et al., 2017).

In weiteren Forschungsarbeiten erfolgte eine gezielte Sequenzierung von Myelompatienten, welche im Lauf der Krankheit Arzneimittelresistenzen aufwiesen. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Sequenzierung von Patienten mit neu diagnostiziertem Multiplem Myelom, zeigte sich eine erhöhte Prävalenz von Mutationen in *RAS* pathway (*KRAS*, *NRAS* und *BRAF*), sowie in *TP53*, *Cereblon*

(*CRBN*) und *CRBN* pathway Genen (*Cullin-4B CUL4B*, *IKZF1* und *IRK4*) (Kortüm, Mai, et al., 2016).

Bei neu diagnostizierten Myelompatienten sind Mutationen in *CRBN* sowie *IKZF1/IKZF3* sehr selten, letztere liegen bei weniger als 1 % der Patienten vor (Zhu et al., 2014). Diese Entdeckung weist darauf hin, dass die Selektion an Mutanten unter dem selektiven Druck einer gezielten Therapie ein Faktor bei der Entwicklung von Arzneimittelresistenzen darstellt (Kortüm, Mai, et al., 2016). Lopez-Girona et al. (2012) zeigten erstmals auf, dass bei der Entwicklung der Teratogenität von Thalidomid *CRBN* als Zielmolekül agiert (Ito et al., 2010; Lopez-Girona et al., 2012). Zhu et al. (2014) zeigten dies erstmalig im Myelompatienten (Zhu et al., 2014). Nach der Behandlung mit Lenalidomid konnte unter anderem eine deutliche Abnahme von *IKZF1* beobachtet werden.

1.6.2 Wirkmechanismus IMiDs (Lenalidomid) und Resistenzbildung

Lenalidomid bindet an *CRBN* und DNA Damage Binding Protein 1 (DDB1), diese bilden zusammen mit Cullin-4B (*CUL4*) und Cullin-Regulator 1 (*ROC1*) die E3-Ubiquitin-Protein-Ligase (*CRBN-CUL4*). Diese Bindung führt zu einer selektiven Ubiquitinierung und Abbau der beiden Transkriptionsfaktoren *IKZF1* und *IKZF3* (Krönke et al., 2014). Der Rückgang dieser beiden Proteine führt zu einer Wachstumsinhibierung der Myelomzellen. Diese Wachstumsinhibierung beruht zu Teilen auf einer Herunterregulierung von den Genen *Interferon Regulatory Factor 4* (*IRF4*) und *MYC*. Ein Knockdown des Gens *CRBN*, sowie die Überexpression von den Genen *IKZF1* und *IKZF3* verringern die Sensitivität der Myelomzellen gegenüber Lenalidomid (Krönke et al., 2017).

Für die anti-Myelom Wirkung der IMiDs stellt *CRBN* eine zentrale Rolle dar. Dieses bildet zusammen mit DDB1, *CUL4B* und *ROC1* die *CRL4-CRBN* E3 Ubiquitin Ligase (Barrio et al., 2019; Krönke et al., 2014) (Abbildung 2). Lenalidomid bindet an Cereblon. Dies bewirkt eine Ubiquitierung und Abbau der Transkriptionsfaktoren *IKZF1* und *IKZF3*. *IKZF1* und *IKZF3* stellen essenzielle Transkriptionsfaktoren im Multiplen Myelom dar. Das Fehlen dieser Transkriptionsfaktoren induziert eine Zytotoxizität in den Myelomzellen (Kortüm, Zhu, et al., 2015; Krönke et al., 2014). Es konnte gezeigt werden, dass eine einzelne Aminosäuresubstitution in *IKZF3* eine

Resistenz gegenüber Lenalidomid induziert und die Lenalidomid induzierte Hemmung des Zellwachstums der Myelomzellen aufhob (Krönke et al., 2014). Mutationen in Genen des gesamten *CRBN* pathway (*CRBN*, *IKZF1*, *CUL4B*, *IRF4*) können zur Entwicklung von Resistenzen gegenüber IMiDs führen (Kortüm, Mai, et al., 2016). Insbesondere Mutationen, die sich auf die Umgebung der Lenalidomid-Bindungsstelle an *IKZF1* auswirken, spielen eine große Rolle in der Resistenzentwicklung (Zhu et al., 2014). Barrio et al. (2019) zeigte eine Zunahme an Mutationen in den Genen *CRBN*, *CUL4B* und *IKZF1* nach der Behandlung mit IMiDs.

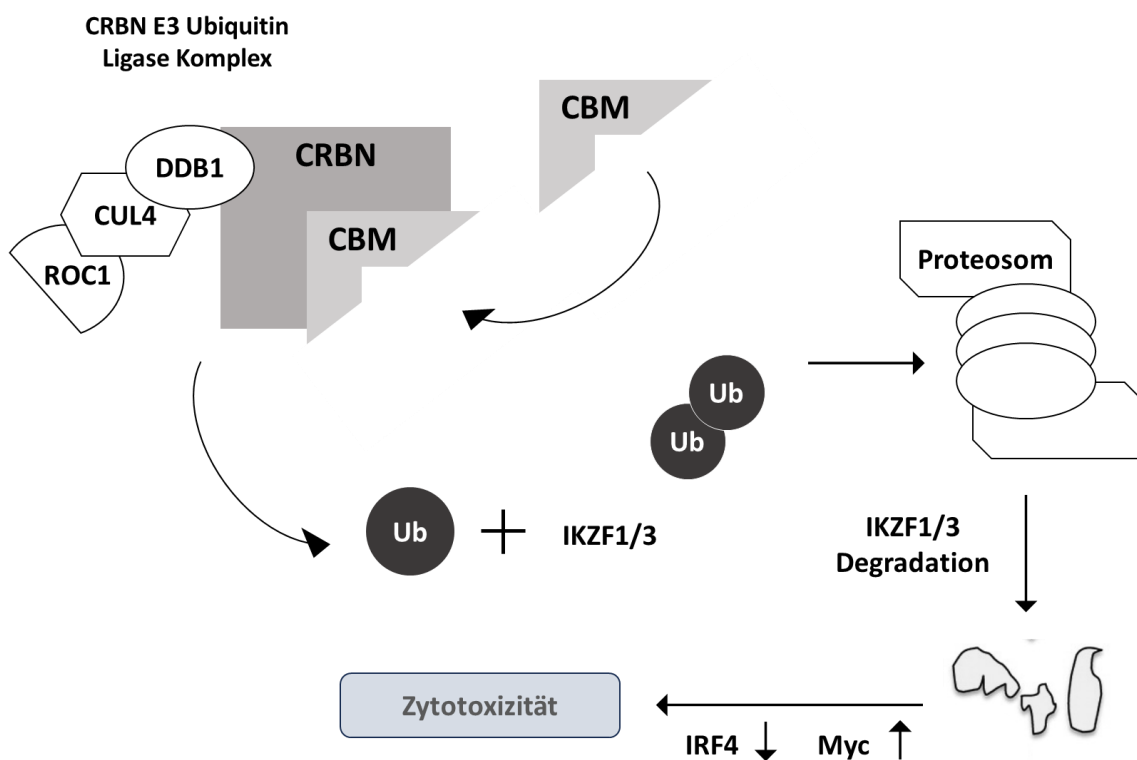


Abbildung 2: CRL4-CRBN E3 Ubiquitin Ligase Komplex

Quelle: modifiziert nach (Kortüm, Zhu, et al., 2015). Die Wirkung von IMiDs (hier beschrieben als CBM) wird von CRBN, welches einen Ligase Komplex mit DDB1, CUL4B und ROC1 bildet, vermittelt. Es kommt zu einer erhöhten Ubiquitinierung und Abbau von *IKZF1/3*. Dies führt zu einer Zytotoxizität in den Myelomzellen.

IKZF1

Mutationen, welche das Zusammenspiel von *IKZF1* und dem CRL4-CRBN E3 Ubiquitin Ligase Komplex beeinflussen, induzieren eine IMiD Resistenz und sind damit klinisch relevant (Kortüm, Mai, et al., 2016). Es konnte gezeigt werden, dass es nach einer Behandlung mit IMiDs unter anderem eine Zunahme an Mutationen in dem Gen *IKZF1* beobachtet werden (Krönke et al., 2014). Besonders die Mutation A152T scheint relevant zu sein. A152T befindet sich in der Umgebung der Lenalidomid-Bindungsstelle (Barrio et al., 2019; Kortüm, Langer, et al., 2015). Zur weiteren Untersuchung der Auswirkungen von *IKZF1* wurde diese Mutation und drei weitere *IKZF1* Mutationen (E170D, Y413C und R439H) in die Myelomzellreihe L363 eingebracht.

Die L363 *IKZF1* Sublinien wurden sechs Tage mit 10 μ M Lenalidomid behandelt. Daraufhin erfolgte die Untersuchung der Überlebensrate. Es wurde sichtbar, dass ausschließlich die Mutation A152T, die die Bindungsstelle von Lenalidomid beeinflusst, einen Vorteil in der Lebensfähigkeit darstellt (Abbildung 3).

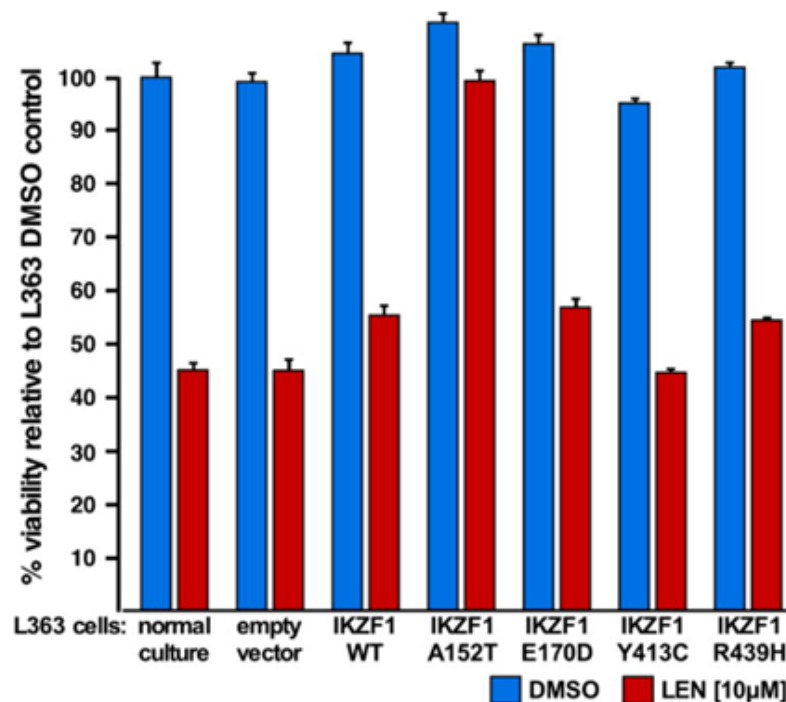


Abbildung 3: Lebensfähigkeit der L363 *IKZF1* Sublinien nach sechstägiger Behandlung mit 10 μ M Lenalidomid

Quelle: (Barrio et al., 2019) (Lizenz zur Verwendung der Abbildung liegt vor)

Des Weiteren wurden mit diesen L363 *IKZF1* Sublinien Western-Blots durchgeführt. Hier wurde sichtbar, dass eine Übernachtbehandlung mit Lenalidomid nur bei der A152T-Sublinie keine Auswirkung auf den *Ikaros* Spiegel hat. Bei der E170D-Sublinie wurde ein geringer inhibitorischer Effekt auf den *IKZF1*-Abbau beobachtet (Abbildung 4).

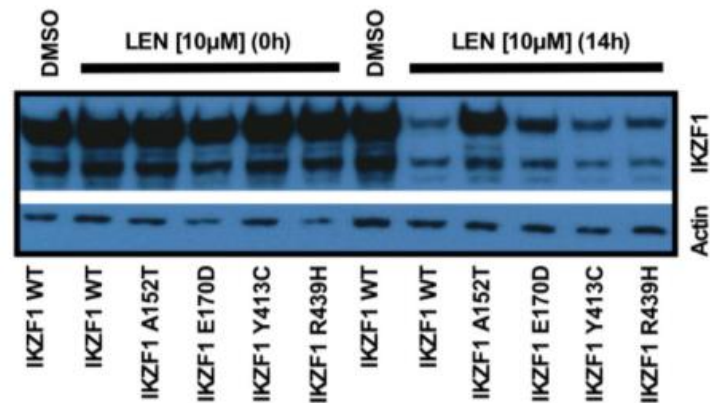


Abbildung 4: Western-Blot, unterschiedliche molekulare Expression von *IKZF1* nach Übernachtbehandlung mit 10 µM Lenalidomid, der L363-*IKZF1* Sublinien

Quelle: (Barrio et al., 2019) (Lizenz zur Verwendung der Abbildung liegt vor)

Dieser geringere inhibitorische Effekt durch die Mutation E170D führte jedoch nicht zu messbaren Veränderungen in der Überlebensrate und der Apoptosetestungen (Barrio et al., 2019). Um die Auswirkungen auf die Wirkung von IMiDs von Mutationen in *IKZF1* näher zu untersuchen, wurden die Mutationen A152T, E170D und R439H für das Zelllinienmodell in dieser Arbeit ausgewählt.

2 Material

Zelllinien

Diehl et al. (1978) etablierten 1975 zwei Langzeitzelllinien *in vitro* aus dem peripheren Blut einer Patientin mit Plasmazell-Leukämie. Eine dieser kultivierten Zelllinien ist die Plasmazell-Leukämie-Zelllinie L363, diese wurde für das clonal competition assay ausgewählt. Die zweite kultivierte Zelllinie ist eine autologe lymphoblastoide Zelllinie LCL, L363 + EBV. Verschiedene Charakterisierungen der Zelllinie L363 sind in der Tabelle 11 aufgelistet (Diehl et al., 1978). Dies ist der Ursprung der heute verwendeten L363-Zelllinien. Die hier wendete L363-Zelllinie stammt aus dem Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. Die Charakteristika dieser Zelllinie werden in Tabelle 12 aufgelistet (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, 2019).

Tabelle 11: Charakteristika der Zelllinien L363

Merkmal	Zelllinie L363
Verdopplungszeit	65-75 Stunden
Maximale Zellkonzentration / ml	$2,5 \times 10^6$

Tabelle 12: Charakteristika der Zelllinie L363

Merkmal	Zelllinie L363
Morphologie	Einzelne, große, runde oder ovale Zellen in Suspension
Medium	85% RPMI 1640 + 15% h.i. FBS
Verdopplungszeit	ca. 25 Stunden
Maximale Zellkonzentration / ml	2×10^6
Subkultur	Aussaat mit ca. $0,5 \times 10^6$ Zellen / ml bei $0,2-0,5 \times 10^6$ Zellen / ml halten

Quelle: (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, 2019)

Primer

Tabelle 13: Primer

Primername	Sequenz (5' zu 3'Richtung)	Primerlänge [bp]
EGFP-AgeI-R	TCGCGACCGGTTTACTTATACAGC TCGTCCATGC	34
EGFP-BsrGI-F	CCATCTGTACAATGGTGAGCAAG GGCGAGGAGCTGT	36
Neo-int	ATTCGCAGCGCATCGCC	18
T3	GCAATTAACCCTCACTAAAGG	21
mKate-validation-R	GTTGTGCCCAGTCATAGC	18
mKate-validation-F	TACGTCGAGCAGCACGA	17
CMV-F	GCAAATGGGCGGTAGGCGT	19
Not-3pr	TGATCTAGAGTCGCGGCCGC	20
M13 Rev	CAGGAAACAGCTATGAC	17
pT2-5	GGCTTTAGAAGCTTCCCAC	19
Nhe-5pr	GAACCGTCAGATCCGCTAGC	20
Kate2-F	CGGTCGCTAGCATGAGCGAGCTG ATTAAGG	30
Kate2-R	GAGTCGCGGCCGCTTTAATTAAG CTTGTGC	30
NheI-BFP-F	GGGCGCTAGCATGGTGTCTAAGG GCGAAGA	30
NotI-BFP-R	AGCTGCGGCCGCTTAATTAAGCTT GTGCCCCAGTT	35
BsrGI-BFP-F	GGGCTGTACAATGGTGTCTAAGG GCGAAGA	30
AgeI-BFP-R	AGCTTCACCGGTTTAATTAAGCTT GTGCCCCAGTT	35

Materialliste

Tabelle 14: Materialliste

Name	Hersteller
Gene Ruler 1kb DNA Ladder 0,5ug/uL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Gel Loading Dye Purple 6X	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts
HDGreen Plus DNA Stain	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
LB-Medium	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
LB-Agar	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
innuPREP Plasmid Mini Kit 2.0	Analytik Jena GmbH, Jena
Puromycin 10 mg/ml	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Heat Inactivated fetal bovine Serum	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Shrimp Alkaline Phosphatase rSAP 1,000 U/ml	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts

mTaq DNA Polymerase 5 U/uL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Quick Ligase	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts
Q5 High GC Enhancer 5X	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts
Quick Ligase Buffer 2X	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts
Q5 Reaction Buffer 5X	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts
FastDigest Buffer 10X	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Deoxynucleotide Solution Mix	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts
DNA Loading Dye 6X	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
DNA, RNA and protein purification	MACHEREY-NAGEL, Düren
Nucleo Spin Gel and PCR Clean up	MACHEREY-NAGEL, Düren
DEPC-Treated Water	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Phosphate Buffered Saline pH 7,4 10X	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Plasmid DNA purification	MACHEREY-NAGEL, Düren

GlutaMAX 100X	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Sodium Pyruvat 100X	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Penicillin 10000 U/mL Streptomycin 10000 ug/mL	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
RPMI Medium 1640 1X	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
TRIS-Base	Bio-Rad Laboratories, München
Ethanol 70%	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Trypan blue solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Ampicillin	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Aqua	B.Braun, Melsungen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Escherichia coli Bakterien	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts
Plasmid pLSSmKate2-N1	Addgene, Watertown, Massachusetts
Plasmid mTagBFP2-pBAD	Addgene, Watertown, Massachusetts

Tabelle 15: TAE Puffer

	Komponenten	Quantität
50X TAE Puffer (pH 8,5)	Tris-Base	2 M
	EDTA	10 mM
	Essigsäure	57,1 ml
	VE-Wasser	auffüllen auf 1 L

Tabelle 16: Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

	Komponenten	Quantität
PBS (pH 7,4)	KCl	0.2 g
	NaCl	8 g
	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,75 g
	KH ₂ PO ₄	0,27 g
	VE-Wasser	auffüllen auf 1 L

Gebrauchsgegenstände

Tabelle 17: Gebrauchsgegenstände

Name	Hersteller
Skalpell	Feather Safety Razor CO, Osaka
Flaschen	Schott AG, Mainz
Kolben	Schott AG, Mainz
PCR Single Cap	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Handschuhe	Hartmann Gruppe, Heidenheim
Pipetten	Eppendorf SE, Hamburg
Filter Tip, refill	STARLAB GmbH, Hamburg

10µl, 200µl und 1000µl	
Parafilm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Flächendesinfektion	Schülke & Mayr GmbH, Nordersted
Cytometry Röhren	Sarstedt SARSTEDT AG & Co.KG, Nümbrecht
Pipettenaufsätze	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Vernichtungsbeutel	A.Hartenstein GmbH, Würzburg
Zählkammer und Deckgläser	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Zellkulturflasche 25cm ² , 75cm ² , 150cm ²	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber Rundkopf	A.Hartenstein GmbH, Würzburg
Elektroporationsküvetten	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Magnetrührstäbchen	A.Hartenstein GmbH, Würzburg

Geräte

Tabelle 18: Geräte

Name	Hersteller
Thermomixer compact	Eppendorf SE, Hamburg
Biofuge pico Heraeus	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

CO2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Veriti 96 Well Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Thermo Mixer C	Eppendorf SE, Hamburg
BD FACS Calibur Flow Cytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey
Mikroskop, Nikon Eclipse TS100	Nikon, Tokio, Japan
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Sterilwerkbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Elektroporations-Setup	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien
Autoklav, Sterimaquet	Getinge AB, Göteborg, Schweden
NanoDrop 2000, Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Gene Pulser XCell	Bio-Rad Laboratories, München

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Klonierung

Ziel der Klonierung ist es einen DNA-Abschnitt in einen Vektor einzubauen und in darauffolgenden Schritten diesen durch Transformation zu vervielfältigen. Damit ein DNA-Abschnitt und ein Vektor durch eine Ligation verbunden werden können, benötigen die jeweiligen Strangenden die gleichen Schnittstellen. Um dies zu erreichen wurden die gewünschten Abschnitte des Backbones und des Inserts mit den gleichen Enzymen ausgeschnitten. Die einzelnen Komponenten und weiteren Arbeitsschritte werden in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Komponenten und Ablauf des Ausschneidens beider Vektorabschnitte

Komponenten	Backbone	Insert
DNA	1 µg	1 µg
Buffer ^{FD} 10X	2 µl	2 µl
H ₂ O	Auffüllen auf 20 µl	Auffüllen auf 20 µl
Enzym1	10 Units	10 Units
Enzym2	10 Units	10 Units
Gesamtvolumen	20 µl	20 µl
Inkubator 37°C 20 min		
Shrimp Phospotase	1 µl	-
Inkubator 37°C 30 min		
Hitzeinkubator 80°C 5-10min		

Um den gewünschten ausgeschnittenen DNA-Abschnitt zu isolieren, wird eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Das benötigte Insert wurde aus einem Plasmid gewonnen. Für die Amplifizierung des gewünschten DNA-Abschnitts wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction - PCR) durchgeführt. Hier wurden durch Restriktionsenzyme Restriktionsstellen angebracht und der DNA-Abschnitt amplifiziert (Tabelle 20). Das dafür verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 21 dargelegt.

Tabelle 20: Komponenten für die PCR zur Anbringung von Restriktionsstellen und Amplifikation

Komponenten	25 µl Reaktion	50 µl Reaktion	Endkonzentration
5X Q5 Reaction Buffer	5 µl	10 µl	1X
10 mM dNTPs	0,5 µl	1 µl	200 µM
10 µM Forward Primer	1,25 µl	2,5 µl	0,5 µM
10 µM Reverse Primer	1,25 µl	2,5 µl	0,5 µM
Template DNA	variable	variable	< 1000 ng
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,5 µl	1,0 µl	1 Unit
Nuklease Free Water	auf 25 µl auffüllen	auf 50 µl auffüllen	

Tabelle 21: PCR-Programm zur Anbringung von Restriktionsstellen

Zyklenanzahl in X	Temperatur in °C	Zeitintervall in min
1	95	1
4	95	0,5
	50	0,5
	72	1
30	95	0,5
	60	0,5
	72	1
1	72	2
	60	0,5
	72	1

Für die Isolierung des gewünschten DNA-Abschnitts wurde mit dem PCR-Endprodukt eine Gelelektrophorese durchgeführt.

3.1.2 Gelelektrophorese

Für die Herstellung des Agarosegels wurde 1 g Agarosepulver mit 100 ml TAE Buffer 1X in einem Erlenmeyerglaskolben vermischt. Dieser wurde in einer Mikrowelle

erhitzt, bis sich das Pulver vollständig aufgelöst hat. Nach einer kurzen Abkühlungszeit wird pro 50 ml 4 µl HD green Plus DNA Stain zugefügt. Dieses hat die Eigenschaft an DNA zu binden und fluoresziert unter Ultraviolettem (UV)-Licht. Das Gemisch wurde in entsprechende Formen gegossen und ein Kamm eingesetzt, der die späteren Ladetaschen bildet. Nachdem das Gel ausgehärtet war, konnte es in die Elektrophoresekammer eingesetzt und beladen werden. Zur späteren Auswertung wurde in die jeweils erste Geltasche jeder Reihe die GeneRuler™ 1 KB DNA Ladder aufgebracht. Diese diente dem Ablesen der Größe in bp der DNA-Abschnitte. Die entsprechenden Proben wurden mit DNA loading dye gemischt und in die übrigen Geltaschen aufgetragen. Aufgrund der unterschiedlichen Basenpaaranzahl bewegen sich die einzelnen Abschnitte bei 75-100 V in der Elektrophoresekammer unterschiedlich schnell im Gel. Da das HD green plus fluoreszierende Eigenschaften besitzt, werden die Stellen mit hoher DNA-Konzentration unter UV-Licht als Banden sichtbar. Die Zeit, in der das Gel dem UV-Licht ausgesetzt wird, sollte so kurz wie möglich gehalten werden, da UV-Licht zu DNA-Schäden führen kann (Mao et al., 2017). Anhand des parallellaufenden Größenstandards kann die gesuchte Bande identifiziert und ausgeschnitten werden.

3.1.3 Ligation

Die Ligation zweier Vektorabschnitte erfolgte gemäß dem Quick Ligation Protocol (M2200) der Firma New England Biolabs. Der gewünschte DNA-Abschnitt wird in ein Plasmid eingefügt, welches die gewünschte Antibiotikaresistenz besitzt. Die rekombinante DNA wurde darauffolgend in *Escherichia coli* (*E.coli*) Bakterien transformiert.

3.1.4 Transformation

Die Transformation diente der Vervielfältigung des gewünschten Plasmids. Für diesen Reaktionsschritt wurden chemisch kompetente *E.coli* Bakterien verwendet. Diese Bakterien besitzen die Fähigkeit fremde DNA aufzunehmen (New England Biolabs). Die Bakterien wurden bei -80 °C gelagert und auf Eis aufgetaut. Unter möglichst keimarmen Bedingungen wurde die rekombinante DNA mit den *E.coli* gemischt. Darauf folgte die Anzucht der Bakterienkolonien auf Agarplatten.

3.1.5 Anzucht von Bakterienkulturen

3.1.5.1 Bakterienkulturen auf Agarplatten

Für die Herstellung von Agarplatten wurde destilliertes Wasser mit LB-Medium Pulver beziehungsweise 1,5 % LB-Agar vermischt. Dieses Gemisch wurde mit dem Standardprogramm für Flüssigkeiten autoklaviert. Nach Abkühlung wurden in der vorgegebenen Konzentration die benötigten Antibiotika zugefügt. Das noch flüssige LB-Agar Gemisch wurde in Einweg-Petrischalen aus Plastik gegossen. Die gegossenen Petrischalen konnten nach Abkühlung einige Wochen im Kühlschrank bei ca. 4 °C aufbewahrt werden.

Nach der Transformation, die in Abschnitt 3.1.4 beschrieben wird, wurden die transformierten *Escherichia coli* Bakterien (*E.coli*) auf Agarplatten ausgestrichen, welche mit dem benötigten Antibiotikum behandelt wurden. Dieser Vorgang diente der Vermehrung einzelner Bakterien zu Kolonien. Für die Selektion der entsprechenden Bakterien, die die gewünschte DNA aufgenommen haben, wird das passende Antibiotikum benötigt. Abhängig von der eingebauten Antibiotikaresistenz wird jeweils dieses Antibiotikum zur Selektion verwendet. *E.coli*, die den gewünschten DNA Abschnitt nicht aufgenommen haben, werden durch das Antibiotikum in den Agarplatten am Wachstum gehindert. Die beladenen *E.coli* wurden unter möglichst keimarmen Bedingungen mit einem Drigalskispatel auf den zuvor angewärmten Agarplatten homogen verteilt und kopfüber bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden einzelne Bakterienkolonien sichtbar.

3.1.5.2 Bakterienkulturen in Flüssigkeiten

Für die Vermehrung der auf Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonien wurden Flüssigkulturen angesetzt. Das verwendete LB-Medium wurde zuvor autoklaviert und mit der entsprechenden Konzentration des passenden Antibiotikums versetzt. Die gewachsene Kolonie wurde mit einem feinen Holzstab aufgenommen und in die benötigte Menge LB-Medium gegeben. Die Flüssigkeitsmenge ist abhängig von der gewünschten Menge an Produkt. Das LB-Medium mit Bakterien wurde in Röhren oder Erlenmeyerkolben mit Schikanen über Nacht in einem Schüttelinkubator inkubiert (37 °C, 250 rpm).

3.1.6 Kolonie-PCR

Zur Kontrolle, ob die Transformation in den gewachsenen Kolonien erfolgreich war, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurden die Kolonien einzeln mit einer Pipettenspitze gepickt und mit den in Tabelle 22 dargestellten PCR-Komponenten gemischt. Die Volumina gelten für jeweils eine gepickte Kolonie. Es wurde jeweils ein Forward und Reverse Primer verwendet, welche spezifisch für den rekombinanten DNA-Abschnitt sind. Die Kolonie-PCRs wurden mit dem in Tabelle 23 dargestellten Kolonie PCR-Programm durchgeführt.

Tabelle 22: Komponenten für Kolonie-PCR zur Kontrolle der Transformation und Ligation

Komponenten	Konzentration
Dream Buffer 10X	2,5 µl
dNTP (Deoxynucleotide)	0,5 µl
Forward Primer 100uM	0,1 µl
Reverse Primer 100uM	0,1 µl
Taq Polymerase 5 U/uL	0,1 µl
Destilliertes H2O	auffüllen auf 25 µl
Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 µl

Tabelle 23: Kolonie-PCR Programm

Zyklenanzahl	Temperatur in °C	Zeitintervall in min
1	94	3
32	94	0,5
	55-57	0,5
	72	1

Mit dem PCR-Produkt wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hier wurde sichtbar, ob der gewünschte Abschnitt der Plasmid DNA, von welchem die Größe bekannt war, in der PCR vervielfältigt werden konnte. Somit konnte auf die Ausgangskolonie rückgeschlossen werden, ob das rekombinante Plasmid eingebaut wurde. Positive Kolonien wurden in Flüssigkultur zur weiteren Verarbeitung vervielfältigt.

3.1.7 DNA-Aufreinigung

3.1.7.1 Isolation der Plasmid DNA durch *E.coli* Mini-Präparation

Nach der Vervielfältigung von Bakterienkolonien in 3 ml Flüssigmedium wurde die DNA mit Hilfe einer Mini-Präparation isoliert. Diese Aufreinigung wurde entsprechend dem Protokoll des Reaktionskits der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Bei dieser Methode ist die Menge an isolierter DNA begrenzt.

3.1.7.2 Isolation der Plasmid DNA durch *E.coli* Midi- und Maxi- Präparation

Um größere Mengen DNA zu isolieren, wurden Bakterienkolonien in 100 ml Flüssigmedium oder mehr vervielfältigt. Zur Isolierung größerer Mengen DNA wurde eine Midi- oder Maxi-Präparation durchgeführt. Die einzelnen Schritte wurden entsprechend der Protokolle der Firma Macherey-Nagel durchgeführt.

3.1.7.3 Isolation der DNA aus Agarosegel

Nach dem in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Ablauf einer Gelelektrophorese wurde die gesuchte DNA-Sequenz anhand ihrer Größe [bp] als Bande unter UV-Licht sichtbar. Diese wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Um die DNA aus dem Agarosegel zu extrahieren, wurde das PCR clean-up, gel extraction Protocol-at-a-glance (Rev. 04) von der Firma Macherey-Nagel befolgt.

3.1.8 DNA-Quantifizierung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration aller Proben wurde mit Hilfe der Nano Drop Software der Firma Thermo Scientific durchgeführt.

3.1.9 Sequenzierung

Zur Erfolgskontrolle der Klonierungen wurden Proben mit passenden Primern sequenziert. Die Sequenzierungen wurden von der Firma LGC Genomics durchgeführt. Ausgewertet wurden die Ergebnisse mit dem Programm SnapGene.

3.2 Methoden in der Zellkultur

3.2.1 Auftauen von Zellen

Zellen der später benötigten L363 *IKZF1* Sublinie wurden in Stickstoff bei -186 °C in Kryokonservierung gelagert. Zum Schutz der Zellen wurden diese mit dem Kälteschutzmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefroren. Das Auftauen sollte zügig durchgeführt werden, da das Gefrierschutzmittel toxisch auf die Zellen wirken kann. Somit sollte dieses schnell aus dem Zellen entfernt werden, jedoch ohne die Zellen zu stark zu erwärmen (Schmitz, 2011). Um dies zu erreichen wurde Nährmedium in einem Wasserbad auf 37 °C aufgewärmt. In die Kryoröhrchen mit den eingefrorenen Zellen wurde eine geringe Menge angewärmtes Nährmedium eingefüllt und die gesamte Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei einer Drehzahl von 1200 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Der Überschuss wurde verworfen und die Zellen entsprechend der Zellzahl in Zellkulturflaschen mit Nährmedium ausgesät.

3.2.2 Kultivierung von Zelllinien

Durch die Kultivierung von Zelllinien können *in vitro* zelluläre Prozesse untersucht werden. Durch die Herstellung ähnlicher Umgebungsbedingungen, welche *in vivo* bestehen, lassen sich anhand der Ergebnisse Rückschlüsse von *in vitro* auf *in vivo* ziehen (Schmitz, 2011). Die verschiedenen Zelllinien wurden in der vorgegebenen optimalen Verdünnung mit Nährmedium in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Da die wachsenden Zellen die Nährstoffe aus dem Medium verbrauchen, muss, um weiteres Wachstum zu gewährleisten, regelmäßig ein Mediumswechsel oder die Zugabe von neuem Medium durchgeführt und die Zellen verdünnt werden (Schmitz, 2011). Je nach Wachstum der Zellen wurde alle zwei bis drei Tage die Zellenanzahl überprüft und entsprechend der optimalen Konzentration Zellen verworfen sowie neues Medium hinzugefügt.

3.2.3 Qualitative und quantitative Zellzählung

3.2.3.1 Kombinierte Zellzählung und Vitaltest mit Trypanblau im Hämocytometer

Durch Anwendung von Trypanblau lassen sich lebende von toten Zellen unterscheiden. Trypanblau wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, da eine intakte Membran

einer lebenden Zelle undurchlässig für dessen Größe ist. Lebende Zellen stellen sich im Mikroskop hell dar. Tote Zellen, die sich anfärben lassen, werden tiefblau sichtbar (Schmitz, 2011).

Für die Zellzahlmessung wurde der Inhalt einer Zellkulturflasche ausreichend gemischt und ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblau-Lösung gemischt. Die Zellzahl der lebenden Zellen wurde unter dem Mikroskop in der Neubauer Zählkammer bestimmt.

3.2.3.2 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting) konnte eine qualitative und quantitative Analyse verschiedener Zellen durchgeführt werden. Hierfür wurde das FACS Calibur Flow Cytometer von BD Biosciences verwendet. Das Prinzip hinter dieser Analyse ist, dass ein Laserstrahl jede einzelne, die Messkapillare durchlaufende Zelle anhand ihrer Eigenschaften detektiert. Das Gerät unterscheidet zwischen lebenden und toten Zellen, sowie deren fluoreszierenden Farben. Diese Analysen werden als Punktwolkendiagramm optisch dargestellt und mit dem Programm FlowJo ausgewertet (BD Biosciences).

Die Proben für eine Durchflusszytometrie-Analyse wurden mit 2 ml PBS gemischt und bei einer Drehzahl von 1200 rpm 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 200 µl PBS gelöst.

3.2.4 Elektroporation

Durch die Elektroporation kann fremde DNA in Zellen eingebaut werden. So werden Zellen generiert, welche die manipulierte Version eines Gens enthalten. Die Zellen wurden einem kurzen elektrischen Impuls ausgesetzt, welcher in der Zellmembran zu temporären Öffnungen führt, durch welche die DNA in die Zellen eindringen kann (Longo et al., 2013). Zur Vorbereitung für diesen Schritt wurden für jede Elektroporation 3 ml pures RPMI im Wasserbad auf 37 °C erwärmt sowie eine Zellkulturschale mit 13 ml RPMI auf 37°C vorgewärmt. Pro Elektroporation wurden ca. 20 Millionen Zellen zentrifugiert und das Zellpellet mit 500 µl purem RPMI gemischt. In die entsprechenden Elektroporations-Küvetten wurden ca. 10000 ng der einzubringenden DNA, 15 µg pTX100 Transposase und 500 µl des Zellgemisches ohne Blasenbildung eingefügt. Elektroporiert wurde mit einem einzelnen exponentiellen Puls

von 280-300 Volt mit dem Gene Pulser XCell. Direkt im Anschluss wurden die elektroporierten Zellen in die vorgewärmten 3 ml pures RPMI gegeben. Nach einigen Minuten wurden die Zellgemische in den vorbereiteten Zellkulturschalen mit RPMI im Brutschrank kultiviert. Nach zwei Tagen konnte der Inhalt der Zellschalen in Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert werden. Das Zellpellet wurde in 10 ml Nährmedium aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe eines Hämocytometer bestimmt (Steinbrunn et al., 2014). In Zellkulturflaschen wurde jeweils eine Zellsuspension angesetzt, sodass eine Konzentration von 300000 Zellen/ml vorlag. Entsprechend dem jeweiligen Volumen wurde Neomycin in einer Konzentration von 1 ng/ml zugefügt. Dies diente der Selektion jener Zellen, die DNA durch die Elektroporation aufgenommen hatten und somit eine Neomycin-Resistenz trugen. Diese Zellen wurden ca. zwei Wochen kultiviert. Hierbei wurde die entsprechende optimale Verdünnung und die benötigte Neomycinkonzentration berücksichtigt. Nachdem die Selektion abgeschlossen war, wurde der gesamte Inhalt der Zellflaschen bei 1200 rpm 10 min zentrifugiert und das Zellpellet in neuem Medium gelöst.

3.2.5 Ansetzen einer Co-Kultur

Ziel der Anlage von Zelllinien-Co-Kulturen ist die Überwachung des Wachstumsverhalten von Zelllinien, die in direkter Konkurrenz miteinander inkubiert werden. Diese Zelllinien-Co-Kulturen wurden unterschiedlichen Konzentrationen von Lenalidomid ausgesetzt. Dieser Spiegel wurde für die Dauer der Inkubation konstant gehalten. Ziel ist die Beobachtungen des Kompetenzverhaltens der unterschiedlichen Mutationen, sowie das Wachstumsverhalten unter Medikamenteneinfluss.

Nach der Elektroporation von L363 *IKZF1* Sublinien mit unterschiedlichen fluoreszierenden Proteinen wurden diese mit Hilfe einer Hämocytometers gezählt. In dem gewünschten Zellverhältnis wurden zwei unterschiedliche Sublinien mit jeweils unterschiedlichen fluoreszierenden Proteinen in einer Zellkulturflasche mit der nötigen Menge an Nährmedium gemischt. Die gewünschte Konzentration von Lenalidomid wurde mit jedem Mediumswechsel erneut sichergestellt.

Zur Kontrolle der Wachstumsveränderungen der Sublinien wurde in regelmäßigen Abständen eine Durchflusszytometrie-Analyse durchgeführt.

3.3 Spezifische Methoden

3.3.1 Grundkomponenten des Zelllinien-Vektorsystems

3.3.1.1 L363 *IKZF1* Sublinien

Für die Herstellung des Zelllinienmodells mit fluoreszierenden Vektoren wurden bereits vorhandene L363 Zelllinien, die jeweils eine der drei *IKZF1*-Mutationen (A152T, E170D und R439H) oder den *IKZF1* Wildtyp (WT) trugen, verwendet. Für deren Herstellung wurden entsprechende Sleeping Beauty Vektoren konstruiert:

- TST-261-pT2-CMV_{puro}-*IKZF1*-WT
- TST-262-pT2-CMV_{puro}-*IKZF1*-A152T
- TST-263-pT2-CMV_{puro}-*IKZF1*-E170D
- TST-265-pT2-CMV_{puro}-*IKZF1*-R439H

Diese Sleeping Beauty Vektoren tragen alle eine Puromycin-Resistenz. Die Vektoren wurden stabil in die Myelomzelllinie L363 eingebracht.

3.3.1.2 pT2-DC

Created with SnapGene®

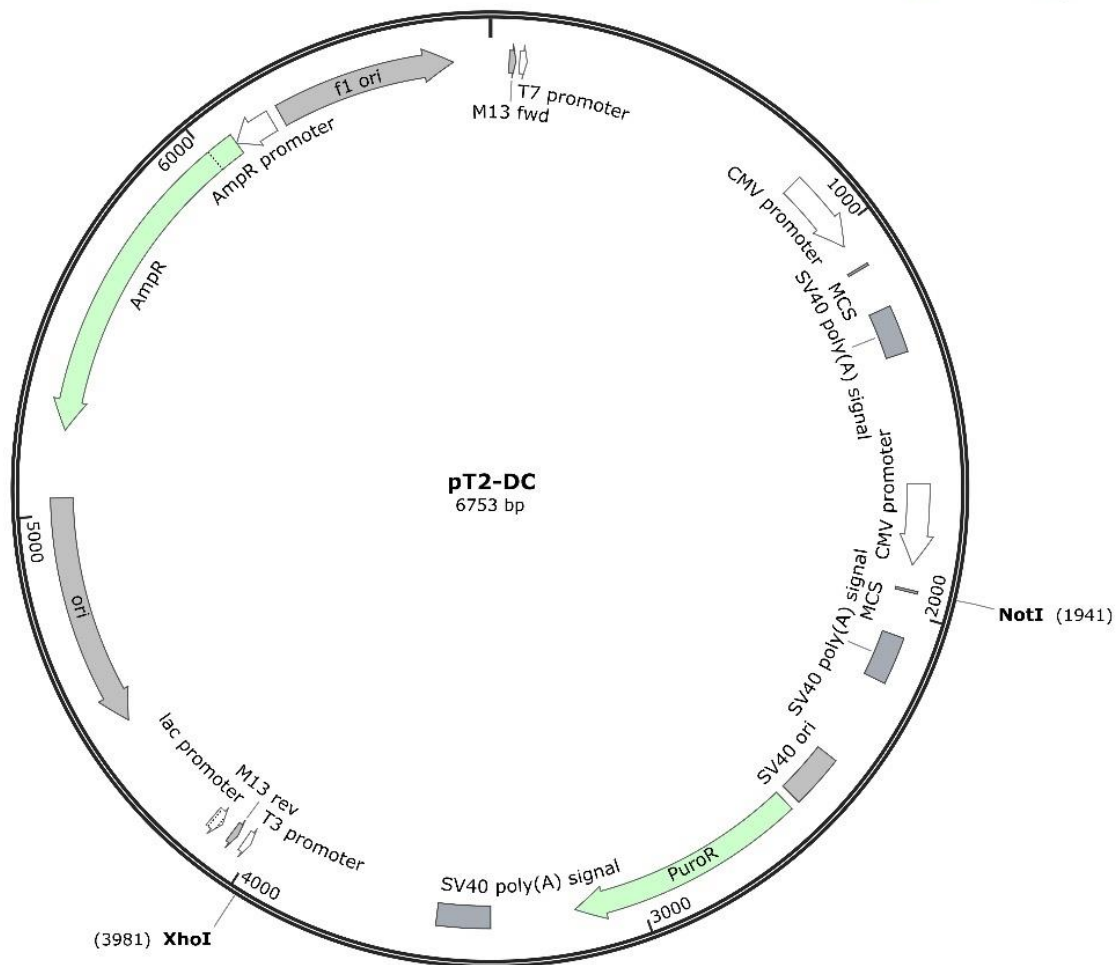


Abbildung 5: Vektor pT2-DC

pT2-DC ist ein Sleeping Beauty Vektor mit einem zwei Kassetten System (Abbildung 5). Die Größe dieses Vektors beträgt 6753 Basenpaare (bp). Dieser Sleeping Beauty Vektor besitzt eine Ampicillin- und Puromycin-Resistenz. Teile dieses Vektors dienen in der späteren Arbeit als Backbone Gerüst.

3.3.1.3 TST-210-pT2SVneo-CMV-EGFP

Created with SnapGene®

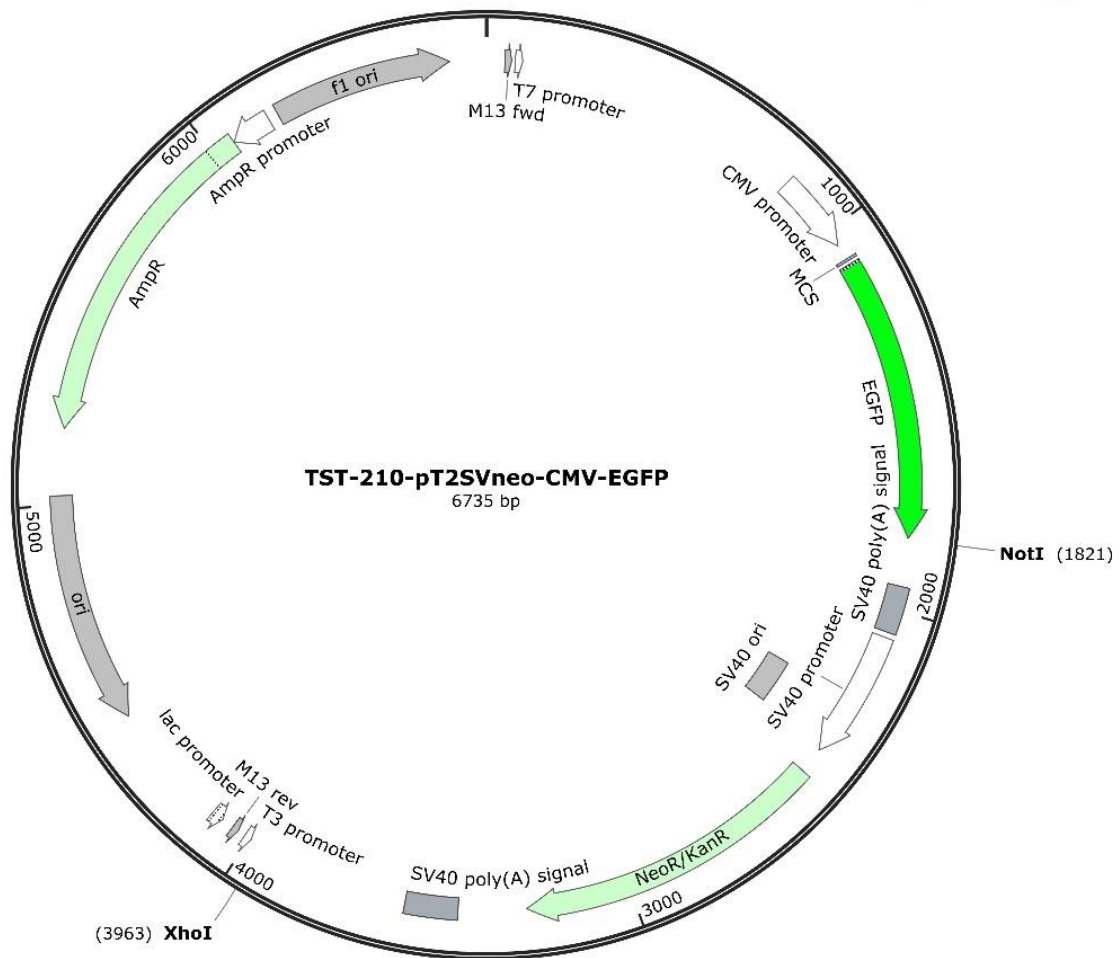


Abbildung 6: Vektor TST-210-pT2SVneo-CMV-EGFP

Der TST-210-pT2SVneo-CMV-EGFP Vektor hat eine Größe von 6735 bp (Abbildung 6). Dieser enthält eine Ampicillin- und Neomycin/Kanamycin-Resistenz sowie die Sequenz für EGFP (enhanced green fluorescent protein). Der Neomycinabschnitt stellt das spätere Insert dar.

3.3.2 Fluoreszierende Proteine

Im folgenden Kapitel werden die drei verwendeten fluoreszierenden Proteine beschrieben.

3.3.2.1 EGFP

EGFP ist eine modifizierte Version eines grün fluoreszierenden Proteins. Dieses fluoreszierende Protein hat ein Anregungsmaximum bei einer Wellenlänge von 488 nm. Dies ist ideal für die Durchflusszytometrie mit dem herkömmlichen 488 nm Laser. Das Emissionsmaximum befindet sich bei 509 nm. Somit kann ein Bandpassfilter von 510/20 nm oder ähnliches (530/30 nm) verwendet werden (Telford et al., 2012). Die relative Helligkeit aller fluoreszierenden Proteine wird im Verhältnis zu EGFP gemessen, welches mit 100 % bewertet wird (Day & Davidson, 2009).

Das 720 bp große Vektorsegment wurde mit Hilfe einer Amplifikations-PCR aus dem Vektor TST-210-pT2SVneo-CMV-EGFP isoliert vervielfältigt. Der Aufbau dieses Vektors ist in Abschnitt 3.3.1.3 beschrieben. Für die PCR wurden die Primer EGFP-BsrGI-F und EGFP-AgeI-R verwendet (Tabelle 13). In Abschnitt 3.1.1 werden die weiteren Komponenten sowie das PCR-Programm dargestellt. Die gesuchte EGFP-Bande mit 720 bp wurde ausgeschnitten. Es folgte wie oben beschrieben eine DNA-Aufreinigung aus dem Gel und eine DNA-Quantifizierung.

3.3.2.2 pLSSmKate2-N1

Created with SnapGene®

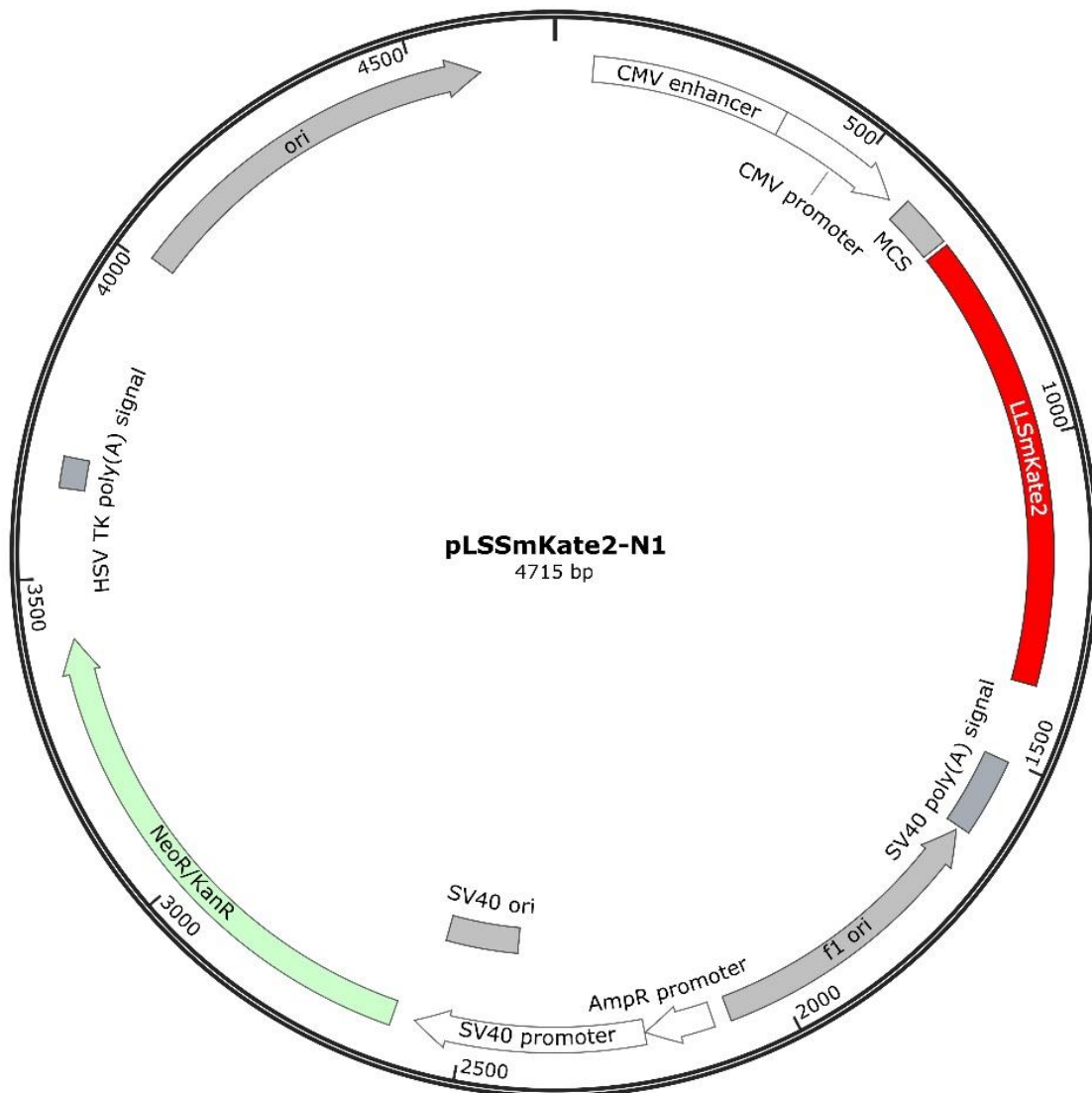


Abbildung 7: Plasmid pLSSmKate2-N1

LSSmKate2 ist ein rotes fluoreszierendes Protein, dessen Sequenz in dem Plasmid pLSSmKate2-N1 enthalten ist. Bei einer Wellenlänge von 460 nm erreicht dieses Protein das Anregungsmaximum. Das Emissionsmaximum befindet sich bei 605 nm. Bei der Laserwellenlänge von 488 nm bei Durchflusszytometrieernäten erreicht LSSmKate2 eine relative Helligkeit von 71 % (Piatkevich & Verkhusha, 2011). LSSmKate2 wurde von der Firma Addgene in einem Plasmid geliefert. Eine Darstellung des Plasmids wird in Abbildung 7 gezeigt. Dieses Plasmid besitzt eine Kanamycin-Resistenz, welche zur späteren Selektion dient. Mit der empfohlenen Konzentration

wurden Kanamycin Agarplatten hergestellt. Es folgt eine Transformation des Plasmids in *E.coli* Bakterien und die Anzucht und Vervielfältigung der Bakterienkulturen. Anzuchtplatten und Flüssignährmedium wurde mit der nötigen Konzentration an Kanamycin angereichert. Es folgte die DNA-Aufreinigung und DNA-Quantifizierung. Der genaue Ablauf dieser Schritte wird in Kapitel 3.1 erläutert.

Danach wurde eine Amplifikations-PCR mit dem Ziel das 700 bp große Segment LSSmKate2 zu vervielfältigen durchgeführt. Hierfür wurden die Primer Kate2-F und Kate2-R verwendet (Tabelle 13). Für diese PCR wurden die Konzentrationen und Komponenten entsprechend der Tabelle 20 verwendet. Das verwendete PCR-Programm wird in Tabelle 21 beschrieben. Es erfolgte wie oben beschrieben eine Gelelektrophorese, das Ausschneiden der gewünschten Bande und die DNA-Aufreinigung, sowie die DNA-Quantifikation.

3.3.2.3 mTagBFP2-pBAD

Created with SnapGene®

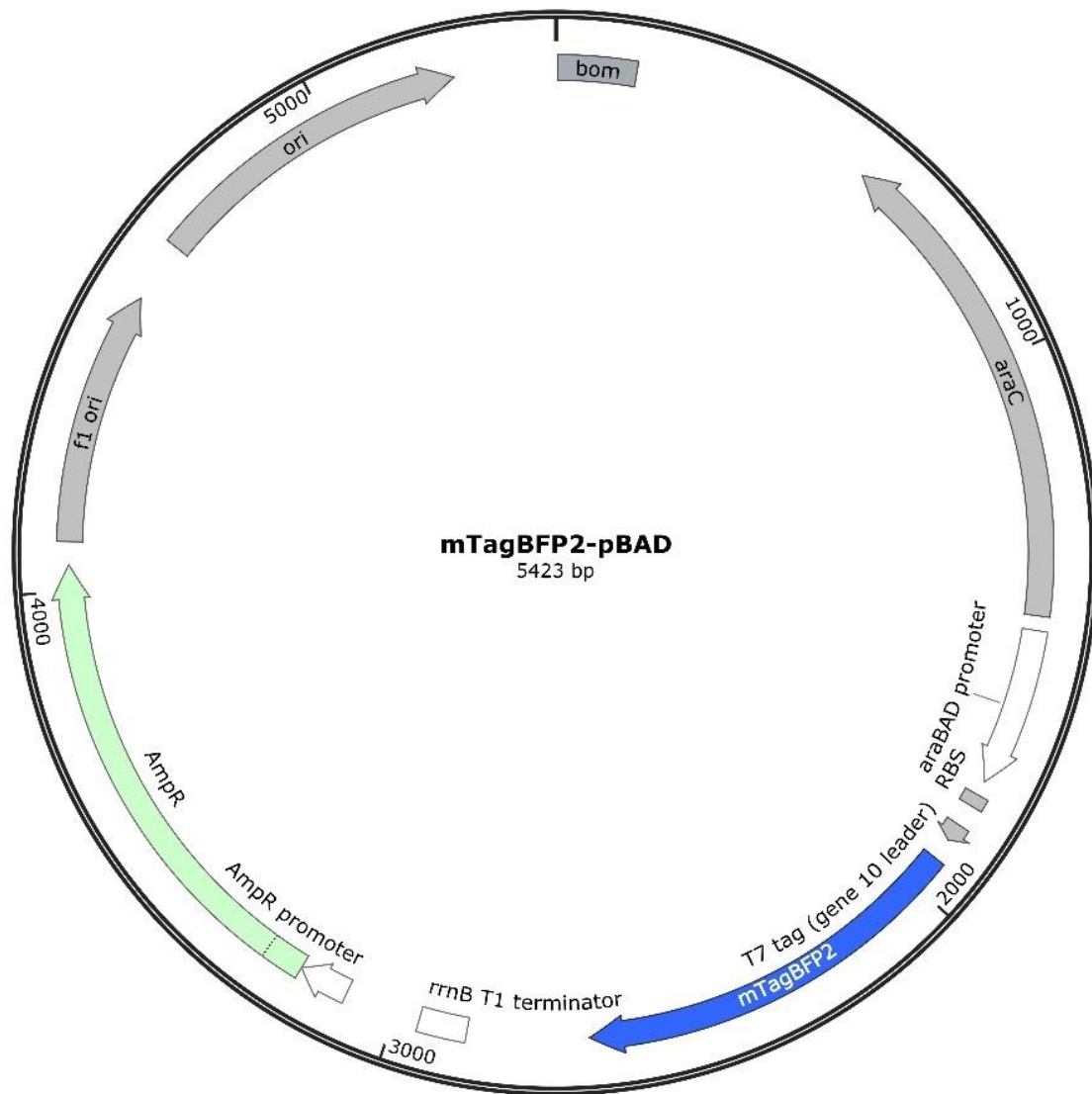


Abbildung 8: Plasmid mTagBFP2-pBAD

mTagBFP2 ist ein blau fluoreszierendes Protein, dessen Sequenz in dem Plasmid mTagBFP2-pBAD enthalten ist. Das Anregungsmaximum wird bei einer Wellenlänge von 400 nm erreicht. Das Emissionsmaximum befindet sich bei 456 nm. Die empfohlene Laserwellenlänge befindet sich bei 355 und 375 nm (Telford et al., 2012). Dieses Plasmid wurde von der Firma Addgene geliefert. Eine Darstellung des Plasmids wird in Abbildung 8 gezeigt. Es weist eine Ampicillin Resistenz auf. Mit der empfohlenen Arbeitskonzentration von 100 µg/ml Ampicillin wurde ebenso wie bei dem Plasmid pLSSmKate2-N1 eine Transformation in *E.coli*, eine Selektion und

Vermehrung sowie die Isolierung der DNA-Plasmide und Quantifizierung durchgeführt. Es folgte eine Amplifikations-PCR, um das 711 bp große Segment mTagBFP2 zu vervielfältigen. Hierfür wurden die Primer NheI-BFP-F und NotI-BFP-R sowie BsrGI-BFP-F und AgeI-BFP-R verwendet (Tabelle 13). Für diese Farbe wurden zwei Primerpaare verwendet, um diesen Vektor mit zwei unterschiedlichen Schnittstellen zu erhalten. Weitere Komponenten sowie das verwendete PCR-Programm werden in Abschnitt 3.1.1 dargestellt. Es folgte wie zuvor beschrieben eine Gelelektrophorese und das Ausschneiden der gewünschten Banden. Diese Banden wurden aufgereinigt und quantifiziert.

3.3.3 Vektorsysteme

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung einer Auswahl an unterschiedlich fluoreszierenden Vektoren, welche in beliebige Zelllinien eingebracht werden können. In der Abbildung 9 ist eine Übersicht der Herstellung dieser Vektoren aufgezeigt.

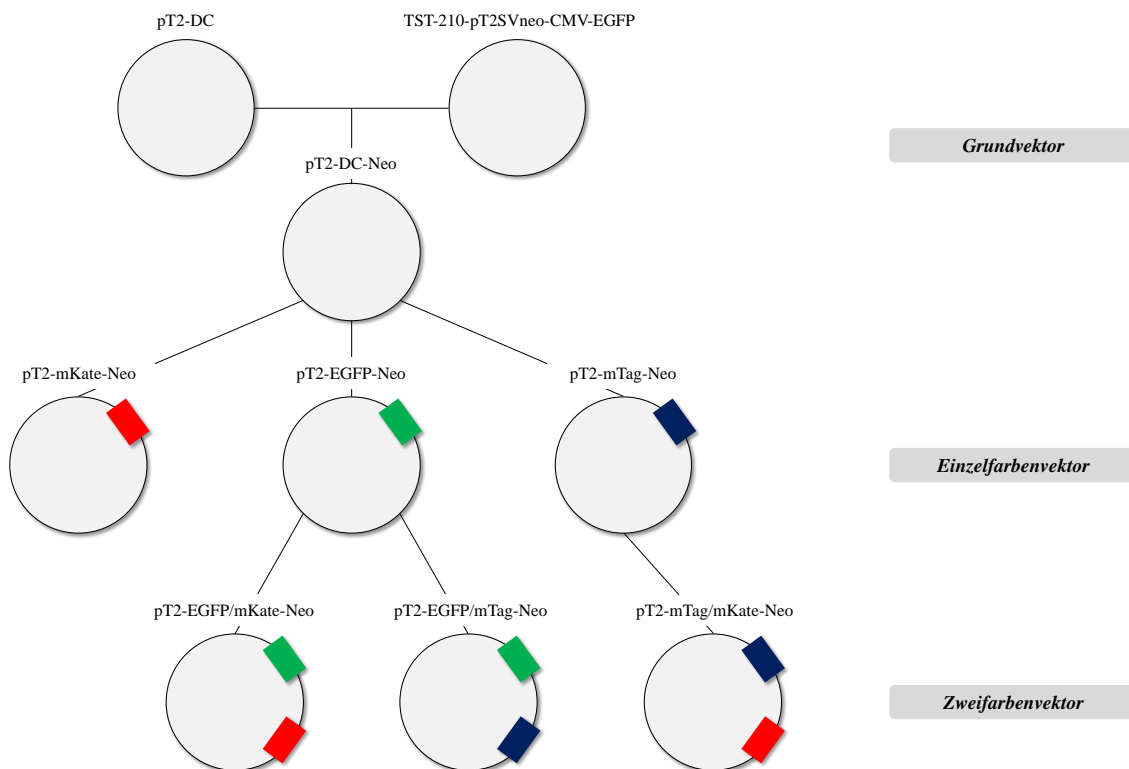


Abbildung 9: Übersicht des Erstellungswegs der fluoreszierenden Farbvektoren

In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Schritte der Herstellung des Vektormodells erläutert.

3.3.3.1 Schritt 1: Herstellung des Grundvektors pT2-DC-Neo

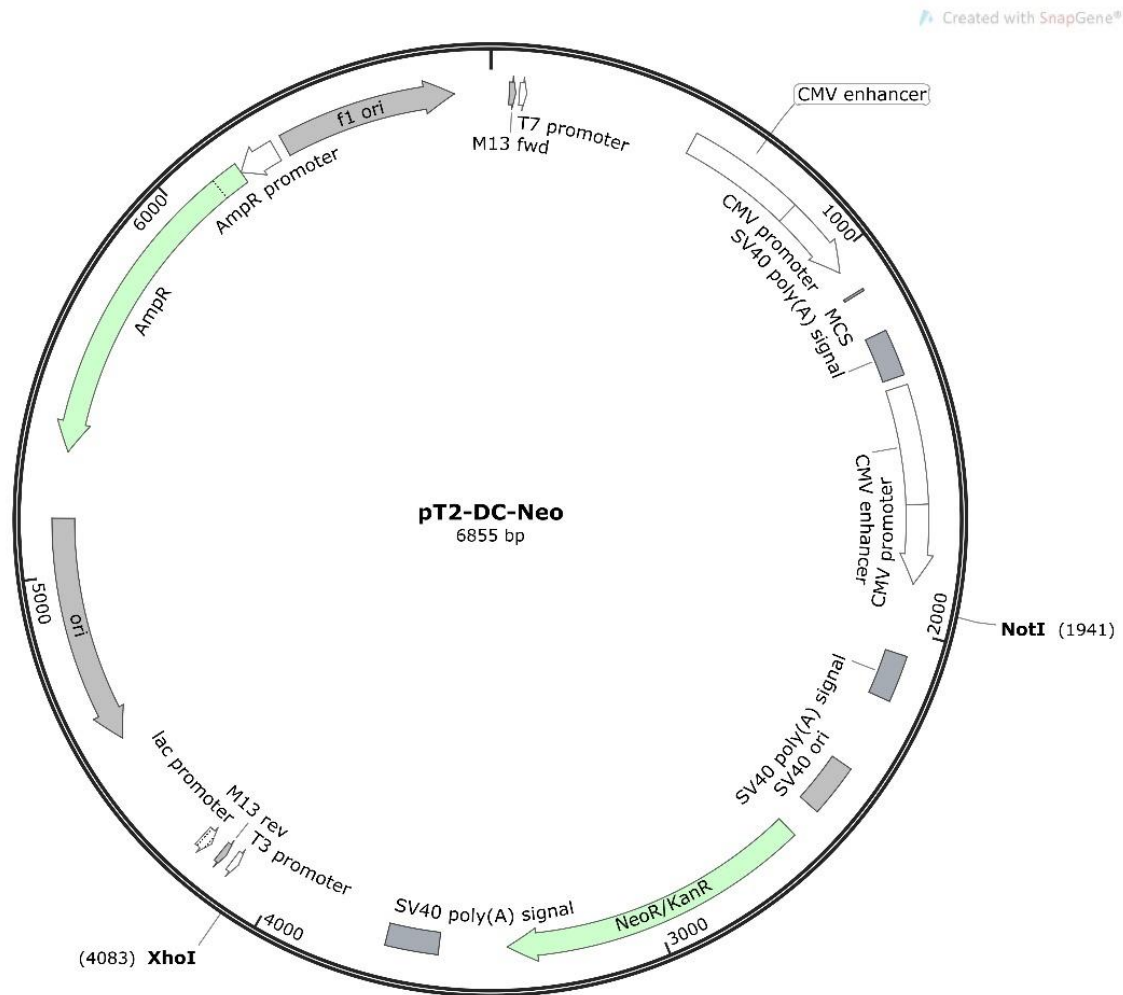


Abbildung 10: Vektor pT2-DC-Neo (Erstellungsjahr 2018)

Als Grundvektor für die Herstellung von Vektoren mit unterschiedlichen fluoreszierenden Eigenschaften wurde ein Sleeping Beauty Vektor mit einem Doppelkassettensystem benötigt. Diese Anforderung erfüllt der Vektor pT2-DC. Jedoch besitzt dieser eine Puromycin-Resistenz. Im weiteren Verlauf werden diese Vektoren in L363 *IKZF1* Sublinien eingebracht. Für die Herstellung der Sublinien wurde wie oben beschrieben ein Sleeping Beauty Vektor benutzt, der ebenfalls eine Puromycin Resistenz aufweist. Daher kann die spätere Selektion der fluoreszierenden Zellen nach Elektroporation nicht mit Puromycin durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde der Vektor pT2-DC-Neo hergestellt (Abbildung 10). Das Backbone besteht aus dem Vektor pT2-DC mit dem Doppelkassettensystem, das Insert mit der benötigten Neomycin-Resistenz stammt aus TST-210-pT2SVneo-CMV-EGFP. Im Folgenden

werden die einzelnen Arbeitsschritte dieser Klonierung erläutert. Dafür wurden zunächst beide Vektorabschnitte mit den Restriktionsenzymen NotI und XhoI geschnitten (Kapitell 3.1.1). In der Gelelektrophorese wurden zwei Banden sichtbar (Anhang 1.1). Die jeweiligen Banden des Backbones aus pT2-DC mit 4713 bp und des Inserts aus TST-210-pT2SVneo-CMV-EGFP mit 2142 bp wurden ausgeschnitten. Es folgte eine Aufreinigung der DNA aus dem Gel und eine DNA-Quantifizierung. Als nächsten Schritt folgte die Ligation beider Vektoren. Das Produkt wurde in *E.coli* transformiert und eine Anzucht der resistenten Bakterienkultur auf mit Ampicillin versetzten Agarplatten durchgeführt. Mit den gewachsenen Kolonien wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt (Tabelle 22, Tabelle 23). Die hierfür verwendeten Primer sind Neo-int und T3 Primer (Tabelle 13). Mit den PCR-Produkten wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt und für Kolonie 9 eine deutliche Bande detektiert (Anhang 1.2). Die Kolonie 9 wurde, wie in Abschnitt 3.1.5.2 beschrieben, mit einer entsprechenden Konzentration von Ampicillin in LB-Medium vermehrt. Nach einer Bebrütung über Nacht folgten die DNA-Aufreinigung und Quantifizierung. Zur Kontrolle, ob diese Klonierung erfolgreich war, wurde eine Probe nach Protokollangaben zur Sequenzierung geschickt. Die verwendeten Primer sind Neo-int und M13Rev (Tabelle 13). Die Sequenzierung zeigte eine korrekte Orientierung des Einsatzes.

3.3.3.2 Schritt 2: Herstellung der Einzelfarben-Vektoren

Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Schritte zur Herstellung der Einzelfarbenvektoren dargelegt (Abbildung 11).

Einzelfarbenvektoren

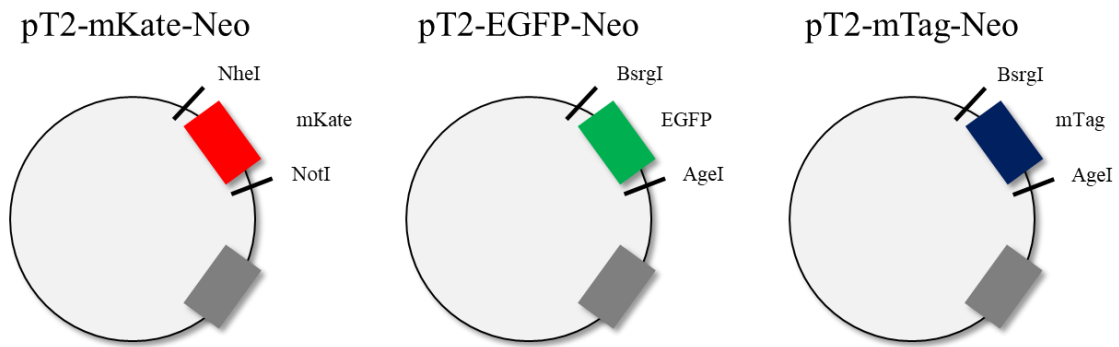


Abbildung 11: Übersicht der Einzelfarbenvektoren

3.3.3.2.1 pT2-mKate-Neo

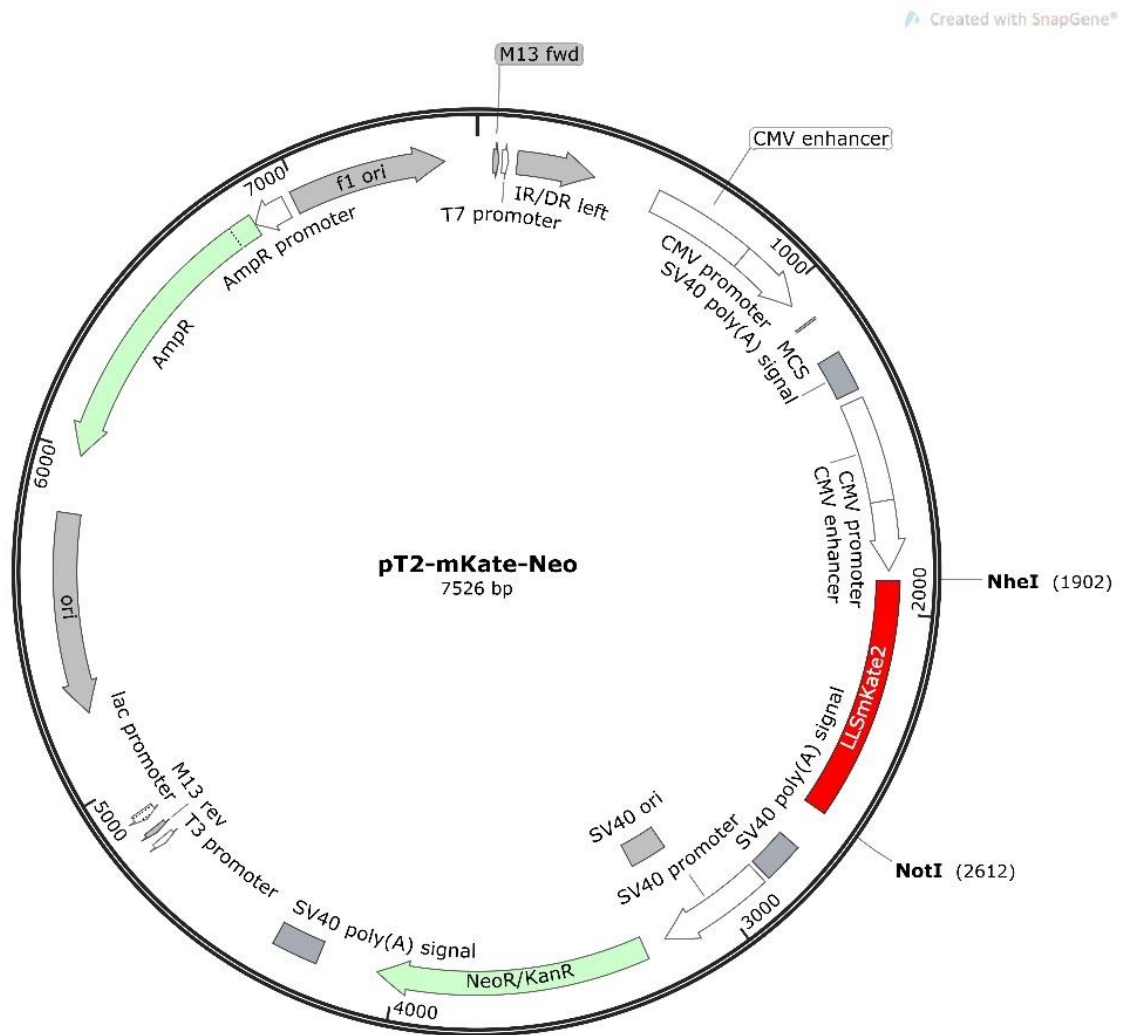


Abbildung 12: Vektor pT2-mKate-Neo (Erstellungsjahr 2018)

Der Vektor pT2-mKate-Neo besteht aus dem oben beschriebenen Grundvektor pT2-DC-Neo und dem ebenso bereits beschriebenen rot fluoreszierenden LSSmKate2 Protein (Abbildung 12).

Die Klonierung erfolgte analog zur Herstellung des Vektors pT2-DC-Neo. Damit das Insert von pLSSmKate2-N1 in das Backbone von pT2-DC-Neo eingebaut werden kann, müssen beide Produkte die gleichen Schnittstellen aufweisen. Mit den Restriktionsenzymen NheI und NotI wurden die beiden Vektoren geschnitten. Dieser Schritt erfolgte zur Herstellung passender Schnittträger. Es folgte die DNA-Aufreinigung und die DNA-Quantifizierung.

Die bei dieser Reaktion angefallenen Ausschnitte sind von der Größe zu vernachlässigen, daher erfolgte die Gelelektrophorese lediglich zur Kontrolle und diente nicht zum Selektieren der einzelnen Banden (Anhang 1.3). Als nächsten Schritt folgte die Ligation des Inserts von pLSSmKate2-N1 in das Backbone von pT2-DC-Neo. Das Produkt der Ligation wurde wie oben beschrieben in *E.coli* transformiert und auf mit Ampicillin behandelten Agarplatten zur Selektion und Anzucht aufgetragen. Mit den gewachsenen Kolonien wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt (Tabelle 22, Tabelle 23). Die Primer für diese PCR sind mKate-Validation-F und mKate-Validation-R (Tabelle 13). Die Gelelektrophorese zeigte für 16 Kolonien eine Bande (Anhang 1.4). Zur Vervielfältigung der Kolonie 16 wurde diese in LB-Medium und entsprechender Konzentration von Ampicillin angezchtet. Im Verlauf folgte eine DNA-Aufreinigung und Quantifikation. Zur Kontrolle wurden wie oben beschrieben eine Sequenzierung durchgeführt. Die hier verwendeten Primer sind Nhe-5pr und Not-3pr (Tabelle 13). In der Sequenzierung zeigte sich eine korrekte Orientierung des Einsatzes.

3.3.3.2.2 pT2-EGFP-Neo

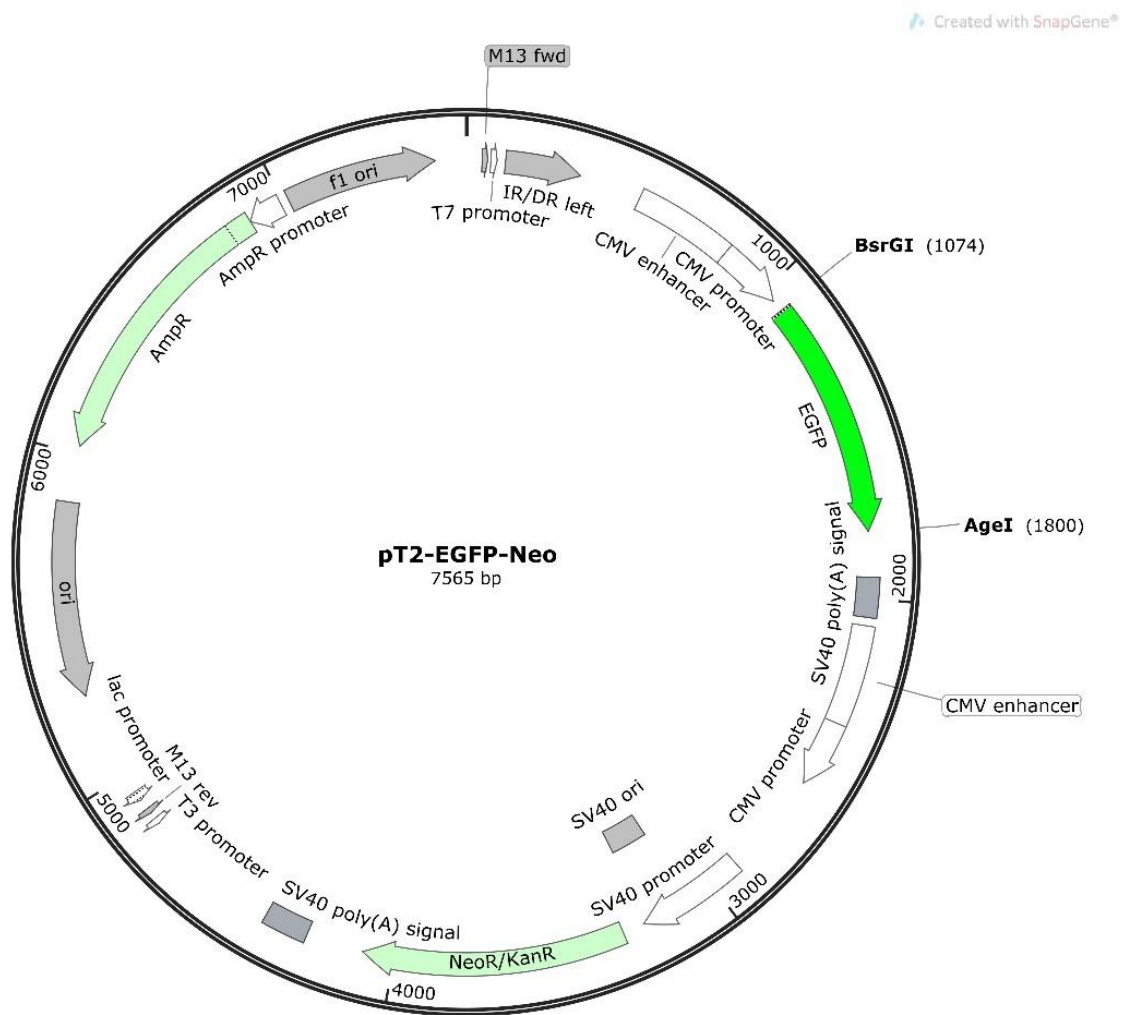


Abbildung 13: Vektor pT2-EGFP-Neo (Erstellungsjahr 2018)

Der Vektor pT2-EGFP-Neo besteht aus dem oben beschriebenen Grundvektor pT2-DC-Neo und dem ebenfalls bereits beschriebenen grün fluoreszierenden EGFP Protein (Abbildung 13).

Die Klonierungsschritte sind analog zu den Herstellungsschritten für den Vektor pT2-mKate-Neo. Im ersten Schritt erfolgte das Schneiden der beiden gewünschten Vektorabschnitte mit den Restriktionsenzymen BsrGI und AgeI. Im Anschluss folgten die DNA-Aufreinigung und eine DNA-Quantifizierung. Da bei dieser Reaktion die angefallenen Ausschnitte von der Größe zu vernachlässigen sind, erfolgte die Gelelektrophorese lediglich zur Kontrolle und diente nicht zum Selektieren der einzelnen Banden (Anhang 1.5). Als nächsten Schritt wurde eine Ligation zwischen

dem Insert EGFP und dem Backbone von pT2-DC-Neo und die Transformation in *E.coli* Bakterien durchgeführt. Die *E.coli* wurden auf eine mit der entsprechenden Menge Ampicillin beimpften Agarplatte ausgestrichen und angezchtet. Mit den gewachsenen Kolonien wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt (Tabelle 22, Tabelle 23). Für diese PCR wurden die Primer CMV-F und Not-3pr verwendet (Tabelle 13). Mit den PCR-Produkten wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, hier zeigte sich eine Bande für eine Kolonie (Anhang 1.6). Die gewachsene positive Kolonie wurde in LB-Medium und entsprechender Konzentration von Ampicillin vervielfältigt. Am darauffolgenden Tag wurde die DNA aufgereinigt und quantifiziert. Mit den Primern Not-3pr und pT2-5 wurde eine Sequenzierung durchgeführt (Tabelle 13). In der Sequenzierung zeigte sich eine korrekte Orientierung des Einsatzes.

3.3.3.2.3 pT2-mTag-Neo

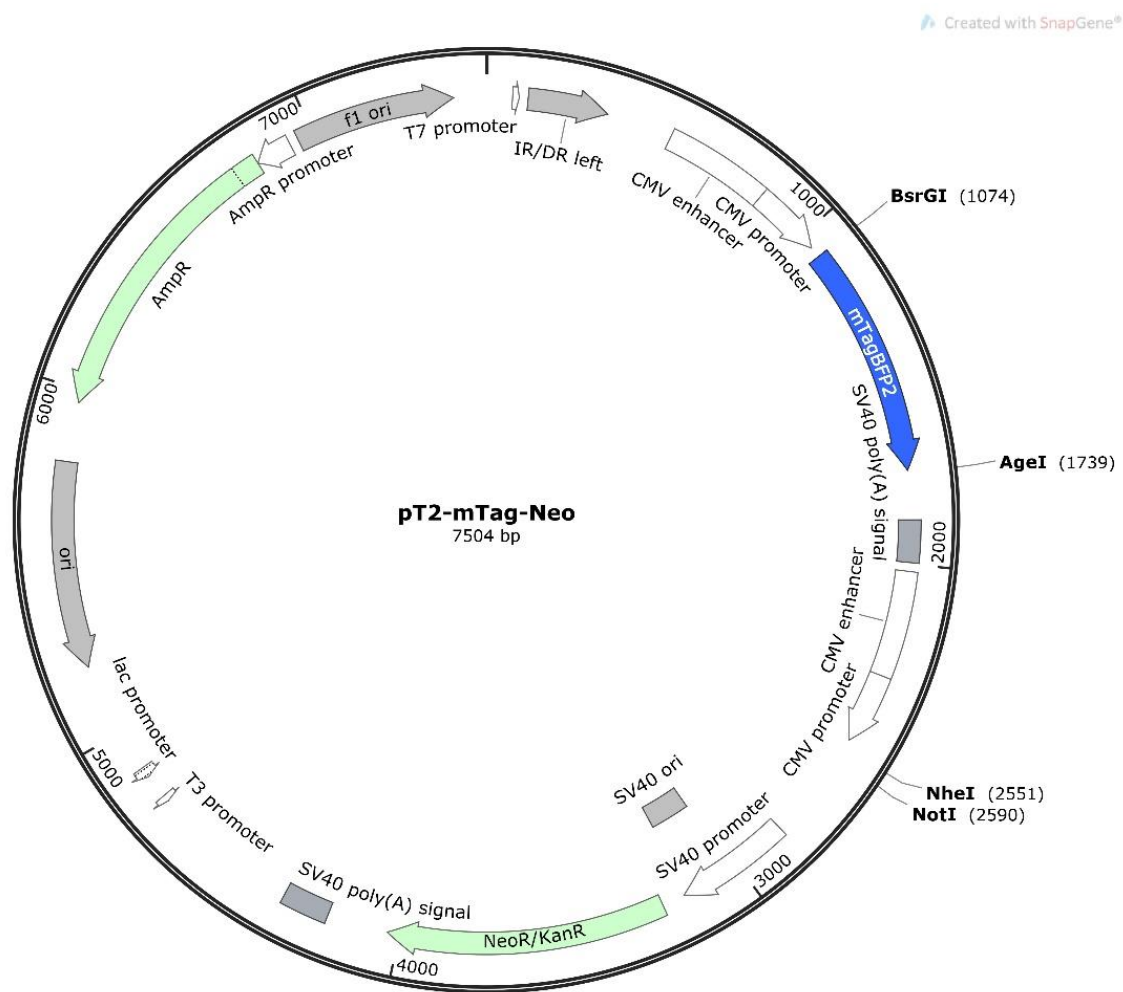


Abbildung 14: Vektor pT2-mTag-Neo (Erstellungsjahr 2018)

Der Vektor pT2-mTag-Neo besteht aus dem Grundvektor pT2-DC-Neo und dem oben beschriebenen blaufluoreszierenden mTagBFP2 Protein (Abbildung 14).

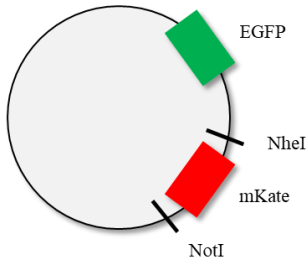
Im Folgenden werden die einzelnen Klonierungsschritte aufgezeigt, welche analog zu den beschriebenen Klonierungen von den Vektoren pT2-mKate-Neo und pT2-EGFP-Neo erfolgt. Für die benötigten Schnittstellen wurden die beiden Vektorabschnitte mit den Restriktionsenzymen BsrGI und AgeI angeschnitten. Zur Herstellung des Vektors pT2-mTag-Neo wurde als Insert das Protein mTagBFP2 verwendet. Als Backbone diente pT2-DC-Neo. In Tabelle 19 werden die einzelnen Komponenten und Arbeitsschritte dargestellt. Als nächsten Schritt folgten die DNA-Aufreinigung und eine DNA-Quantifizierung. Mit den gereinigten Produkten erfolgte eine Elektrophorese (Anhang 1.7). Als nächsten folgte die Ligation von dem Insert mTagBFP2-pBAD in das Backbone pT2-DC-Neo. Das Produkt der Ligation wurde in *E.coli* transformiert und auf mit Ampicillin beimpfte Agarplatten aufgetragen. Mit den gewachsenen Kolonien wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt (Tabelle 22, Tabelle 23). Für dieser PCR wurden die Primer CMV-F und Not-3pr verwendet (Tabelle 13). Die PCR-Produkten durchliefen eine Gelelektrophorese (Anhang 1.8). Die Kolonie mit positivem PCR-Ergebnis wurde für die Amplifikation in LB-Medium und entsprechend Ampicillin inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die DNA aufgereinigt und quantifiziert. Zur Kontrolle der Klonierung wurde eine Probe mit den Primern pT2-5 und Not-3pr sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte eine korrekte Orientierung des Inserts.

3.3.3.3 Schritt 3: Herstellung der Zweifarben-Vektorsysteme

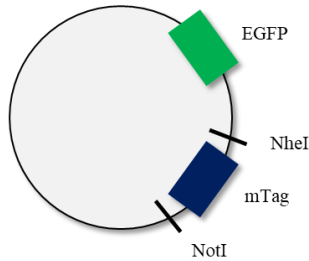
Im Folgenden wird die Herstellung der Zweifarben-Vektorsysteme dargestellt. Diese bestehen jeweils aus einem der oben beschriebenen Einzelfarben-Vektoren und einem weiteren fluoreszierenden Protein, welches in die zweite Kassette eingebracht wurde (Abbildung 15).

Zweifarbenvektoren

pT2-EGFP/mKate-Neo



pT2-EGFP/mTag-Neo



pT2-mTag/mKate-Neo

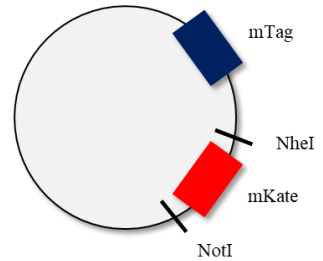


Abbildung 15: Übersicht der Zweifarbenvektoren

3.3.3.3.1 pT2-EGFP/mKate-Neo

Created with SnapGene®

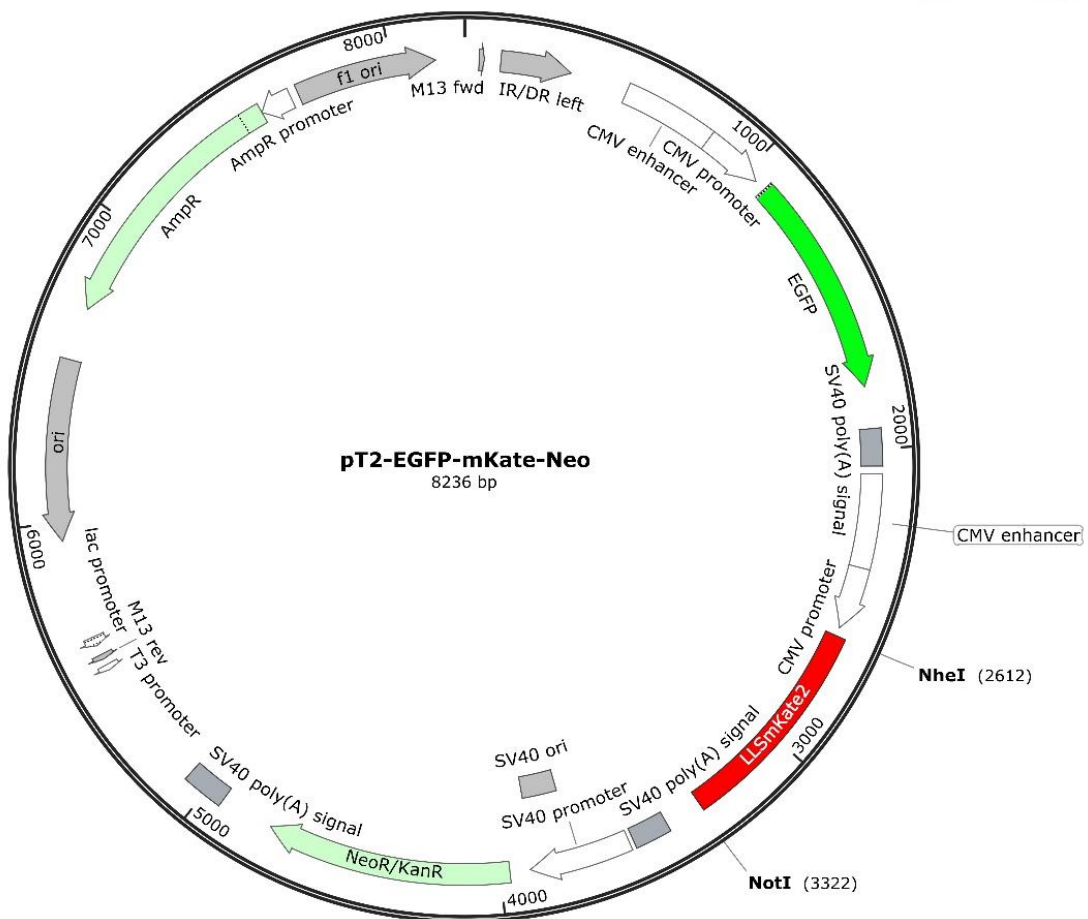


Abbildung 16: Vektor pT2-EGFP-mKate-Neo (Erstellungsjahr 2018)

Dieser Zweifarben-Vektor besteht zum einen aus dem oben beschriebenen Einzelvektor pT2-EGFP-Neo, dieser enthält das grün fluoreszierende EGFP Protein und dient als Backbone. Diesem Vektor wurde in die zweite Kasette des ursprünglichen Sleeping Beauty Gerüsts die zweite Farbe LSSmKate2, ein rot fluoreszierendes Protein als Insert, eingebaut. Somit besitzt dieser Vektor die beiden fluoreszierenden Farben Rot und Grün (Abbildung 16).

Für das Zusammensetzen des Vektors pT2-EGFP-Neo und dem Insert aus pLSSmKate2-N1 benötigen beide Teile die gleichen Schnittstellen. LSSmKate2 wurde aus dem bereits bestehenden Vektor pT2-mKate-Neo ausgeschnitten. Um die Schnittstellen zu erreichen, wurden die Enzyme NheI und NotI verwendet. In der Tabelle 19 werden die einzelnen Komponenten und Arbeitsschritte dieses Prozesses dargestellt. Es folgte wie oben beschrieben eine DNA-Aufreinigung, eine DNA-Quantifizierung und Gelelektrophorese. Der nächste Schritt zur Klonierung des Vektors pT2-EGFP-mKate-Neo stellte die Ligation zwischen dem hier verwendeten Backbone pT2-EGFP-Neo und dem Insert aus pLSSmKate2-N1 dar. Mit diesem Produkt folgte die Transformation und Aufzucht der Bakterienkulturen auf Agarplatten mit entsprechender Konzentration an Ampicillin. Am darauffolgenden Tag wurde eine Kolonie-PCR mit den gewachsenen Kolonien durchgeführt (Tabelle 22, Tabelle 23). Die hier genutzten Primer sind mKate-validation-F und mKate-validation-R (Tabelle 13). Mit diesen Produkten wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Eine positive Kolonie wurde in LB-Medium und der entsprechenden Konzentration an Ampicillin in Flüssigkultur amplifiziert. Am folgenden Tag wurde DNA aufgereinigt und quantifiziert. Zur Kontrolle der Klonierung des Vektors pT2-EGFP-mKate-Neo wurde eine Probe mit den Primern Nhe 5pr und Not 3pr sequenziert. Hier konnte eine positive Orientierung des Inserts gezeigt werden.

3.3.3.3.2 pT2-EGFP-mTag-Neo

Created with SnapGene®

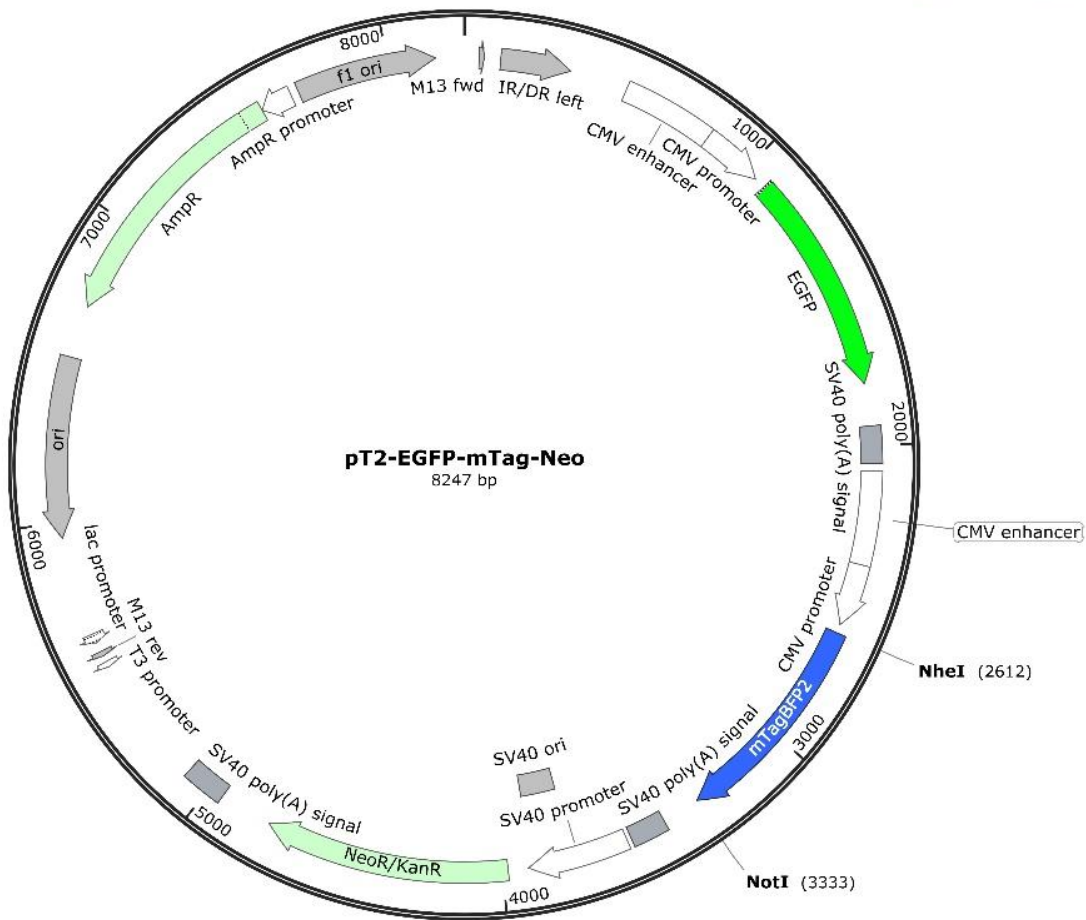


Abbildung 17: pT2-EGFP-mTag-Neo (Erstellungsjahr 2018)

Dieser Zweifarben-Vektor besteht aus dem grün fluoreszierenden Einzelfarben-Vektor pT2-EGFP-Neo und dem blau fluoreszierenden Insert mTagBFP2-pBAD Protein. Letzteres wurde in die zweite Kassette des Sleeping Beauty Vektors pT2-EGFP-Neo eingebaut. Diese zweite Kassette hat die Schnittstellen NheI und NotI. Der hier verwendete Vektor pT2-EGFP-Neo besteht aus dem Grundvektor pT2-DC-Neo und dem grün fluoreszierenden EGFP. Der Zweifarben-Vektor pT2-EGFP-mTag-Neo enthält die beiden fluoreszierenden Farben Grün und Blau (Abbildung 17).

Für den Einbau des mTagBFP2-pBAD in den Vektor pT2-EGFP-Neo benötigen alle Komponenten die gleichen Schnittstellen. Beide Komponenten wurden mit den Enzymen NheI und NotI ausgeschnitten. Die weiteren Komponenten und Arbeitsschritte werden in Tabelle 19 dargestellt. Mit den entstandenen DNA-Produkten wurden eine

Aufreinigung, Quantifizierung und Gelelektrophorese durchgeführt. Nach der durchgeführten Ligation von dem Vektor pT2-EGFP-Neo und mTagBFP2-pBAD wurde das Produkt in *E.coli* transformiert und auf mit Ampicillin behandelten Agarplatten angezchtet. Am folgenden Tag wurde mit den gewachsenen Kulturen eine Kolonie-PCR durchgeführt (Tabelle 22, Tabelle 23). Die verwendeten Primer sind CMV-F und Not-3pr (Tabelle 13). Mit diesen Produkten wurde erneut eine Gelelektrophorese durchgeführt. Eine Kolonie, die einen erfolgreichen Einbau zeigte, wurde in Flüssigkultur mit der entsprechenden Menge Ampicillin amplifiziert. Das DNA-Produkt wurde am folgenden Tag aufgereinigt und quantifiziert. Zur Kontrolle wurde ein Teil der Probe mit den Primern Nhe 5pr und Not 3pr sequenziert. Die Sequenzierung zeigte eine positive Orientierung des Inserts.

3.3.3.3.3 pT2-mTag-mKate-Neo

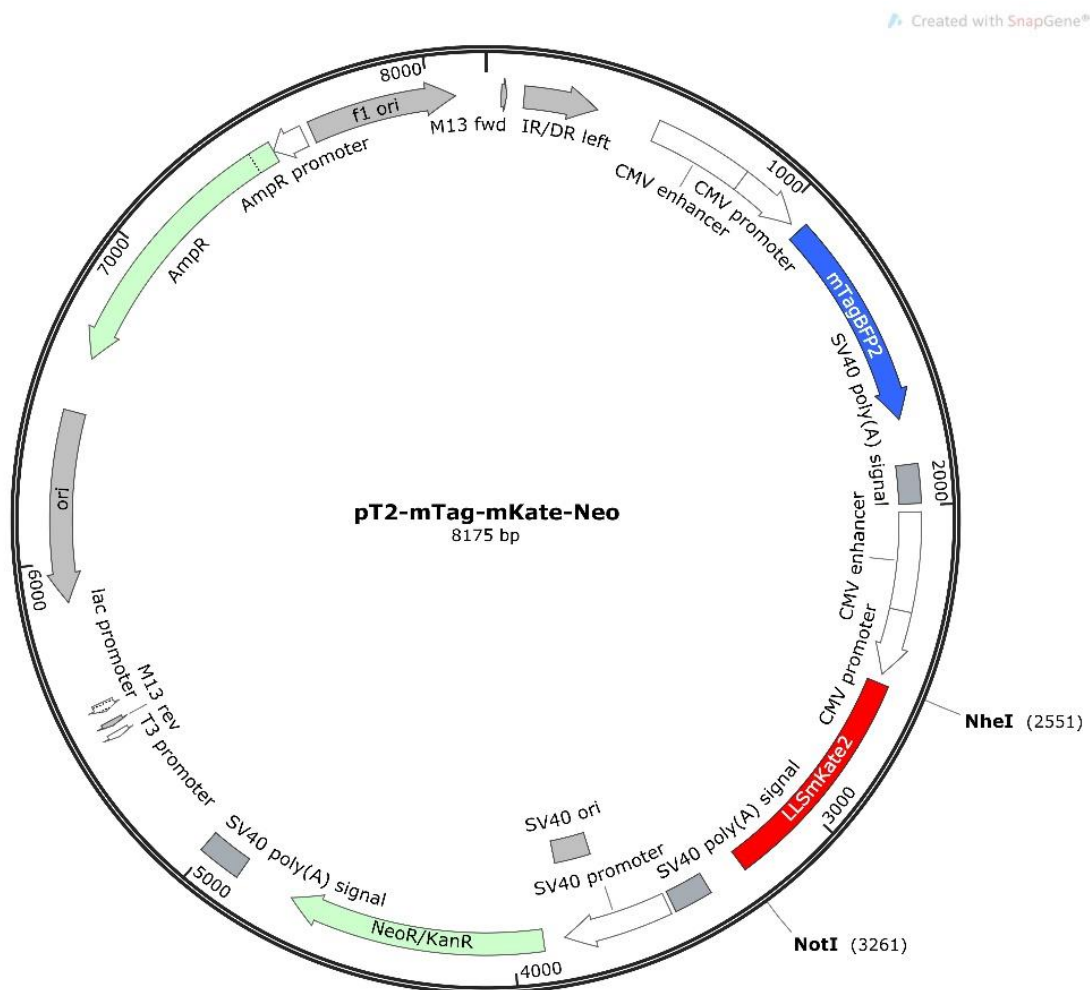


Abbildung 18: Vektor pT2-mTag-mKate-Neo (Erstellungsjahr 2018)

Dieser Zweifarben-Vektor besteht aus dem Einzelfarben-Vektor pT2-mTag-Neo, welcher das Backbone bildet, und dem Insert LSSmKate2. Das rot fluoreszierende Protein wurde in die zweite Kasette des Vektors pT2-mTag-Neo eingebaut. Der Vektor pT2-mTag-Neo besteht aus dem blau fluoreszierenden Protein mTagBFP2-pBAD und dem Grundvektor pT2-DC-Neo. Der resultierende Zweifarben-Vektor pT2-mTag-mKate-Neo enthält somit die beiden fluoreszierenden Farben Blau und Rot (Abbildung 18).

Für das Anschneiden beider Vektoren wurden die Restriktionsenzyme NheI und NotI verwendet. Das Backbone wird von dem Einzelfarbenvektor pT2-mTag-Neo gebildet. Das Insert pLSSmKate2 wurde mit den beiden oben genannten Enzymen aus dem Einzelfarben-Vektor pT2-mKate-Neo geschnitten. Die weiteren Komponenten und Arbeitsschritte werden in Tabelle 19 dargestellt. Mit den Produkten wurden eine Aufreinigung, Quantifizierung und Gelelektrophorese durchgeführt. Nach der Ligation von pT2-mTag-Neo und pLSSmKate2 wurde das Produkt in *E.coli* transformiert und auf mit Ampicillin behandelten Agarplatten angezüchtet. Mit den gewachsenen Kolonien wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt (Tabelle 22, Tabelle 23). Hierfür wurden die Primer mKate-validation-F und mKate-validation-R verwendet (Tabelle 13). Mit diesen Produkten wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Eine Kolonie, die einen erfolgreichen Einbau zeigte, wurde in Flüssigkultur mit der entsprechenden Menge Antibiotika amplifiziert und im Verlauf aufgereinigt und quantifiziert. Zur Kontrolle wurde mit den Primern Nhe 5pr und Not 3pr eine Sequenzierung durchgeführt. Es konnte eine positive Orientierung des Inserts gezeigt werden.

3.3.4 Elektroporation der Sublinien mit Einzelfarben-Vektoren

Die oben beschriebenen L363 *IKZF1* Sublinien, welche eine der drei verschiedenen *IKZF1* Mutationen oder den *IKZF1* WT enthalten, wurden mit den Einzelfarben-Vektoren pT2-mKate-Neo und pT2-EGFP-Neo elektroporiert. Die Sublinie L363 261 enthält den *IKZF1* WT. Diese wurde mit dem Vektor pT2-mKate-Neo und pT2-EGFP-Neo elektroporiert. Die Sublinie L363 262, welche die Mutation *IKZF1* A152T enthält, wurde mit dem Vektor pT2-EGFP-Neo und pT2-mKate-Neo elektroporiert. Die Sublinie L363 263 trägt die Mutation *IKZF1* E170D. Sublinie L363 265 enthält die Mutation R439H. Beide Sublinien wurden jeweils mit dem Vektor pT2-EGFP-Neo

elektroporiert. Der genaue Ablauf der Elektroporation und die darauffolgende Selektion mittels Neomycin wurden bereits in Abschnitt 3.2.4 beschrieben.

3.3.5 Ansetzen der Co-Kulturen mit Lenalidomid

In Zellkulturflaschen wurden jeweils zwei der L363 *IKZF1* Sublinien mit eingebrachtem fluoreszierenden Einzelfarbenvektor in Co-Kultur kultiviert. Insgesamt wurden zum Ansetzen 5.000.000 Zellen als 100 % festgelegt. In den Ansätzen wurde immer 90 % (4.500.000 Zellen) der L363 *IKZF1* WT Sublinie und 10 % (500.000 Zellen) einer *IKZF1* Mutationssublinie gemischt. Dieses Zellgemisch wurde mit ausreichend Nährmedium aufgefüllt. Es wurden Ansatzgruppen mit drei Medikamentenbedingungen angesetzt: 2,5 μ M und 5 μ M Lenalidomid sowie ein Ansatz ohne Medikamentenbehandlung. Den Co-Kulturen wurde jeden zweiten bis dritten Tag neues Nährmedium und entsprechend der Zielkonzentration Lenalidomid zugefügt. Im Folgenden werden die Ansätze dargelegt.

Hauptgruppe 1 mit Lenalidomid – WT rot - Mutation grün

Ansatzgruppe 1: Hauptgruppe 1 mit 2,5 μ M Lenalidomid

In Ansatzgruppe 1 wurde die Sublinie L363 261 (*IKZF1* WT) mit dem rot fluoreszierenden Protein pLSSmKate2 zusammen mit jeweils einer der drei *IKZF1* Mutationen gemischt, welche EGFP exprimieren. Die drei Ansätze aus Ansatzgruppe 1 werden im Folgenden beschrieben und in Abbildung 19 veranschaulicht:

- Ansatz 1.1: 90 % L363 261 (WT) + pT2-mKate-Neo vs. 10 % L363 262 (A152T) + pT2-EGFP-Neo
- Ansatz 1.2: 90 % L363 261 (WT) + pT2-mKate-Neo vs. 10 % L363 263 (E170D) + pT2-EGFP-Neo
- Ansatz 1.3: 90 % L363 261 (WT) + pT2-mKate-Neo vs. 10 % L363 265 (R439H) + pT2-EGFP-Neo

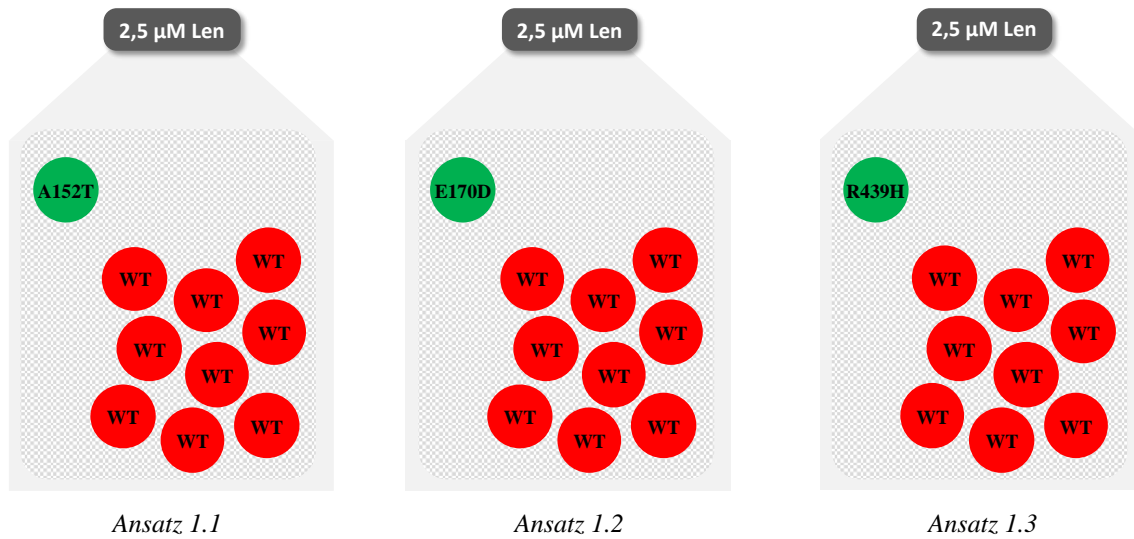


Abbildung 19: Veranschaulichung der drei Ansätze aus Ansatzgruppe 1

Ansatzgruppe 2: Hauptgruppe 1 mit 5µM Lenalidomid

Die drei Ansätze aus Ansatzgruppe 2 werden im Folgenden beschrieben und in Abbildung 20 dargestellt:

- Ansatz 2.1: 90 % L363 261 (WT) + pT2-mKate-Neo vs. 10 % L363 262 + pT2-EGFP-Neo
- Ansatz 2.2: 90 % L363 261 (WT) + pT2-mKate-Neo vs. 10 % L363 263 + pT2-EGFP-Neo
- Ansatz 2.3: 90 % L363 261 (WT) + pT2-mKate-Neo 10 % L363 265 + pT2-EGFP-Neo

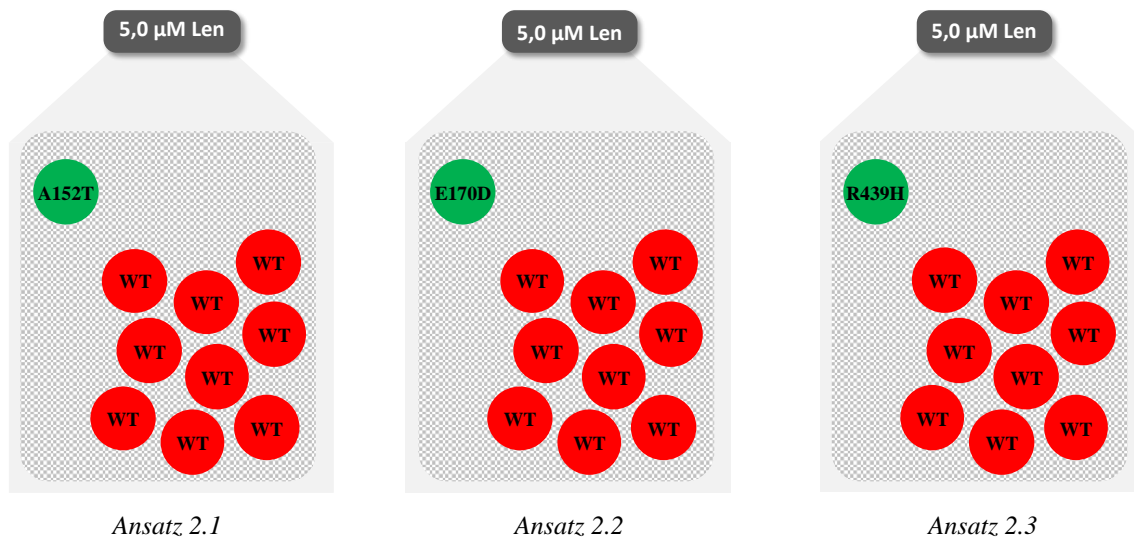


Abbildung 20: Veranschaulichung der drei Ansätze aus Ansatzgruppe 2

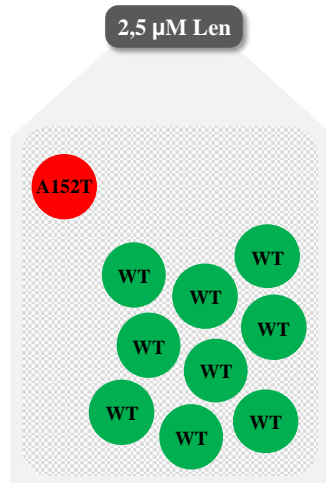
Hauptgruppe 2 mit Lenalidomid - WT grün – Mutation rot

In der zweiten Hauptgruppe wurde die *IKZF1* WT Sublinie mit dem grün fluoreszierenden EGFP ausgewählt und die Sublinie mit der *IKZF1* Mutation A152T mit dem rot fluoreszierenden Protein LSSmKate2. Diese Hauptgruppe diente zur Kontrolle, ob mögliche zu beobachtende Effekte auf Eigenschaften der elektroporierten fluoreszierenden Proteine zurückzuführen sind. Um dies auszuschließen wurde der gleiche Versuchsansatz wie in den Ansätzen 1.1 und 2.1 gewählt, jedoch mit den jeweils entgegengesetzten fluoreszierenden Proteinen. Zum Ausschluss einer Beeinflussung des Wachstums durch die Proteine müsste hier dasselbe Wachstumsverhalten der Mutation A152T zu beobachten sein.

Ansatzgruppe 3: Hauptgruppe 2 mit 2,5 µM Lenalidomid

Der Ansatz aus Ansatzgruppe 3 wird im Folgenden beschrieben und in Abbildung 21 dargestellt:

- Ansatz 3.1: 90 % L363 261 (WT) + pT2-EGFP-Neo vs. 10 % L363 262 (A152T) + pT2-mKate-Neo



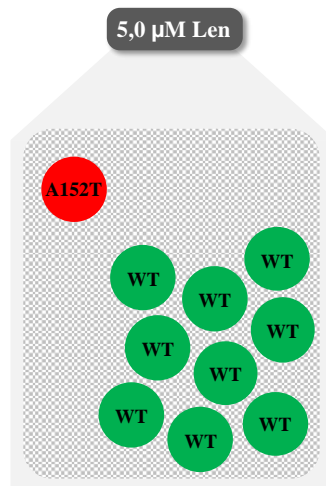
Ansatz 3.1

Abbildung 21: Veranschaulichung des Ansatzes aus Ansatzgruppe 3

Ansatzgruppe 4: Hauptgruppe 2 mit 5 µM Lenalidomid

Der Ansatz aus Ansatzgruppe 4 wird im Folgenden beschrieben:

- Ansatz 4.1: 90 % L363 261 (WT) + pT2-EGFP-Neo vs. 10 % L363 262 (A152T) + pT2-mKate-Neo



Ansatz 4.1

Abbildung 22: Veranschaulichung des Ansatzes aus Ansatzgruppe 4

Hauptgruppe 1 ohne Lenalidomid – Kontrollgruppe – WT rot - Mutation grün

Ansatzgruppe 5: Hauptgruppe 1 mit 0 µM Lenalidomid

In Ansatzgruppe 5 wurde der Aufbau aus Ansatzgruppe 1 übernommen, jedoch wurde kein Lenalidomid zugefügt (Abbildung 23). Ziel dieses Ansatzes war es auszuschließen,

dass mögliche Wachstumsveränderungen auch ohne den Selektionsdruck durch den Medikamenteneinfluss zu beobachten wären.

- Ansatz 5.1: 90 % L363 261 (WT)+ pT2-mKate-Neo vs. 10 % L363 262 (A152T) + pT2-EGFP-Neo
- Ansatz 5.2: 90 % L363 261 (WT)+ pT2-mKate-Neo vs. 10 % L363 263 (E170D) + pT2-EGFP-Neo
- Ansatz 5.3: 90 % L363 261 (WT)+ pT2-mKate-Neo vs. 10 % L363 265 (R439H) + pT2-EGFP-Neo

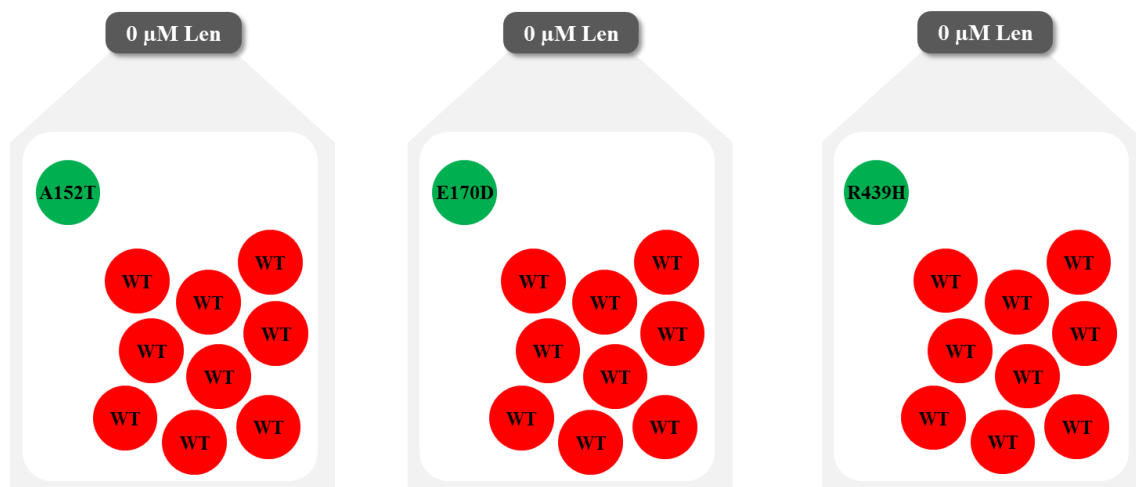


Abbildung 23: Veranschaulichung der drei Ansätze aus Ansatzgruppe 5

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines modularen Zelllinien-Vektormodells zur Visualisierung klonaler Evolutionsmechanismen sowie die Untersuchung der Auswirkungen auf die Wirksamkeit von IMiDs (hier speziell Lenalidomid) durch Mutationen auf bestimmten Genabschnitten in *IKZF1*. In diesem Modell wurden fluoreszierende Proteine unter Anwendung eines Sleeping Beauty basierenden Verfahrens in Vektoren eingebaut. Weiterführend wurden die unterschiedlich kolorierten Vektoren stabil in Zellen von Sublinien der Myelom-Zelllinie L363 eingebracht. Diese Sublinien setzen sich aus dem *IKZF1* WT und den drei oben beschriebenen *IKZF1* Mutationen A152T, E170D und R439H zusammen. Ziel des Zelllinien-Vektormodells war es mögliche Selektionsvorteile in direkter Konkurrenz zueinander zu visualisieren.

Jede Sublinie wurde mit jeweils einem Vektor, der das rot (LSSmKate2) oder grün (EGFP) fluoreszierenden Protein enthielt, stabil elektroporiert. In der Zellkultur wurden jeweils Zellen der Sublinie mit dem *IKZF1* WT mit Zellen, die eine *IKZF1* Mutation trugen, in vorgegebener Konzentration gemischt. Zur Messbarkeit der Anteile dieser unterschiedlichen Zellen trugen diese jeweils das grün- oder rot fluoreszierende Protein. Diese Ansätze wurden einer konstanten Medikamentenkonzentration von 0 μM , 2,5 μM oder 5 μM Lenalidomid ausgesetzt. In regelmäßigen Abständen wurden Durchflusszytometrie-Analysen durchgeführt, um die Wachstumsentwicklungen im Verlauf zu veranschaulichen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Durchflusszytometrie-Analysen der unterschiedlichen Ansätze dargestellt. Aus Übersichtsgründen werden an dieser Stelle lediglich die Durchflusszytometrie-Bilder von ausgewählten Tagen dargestellt. Alle Analysebilder, die zusätzlich erhoben wurden, werden im Anhang zur Verfügung gestellt.

Hauptgruppe 1 mit Lenalidomid – WT rot - Mutation grün

Ansatzgruppe 1: Hauptgruppe 1 mit 2,5 μM Lenalidomid

In den Durchflusszytometrie-Bildern in Abbildung 24 und in der Veranschaulichung des Wachstumsverhaltens in Abbildung 25 werden die Co-Kultur Veränderungen von

Ansatz 1.1 gezeigt. Hier kam es zu einem konstanten Zuwachs der Zellen, die die *IKZF1* Mutation A152T beinhalten. Die Konzentration an Zellen, welche den *IKZF1* WT tragen, nahm stetig ab. An Tag 0 wurde mit einer Konzentration von 90,8% rot fluoreszierender Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT und 7,67% grün fluoreszierender Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation A152T begonnen. Zwischen Tag 9 und Tag 12 lagen beide Sublinien in gleicher Konzentration vor. An Tag 19 zeigten sich umgekehrte Mengenverhältnisse mit 98,1% grün fluoreszierende Zellen mit *IKZF1* Mutation A152T und 9,96% rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT. Nach 50 Tagen sank die Konzentration der rot fluoreszierenden Zellen mit dem *IKZF1* WT auf 1,77%.

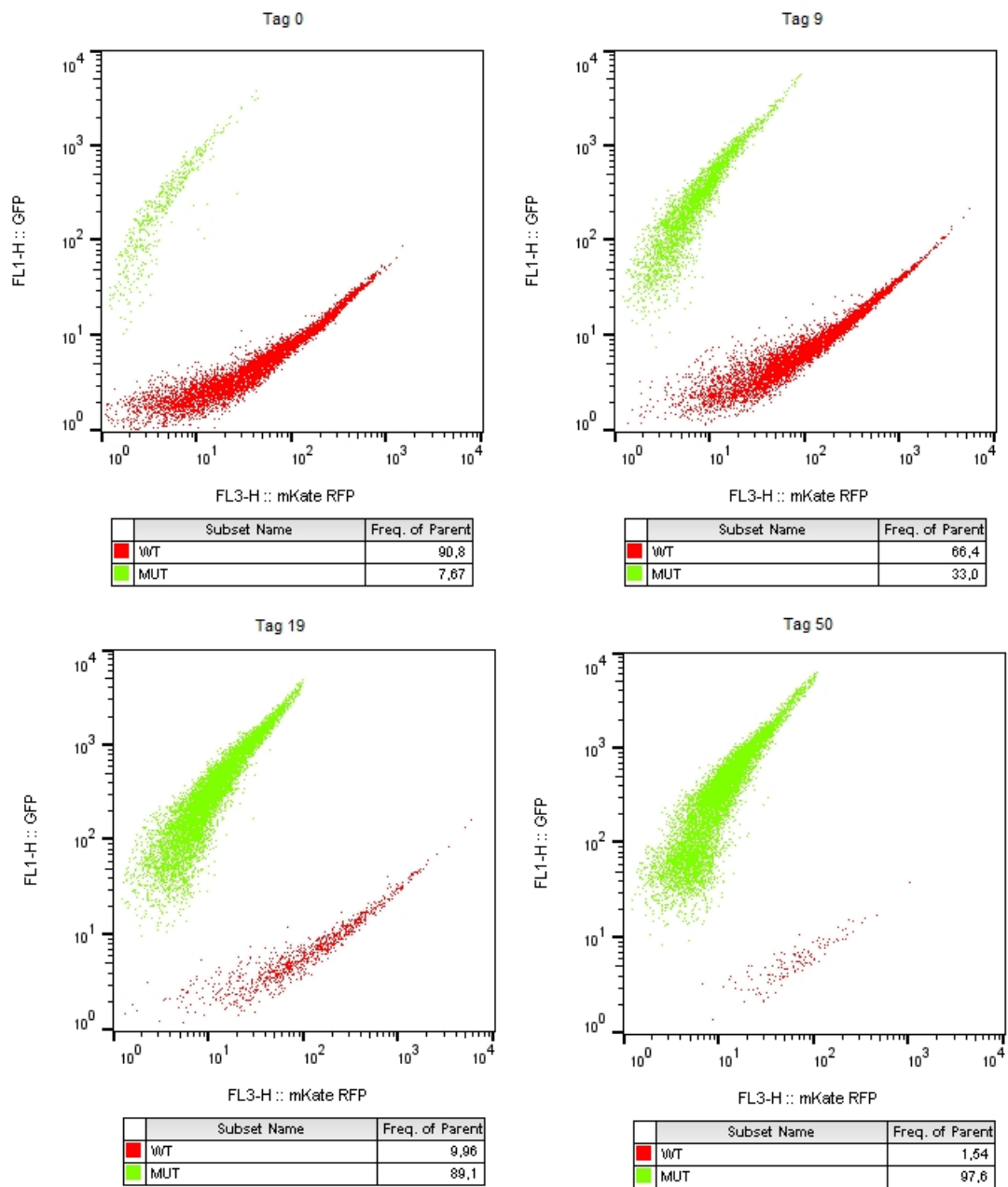


Abbildung 24: Durchflusszytometrie-Auswertung von Ansatz 1.1

Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 und 9 (obere Reihe), Tag 19 und 50 (untere Reihe). Die rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT sind in der Abbildung rot dargestellt. Grün fluoreszierende Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation A152T werden in der Abbildung grün dargestellt.

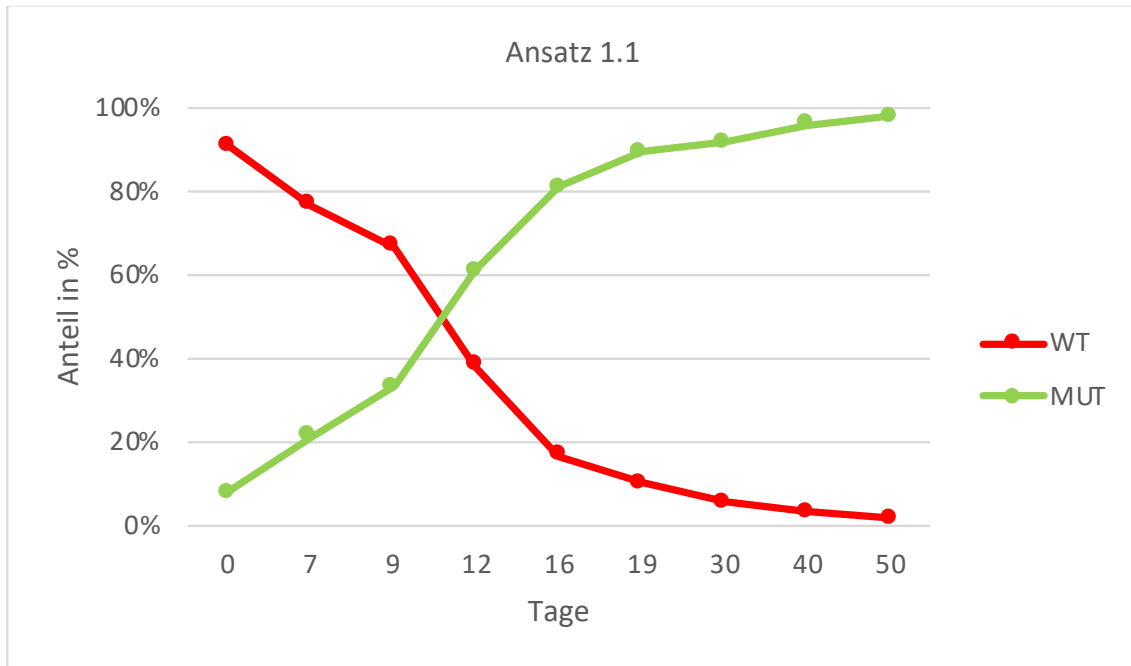


Abbildung 25: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 1.1

In der roten Diagrammlinie wird das Wachstumsverhalten der rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT zwischen Tag 0 und 50 dargestellt. Die grüne Diagrammlinie zeigt das Wachstumsverhalten der grün fluoreszierenden Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation A152T im Laufe von 50 Tagen in Inkubation.

Während der Zeit des kompetitiven Wachstums der beiden Sublinien in Ansatz 1.2 konnte keine signifikante Veränderung in der Mengenverteilung zwischen Zellen mit dem *IKZF1* WT und der *IKZF1* Mutation E170D beobachtet werden. Dieses Wachstumsverhalten wird in den Durchflusszytometrie-Analysen in Abbildung 26 und in Abbildung 27 als Wachstumskurven gezeigt. Die Verteilung beider Zelllinien blieb bis auf kleine Schwankungen konstant zur Ausgangskonzentration. An Tag 0 wurde die Inkubation mit 90,6 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT und 8,24 % grün fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* Mutation E170D begonnen. Nach 50 Tagen Inkubation mit 2,5 μ M Lenalidomid zeigte sich ein konstantes Mengenverhältnis mit 92,6 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT und 7,5 % grün fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* Mutation E170D. Im Zeitverlauf wurde eine Schwankung an Tag 19 mit 83,4 % Zellen mit *IKZF1* WT und 16,2 % Zellen mit *IKZF1* Mutation E170D gezeigt.

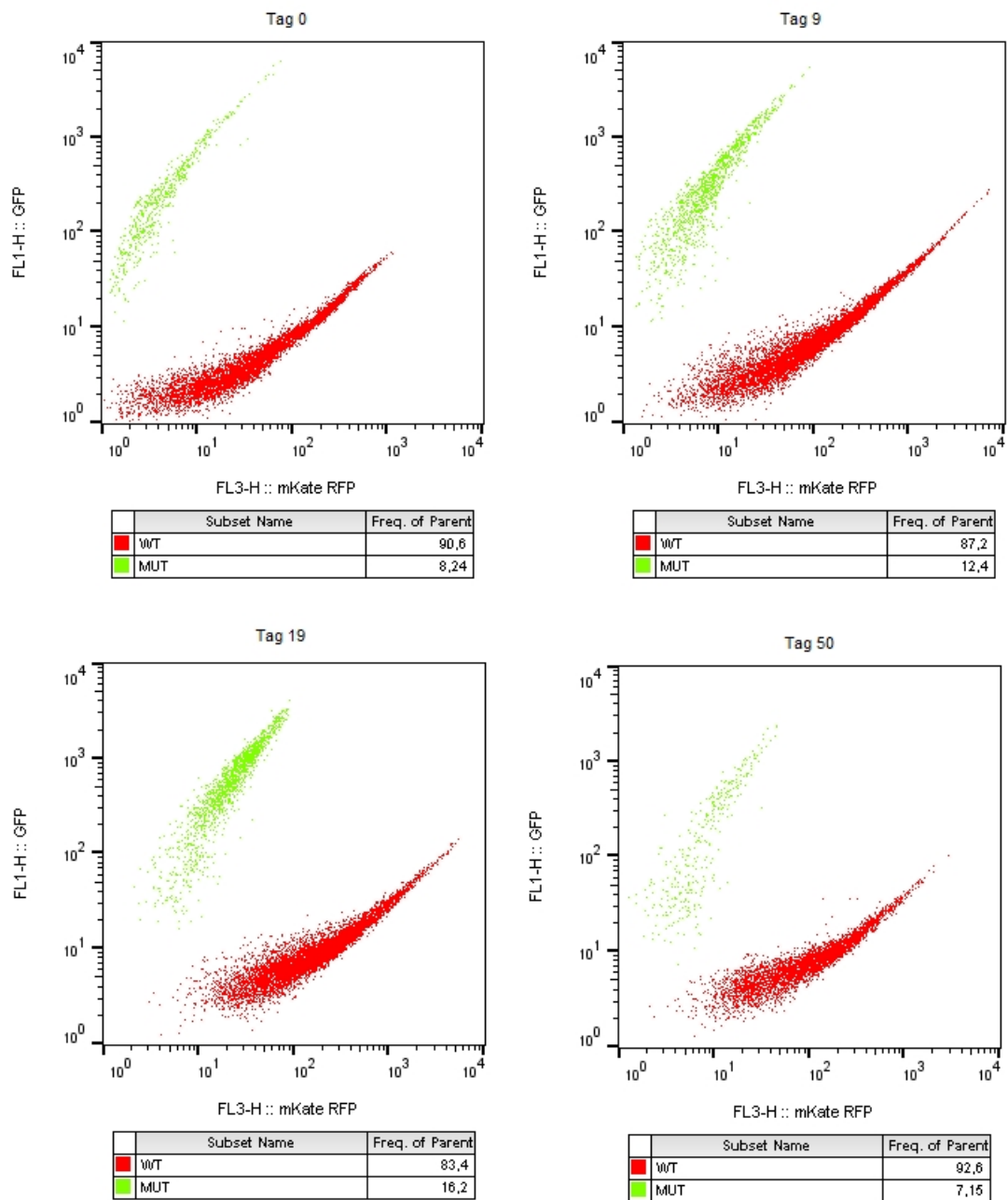


Abbildung 26: Durchflusszytometrie-Auswertung von Ansatz 1.2

Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 und 9 (obere Reihe), Tag 19 und 50 (untere Reihe). Die rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT sind in der Abbildung rot dargestellt. Grün fluoreszierende Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation E170D werden in der Abbildung grün dargestellt.

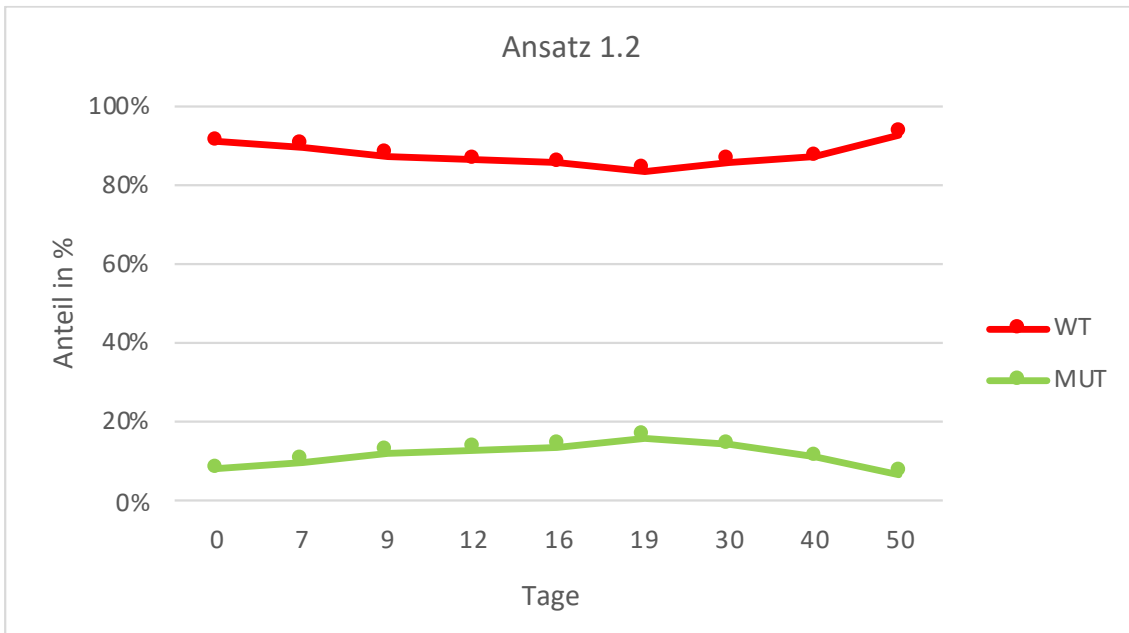


Abbildung 27: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 1.2

In der roten Diagrammlinie wird das Wachstumsverhalten der rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate) mit *IKZF1* WT zwischen Tag 0 und 50 dargestellt. Die grüne Diagrammlinie zeigt das Wachstumsverhalten der grün fluoreszierenden Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation E170D im Laufe von 50 Tagen in Inkubation.

In Ansatz 1.3 wurde die Inkubation mit 90,5 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT und 8,37 % grün fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* Mutation R439H begonnen. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit einer Konzentration von 2,5 μ M Lenalidomid inkubiert. In Ansatz 2.3 mit denselben Sublinienverhältnissen, jedoch mit einer Konzentration von 5 μ M Lenalidomid, zeigte sich im Verlauf eine Veränderung der Verhältnisse. Daher wurden beide Versuchsansätze mit beiden Lenalidomid Konzentrationen (5 μ M, 2,5 μ M) auf 80 Tage verlängert. Nach 50 Tagen Inkubation mit 2,5 μ M Lenalidomid zeigte sich ein Mengenverhältnis mit 90,8 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT und 7,53 % grün fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* Mutation R439H. An Tag 80 hat die Zellpopulation mit *IKZF1* Mutation R439H auf 2,93 % abgenommen.

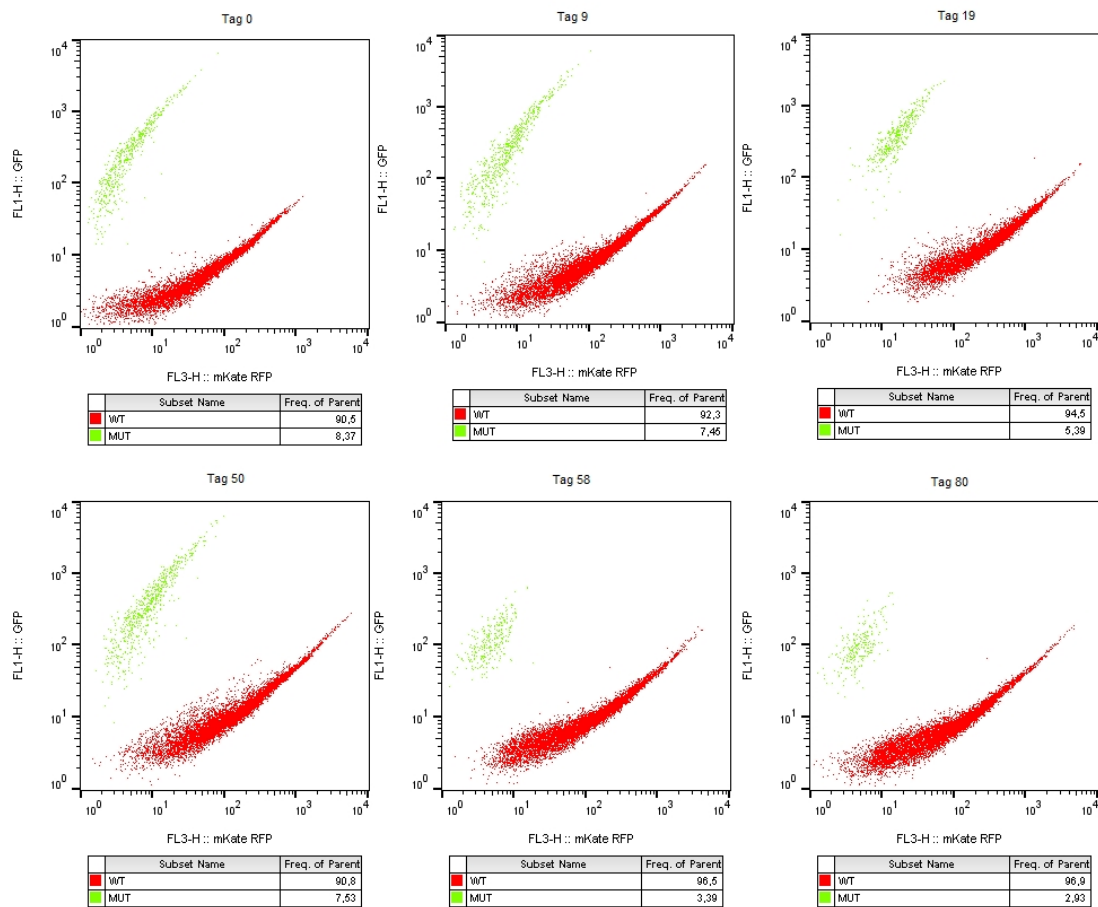


Abbildung 28: Durchflusszytometrie-Auswertung von Ansatz 1.3

Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0, 9 und 19 (obere Reihe), Tag 50, 58 und 80 (untere Reihe). Die rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT sind in der Abbildung rot dargestellt. Grün fluoreszierende Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation R439H werden in der Abbildung grün dargestellt.

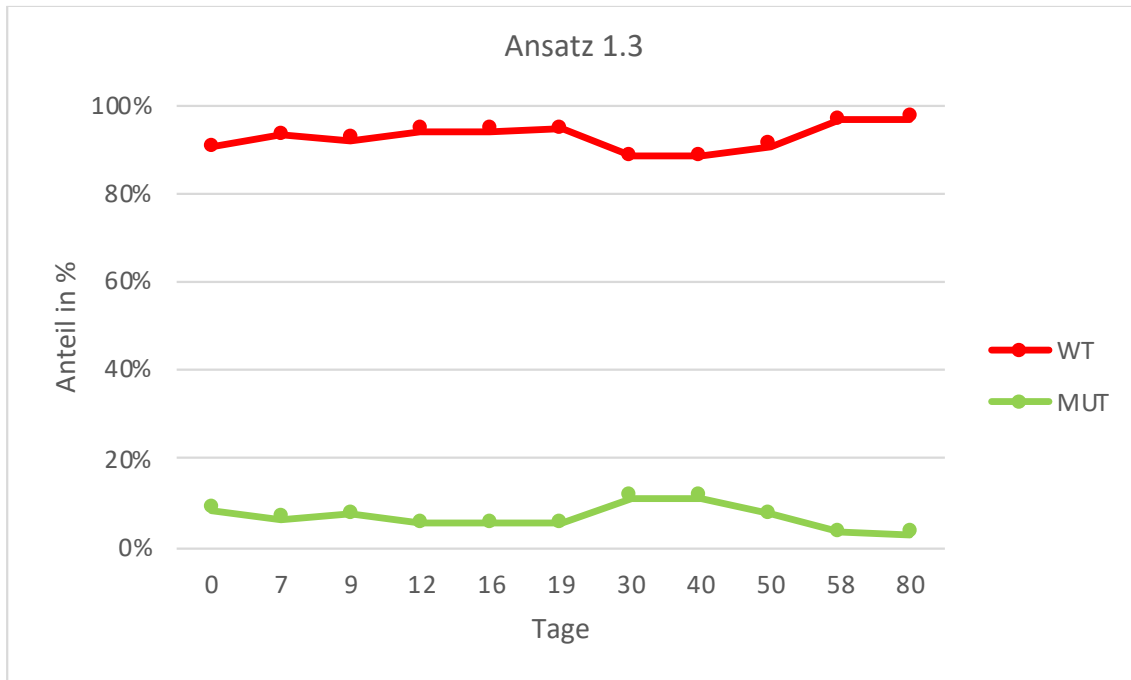


Abbildung 29: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 1.3

In der roten Diagrammlinie wird das Wachstumsverhalten der rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT zwischen Tag 0 und 80 dargestellt. Die grüne Diagrammlinie zeigt das Wachstumsverhalten der grün fluoreszierenden Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation R439H im Laufe von 80 Tagen in Inkubation.

Ansatzgruppe 2: Hauptgruppe 1 mit 5µM Lenalidomid

Im Folgenden wird auf die Ergebnisse der Co-Kulturen aus der Ansatzgruppe 2 eingegangen. Diese Ansätze wurden mit derselben Verteilung an Zellpopulationen, Sublinientypen und fluoreszierenden Proteinen wie in Ansatzgruppe 1 kultiviert. Die Konzentration an Lenalidomid wurde in diesen Ansätzen auf 5 µM erhöht.

In Ansatz 2.1 konnte dasselbe verdrängende Wachstumsverhalten der Zellen mit *IKZF1* Mutation A152T gezeigt werden, welches bereits in den Ergebnissen von Ansatz 1.1 beschreiben wurde. An Tag 0 wurde die Inkubation mit 90,8 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT und 7,67 % grün fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* Mutation A152T begonnen. Zwischen Tag 9 und Tag 12 liegen beide Sublinien in ausgeglichenen Mengenverhältnissen vor. An Tag 19 zeigten sich umgekehrte Mengenverhältnisse mit 91,0 % grün fluoreszierende Zellen mit *IKZF1* Mutation A152T und 8,01 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT. Nach 50 Tagen sank die Konzentration der rot fluoreszierenden Zellen mit dem *IKZF1* WT auf 0,85 % (Abbildung 30). Das Wachstumsverhalten wird graphisch in Abbildung 31 veranschaulicht.

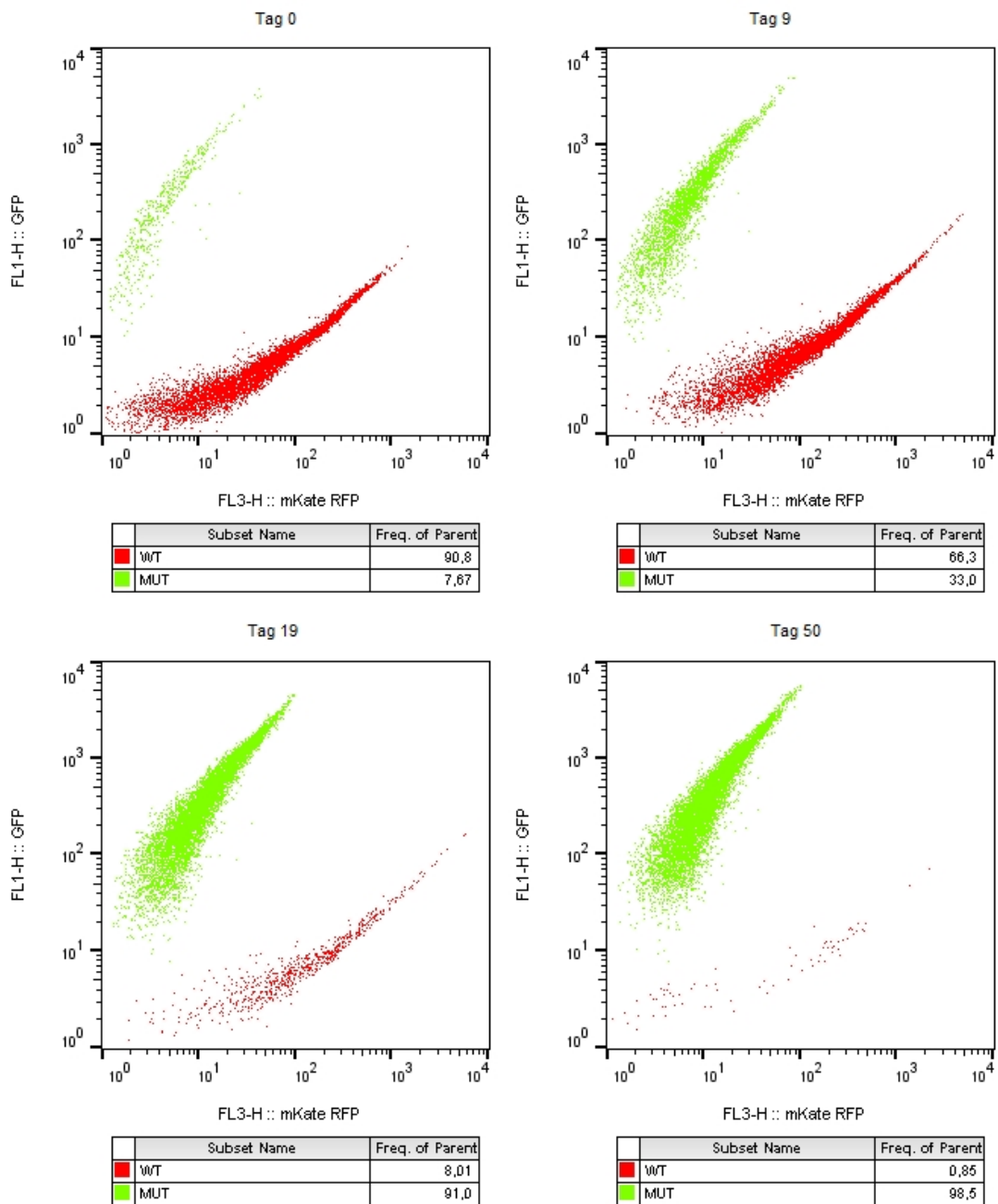


Abbildung 30: Durchflusszytometrie-Auswertung von Ansatz 2.1

Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 und 9 (obere Reihe), Tag 19 und 50 (untere Reihe). Die rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT sind in der Abbildung rot dargestellt. Grün fluoreszierende Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation A152T werden in der Abbildung grün dargestellt.

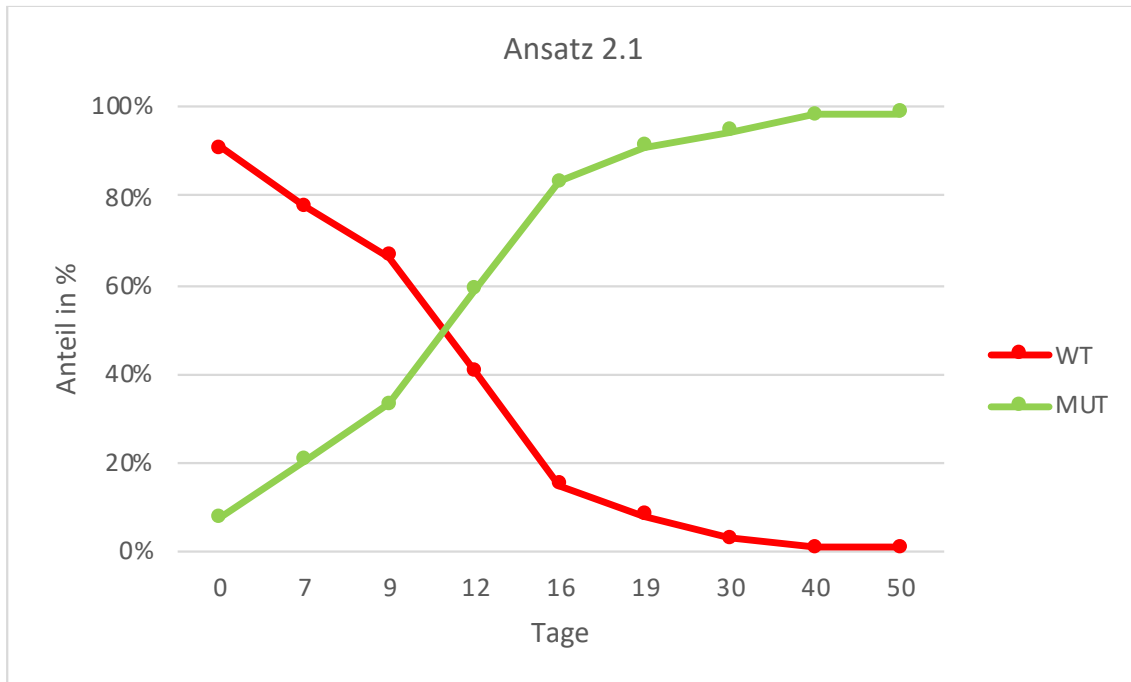


Abbildung 31: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 2.1

In der roten Diagrammlinie wird das Wachstumsverhalten der rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT zwischen Tag 0 und 50 dargestellt. Die grüne Diagrammlinie zeigt das Wachstumsverhalten der grün fluoreszierenden Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation A152T im Laufe von 50 Tagen in Inkubation.

In Ansatz 2.2 wurde bei einer höheren Konzentration von Lenalidomid dasselbe Wachstumsverhalten der Sublinien wie in Ansatz 1.2 beobachtet. Die Verteilung beider Zelllinien blieb bis auf minimale Schwankungen konstant zur Ausgangskonzentration. An Tag 0 wurde die Inkubation mit 90,6 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT und 8,24 % grün fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* Mutation E170D begonnen. Nach 50 Tagen Inkubation mit 5 μ M Lenalidomid zeigte sich ein Mengenverhältnis von 99,3 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT und 0,63 % grün fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* Mutation E170D (Abbildung 32). Graphisch wird das Wachstumsverhalten in Abbildung 33 dargestellt.

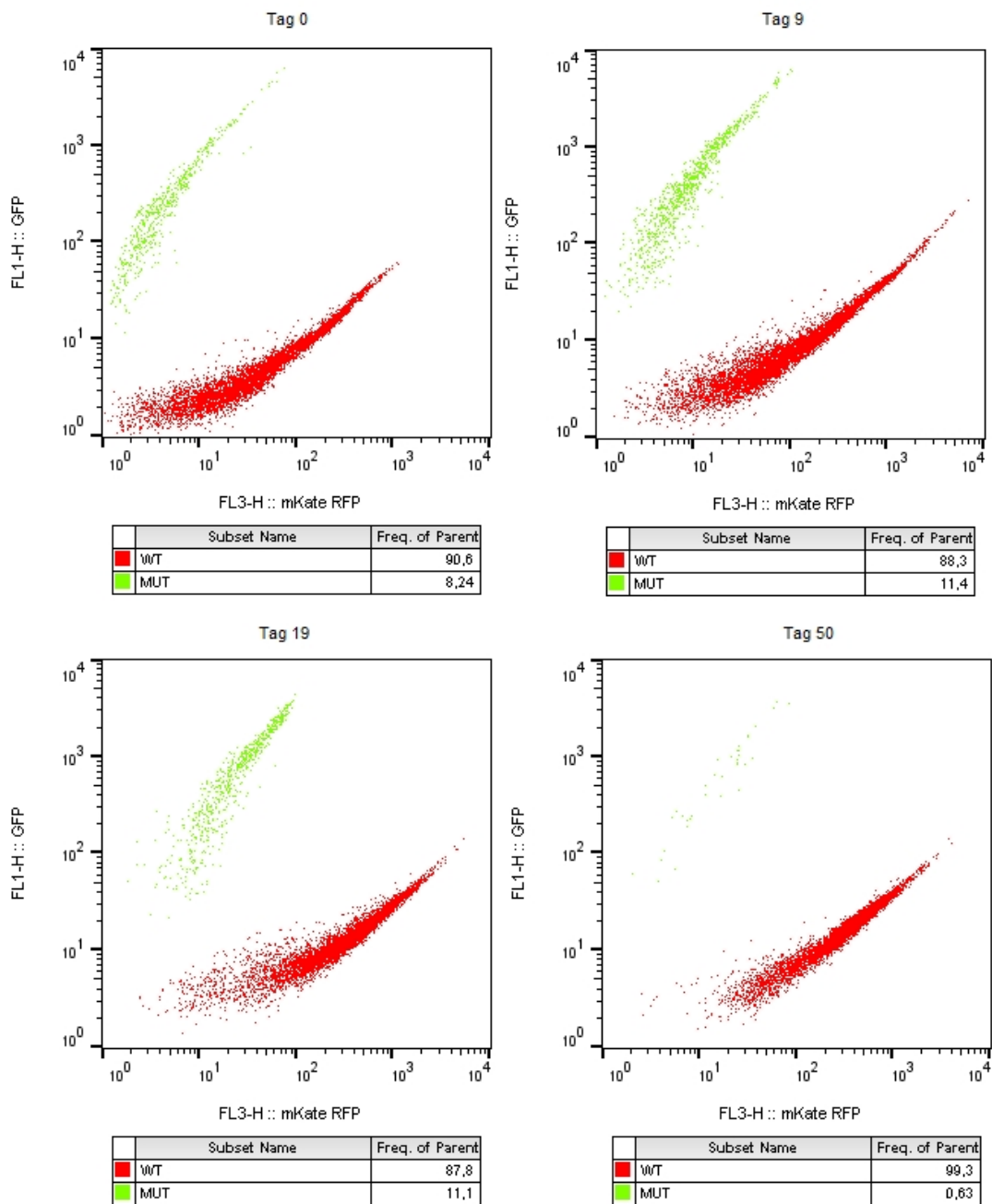


Abbildung 32: Durchflusszytometrie-Auswertung von Ansatz 2.2

Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 und 9 (obere Reihe), Tag 19 und 50 (untere Reihe). Die rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT sind in der Abbildung rot dargestellt. Grün fluoreszierende Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation E170D werden in der Abbildung grün dargestellt.

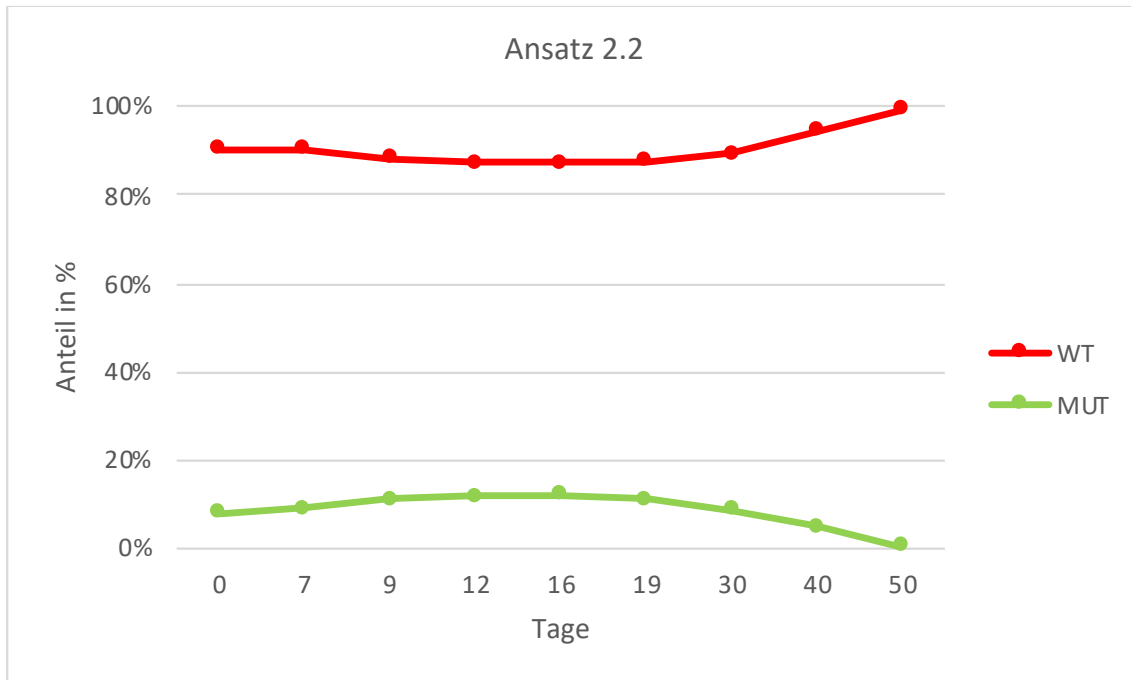


Abbildung 33: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 2.2

In der roten Diagrammlinie wird das Wachstumsverhalten der rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT zwischen Tag 0 und 50 dargestellt. Die grüne Diagrammlinie zeigt das Wachstumsverhalten der grün fluoreszierenden Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation E170D im Laufe von 50 Tagen in Inkubation.

Bei dem Ansatz 2.3 mit Zellen des *IKZF1* WT und *IKZF1* Mutation R439H und einer Behandlung mit 5 μ M Lenalidomid konnte in den ersten Wochen ein simultaner Verlauf wie in Ansatz 1.3 beobachten werden (Abbildung 34). An Tag 0 wurden die Inkubation mit 90,5 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT und 8,37 % grünfluoreszierender Zellen mit *IKZF1* Mutation R439H begonnen. Von Tag 19 bis 50 werden Abweichungen im Wachstum beobachtet. Der Beobachtungszeitraum wurde daher auf 80 Tage erweitert. An Tag 19 wurden 89,6 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT und 8,91 % grünfluoreszierender Zellen mit *IKZF1* Mutation R439H gemessen. Bis Tag 50 zeigte sich ein Rückgang der rot fluoreszierenden Zellen mit *IKZF1* WT auf 71,2 % und ein Anstieg der grünfluoreszierenden Zellen mit *IKZF1* Mutation R439H auf 28,4 %. Bis Tag 80 zeigte sich das Verhältnis der Sublinien konstant bei 77,3 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT und 21,7 % grünfluoreszierenden Zellen mit *IKZF1* Mutation R439H (Abbildung 35).

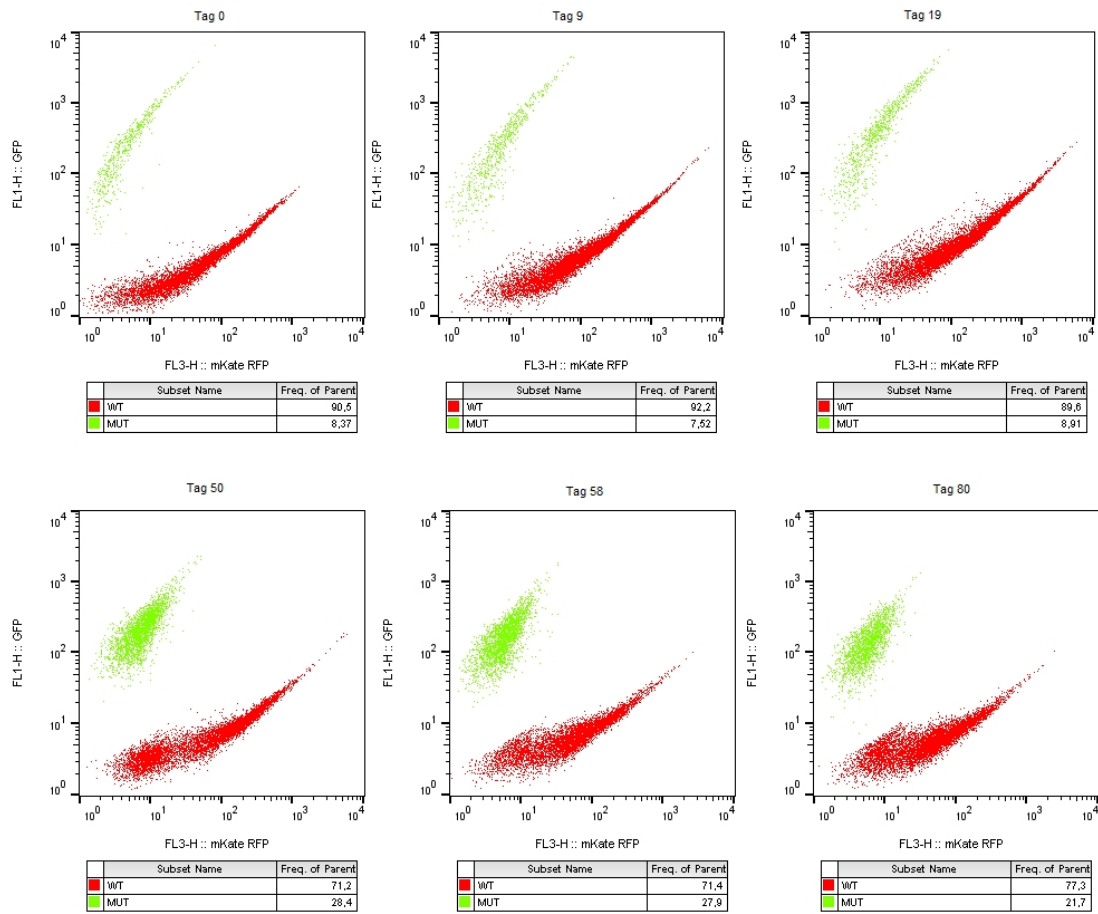


Abbildung 34: Durchflusszytometrie-Auswertung von Ansatz 2.3

Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0, 9 und 19 (obere Reihe), Tag 50, 58 und 80 (untere Reihe). Die rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT sind in der Abbildung rot dargestellt. Grün fluoreszierende Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation R439H werden in der Abbildung grün dargestellt.

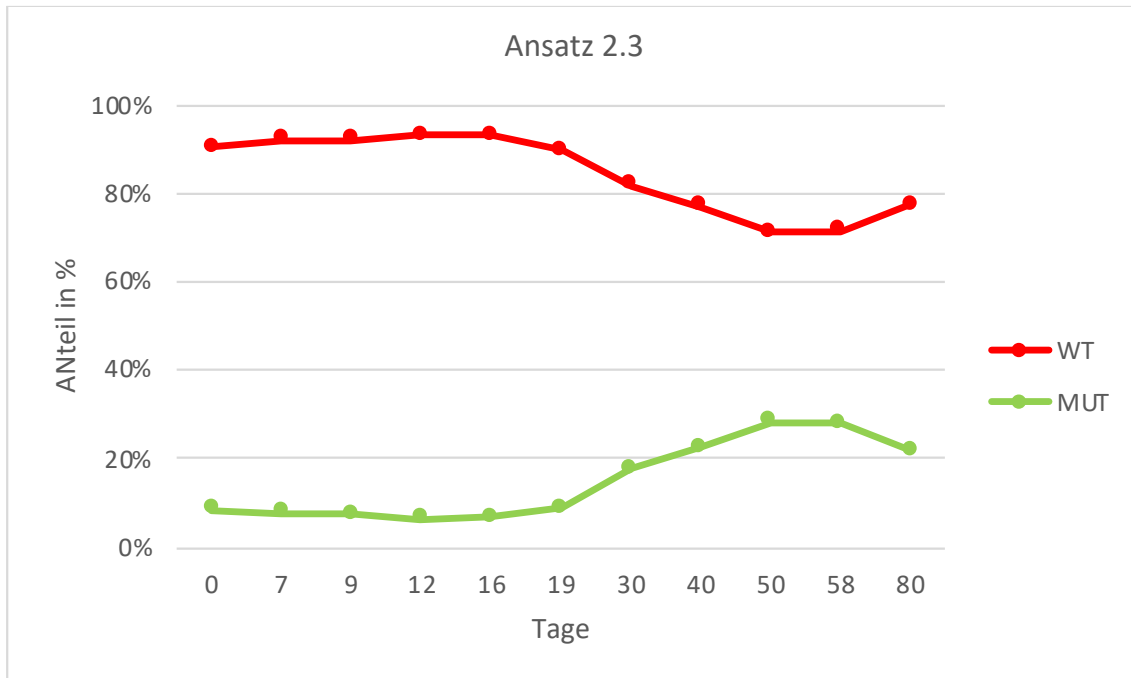


Abbildung 35: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 2.3

In der roten Diagrammlinie wird das Wachstumsverhalten der rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT zwischen Tag 0 und 80 dargestellt. Die grüne Diagrammlinie zeigt das Wachstumsverhalten der grün fluoreszierenden Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation R439H im Laufe von 80 Tagen in Inkubation.

Hauptgruppe 2 mit Lenalidomid - WT grün – Mutation rot

Der Einsatz der verwendeten Sublinien und Konzentrationen an Lenalidomid in den Ansätzen 3.1 und 4.1 entspricht dem Aufbau von Ansatz 1.1 und 2.1. Jedoch wurden den Zellen der Sublinie L363 mit *IKZF1* WT das grün fluoreszierende Protein und den Zellen mit der Sublinie L363 mit der *IKZF1* Mutation A152T das rot fluoreszierende Protein eingebracht. Mit diesem Ansatz sollte ein möglicher Einfluss der fluoreszierenden Proteine auf das Wachstumsverhalten ausgeschlossen werden.

In diesen Ansätzen konnten dieselben Selektionsentwicklungen wie in Ansatz 1.1 und 2.1 beschrieben beobachtet werden. Die Zellen, die die Mutation A152T tragen, nehmen stetig einen größeren Anteil an Zellen ein. Die Konzentrationen der Zellen des *IKZF1* WT nehmen stetig ab.

Ansatzgruppe 3: Hauptgruppe 2 mit 2,5 µM Lenalidomid

In Ansatz 3.1 wurde mit einem Mengenverhältnis von 92,0 % grünfluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT und 7,77 % rotfluoreszierender Zellen mit der *IKZF1* Mutation A152T begonnen. Während der Inkubation von 50 Tagen wurden die Zellen einer

Konzentration von 2,5 μ M Lenalidomid ausgesetzt. Analog zu den Ergebnissen aus 1.1 und 2.1 zeigte sich zwischen Tag 9 und 12 die Angleichung der Mengenverhältnisse beider Sublinien. An Tag 19 wurden bereits 80,8 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* Mutation A152T und lediglich 11,5 % grün fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT gemessen (Abbildung 36). Graphisch wird das Wachstumsverhalten in Abbildung 37 dargestellt.

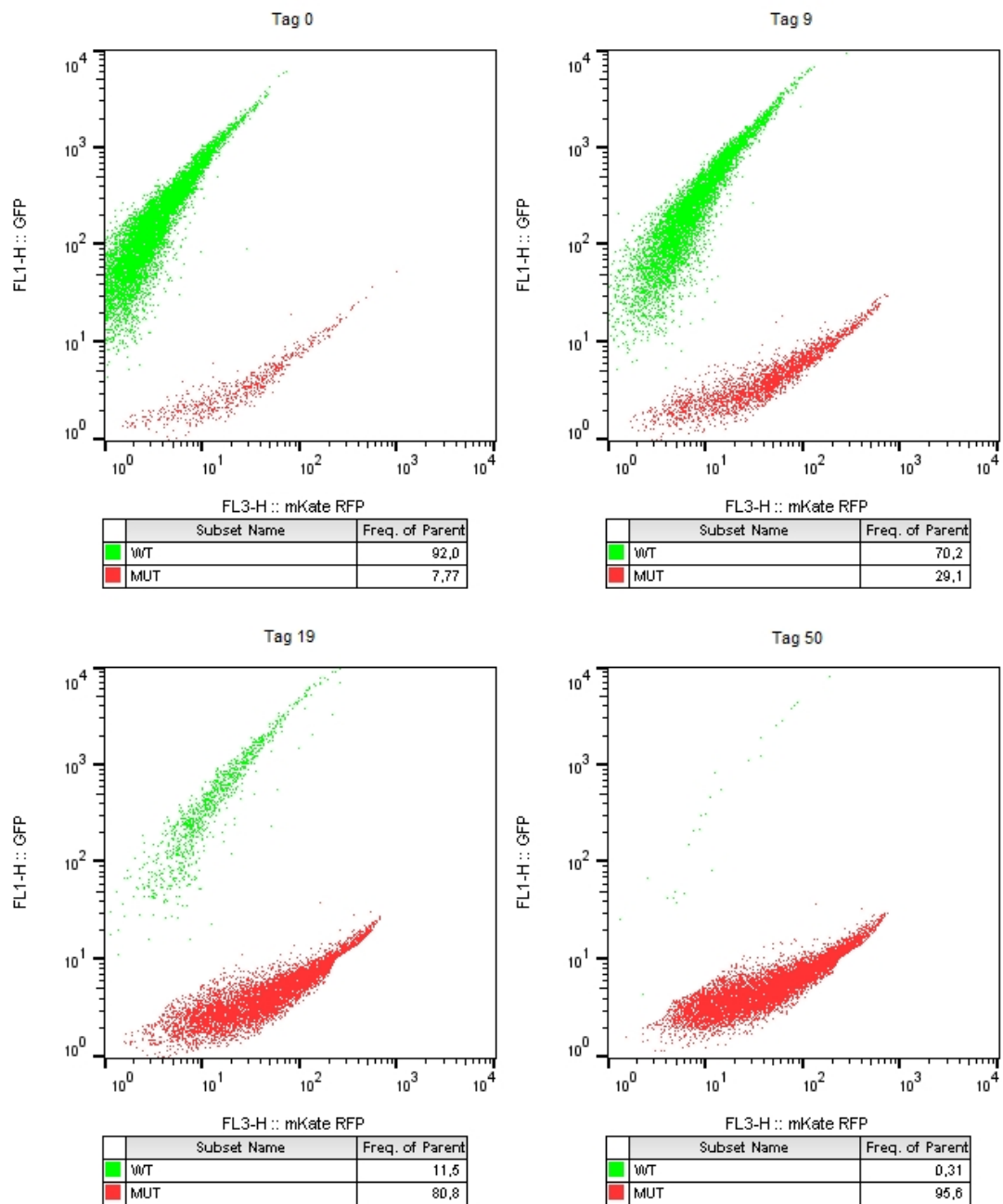


Abbildung 36: Durchflusszytometrie -Auswertung von Ansatz 3.1

Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 und 9 (obere Reihe), Tag 19 und 50 (untere Reihe). Die grün fluoreszierenden Zellen (EGFP) mit *IKZF1* WT sind in der Abbildung grün dargestellt. Rot fluoreszierende Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* Mutation A152T werden in der Abbildung rot dargestellt.

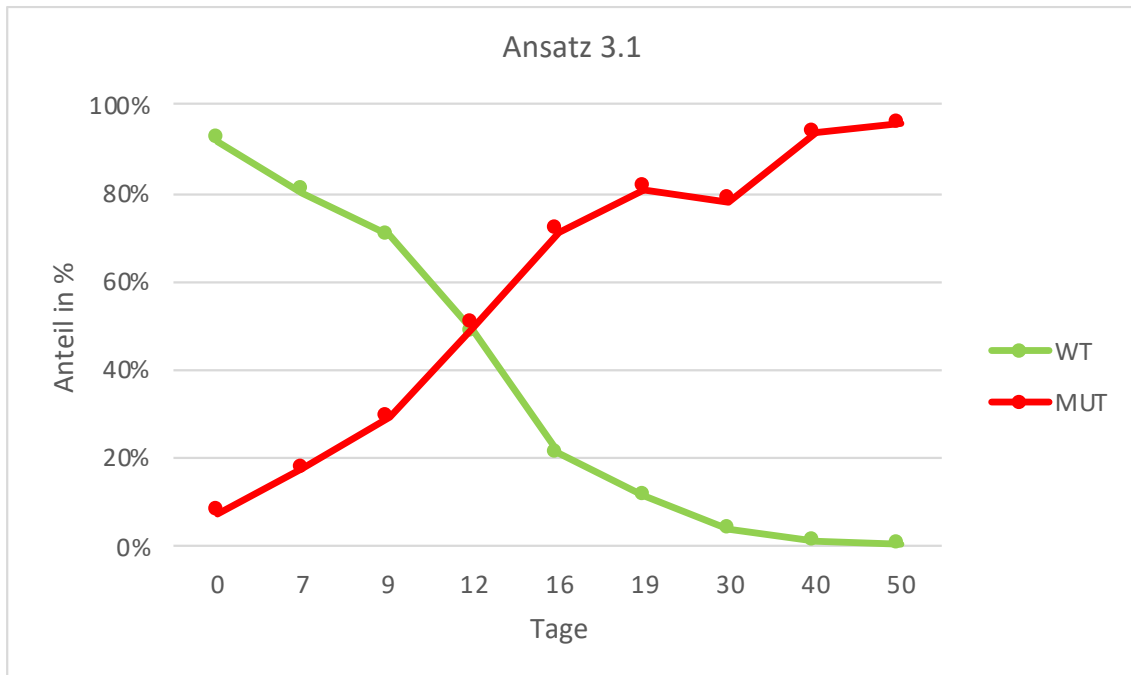


Abbildung 37: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 3.1

In der grünen Diagrammlinie wird das Wachstumsverhalten der grün fluoreszierenden Zellen (EGFP) mit *IKZF1* WT zwischen Tag 0 und 50 dargestellt. Die rote Diagrammlinie zeigt das Wachstumsverhalten der rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* Mutation A152T im Laufe von 50 Tagen in Inkubation.

Ansatzgruppe 4: Hauptgruppe 2 mit 5 µM Lenalidomid

Ansatz 4.1 wurde simultan zu Ansatz 2.1 mit einer Lenalidomid Konzentration von 5 µM inkubiert. An Tag 0 wurden 92,0 % grün fluoreszierende Zellen mit *IKZF1* WT und 7,77 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* Mutation A152T gemessen. Auch in diesem Ansatz mit der *IKZF1* Mutation A152T wurde zwischen Tag 9 und 12 die Umkehr der Mengenverhältnisse gemessen. An Tag 19 zeigten sich 85 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* Mutation A152T und 7,31 % grün fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT (Abbildung 38). Die Wachstumskurven werden in Abbildung 39 dargestellt.

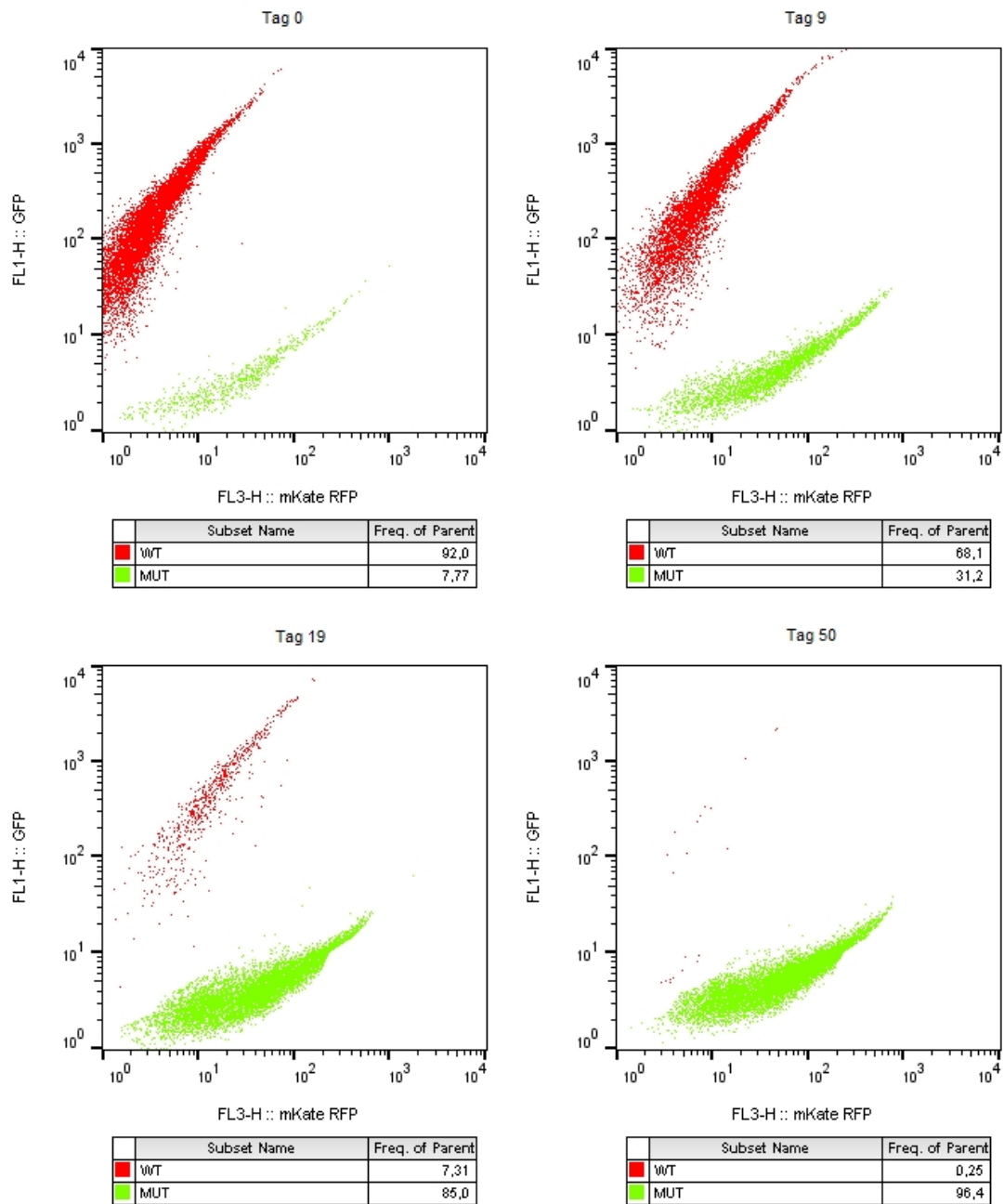


Abbildung 38: Durchflusszytometrie-Auswertung von Ansatz 4.1

Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 und 9 (obere Reihe), Tag 19 und 50 (untere Reihe). Die grün fluoreszierenden Zellen (EGFP) mit *IKZF1* WT sind in der Abbildung rot dargestellt. Rot fluoreszierende Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* Mutation A152T werden in der Abbildung grün dargestellt.

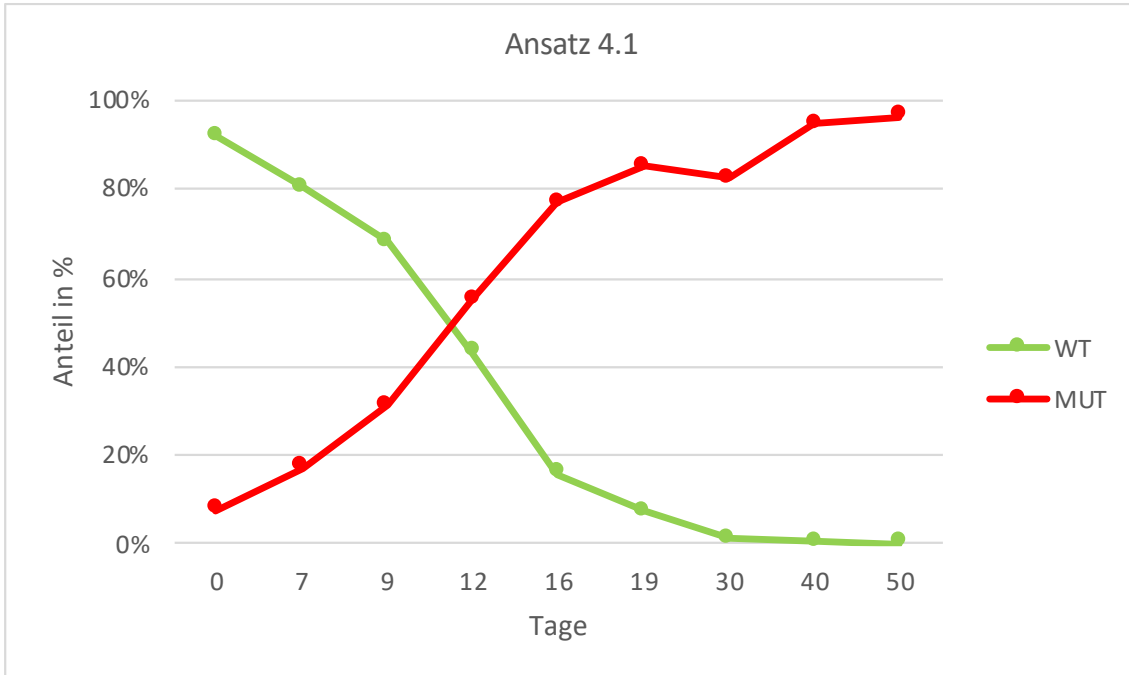


Abbildung 39: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 4.1

In der grünen Diagrammlinie wird das Wachstumsverhalten der grün fluoreszierenden Zellen (EGFP) mit *IKZF1* WT zwischen Tag 0 und 50 dargestellt. Die rote Diagrammlinie zeigt das Wachstumsverhalten der rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* Mutation A152T im Laufe von 50 Tagen in Inkubation.

Hauptgruppe 1 ohne Lenalidomid – Kontrollgruppe – WT rot - Mutation grün

Ansatzgruppe 5: Hauptgruppe 1 mit 0 μ M Lenalidomid

Der Aufbau der Ansatzgruppe 5 entspricht dem Aufbau der Ansatzgruppe 1. Hier wurden jedoch die jeweiligen Sublinien ohne Zugabe von Lenalidomid inkubiert. In allen drei Ansätzen mit Zellen des *IKZF1* WT und den jeweiligen Mutationen konnte keine signifikante Veränderung zu der Ausgangskonzentration beobachtet werden.

In Ansatz 5.1 wurde mit einer Ausgangskonzentration von 87,5 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT und 12,2 % grün fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* Mutation A152T begonnen. An Tag 50 zeigte sich eine Verteilung von 79,2 % grün fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* Mutation A152T und 20,5 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT (Abbildung 40). Die Wachstumskurven werden für die Dauer von 62 Tagen in Abbildung 41 dargestellt.

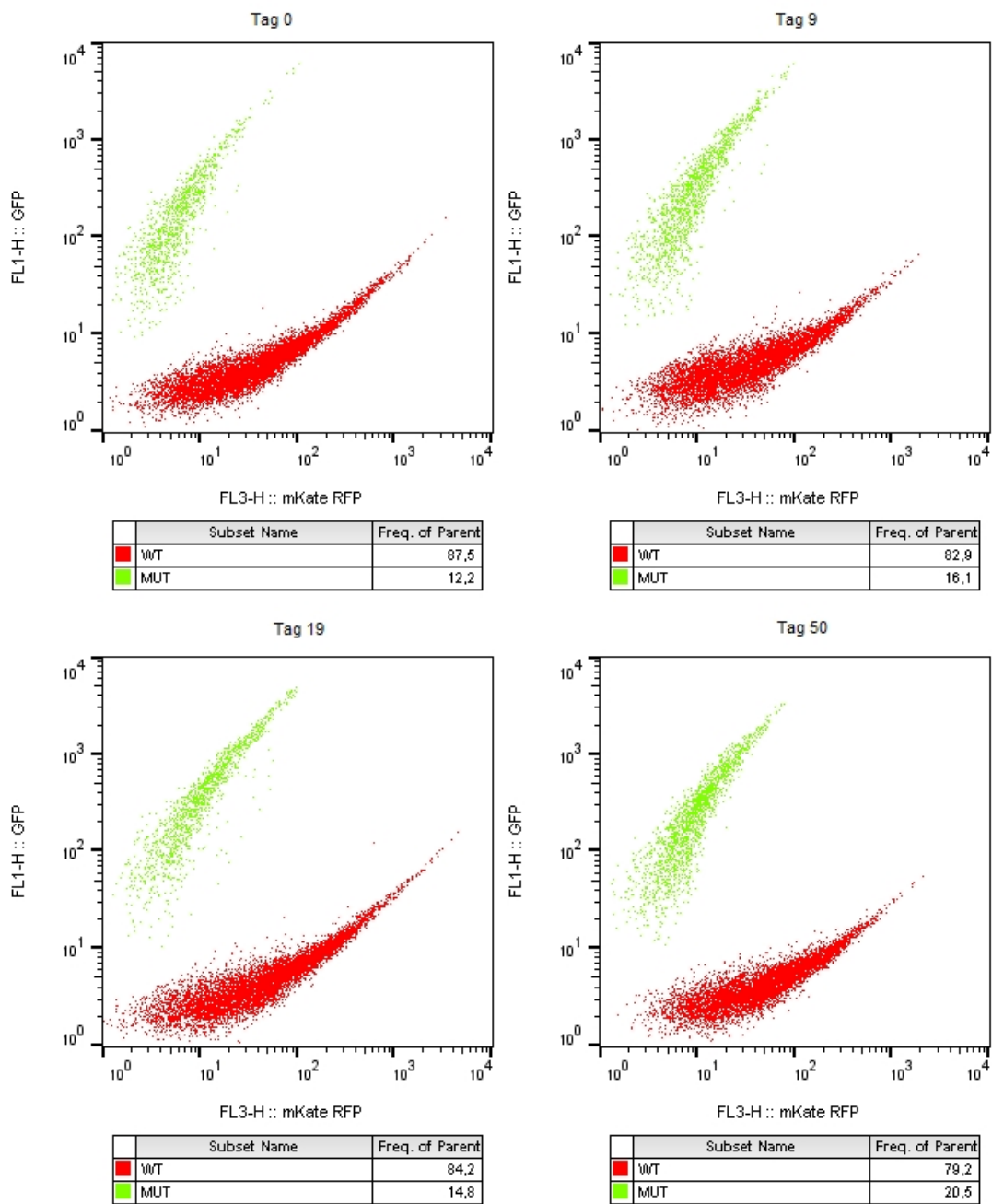


Abbildung 40: Durchflusszytometrie -Auswertung von Ansatz 5.1

Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 und 9 (obere Reihe), Tag 19 und 50 (untere Reihe). Die rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT sind in der Abbildung rot dargestellt. Grün fluoreszierende Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation A152T werden in der Abbildung grün dargestellt.

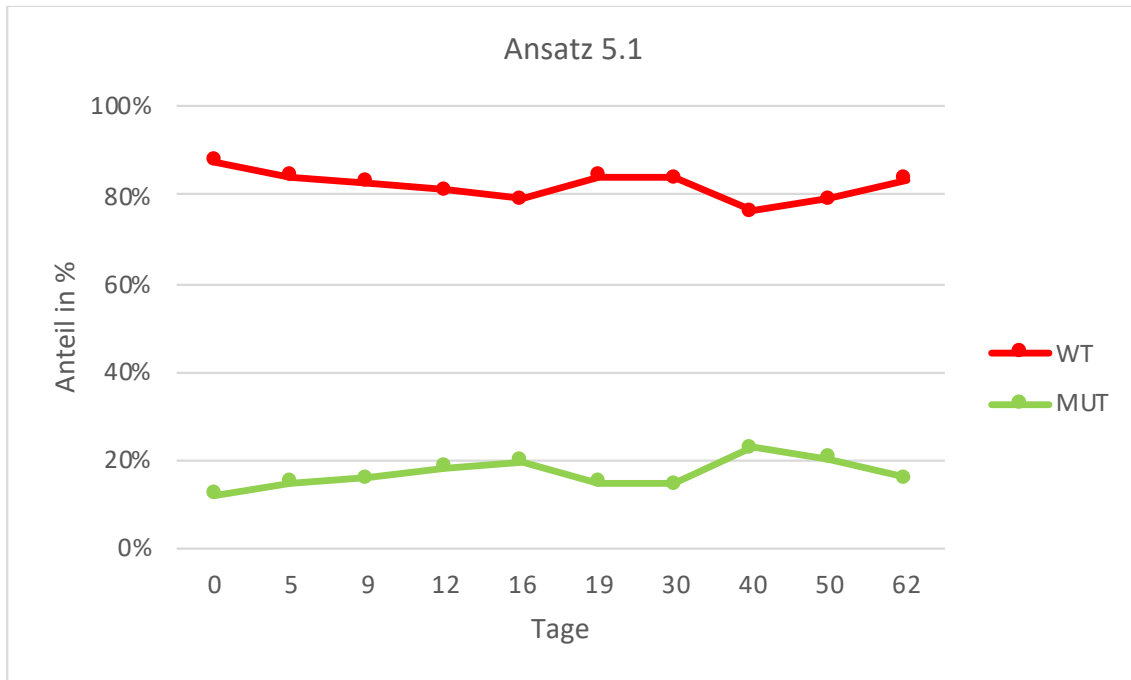


Abbildung 41: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 5.1

In der roten Diagrammlinie wird das Wachstumsverhalten der rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT zwischen Tag 0 und 62 dargestellt. Die grüne Diagrammlinie zeigt das Wachstumsverhalten der grün fluoreszierenden Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation A152T im Laufe von 62 Tagen in Inkubation.

Der Versuchsansatz 5.2 wurde an Tag 0 mit 90,9 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT und 8,78 % grün fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* Mutation A152T begonnen. An Tag 50 wurden 90,8 % grün fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* Mutation A152T und 9,03 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT gemessen (Abbildung 42). Im Verlauf der Inkubation traten keine signifikanten Schwankungen auf (Abbildung 43).

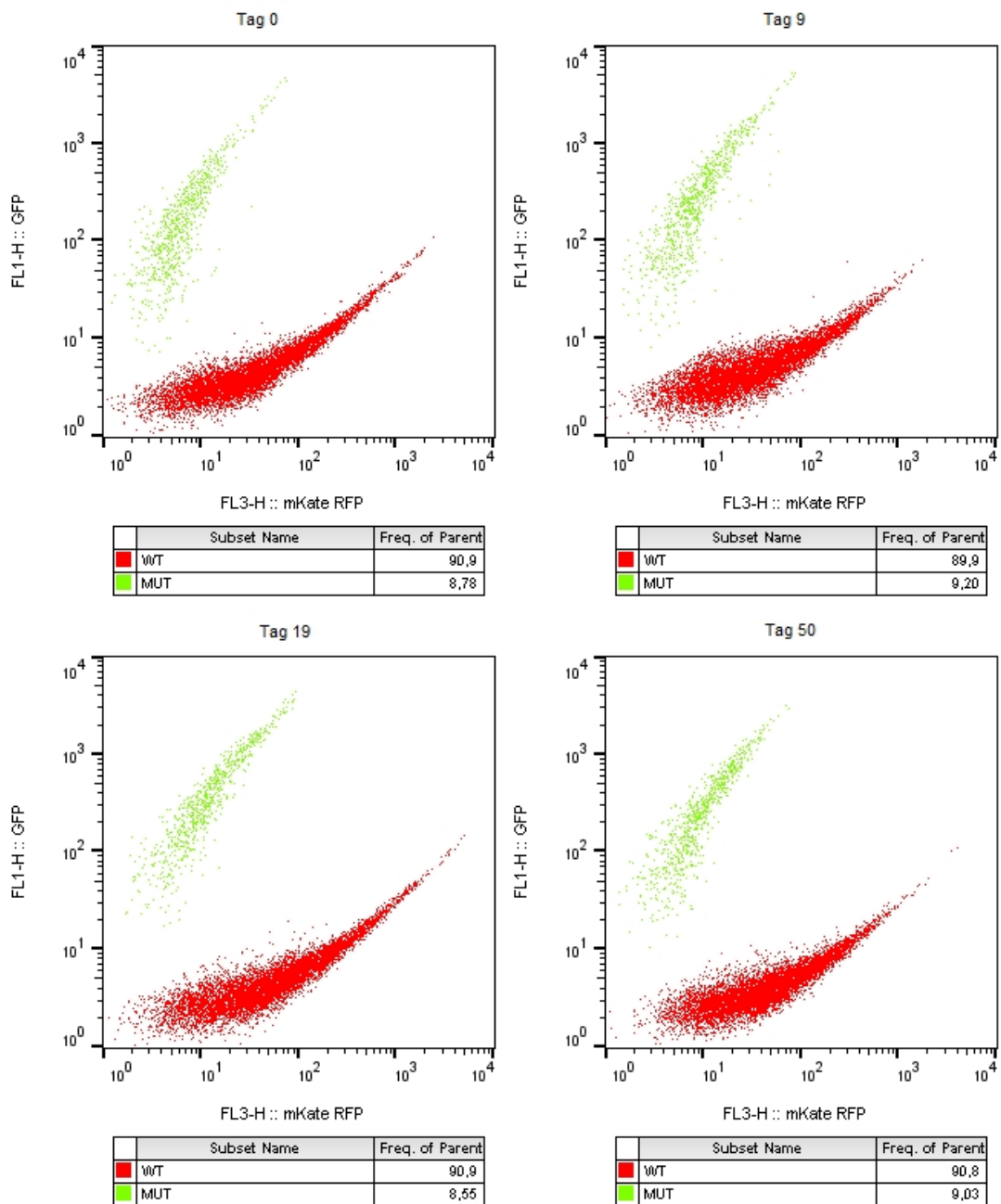


Abbildung 42: Durchflusszytometrie-Auswertung von Ansatz 5.2

Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 und 9 (obere Reihe), Tag 19 und 50 (untere Reihe). Die rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT sind in der Abbildung rot dargestellt. Grün fluoreszierende Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation E170D werden in der Abbildung grün dargestellt.

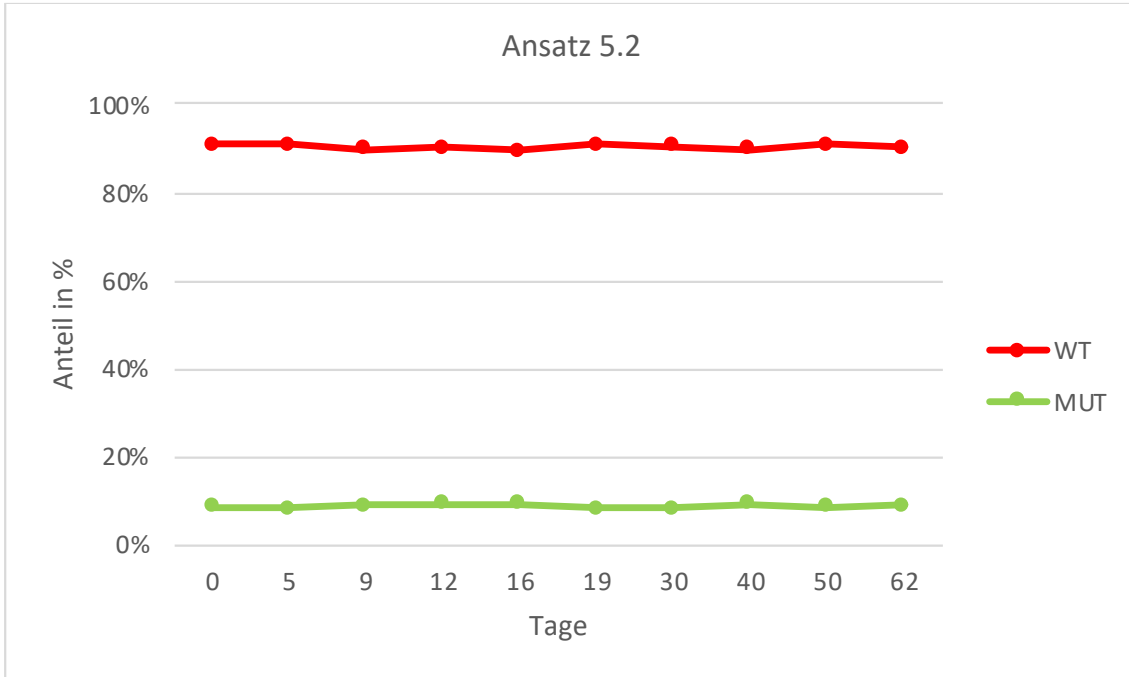


Abbildung 43: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 5.2

In der roten Diagrammlinie wird das Wachstumsverhalten der rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT zwischen Tag 0 und 62 dargestellt. Die grüne Diagrammlinie zeigt das Wachstumsverhalten der grün fluoreszierenden Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation E170D im Laufe von 62 Tagen in Inkubation.

Die Inkubation von Ansatz 5.3 wurde mit 91,2 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT und 8,07 % grün fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* Mutation R438H begonnen. Für die Dauer der Inkubation zeigten sich keine signifikanten Schwankungen (Abbildung 45). An Tag 50 wurden 92,2 % grün fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* Mutation R438H und 7,44 % rot fluoreszierender Zellen mit *IKZF1* WT gemessen (Abbildung 44).

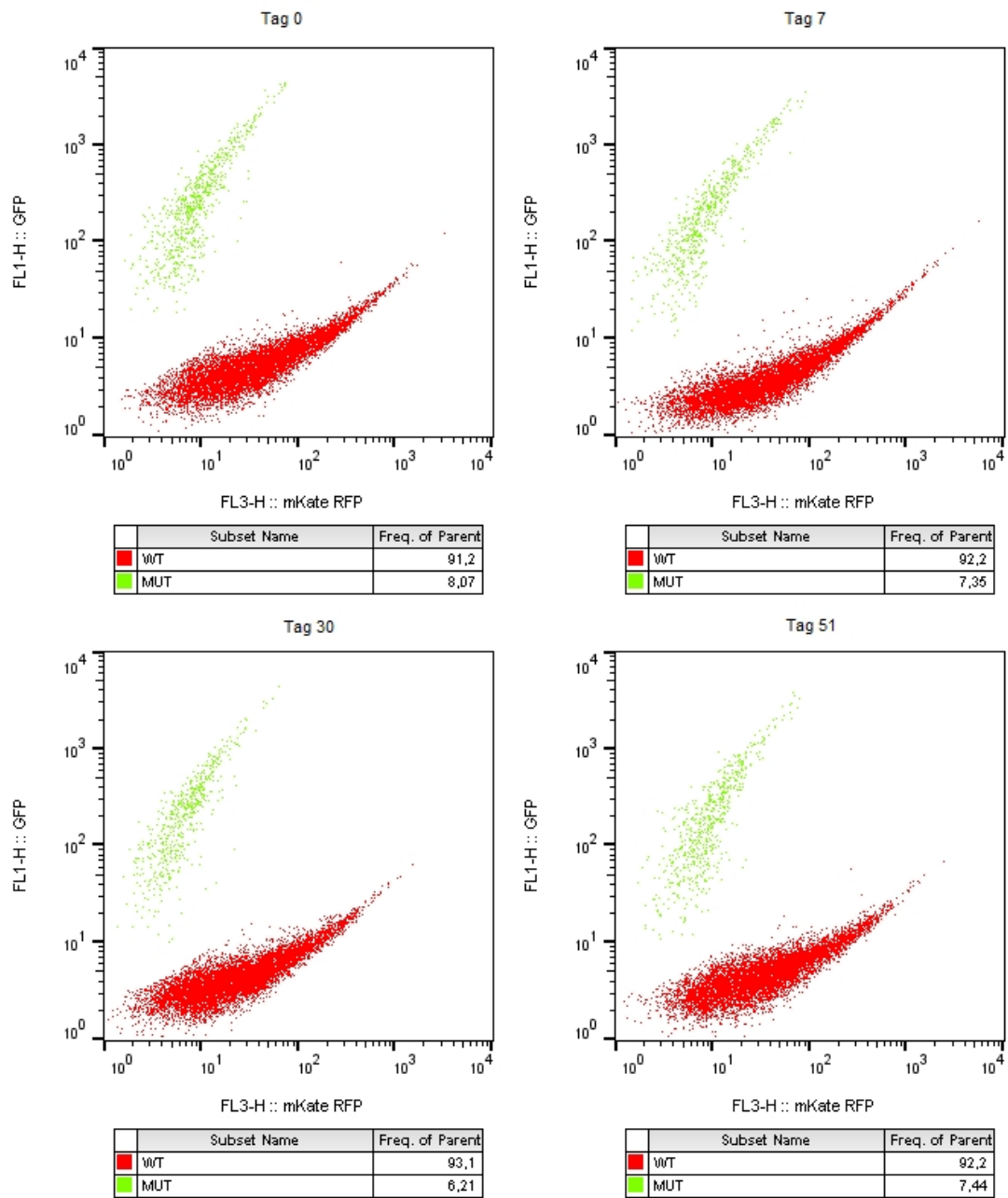


Abbildung 44: Durchflusszytometrie -Auswertung von Ansatz 5.3

Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 und 7 (obere Reihe), Tag 30 und 51 (untere Reihe). Die rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT sind in der Abbildung rot dargestellt. Grün fluoreszierende Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation R439H werden in der Abbildung grün dargestellt.

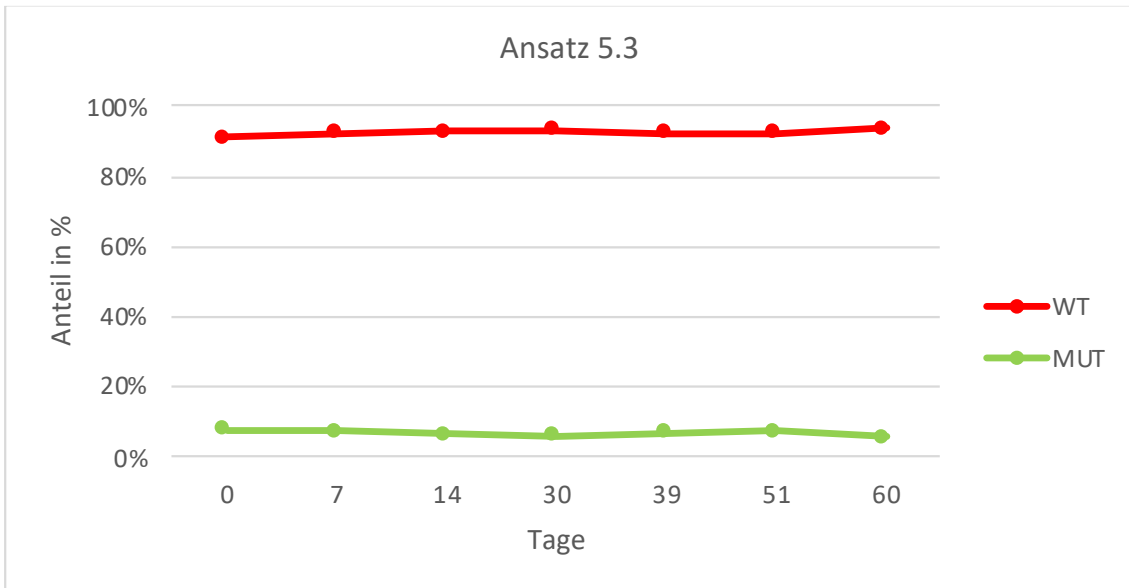


Abbildung 45: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 5.3

In der roten Diagrammlinie wird das Wachstumsverhalten der rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT zwischen Tag 0 und 60 dargestellt. Die grüne Diagrammlinie zeigt das Wachstumsverhalten der grün fluoreszierenden Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation R439H im Laufe von 60 Tagen in Inkubation.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein Zelllinien-Vektormodell zur Beobachtung klonaler Evolutionsmechanismen etabliert. Aus vorherigen Experimenten wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Wirkung von IMiDs (hier speziell Lenalidomid) durch bestimmte Mutationen auf Genabschnitten von *IKZF1* beeinflusst wird (Barrio et al., 2019). Anhand des etablierten Zelllinien-Vektormodells sollte diese Hypothese überprüft werden. Wie in Abschnitt 1.6.2 bereits erläutert, binden IMiDs an Cereblon, welches unter anderem zu einer verstärkten Ubiquitinierung des Transkriptionsfaktors *IKZF1* führt. Dadurch entsteht eine Zytotoxizität in den Myelomzellen (Krönke et al., 2014). In Vorversuchen wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch Mutationen in bestimmten Abschnitten von *IKZF1* diese Ubiquitinierung nicht greifen kann und daher eine geringere Wirkung von IMiDs auf die Myelomzellen zu verzeichnen ist. Des Weiteren konnte ein Selektionsvorteil der Zellen mit der Mutation A152T gegenüber Zellen mit WT unter Behandlung mit IMiDs gezeigt werden (Barrio et al., 2019).

In dieser Arbeit wurde ein Zelllinien-Vektorsystem entwickelt, das die Beobachtung von Wachstumsveränderungen von Zellen in direkter Konkurrenz mit verschiedener genetischer Ausstattung ermöglicht. Anhand dieses Zelllinien-Vektorsystems wurden verschiedene Sublinien entwickelt, welche den *IKZF1* WT oder eine von drei *IKZF1* Mutation tragen. Deren Wachstumsverhalten konnte mit Hilfe dieses Systems in direkter Konkurrenz zueinander beobachtet werden. Unter der Behandlung mit 2,5 und 5 μ M Lenalidomid konnte ein deutlicher Selektionsvorteil der Zellen mit der Mutation A152T gegenüber Zellen mit *IKZF1* WT beobachtet werden. Die Zellen mit der entsprechenden Mutation scheinen in ihrem Wachstum weniger beeinträchtigt durch Lenalidomid. Bei Zellen mit dem *IKZF1* WT ist dementsprechend eine Zellabnahme zu beobachten. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist die durch Lenalidomid induzierte Ubiquitinierung des *IKZF1* und die damit entstehende Zytotoxizität (Kortüm, Mai, et al., 2016; Krönke et al., 2017; Krönke et al., 2014).

In den Ansätzen 1.1, 2.1 und 3.1, die Zellen der Sublinien mit *IKZF1* WT und der Mutation *IKZF1* A152T beinhalten, konnte jeweils bei 2,5 sowie bei 5 μ M Lenalidomid bereits nach wenigen Tagen (Tag 7) eine deutliche Zunahme der Zellen mit Mutation verzeichnet werden. Über ein Wachstum von 50 Tagen kam es fast vollständig zu einer

Verdrängung der Zellen mit *IKZF1* WT. Der gezeigte Selektionsvorteil der Zellen mit der Mutation *IKZF1* A152T konnte die Validität des Zelllinien-Vektorsystem beweisen. Bereits in bestehenden Forschungsergebnissen wurde bei der Mutation A152T die Entwicklung von Therapieresistenzen beschrieben (Barrio et al., 2019). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten decken sich mit den bestehenden Ergebnissen eines Selektionsvorteils der Mutation *IKZF1* A152T. Des Weiteren wurde in Vorversuchen ein möglicher geringer Selektionsvorteil durch die Mutation E170D in *IKZF1* im Vergleich zu *IKZF1* WT beobachtet (Barrio et al., 2019). Western-Blot Versuche zeigten, dass nach einer Behandlung der Zellen mit Lenalidomid die Menge an Ikaros in Zellen mit der Mutation A152T nicht abnimmt. Ein fraglicher inhibitorischer Effekt auf die Produktion von Ikaros konnte bei Zellen mit der Mutation *IKZF1* E170D beobachtet werden. Diese Beobachtung bei der Mutation E170D konnte jedoch nicht durch Veränderungen der Zellaktivität validiert werden (Barrio et al., 2019). Zur weiteren Überprüfung dieses möglichen Effekts wurde die Mutation *IKZF1* E170D ebenfalls in das Zelllinien-Vektorsystem eingebracht. Hier konnte ein Selektionsvorteil nicht bestätigt werden. Über den Zeitraum der Zellinkubation konnte bei beiden Lenalidomid-Konzentrationen keine signifikante Veränderung in der Anzahl an Zellen von *IKZF1* mit WT und *IKZF1* mit der Mutation E170D beobachtet und damit kein Selektionsvorteil durch die Mutation E170D unter der Behandlung mit Lenalidomid gezeigt werden. Durch die *IKZF1* Mutation E170D wird keine Resistenz gegenüber Lenalidomid vermittelt. Diese Beobachtungen decken sich mit bereits veröffentlichten Ergebnissen. Diese zeigen, dass lediglich Mutationen auf *IKZF1* innerhalb der Lenalidomid/Cereblon-Bindungsstelle eine Resistenz und damit einen Selektionsvorteil gegenüber Lenalidomid bewirken (Krönke et al., 2014).

In Ansatz 1.3 mit der *IKZF1* Mutation R439H konnte von geringen Schwankungen abgesehen eine unveränderte Verteilung von Zellen mit *IKZF1* Mutation und *IKZF1* WT beobachtet werden. Durch die *IKZF1* Mutation R439H wird keine Resistenz gegenüber Lenalidomid vermittelt. Bei Ansatz 2.3 konnte nach 20 Tagen eine Zellzunahme der Zellen mit *IKZF1* Mutation R439H beobachtet werden. In diesem neuen Mischverhältnis blieb die Verteilung in der weiteren Inkubationszeit konstant. Daher kann man bei dieser Auffälligkeit am ehesten von einer Abweichung beim Ansetzen des Versuchs oder der Messung ausgehen.

Über die Zeit der Inkubation traten bei mehreren Versuchsansätzen geringe Schwankungen in der Verteilung der Zellen auf, die sich als nicht signifikant darstellen. Die Schwankungen sind auf Messungenauigkeiten, Ungenauigkeiten bei der Mischung und Wachstum zurückzuführen. Bei den Versuchsansätzen 1.2, 1.3, 2.2, 2.3 und 5.1 - 5.3 zeigten sich während der Kultivierung keine relevanten Veränderungen in den jeweils beiden Zellpopulationen (*IKZF1* Mutation und *IKZF1* WT). Die Ansätzen 1.2, 1.3, 2.2 und 2.3 wurden mit einer bestimmten Konzentration an Lenalidomid kultiviert. In den Ansätzen 5.1 - 5.3 wurde kein Lenalidomid verwendet. In den beschriebenen Ansätzen zeigten sich konstante Populationsverhältnisse. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Zellen beider Sublinien in gleichem Maße durch Lenalidomid in ihrem Zellwachstum beeinträchtigt werden und die Mutationen keinen Selektionsvorteil darstellen. Die gewählten Konzentrationen an Lenalidomid beeinflussen das Wachstum der Zellen, führen jedoch nicht zu einer kompletten Wachstumshemmung. Selektionsvorteile und Selektionsnachteile konnten sichtbar gemacht werden. Die Populationsverhältnisse der Ansätze mit den *IKZF1* Mutationen E170D und R439H sind somit bei einer Behandlung mit und ohne Lenalidomid gleich.

Unser Zelllinien-Vektorsystem stellt eine Möglichkeit zur Visualisierung von klonalen Evolutionsmechanismen dar. Es erlaubt die Beobachtung und Beurteilung von Selektionsvorteilen unterschiedlicher Mutationen *in vitro* unter kontrollierten Bedingungen. Dieses Modell von fluoreszierenden Vektoren kann auf weitere Zelllinien und Mutationen angewandt werden. Dass die Übertragung auf andere Zelllinienmodelle erfolgreich ist, konnte im Anschluss an diese Arbeit bereits gezeigt werden (Munawar et al., 2019). Hier wurden AMO-1 Sublinien mit WT, mono- und biallelischen TP53 Veränderungen mit den in dieser Arbeit etablierten fluoreszierenden Vektormodellen markiert. Es konnte gezeigt werden, dass biallelische Veränderungen zu einem deutlichen Wachstums- und damit Selektionsvorteil von Myelomzellen gegenüber anderen Sublinien führen. Dies deckt sich mit publizierten Daten, dass bei Rezidiven von Patienten häufig mono- und biallelische Veränderungen in TP53 zu finden waren (Corre et al., 2018; Kortüm, Braggio, et al., 2016; Weinhold et al., 2016).

Bisher wurde das Verhalten von Mutationen in wichtigen Genabschnitten nur in einzelnen Zelllinien untersucht. Um detailliertere Aussagen über das genaue Verhalten von Zellen mit Mutationen unter einer medikamentösen Behandlung und in direkter

Konkurrenz mit anderen Mutationen treffen zu können, müssen weiterführende Modelle aufgestellt werden.

Ein limitierender Faktor für die Anwendung in vergrößertem Ausmaß könnte die begrenzte Anzahl an Zelllinien darstellen, welche mit jeweils verschiedenen Mutationen in direkter Konkurrenz inkubiert werden können. Es muss eine mit den zur Verfügung stehenden Geräten messbare Zellanzahl erreicht werden sowie etwaige Messungenauigkeiten durch eine bestimmte Anzahl an Zellen ausgeschlossen sein.

In dieser Arbeit wurden weitere Farbvektoren bestehend aus einer Kombination zweier fluoreszierender Proteine entwickelt. Mit diesem Versuchsansatz wurde eine dritte Farbexpression ermöglicht. Dies könnte ein Ansatz sein, die Anwendungsmöglichkeiten dieses Zellmodells deutlich zu erweitern. Weitere Experimente werden benötigt, um dieses Modell zu evaluieren.

Des Weiteren könnte die Möglichkeit von nachlassenden Farbexpressionen für Ansätze, die über einen deutlich längeren Zeitraum als es in dieser Arbeit gewählt wurde, ein Problem darstellen. Diese Arbeit verzeichnet jedoch bei einer maximalen Inkubationszeit von 80 Tagen kein Nachlassen der Farbexpression. Zur genaueren Untersuchung des Farbverhaltens wären Versuchsansätze mit erweiterten Inkubationszeiten notwendig.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein modulares Zelllinienmodell zur Visualisierung klonaler Evolutionsmechanismen etabliert. Hierfür wurden unterschiedlich fluoreszierende Proteine (LSSmKate2, EGFP, mTagBFP2) durch Anwendung eines Sleeping Beauty basierten Vektorsystems in unterschiedliche Sublinien der Myelom Zelllinie L363 eingebracht. Diese vier Sublinien beinhalten jeweils eine von drei aus primären Patientenproben gewonnenen Mutationen in *IKZF1* (A152T, E170D, R439H) oder den *IKZF1* WT. Die Anwendung von IMiDs führt zu einer Ubiquitinierung des Transkriptionsfaktors *IKZF1* durch die E3-Ubiquitin-Protein-Ligase (CRBN-CUL4) (Kortüm, Zhu, et al., 2015). Durch Mutationen in *IKZF1* kommt es zu Störungen in diesem Prozess und damit zu einer Überexpression von *IKZF1*. Dies wirkt sich wachstumsfördernd auf die Myelomzellen aus (Krönke et al., 2017). Die Auswirkungen der einzelnen Mutationen in *IKZF1* ist aufgrund dessen ein klinisch relevantes Forschungsthema.

In Zellen, die die Mutation A152T tragen, konnte unter der Behandlung mit Lenalidomid eine Überexpression von *IKZF1* beobachtet werden (Barrio et al., 2019). Für die *IKZF1* Mutation E170D konnte ein geringer inhibitorischer Effekt auf den Abbau von *IKZF1* verzeichnet werden. Für die *IKZF1* Mutation R439H wurde während der Inkubation kein inhibitorischer Effekt beobachtet. Um einen direkten Vergleich dieses Effekts durch Mutationen und WT zu ermöglichen, wurde diese in dem etablierten Zelllinien-Vektorsystem angewandt.

In dieser Arbeit wurden jeweils zwei Sublinien mit Zellen des *IKZF1* WT und Zellen mit einer *IKZF1* Mutation mit jeweils unterschiedlich fluoreszierenden Proteinen markiert. Diese wurden gemeinsam unter Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Lenalidomid inkubiert. Somit konnte das Selektionsverhalten mittels Durchflusszytometrie-Auswertungen visualisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die *IKZF1* Mutation A152T einen deutlichen Selektionsvorteil für die Myelomzellen darstellt. Bei den *IKZF1* Mutationen E170D und R439H konnte kein Selektionsvorteil gegenüber dem *IKZF1* WT beobachtet werden.

Unser fluoreszierendes Zelllinienmodell fand in der Folge dieser Arbeit Anwendung in einem Versuchsaufbau von AMO-1 Sublinien mit WT, mono- und biallelischen TP53

Veränderungen. Durch das Zelllinien-Vektorsystem konnte gezeigt werden, dass biallelische Veränderungen in TP53 einen Selektionsvorteil darstellen und dies zu einem verstärkten Wachstum von Myelomzellen führt (Munawar et al., 2019).

Unser durch diese Arbeit etabliertes Zelllinien-Vektorsystem eröffnet also die Möglichkeit einer Anwendung zur Objektivierung und Sichtbarmachung klonaler Evolutionsmechanismen. Des Weiteren liefert es Hinweise zur Resistenzentwicklung beim Multiplen Myelom und kann einen Beitrag zur Weiterentwicklung individualisierter Therapie bei Patienten mit Multiplen Myelom leisten.

7 Literaturverzeichnis

- Alexander, D. D., Mink, P. J., Adami, H.-O., Cole, P., Mandel, J. S., Oken, M. M., & Trichopoulos, D. (2007). Multiple myeloma: A review of the epidemiologic literature. *International Journal of Cancer*, *120*(S12), 40-61. <https://doi.org/10.1002/ijc.22718>
- Barrio, S., Munawar, U., Zhu, Y. X., Giesen, N., Shi, C.-X., Da Viá, M., 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. (2019). IKZF1/3 and CRL4-CRBN E3 ubiquitin ligase mutations and IMiD resistance in multiple myeloma. *Haematologica*, *105*(5), e237-e241. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.217943>
- Bolli, N., Avet-Loiseau, H., Wedge, D. C., Van Loo, P., Alexandrov, L. B., Martincorena, I., Dawson, K. J., Iorio, F., Nik-Zainal, S., Bignell, G. R., Hinton, J. W., Li, Y., Tubio, J. M. C., McLaren, S., O' Meara, S., Butler, A. P., Teague, J. W., Mudie, L., Anderson, E., Rashid, N., Tai, Y.-T., Shammash, M. A., Sperling, A. S., Fulciniti, M., Richardson, P. G., Parmigiani, G., Magrangeas, F., Minvielle, S., Moreau, P., Attal, M., Facon, T., Futreal, P. A., Anderson, K. C., Campbell, P. J., & Munshi, N. C. (2014). Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nature Communications*, *5*(1), 2997. <https://doi.org/10.1038/ncomms3997>
- Chesi, M., & Bergsagel, P. L. (2013). Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *International Journal of Hematology*, *97*(3), 313-323. <https://doi.org/10.1007/s12185-013-1291-2>
- Corre, J., Cleynen, A., Robiou du Pont, S., Buisson, L., Bolli, N., Attal, M., Munshi, N., & Avet-Loiseau, H. (2018). Multiple myeloma clonal evolution in homogeneously treated patients. *Leukemia*, *32*(12), 2636-2646. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0153-6>
- Day, R. N., & Davidson, M. W. (2009). The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society Reviews*, *38*(10), 2887-2921. <https://doi.org/10.1039/b901966a>
- Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. (2018). *Multiples Myelom*. Retrieved 10.04.2023 from <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/multiples-myelom/@@guideline/html/index.html>
- Diehl, V., Schaadt, M., Kirchner, H., Hellriegel, K. P., Gudat, F., Fonatsch, C., Laskewitz, E., & Guggenheim, R. (1978). Long-term cultivation of plasma cell leukemia cells and autologous lymphoblasts (LCL) in vitro: A comparative study. *Blut*, *36*(6), 331-338. <https://doi.org/10.1007/BF01000590>
- Dimopoulos, M. A., Kyle, R., Fermand, J.-P., Rajkumar, S. V., San Miguel, J., Chanan-Khan, A., Ludwig, H., Joshua, D., Mehta, J., Gertz, M., Avet-Loiseau, H., Beksaç, M., Anderson, K. C., Moreau, P., Singhal, S., Goldschmidt, H., Boccadoro, M., Kumar, S., Giralt, S., Munshi, N. C., & Jagannath, S. (2011). Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the

- International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood*, 117(18), 4701. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-299529>
- Dimopoulos, M. A., Moreau, P., Terpos, E., Mateos, M. V., Zweegman, S., Cook, G., Delforge, M., Hájek, R., Schjesvold, F., Cavo, M., Goldschmidt, H., Facon, T., Einsele, H., Boccadoro, M., San-Miguel, J., Sonneveld, P., & Mey, U. (2021). Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 32(3), 309-322. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.11.014>
- Dimopoulos, M. A., Moulopoulos, L. A., Maniatis, A., & Alexanian, R. (2000). Solitary plasmacytoma of bone and asymptomatic multiple myeloma. *Blood*, 96(6), 2037-2044. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.6.2037>
- Durie, B. G. M., Harousseau, J. L., Miguel, J. S., Bladé, J., Barlogie, B., Anderson, K., Gertz, M., Dimopoulos, M., Westin, J., Sonneveld, P., Ludwig, H., Gahrton, G., Beksac, M., Crowley, J., Belch, A., Boccadoro, M., Turesson, I., Joshua, D., Vesole, D., Kyle, R., Alexanian, R., Tricot, G., Attal, M., Merlini, G., Powles, R., Richardson, P., Shimizu, K., Tosi, P., Morgan, G., Rajkumar, S. V., & on behalf of the International Myeloma Working, G. (2006). International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 20(9), 1467-1473. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404284>
- Fairfield, H., Falank, C., Avery, L., & Reagan, M. R. (2016). Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1364(1), 32-51. <https://doi.org/10.1111/nyas.13038>
- Fernández de Larrea, C., Kyle, R., Rosiñol, L., Paiva, B., Engelhardt, M., Usmani, S., Caers, J., Gonsalves, W., Schjesvold, F., Merlini, G., Lentzsch, S., Ocio, E., Garderet, L., Moreau, P., Sonneveld, P., Badros, A., Gahrton, G., Goldschmidt, H., Tuchman, S., Einsele, H., Durie, B., Wirk, B., Musto, P., Hayden, P., Kaiser, M., Miguel, J., Bladé, J., Rajkumar, S., & Mateos, M. V. (2021). Primary plasma cell leukemia: consensus definition by the International Myeloma Working Group according to peripheral blood plasma cell percentage. *Blood Cancer Journal*, 11(12). <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00587-0>
- GEKID-atlas. (o.J.). Retrieved 10.04.2023 from <https://atlas.gekid.de/CurrentVersion/atlas.html>
- Goldschmidt, H. (2011). *Das multiple Myelom (Plasmozytom): Diagnose und Therapie* (Vol. 2). Uni-Med-Verlag.
- Greipp, P. R., Miguel, J. S., Durie, B. G., Crowley, J. J., Barlogie, B., Bladé, J., Boccadoro, M., Child, J. A., Avet-Loiseau, H., & Kyle, R. A. (2005). International staging system for multiple myeloma. *Journal of clinical oncology*, 23(15), 3412-3420. <https://doi.org/10.1200/jco.2005.04.242>
- International Myeloma Working Group. (2003). Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British Journal of Haematology*, 121(5), 749-757. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04355.x>

- International Myeloma Working Group. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology*, 15(12), e538-e548. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5)
- Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., Yamaguchi, Y., & Handa, H. (2010). Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science*, 327(5971). <https://doi.org/10.1126/science.1177319>
- Jackson, G., Einsele, H., Moreau, P., & Miguel, J. S. (2005). Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in the treatment of hematologic malignancies. *Cancer Treatment Reviews*, 31(8), 591-602. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2005.10.001>
- Keats, J. J., Chesi, M., Egan, J. B., Garbitt, V. M., Palmer, S. E., Braggio, E., Van Wier, S., Blackburn, P. R., Baker, A. S., Dispenzieri, A., Kumar, S., Rajkumar, S. V., Carpten, J. D., Barrett, M., Fonseca, R., Stewart, A. K., & Bergsagel, P. L. (2012). Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*, 120(5), 1067. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-405985>
- Kehrer, M., Koob, S., Strauss, A., Wirtz, D. C., & Schmolders, J. (2017). Multiples Myelom – aktuelle Standards in Diagnostik und Therapie [Multiple Myeloma – Current Status in Diagnostic Testing and Therapy]. *Z Orthop Unfall*, 155(05), 575-586. <https://doi.org/10.1055/s-0043-110224>
- Kortüm, K. M. (2021). *Multiples Myelom 2021 - ONKOPEDIA – Online-Seminar 19.11.2021*.
- Kortüm, K. M., Braggio, E., Bruins, L., Barrio, S., Shi, C. S., Zhu, Y. X., Tibes, R., Viswanatha, D., Votruba, P., Ahmann, G., Fonseca, R., Jedlowski, P., Schlam, I., Kumar, S., Bergsagel, P. L., & Stewart, A. K. (2016). Panel sequencing for clinically oriented variant screening and copy number detection in 142 untreated multiple myeloma patients. *Blood Cancer Journal*, 6(2), e397-e397. <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.1>
- Kortüm, K. M., Langer, C., Monge, J., Bruins, L., Egan, J. B., Zhu, Y. X., Shi, C. X., Jedlowski, P., Schmidt, J., Ojha, J., Bullinger, L., Liebisch, P., Kull, M., Champion, M. D., Van Wier, S., Ahmann, G., Rasche, L., Knop, S., Fonseca, R., Einsele, H., Stewart, A. K., & Braggio, E. (2015). Targeted sequencing using a 47 gene multiple myeloma mutation panel (M3P) in -17p high risk disease [<https://doi.org/10.1111/bjh.13171>]. *British Journal of Haematology*, 168(4), 507-510. <https://doi.org/10.1111/bjh.13171>
- Kortüm, K. M., Mai, E. K., Hanafiah, N. H., Shi, C.-X., Zhu, Y.-X., Bruins, L., Barrio, S., Jedlowski, P., Merz, M., Xu, J., Stewart, R. A., Andrulis, M., Jauch, A., Hillengass, J., Goldschmidt, H., Bergsagel, P. L., Braggio, E., Stewart, A. K., & Raab, M. S. (2016). Targeted sequencing of refractory myeloma reveals a high incidence of mutations in CRBN and ras pathway genes. *Blood*, 128(9), 1226. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-02-698092>
- Kortüm, K. M., Zhu, Y. X., Shi, C. X., Jedlowski, P., & Stewart, A. K. (2015). Cereblon binding molecules in multiple myeloma. *Blood Reviews*, 29(5), 329-334. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2015.03.003>
- Krönke, J., Kuchenbauer, F., Kull, M., Teleanu, V., Bullinger, L., Bunjes, D., Greiner, A., Kolmus, S., Köpff, S., Schreder, M., Mügge, L. O., Straka, C., Engelhardt,

- M., Döhner, H., Einsele, H., Bassermann, F., Bargou, R., Knop, S., & Langer, C. (2017). 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*, *31*(6), 1363-1367. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.384>
- Krönke, J., Udeshi, N. D., Narla, A., Grauman, P., Hurst, S. N., McConkey, M., Svinkina, T., Heckl, D., Comer, E., Li, X., Ciarlo, C., Hartman, E., Munshi, N., Schenone, M., Schreiber, S. L., Carr, S. A., & Ebert, B. L. (2014). Lenalidomide Causes Selective Degradation of IKZF1 and IKZF3 in Multiple Myeloma Cells. *Science*, *343*(6168), 301. <https://doi.org/10.1126/science.1244851>
- Kumar, A., Loughran, T., Alsina, M., Durie, B. G. M., & Djulbegovic, B. (2003). Management of multiple myeloma: a systematic review and critical appraisal of published studies. *The Lancet Oncology*, *4*(5), 293-304. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(03\)01077-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(03)01077-5)
- Kyle, R. A., Gertz, M. A., Witzig, T. E., Lust, J. A., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Fonseca, R., Rajkumar, S. V., Offord, J. R., Larson, D. R., Plevak, M. E., Therneau, T. M., & Greipp, P. R. (2003). Review of 1027 Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Mayo Clinic Proceedings*, *78*(1), 21-33. <https://doi.org/10.4065/78.1.21>
- Kyle, R. A., & Rajkumar, S. V. (2004). Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, *351*(18), 1860-1873. <https://doi.org/10.1056/NEJMra041875>
- Kyle, R. A., & Rajkumar, S. V. (2009). Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*, *23*(1), 3-9. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.291>
- Kyle, R. A., Therneau Tm Fau - Rajkumar, S. V., Rajkumar Sv Fau - Offord, J. R., Offord Jr Fau - Larson, D. R., Larson Dr Fau - Plevak, M. F., Plevak Mf Fau - Melton, L. J., 3rd, & Melton, L. J., 3rd. (2002). A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *New England Journal of Medicine*, *346*(8), 564-569. <https://doi.org/10.1056/nejmoa01133202>
- Landgren, O., Kyle, R. A., Pfeiffer, R. M., Katzmann, J. A., Caporaso, N. E., Hayes, R. B., Dispenzieri, A., Kumar, S., Clark, R. J., & Baris, D. (2009). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*, *113*(22), 5412-5417. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-194241>
- Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. (2019). *L363 ACC49*. Retrieved 03.10.2019 from <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-49>
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF),. (2017). *Supportive Therapie bei onkologischen PatientInnen - Langversion 1.1*. AWMF Registernummer: 032/054OL. Retrieved 23.09.2019 from <http://leitlinienprogramm.onkologie.de/Supportive-Therapie.95.0.html>
- Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M.-S., & Leahy, D. J. (2013). Chapter Seventeen - Generating Mammalian Stable Cell Lines by Electroporation. In J. Lorsch (Ed.),

- Methods in Enzymology* (Vol. 529, pp. 209-226). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00017-3>
- Lopez-Girona, A., Mendy, D., Ito, T., Miller, K., Kang, J., Karasawa, S., Carmel, G., Jackson, P., Abbasian, M., Mahmoudi, A., Cathers, B., Rychak, E., Gaidarova, S., Chen, R., Schafer, P. H., Handa, H., Daniel, T. O., Evans, J. F., & Chopra, R. (2012). Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. *Leukemia*, *26*(11), 2326-2335. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.119>
- Manier, S., Salem, K. Z., Park, J., Landau, D. A., Getz, G., & Ghobrial, I. M. (2017). Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *14*(2), 100-113. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.122>
- Mao, P., Wyrick, J. J., Roberts, S. A., & Smerdon, M. J. (2017). UV-Induced DNA Damage and Mutagenesis in Chromatin. *Photochemistry and Photobiology*, *93*(1), 216-228. <https://doi.org/10.1111/php.12646>
- Mateos, M.-V., Kumar, S., Dimopoulos, M. A., González-Calle, V., Kastiris, E., Hajek, R., De Larrea, C. F., Morgan, G. J., Merlini, G., Goldschmidt, H., Galdes, C., Gozzetti, A., Kyriakou, C., Garderet, L., Hansson, M., Zamagni, E., Fantl, D., Leleu, X., Kim, B.-S., Esteves, G., Ludwig, H., Usmani, S., Min, C.-K., Qi, M., Ukropec, J., Weiss, B. M., Rajkumar, S. V., Durie, B. G. M., & San-Miguel, J. (2020). International Myeloma Working Group risk stratification model for smoldering multiple myeloma (SMM). *Blood Cancer Journal*, *10*(10), 102. <https://doi.org/10.1038/s41408-020-00366-3>
- Mateos, M.-V., & Landgren, O. (2016). MGUS and smoldering multiple myeloma: diagnosis and epidemiology. In *Plasma Cell Dyscrasias* (pp. 3-12). Springer.
- Mateos, M.-V., & San Miguel, J. F. (2017). Management of multiple myeloma in the newly diagnosed patient. *Hematology*, *2017*(1), 498-507. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2017.1.498>
- Maura, F., Bolli, N., Angelopoulos, N., Dawson, K. J., Leongamornlert, D., Martincorena, I., Mitchell, T. J., Fullam, A., Gonzalez, S., Szalat, R., Abascal, F., Rodriguez-Martin, B., Samur, M. K., Glodzik, D., Roncador, M., Fulciniti, M., Tai, Y. T., Minvielle, S., Magrangeas, F., Moreau, P., Corradini, P., Anderson, K. C., Tubio, J. M. C., Wedge, D. C., Gerstung, M., Avet-Loiseau, H., Munshi, N., & Campbell, P. J. (2019). Genomic landscape and chronological reconstruction of driver events in multiple myeloma. *Nature Communications*, *10*(1), 3835. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11680-1>
- Merlini, G. (2014). Determining the significance of MGUS. *Blood*, *123*(3), 305. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-12-539940>
- Merz, M., Jansen, L., Castro, F. A., Hillengass, J., Salwender, H., Weisel, K., Scheid, C., Luttmann, S., Emrich, K., Holleczeck, B., Katalinic, A., Nennecke, A., Straka, C., Langer, C., Engelhardt, M., Einsele, H., Kröger, N., Beelen, D., Dreger, P., Brenner, H., & Goldschmidt, H. (2016). Survival of elderly patients with multiple myeloma—Effect of upfront autologous stem cell transplantation. *European Journal of Cancer*, *62*, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.04.004>

- Mhaskar, R., Redzepovic, J., Wheatley, K., Clark, O. A. C., Miladinovic, B., Glasmacher, A., Kumar, A., & Djulbegovic, B. (2012). Bisphosphonates in multiple myeloma: a network meta-analysis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(5). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003188.pub3>
- Michels, T. C., & Petersen, K. E. (2017). Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *American family physician*, 95(6).
- Mikhael, J. R., Dingli D Fau - Roy, V., Roy V Fau - Reeder, C. B., Reeder Cb Fau - Buadi, F. K., Buadi Fk Fau - Hayman, S. R., Hayman Sr Fau - Dispenzieri, A., Dispenzieri A Fau - Fonseca, R., Fonseca R Fau - Sher, T., Sher T Fau - Kyle, R. A., Kyle Ra Fau - Lin, Y., Lin Y Fau - Russell, S. J., Russell Sj Fau - Kumar, S., Kumar S Fau - Bergsagel, P. L., Bergsagel Pl Fau - Zeldenrust, S. R., Zeldenrust Sr Fau - Leung, N., Leung N Fau - Drake, M. T., Drake Mt Fau - Kapoor, P., Kapoor P Fau - Ansell, S. M., Ansell Sm Fau - Witzig, T. E., Witzig Te Fau - Lust, J. A., Lust Ja Fau - Dalton, R. J., Dalton Rj Fau - Gertz, M. A., Gertz Ma Fau - Stewart, A. K., Stewart Ak Fau - Rajkumar, S. V., Rajkumar Sv Fau - Chanan-Khan, A., Chanan-Khan A Fau - Lacy, M. Q., & Lacy, M. Q. (2013). Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clinic Proceedings*, 88(4). <https://doi.org/360-376>
- Mina, R., D'Agostino, M., Cerrato, C., Gay, F., & Palumbo, A. (2017). Plasma cell leukemia: update on biology and therapy. *Leukemia & Lymphoma*, 58(7), 1538-1547. <https://doi.org/10.1080/10428194.2016.1250263>
- Moreau, P. (2017). How I treat myeloma with new agents. *Blood*, 130(13), 1507-1513. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-743203>
- Moreau, P., Hulin, C., Perrot, A., Arnulf, B., Belhadj, K., Benboubker, L., Béné, M. C., Zweegman, S., Caillon, H., Caillot, D., Corre, J., Delforge, M., Dejoie, T., Doyen, C., Facon, T., Sonntag, C., Fontan, J., Mohty, M., Jie, K. S., Karlin, L., Kuhnowski, F., Lambert, J., Leleu, X., Macro, M., Orsini-Piocelle, F., Roussel, M., Stoppa, A. M., van de Donk, N., Wuillème, S., Broijl, A., Touzeau, C., Tiab, M., Marolleau, J. P., Meuleman, N., Vekemans, M. C., Westerman, M., Klein, S. K., Levin, M. D., Offner, F., Escoffre-Barbe, M., Eveillard, J. R., Garidi, R., Ahmadi, T., Krevvata, M., Zhang, K., de Boer, C., Vara, S., Kampfenkel, T., Vanquichelberghe, V., Vermeulen, J., Avet-Loiseau, H., & Sonneveld, P. (2021). Maintenance with daratumumab or observation following treatment with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab and autologous stem-cell transplant in patients with newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): an open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 22(10). [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(21\)00428-9](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(21)00428-9)
- Moreau, P., Masszi, T., Grzasko, N., Bahlis, N. J., Hansson, M., Pour, L., Sandhu, I., Ganly, P., Baker, B. W., Jackson, S. R., Stoppa, A.-M., Simpson, D. R., Gimsing, P., Palumbo, A., Garderet, L., Cavo, M., Kumar, S., Touzeau, C., Buadi, F. K., Laubach, J. P., Berg, D. T., Lin, J., Di Bacco, A., Hui, A.-M., van de Velde, H., & Richardson, P. G. (2016). Oral Ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 374(17), 1621-1634. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516282>

- Munawar, U., Rasche, L., Müller, N., Vogt, C., Da-Via, M., Haertle, L., Arampatzi, P., Dietrich, S., Roth, M., Garitano-Trojaola, A., Steinhardt, M. J., Strifler, S., Gallardo, M., Martinez-Lopez, J., Bargou, R. C., Heckel, T., Einsele, H., Stühmer, T., Kortüm, K. M., & Barrio, S. (2019). Hierarchy of mono- and biallelic TP53 alterations in multiple myeloma cell fitness. *Blood*, *134*(10), 836-840. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000080>
- National Cancer Institute. (o.J.). *Cancer Stat Facts: Myeloma*. Retrieved 10.04.2023 from <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/mulmy.html>
- Nijhof, I. S., van de Donk, N. W. C. J., Zweegman, S., & Lokhorst, H. M. (2018). Current and New Therapeutic Strategies for Relapsed and Refractory Multiple Myeloma: An Update. *Drugs*, *78*(1), 19-37. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0841-y>
- Palumbo, A., Avet-Loiseau, H., Oliva, S., Lokhorst, H. M., Goldschmidt, H., Rosinol, L., Richardson, P., Caltagirone, S., Lahuerta, J. J., Facon, T., Bringhen, S., Gay, F., Attal, M., Passera, R., Spencer, A., Offidani, M., Kumar, S., Musto, P., Lonial, S., Petrucci, M. T., Orłowski, R. Z., Zamagni, E., Morgan, G., Dimopoulos, M. A., Durie, B. G. M., Anderson, K. C., Sonneveld, P., San Miguel, J., Cavo, M., Rajkumar, S. V., & Moreau, P. (2015). Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *Journal of clinical oncology*, *33*(26), 2863-2869. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.2267>
- Pawlyn, C., & Morgan, G. J. (2017). Evolutionary biology of high-risk multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer*, *17*(9), 543-556. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.63>
- Piatkevich, K. D., & Verkhusha, V. V. (2011). Chapter 17 - Guide to Red Fluorescent Proteins and Biosensors for Flow Cytometry. In Z. Darzynkiewicz, E. Holden, A. Orfao, W. Telford, & D. Wlodkovic (Eds.), *Methods in Cell Biology* (Vol. 102, pp. 431-461). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374912-3.00017-1>
- Podar, K., Shah, J., Chari, A., Richardson, P. G., & Jagannath, S. (2020). Selinexor for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *21*(4). <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1707184>
- Pönisch, W., Mitrou Ps Fau - Merkle, K., Merkle K Fau - Herold, M., Herold M Fau - Assmann, M., Assmann M Fau - Wilhelm, G., Wilhelm G Fau - Dachselt, K., Dachselt K Fau - Richter, P., Richter P Fau - Schirmer, V., Schirmer V Fau - Schulze, A., Schulze A Fau - Subert, R., Subert R Fau - Harksel, B., Harksel B Fau - Grobe, N., Grobe N Fau - Stelzer, E., Stelzer E Fau - Schulze, M., Schulze M Fau - Bittrich, A., Bittrich A Fau - Freund, M., Freund M Fau - Pasold, R., Pasold R Fau - Friedrich, T., Friedrich T Fau - Helbig, W., Helbig W Fau - Niederwieser, D., & Niederwieser, D. (2006). Treatment of bendamustine and prednisone in patients with newly diagnosed multiple myeloma results in superior complete response rate, prolonged time to treatment failure and improved quality of life compared to treatment with melphalan and prednisone-- a randomized phase III study of the East German Study Group of Hematology

- and Oncology (OSHO). *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 132(4). <https://doi.org/10.1007/s00432-005-0074-4>
- Puyo, S., Montaudon, D., & Pourquier, P. (2014). From old alkylating agents to new minor groove binders. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 89(1), 43-61. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.07.006>
- Rajkumar, S. V. (2012). Preventive strategies in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *American Journal of Hematology*, 87(5), 453-454. <https://doi.org/10.1002/ajh.23204>
- Rajkumar, S. V., Harousseau, J.-L., Durie, B., Anderson, K. C., Dimopoulos, M., Kyle, R., Blade, J., Richardson, P., Orlowski, R., Siegel, D., Jagannath, S., Facon, T., Avet-Loiseau, H., Lonial, S., Palumbo, A., Zonder, J., Ludwig, H., Vesole, D., Sezer, O., Munshi, N. C., & San Miguel, J. (2011). Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood*, 117(18), 4691. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-299487>
- Rasche, L., Chavan, S. S., Stephens, O. W., Patel, P. H., Tytarenko, R., Ashby, C., Bauer, M. A.-O., Stein, C., Deshpande, S., Wardell, C., Buzder, T., Molnar, G., Zangari, M., van Rhee, F., Thanendrarajan, S., Schinke, C., Epstein, J., Davies, F. E., Walker, B. A.-O., Meissner, T., Barlogie, B., Morgan, G. J., & Weinhold, N. (2017). Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00296-y>
- Sanchez, L., Dardac, A., Madduri, D., Richard, S., & Richter, J. A.-O. (2021). B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: the new frontier of targeted therapies. *Therapeutic Advances in Hematology*, 12. <https://doi.org/10.1177/2040620721989585>
- Schmitz, S. (2011). *Der Experimentator: Zellkultur*. Springer-Verlag.
- Schulz, C.-O. (2017). Plasmazellneoplasien. In *Facharztwissen Hämatologie Onkologie* (pp. 511-533). Elsevier.
- Schürch, C. A.-O., Rasche, L. A.-O., Frauenfeld, L., Weinhold, N., & Fend, F. A.-O. X. (2019). A review on tumor heterogeneity and evolution in multiple myeloma: pathological, radiological, molecular genetics, and clinical integration. *Virchows Archiv*, 476(3), 337-351. <https://doi.org/10.1007/s00428-019-02725-3>
- Shah, N., Callander, N., Ganguly, S., Gul, Z., Hamadani, M., Costa, L., Sengsayadeth, S., Abidi, M., Hari, P., Mohty, M., Chen, Y.-B., Koreth, J., Landau, H., Lazarus, H., Leather, H., Majhail, N., Nath, R., Osman, K., Perales, M.-A., Schriber, J., Shaughnessy, P., Vesole, D., Vij, R., Wingard, J., Giralt, S., & Savani, B. N. (2015). Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Multiple Myeloma: Guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21(7), 1155-1166. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.03.002>
- Sonneveld, P., Dimopoulos, M. A., Beksac, M., van der Holt, B., Aquino, S., Ludwig, H., Zweegman, S., Zander, T., Zamagni, E., Wester, R., Hajek, R., Pantani, L., Dozza, L., Gay, F., Cafro, A., De Rosa, L., Morelli, A., Gregersen, H.,

- Gulbrandsen, N., Cornelisse, P., Troia, R., Oliva, S., van de Velden, V., Wu, K., Ypma, P., Bos, G., Levin, M. D., Pour, L., Driessen, C., Broijl, A., Croockewit, A., Minnema, M., Waage, A., Hveding, C., van de Donk, N., Offidani, M., Palumbo, G., Spencer, A., Boccadoro, M., & Cavo, M. (2021). Consolidation and Maintenance in Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 39(32), 3613–3622. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.01045>
- Stadtmauer, E. A., Pasquini, M. C., Blackwell, B., Hari, P., Bashey, A., Devine, S., Efebera, Y., Ganguly, S., Gasparetto, C., Geller, N., Horowitz, M. M., Koreth, J., Knust, K., Landau, H., Brunstein, C., McCarthy, P., Nelson, C., Qazilbash, M. H., Shah, N., Vesole, D. H., Vij, R., Vogl, D. T., Giralt, S., Somlo, G., & Krishnan, A. (2019). Autologous Transplantation, Consolidation, and Maintenance Therapy in Multiple Myeloma: Results of the BMT CTN 0702 Trial. *Journal of clinical oncology*, 37(7), 589-597. <https://doi.org/10.1200/jco.18.00685>
- Steinbrunn, T., Chatterjee, M., Bargou, R. C., & Stühmer, T. (2014). Efficient Transient Transfection of Human Multiple Myeloma Cells by Electroporation – An Appraisal. *PLOS ONE*, 9(6), e97443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097443>
- Telford, W. G., Hawley, T., Subach, F., Verkhusha, V., & Hawley, R. G. (2012). Flow cytometry of fluorescent proteins. *Methods*, 57(3), 318-330. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.01.003>
- Watanabe, R., Tokuhira, M., & Kizaki, M. (2013). Current approaches for the treatment of multiple myeloma. *International Journal of Hematology*, 97(3), 333-344. <https://doi.org/10.1007/s12185-013-1294-z>
- Weber, D. M. (2005). Solitary Bone and Extramedullary Plasmacytoma. *Hematology*, 2005(1), 373-376. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2005.1.373>
- Weinhold, N., Ashby, C., Rasche, L., Chavan, S. S., Stein, C., Stephens, O. W., Tytarenko, R., Bauer, M. A., Meissner, T., Deshpande, S., Patel, P. H., Buzder, T., Molnar, G., Peterson, E. A., van Rhee, F., Zangari, M., Thanendrarajan, S., Schinke, C., Tian, E., Epstein, J., Barlogie, B., Davies, F. E., Heuck, C. J., Walker, B. A., & Morgan, G. J. (2016). Clonal selection and double-hit events involving tumor suppressor genes underlie relapse in myeloma. *Blood*, 128(13), 1735-1744. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-723007>
- Weiss, B. M., Abadie, J., Verma, P., Howard, R. S., & Kuehl, W. M. (2009). A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*, 113(22), 5418. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195008>
- Went, M., Kinnarsley, B., Sud, A., Johnson, D. C., Weinhold, N., Försti, A., van Duin, M., Orlando, G., Mitchell, J. S., Kuiper, R., Walker, B. A., Gregory, W. M., Hoffmann, P., Jackson, G. H., Nöthen, M. M., da Silva Filho, M. I., Thomsen, H., Broyl, A., Davies, F. E., Thorsteinsdottir, U., Hansson, M., Kaiser, M., Sonneveld, P., Goldschmidt, H., Stefansson, K., Hemminki, K., Nilsson, B., Morgan, G. J., & Houlston, R. S. (2019). Transcriptome-wide association study of multiple myeloma identifies candidate susceptibility genes. *Human Genomics*, 13(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s40246-019-0231-5>

Went, M., Sud, A., Försti, A., Halvarsson, B.-M., Weinhold, N., Kimber, S., van Duin, M., Thorleifsson, G., Holroyd, A., Johnson, D. C., Li, N., Orlando, G., Law, P. J., Ali, M., Chen, B., Mitchell, J. S., Gudbjartsson, D. F., Kuiper, R., Stephens, O. W., Bertsch, U., Broderick, P., Campo, C., Bandapalli, O. R., Einsele, H., Gregory, W. A., Gullberg, U., Hillengass, J., Hoffmann, P., Jackson, G. H., Jöckel, K.-H., Johnsson, E., Kristinsson, S. Y., Mellqvist, U.-H., Nahi, H., Easton, D., Pharoah, P., Dunning, A., Peto, J., Canzian, F., Swerdlow, A., Eeles, R. A., Kote-Jarai, Z., Muir, K., Pashayan, N., Nickel, J., Nöthen, M. M., Rafnar, T., Ross, F. M., da Silva Filho, M. I., Thomsen, H., Turesson, I., Vangsted, A., Andersen, N. F., Waage, A., Walker, B. A., Wihlborg, A.-K., Broyl, A., Davies, F. E., Thorsteinsdottir, U., Langer, C., Hansson, M., Goldschmidt, H., Kaiser, M., Sonneveld, P., Stefansson, K., Morgan, G. J., Hemminki, K., Nilsson, B., Houlston, R. S., Henderson, B. E., Haiman, C. A., Benlloch, S., Schumacher, F. R., Olama, A. A. A., Berndt, S. I., Conti, D. V., Wiklund, F., Chanock, S., Stevens, V. L., Tangen, C. M., Batra, J., Clements, J., Gronberg, H., Schleutker, J., Albanes, D., Weinstein, S., Wolk, A., West, C., Mucci, L., Cancel-Tassin, G., Koutros, S., Sorensen, K. D., Grindedal, E. M., Neal, D. E., Hamdy, F. C., Donovan, J. L., Travis, R. C., Hamilton, R. J., Ingles, S. A., Rosenstein, B., Lu, Y.-J., Giles, G. G., Kibel, A. S., Vega, A., Kogevinas, M., Penney, K. L., Park, J. Y., Stanford, J. L., Cybulski, C., Nordestgaard, B. G., Brenner, H., Maier, C., Kim, J., John, E. M., Teixeira, M. R., Neuhausen, S. L., De Ruyck, K., Razack, A., Newcomb, L. F., Lessel, D., Kaneva, R., Usmani, N., Claessens, F., Townsend, P. A., Gago-Dominguez, M., Roobol, M. J., Menegaux, F., Khaw, K.-T., Cannon-Albright, L., Pandha, H., Thibodeau, S. N., & The, P. c. (2018). Identification of multiple risk loci and regulatory mechanisms influencing susceptibility to multiple myeloma. *Nature Communications*, 9(1), 3707. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04989-w>

Zentrum für Krebsregisterdaten. (2021). *Multiple Myelom*. Retrieved 29.10.2021 from https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Multiples%20Myelom/multiples_myelom_node.html;jsessionid=706B0D9D8C53BD8C87632C8FF432D683.1_cid372

Zhou, X., Rasche, L., Kortüm, K. M., Mersi, J., & Einsele, H. (2022). BCMA loss in the epoch of novel immunotherapy for multiple myeloma: from biology to clinical practice. *Haematologica*, 108(4). <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.266841>

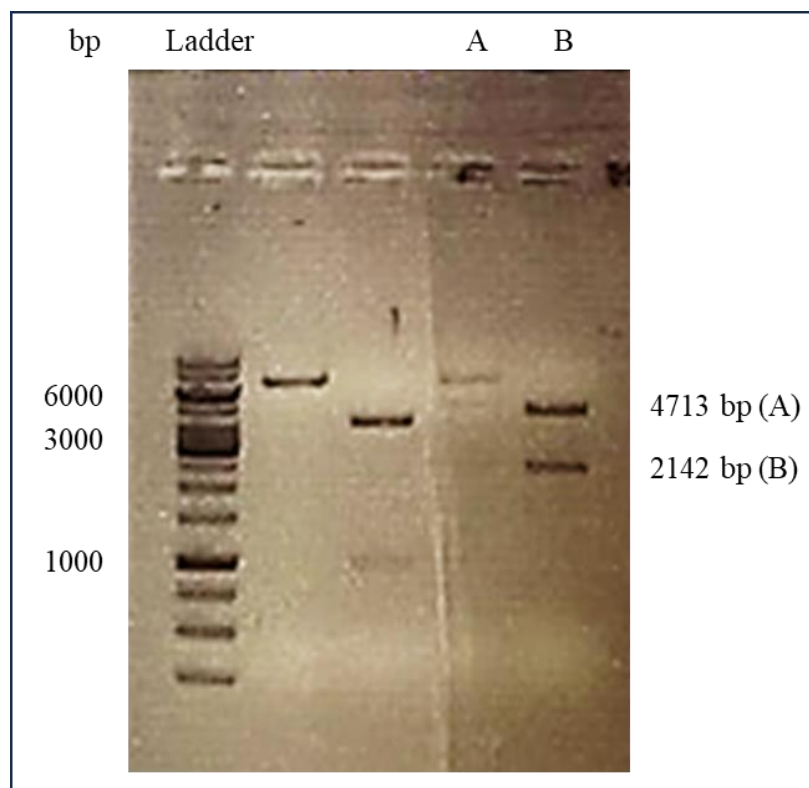
Zhu, Y. X., Braggio, E., Shi, C.-X., Kortuem, K. M., Bruins, L. A., Schmidt, J. E., Chang, X.-B., Langlais, P., Luo, M., Jedlowski, P., LaPlant, B., Laumann, K., Fonseca, R., Bergsagel, P. L., Mikhael, J., Lacy, M., Champion, M. D., & Stewart, A. K. (2014). Identification of cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma. *Blood*, 124(4), 536. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-557819>

Appendix

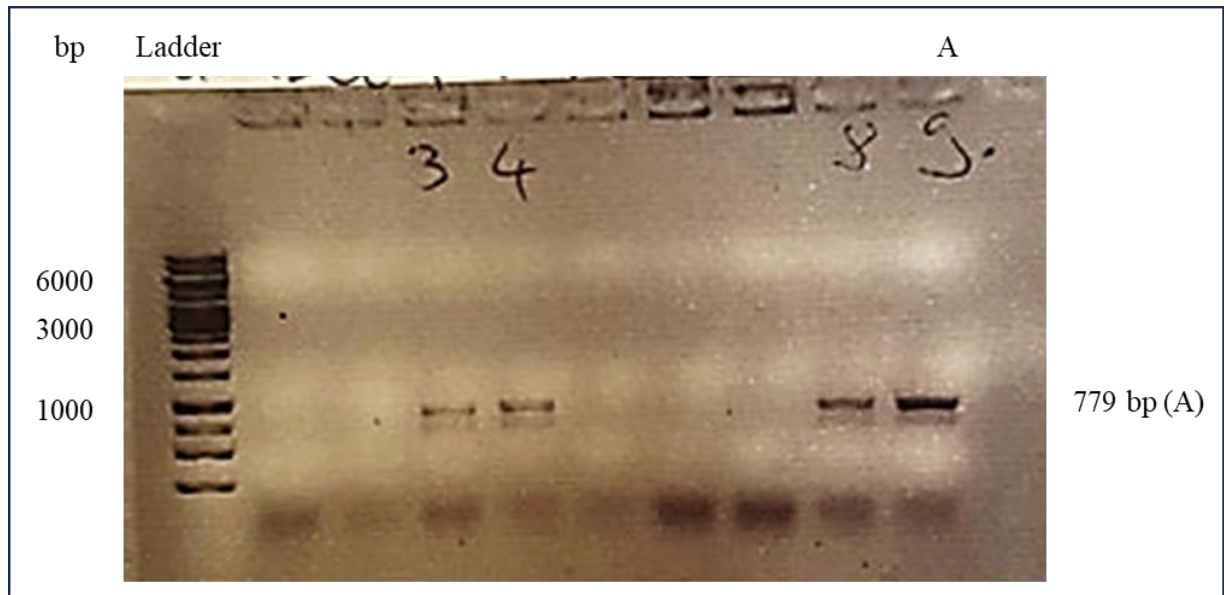
Anhang 1. Ergebnisse der Gelelektrophoresen

Die Größenbestimmung erfolgte mithilfe der GeneRuler™ 1 KB DNA Ladder, die jeweils in der ersten Geltasche (Ladder) aufgebracht wurde. Die entsprechenden Proben wurden in die weiteren Geltaschen aufgebracht und in den folgenden Abbildungen markiert. Die Größe wird in Basenpaaren (bp) angegeben.

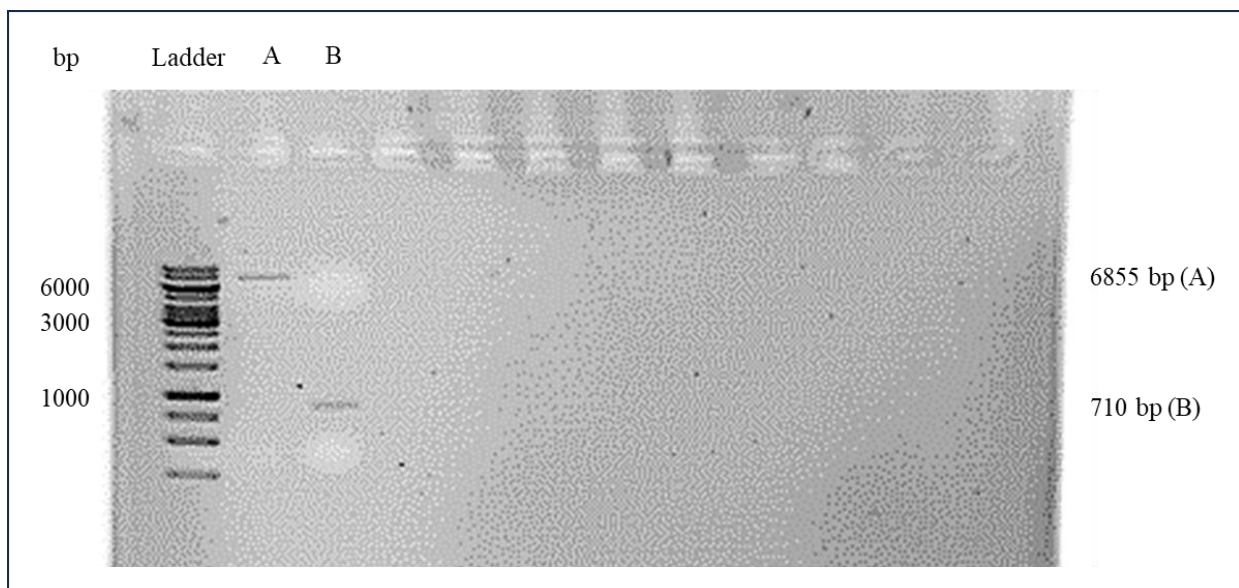
Anhang 1.1. Gelelektrophorese mit pT2-DC (A) und TST-210-pT2SVneo-CMV-EGFP (B) nach Ausschneiden mit Restriktionsenzymen



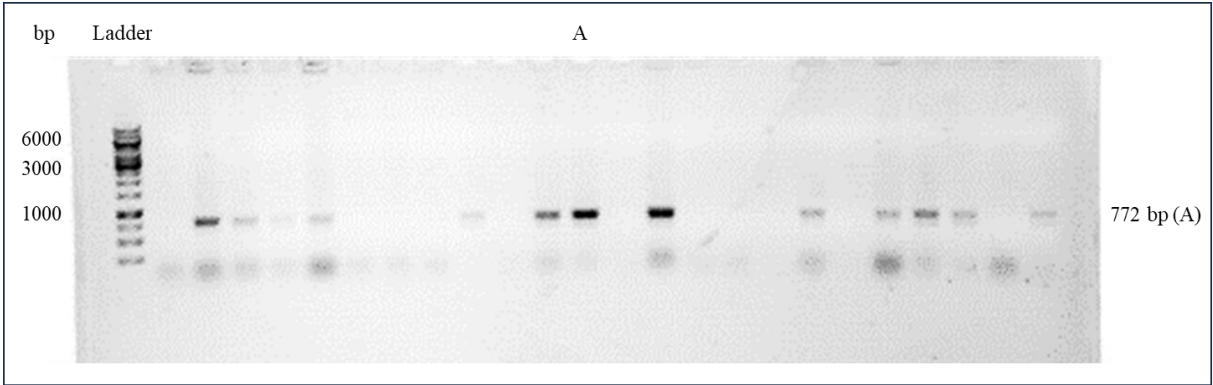
Anhang 1.2. Gelelektrophorese nach Kolonie-PCR zur Erfolgskontrolle nach Ligation von Insert pT2-DC und Backbone TST-210-pT2SVneo-CMV-EGFP (A)



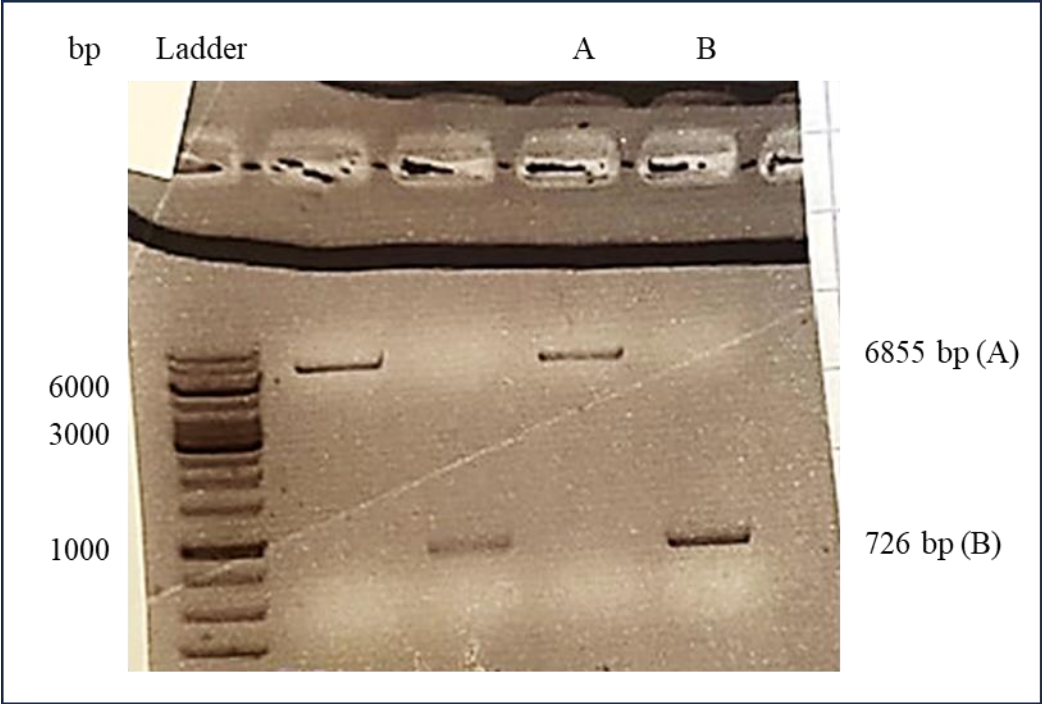
Anhang 1.3. Gelelektrophorese mit pT2-DC-Neo (A) und pLSSmKate2-N1 (B) nach Anschneiden mit Restriktionsenzymen



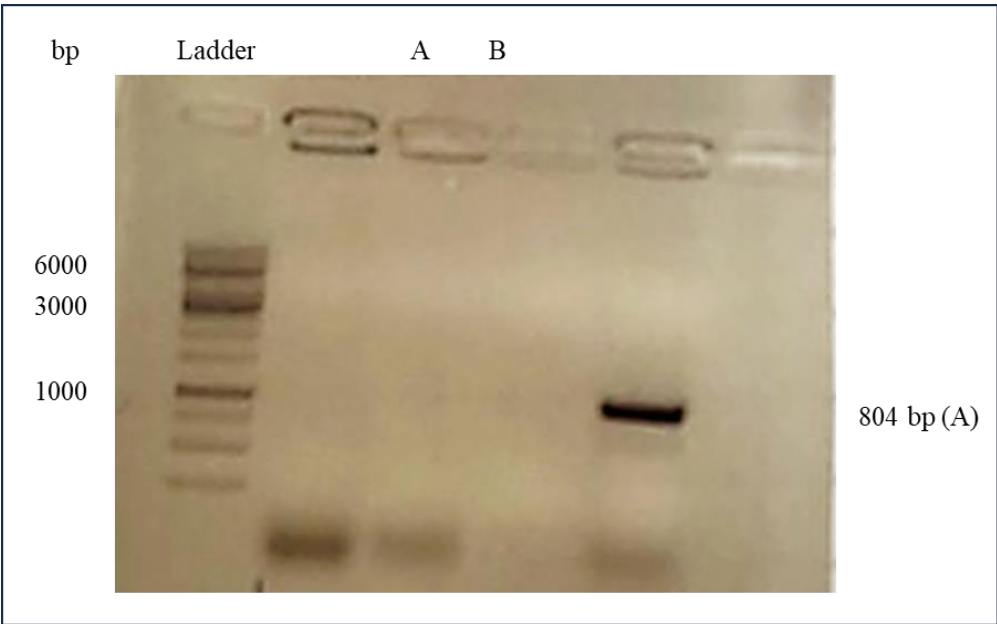
Anhang 1.4. Gelelektrophorese nach Kolonie-PCR als Erfolgskontrolle nach Ligation von Insert pLSSmKate2-N1 und Backbone pT2-DC-Neo (A)



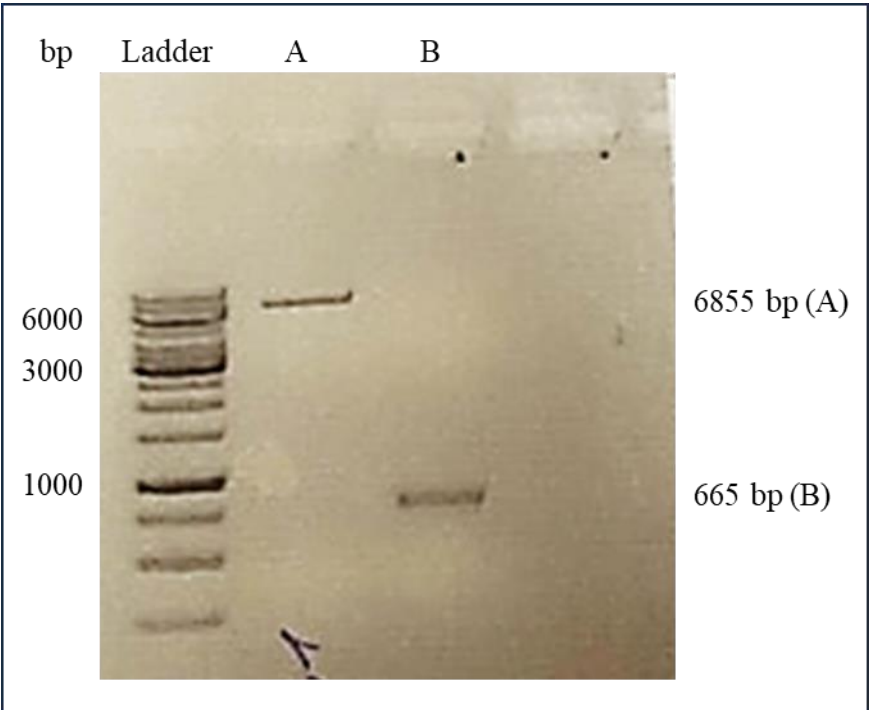
Anhang 1.5. Gelelektrophorese mit pT2-DC-Neo (A) und EGFP (B) nach Anschneiden mit Restriktionsenzymen



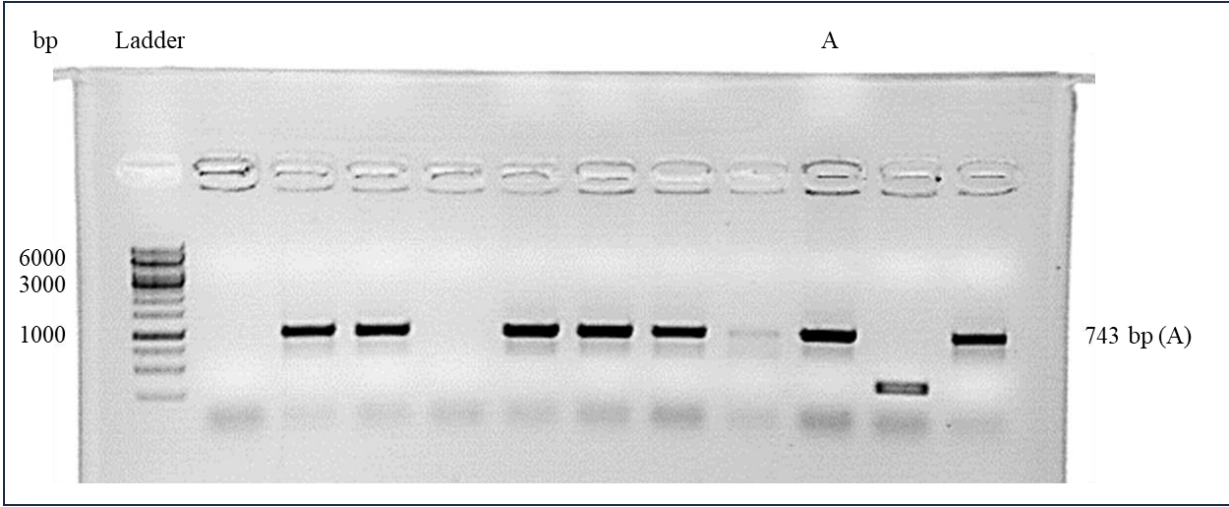
Anhang 1.6. Gelelektrophorese nach Kolonie-PCR als Erfolgskontrolle nach Ligation von Insert EGFP und Backbone pT2-DC-Neo (A)



Anhang 1.7. Gelelektrophorese mit pT2-DC-Neo (A) und mTagBFP2-pBAD (B) nach Anschneiden mit Restriktionsenzymen



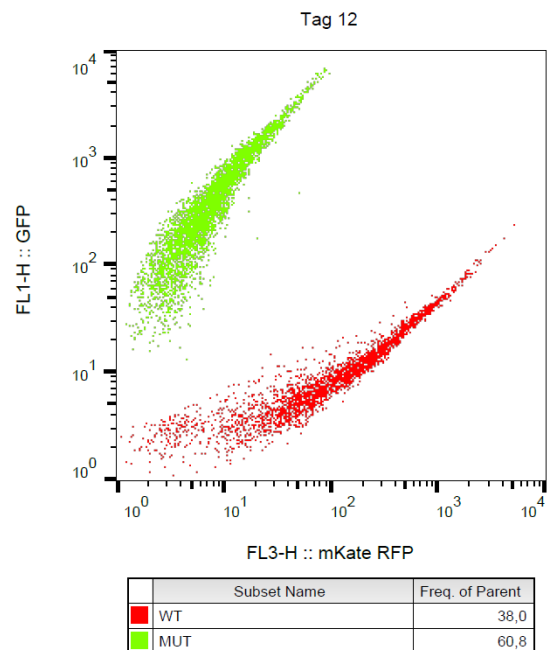
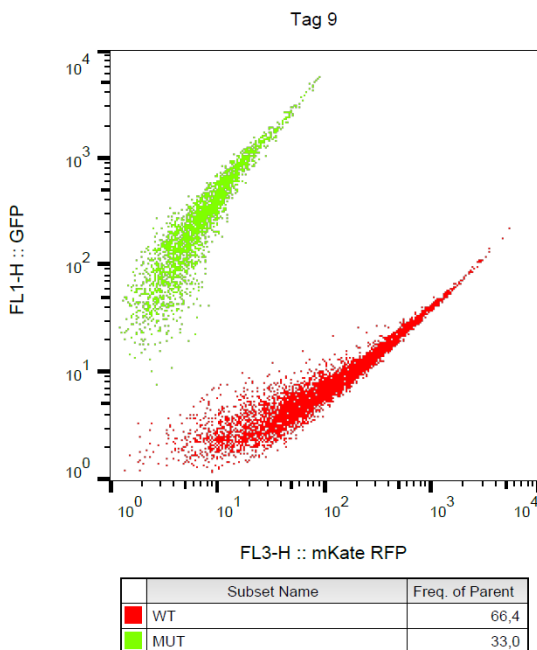
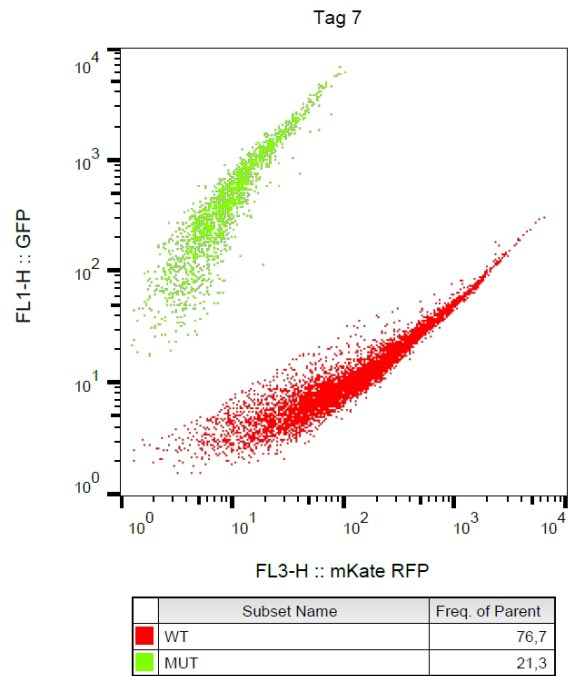
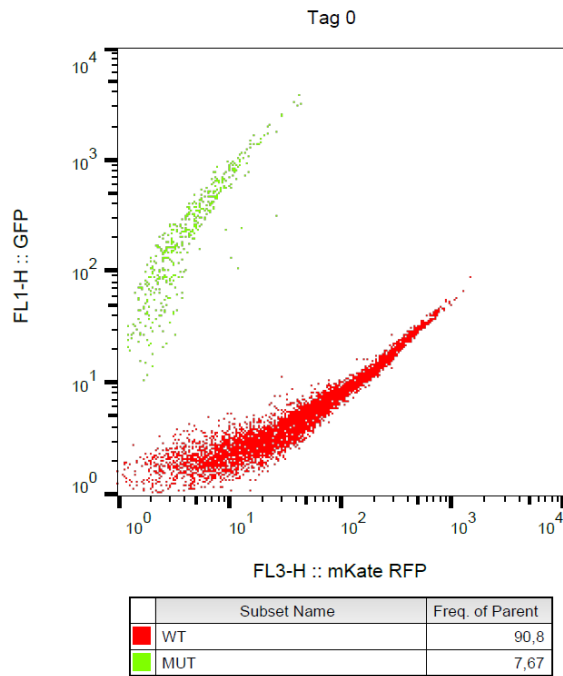
Anhang 1.8. Gelelektrophorese nach Kolonie-PCR als Erfolgskontrolle nach Ligation von Insert mTagBFP2-pBAD und Backbone pT2-DC-Neo (A)

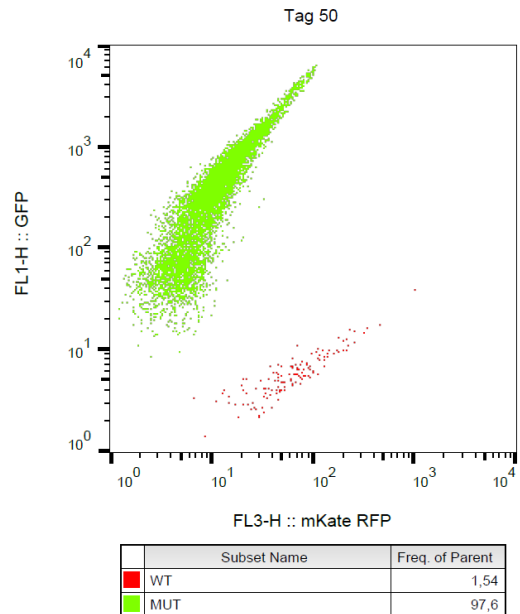
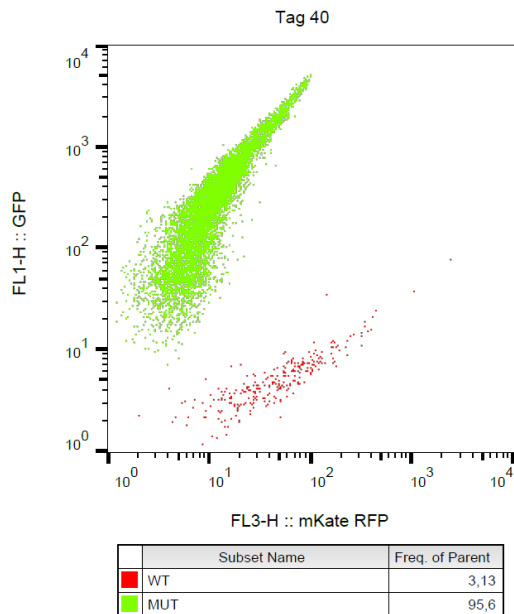
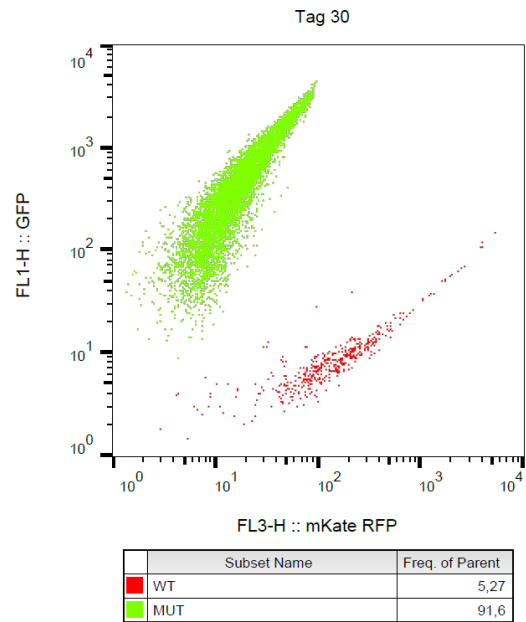
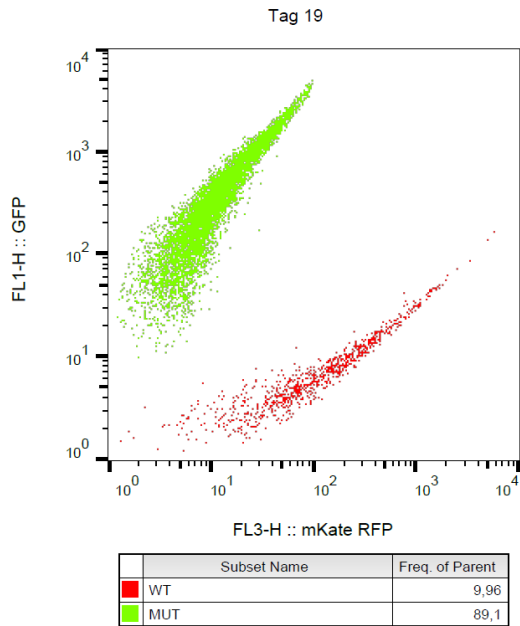
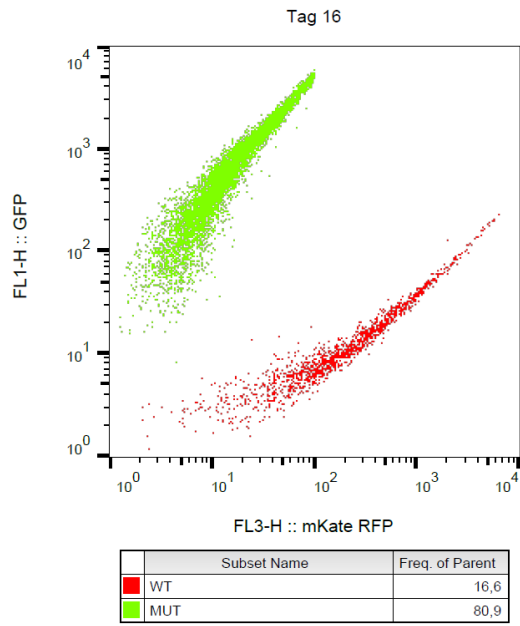


Anhang 2. Durchflusszytometrie -Ergebnisse

Anhang 2.1. Vollständige Durchflusszytometrie -Auswertung von Ansatz 1.1

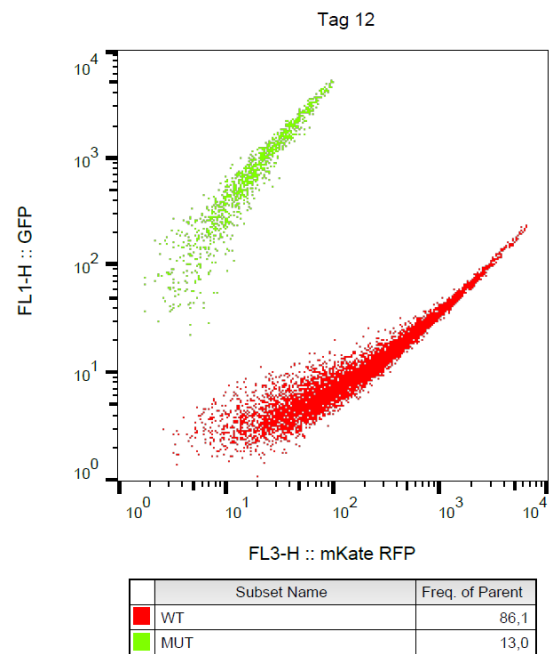
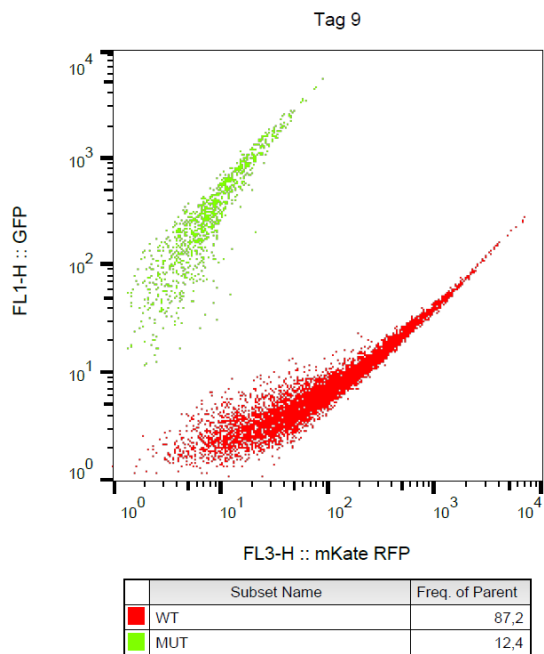
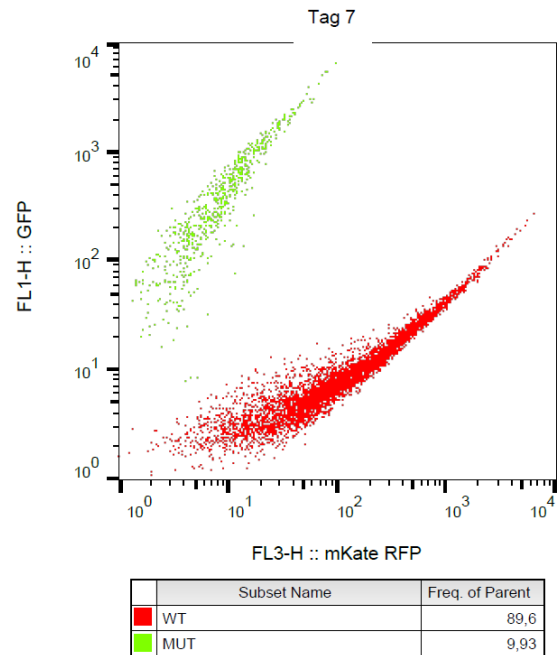
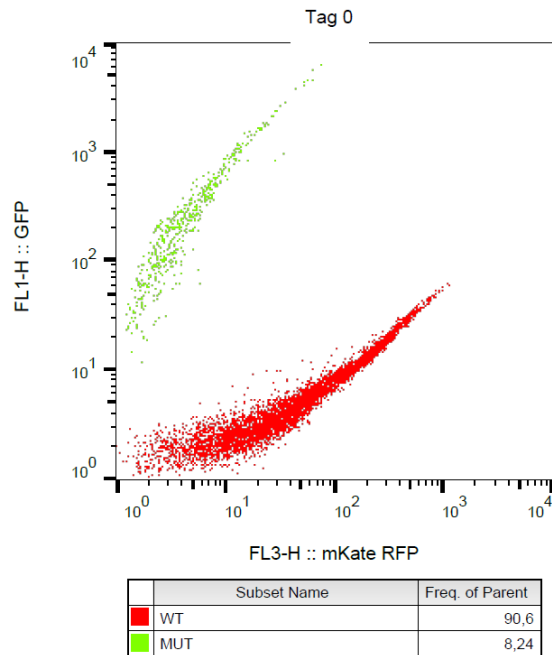
Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 bis Tag 50. Die rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT sind im Anhang 2.1 rot dargestellt. Grün fluoreszierende Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation A152T werden im Anhang 2.1 grün dargestellt.

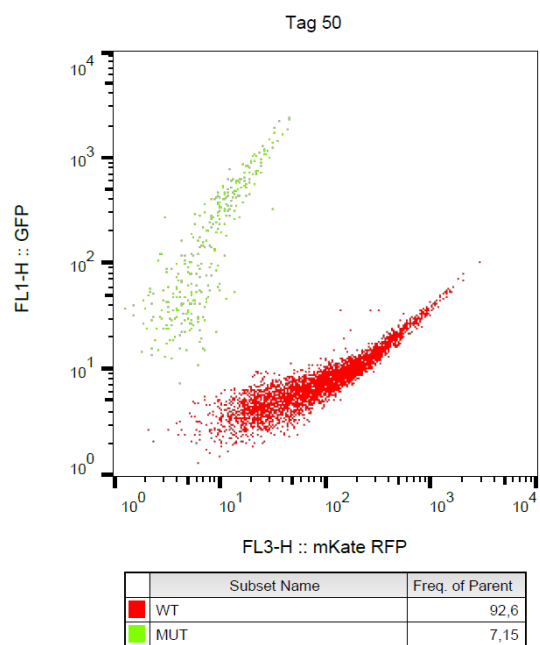
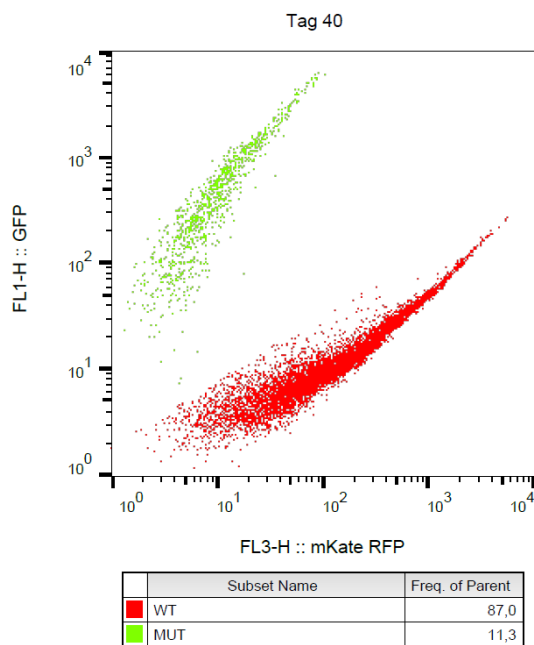
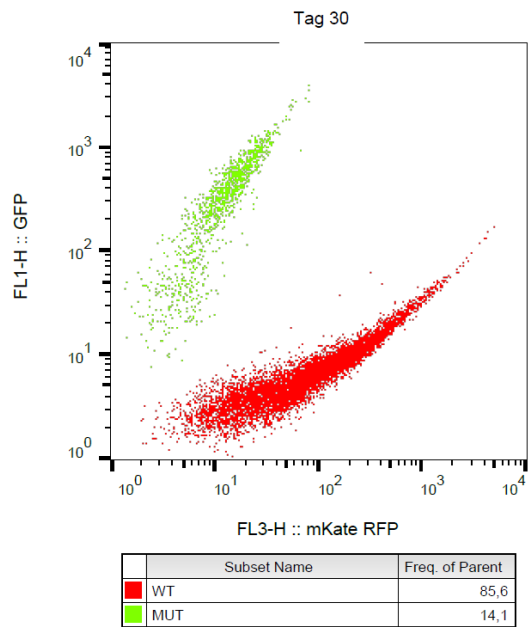
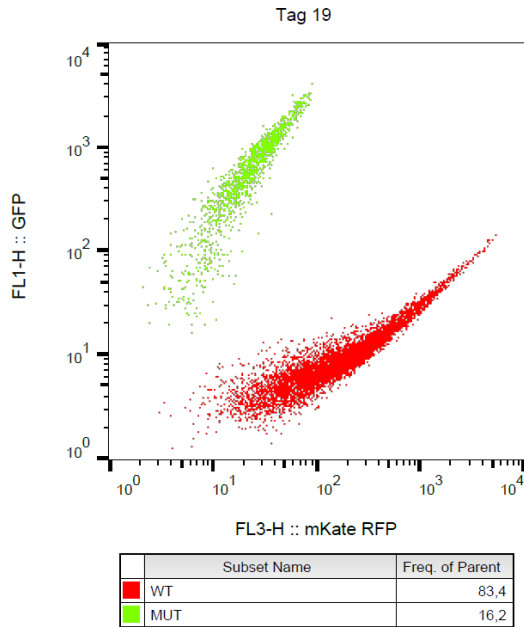
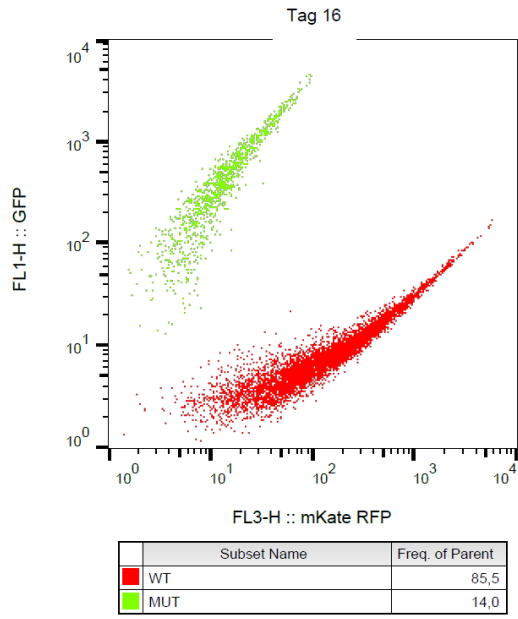




Anhang 2.2. Vollständige Durchflusszytometrie -Auswertung von Ansatz 1.2

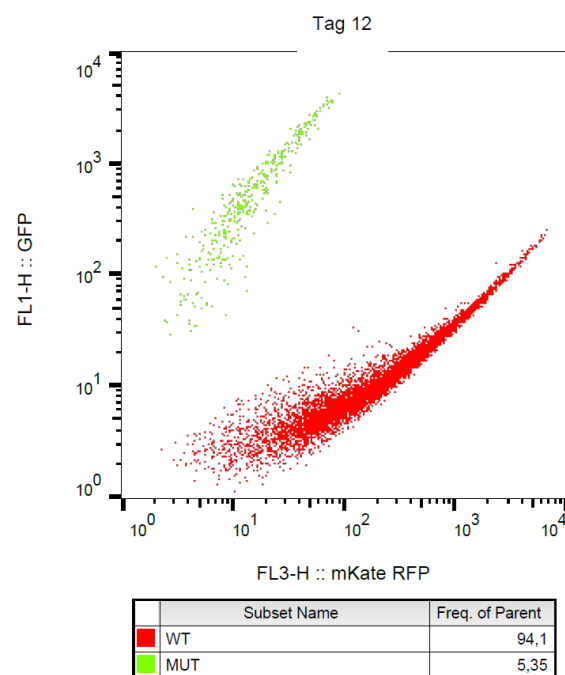
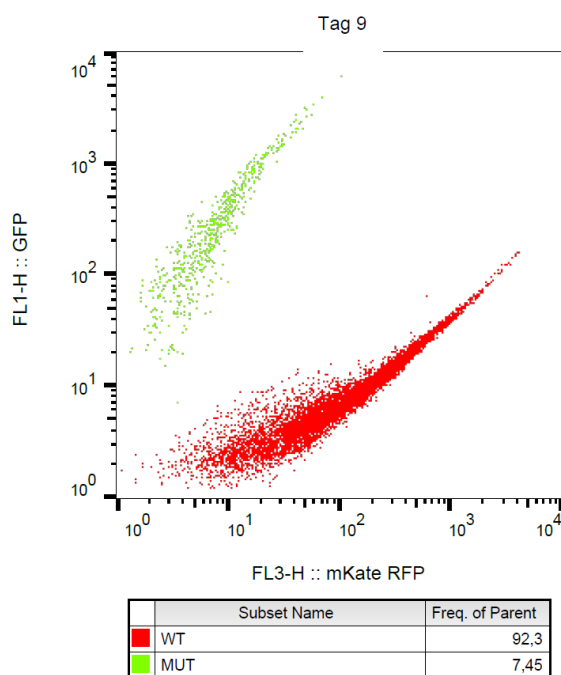
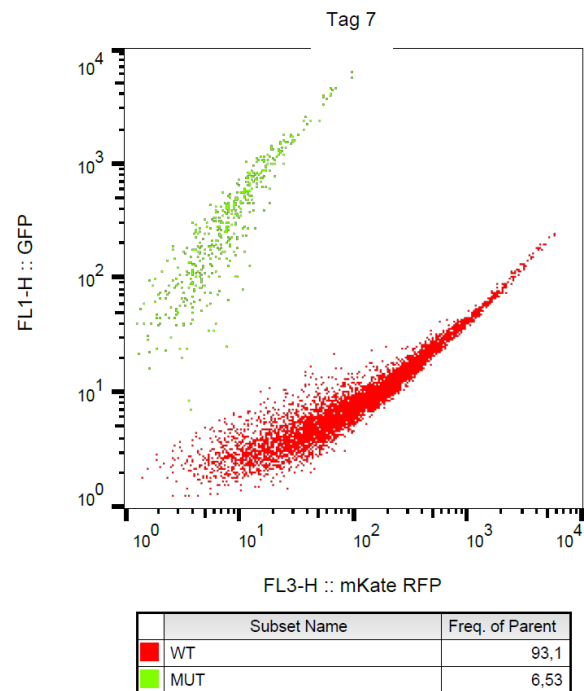
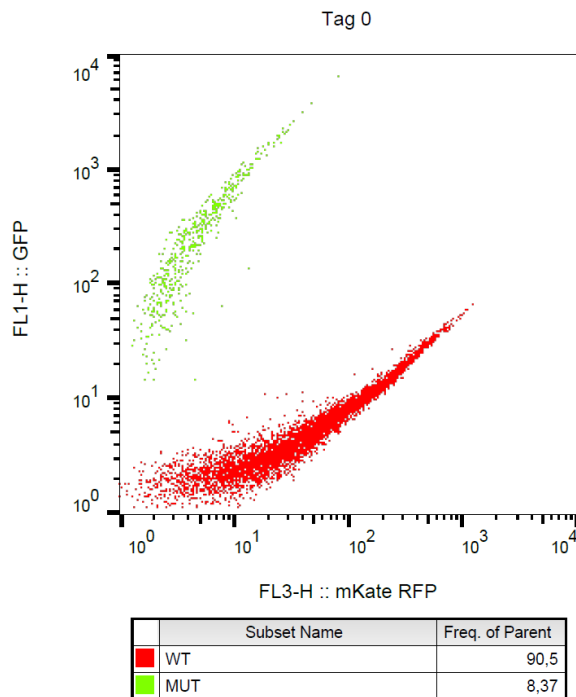
Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 bis 50. Die rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT sind im Anhang 2.2 rot dargestellt. Grün fluoreszierende Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation E170D werden im Anhang 2.2 grün dargestellt.

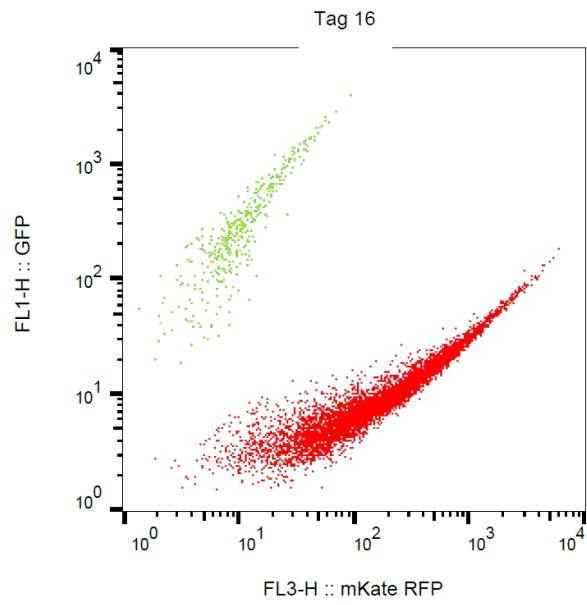




Anhang 2.3. Vollständige Durchflusszytometrie -Auswertung von Ansatz 1.3

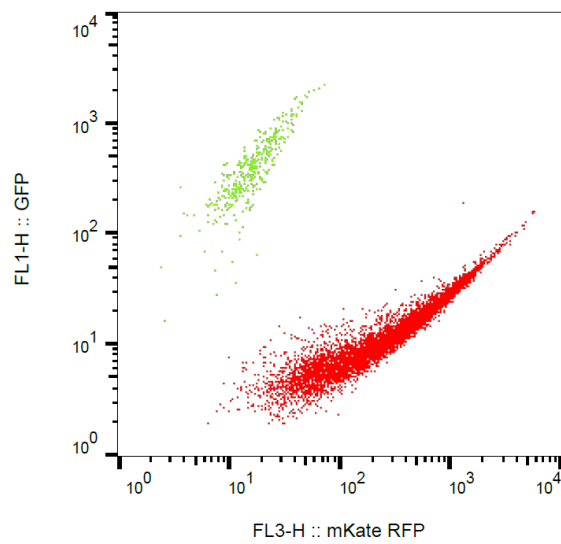
Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 bis 80. Die rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT sind im Anhang 2.3 rot dargestellt. Grün fluoreszierende Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation R439H werden im Anhang 2.3 grün dargestellt.





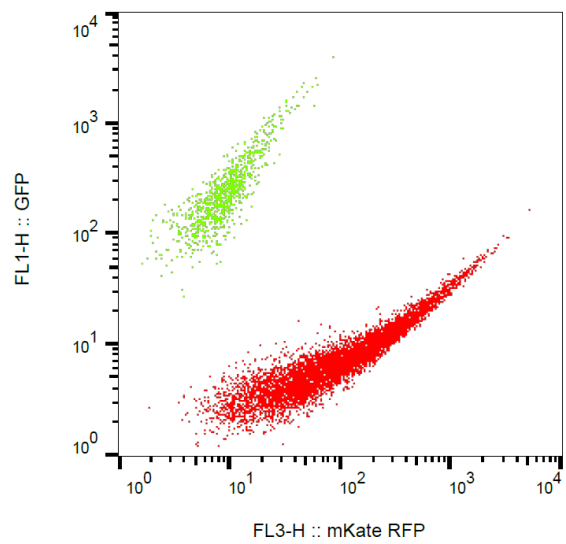
	Subset Name	Freq. of Parent
■	WT	94,2
■	MUT	5,53

Tag 19

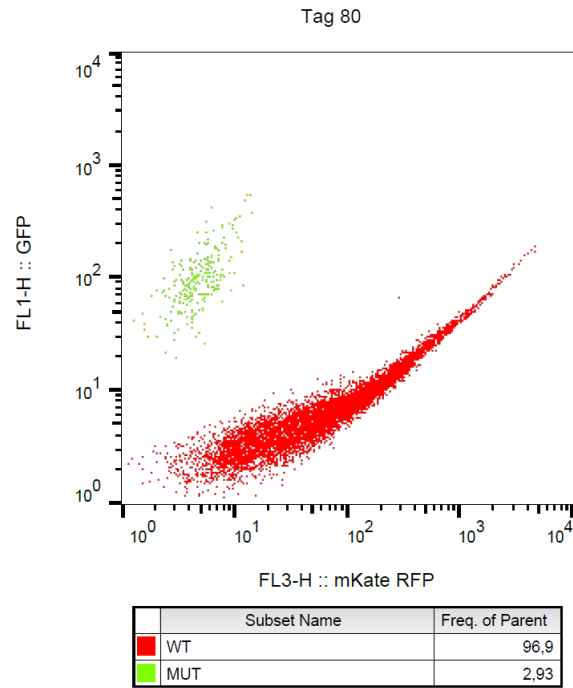
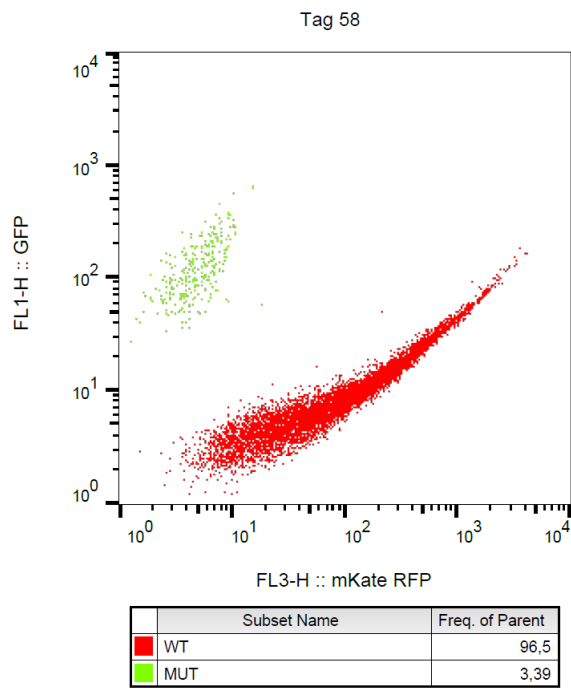
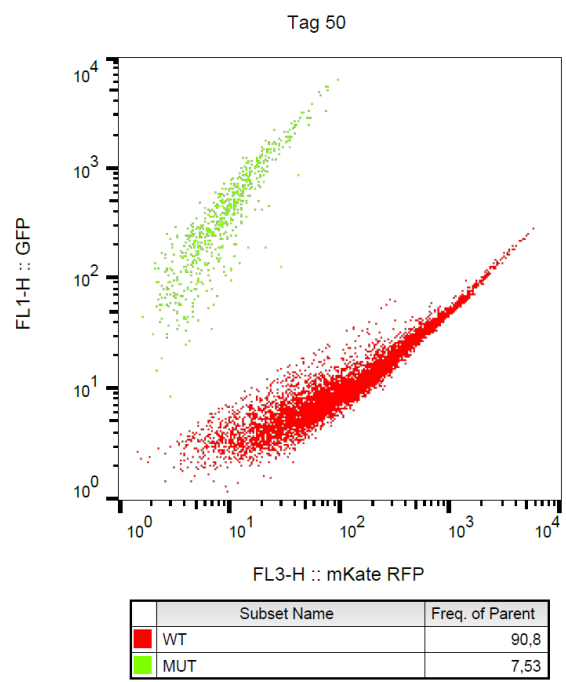
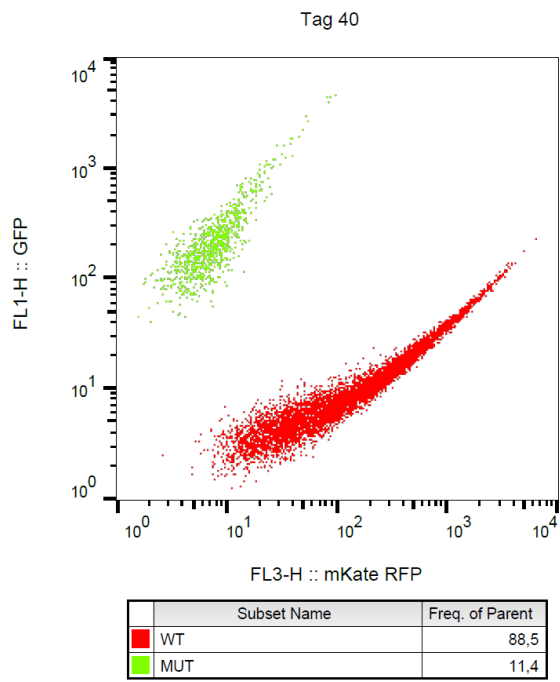


	Subset Name	Freq. of Parent
■	WT	94,5
■	MUT	5,39

Tag 30

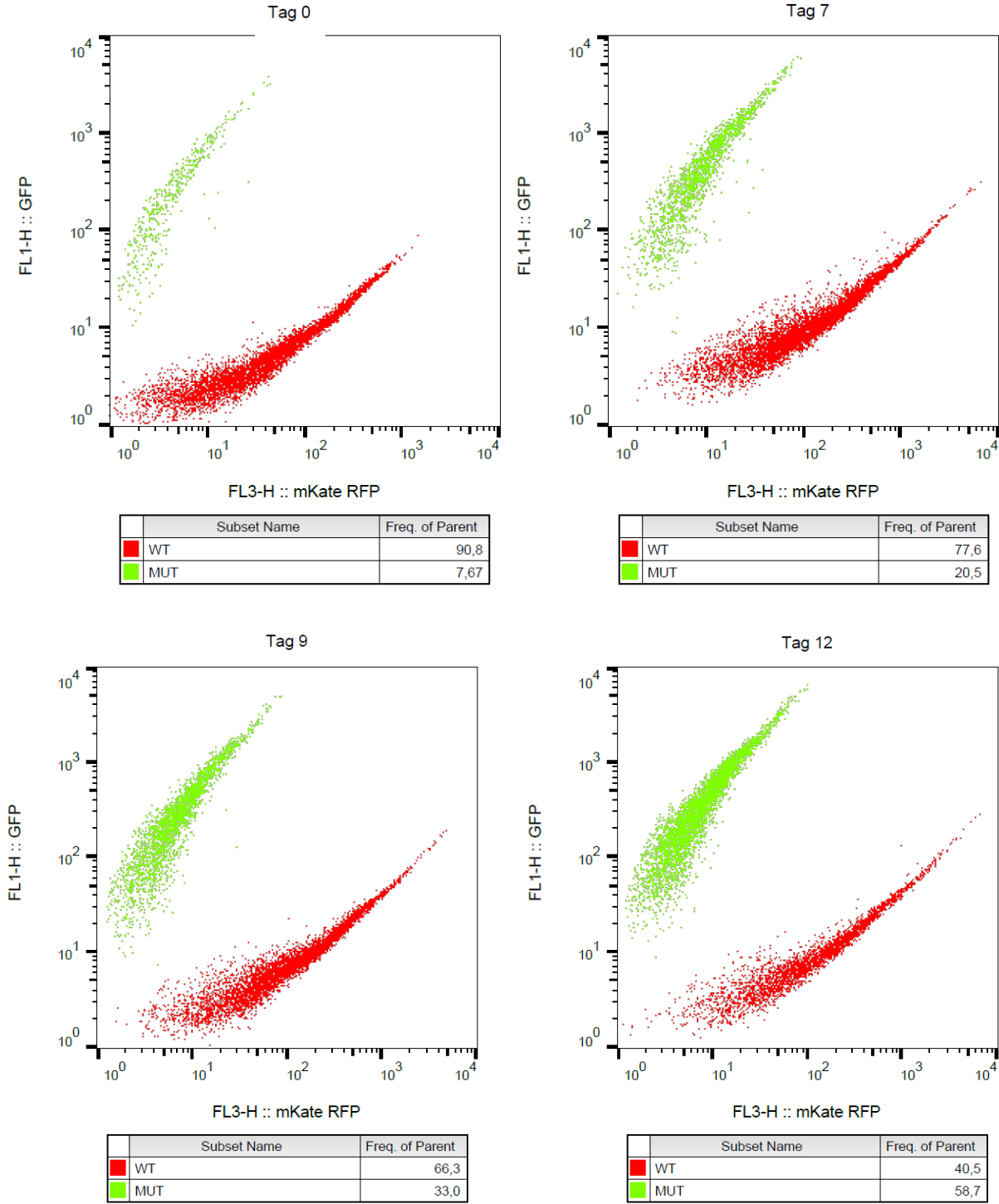


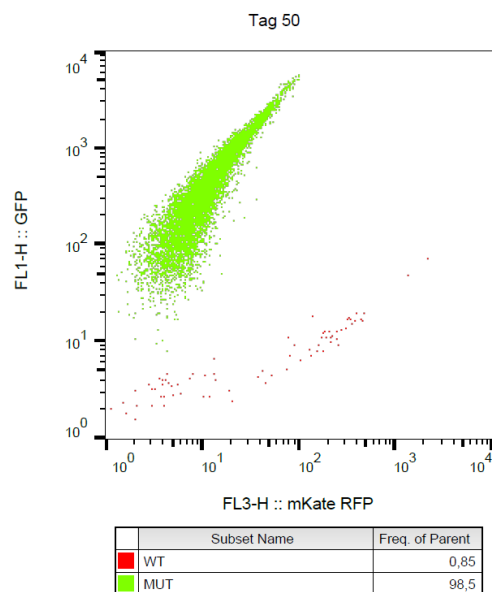
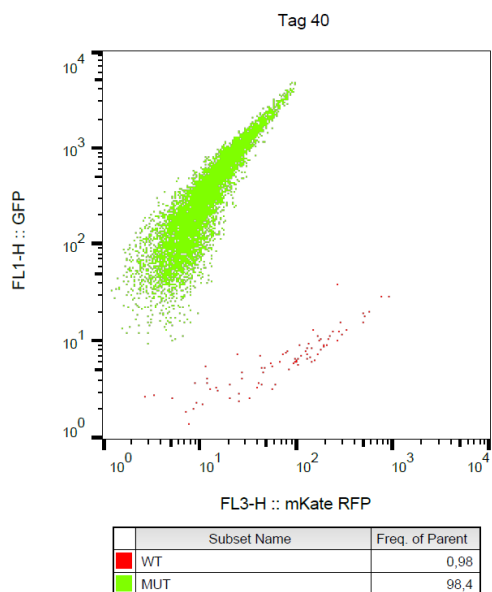
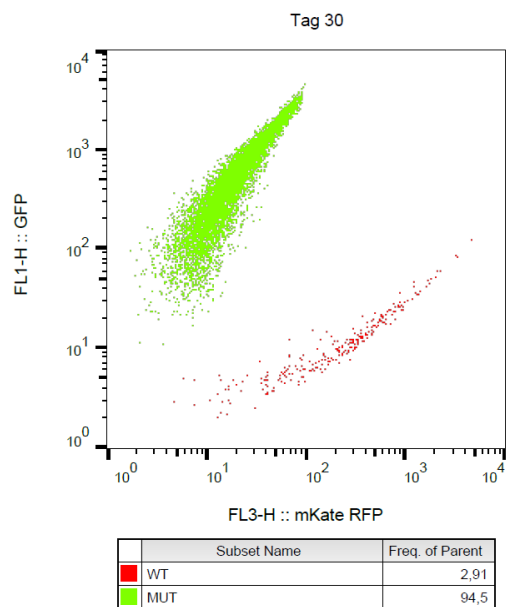
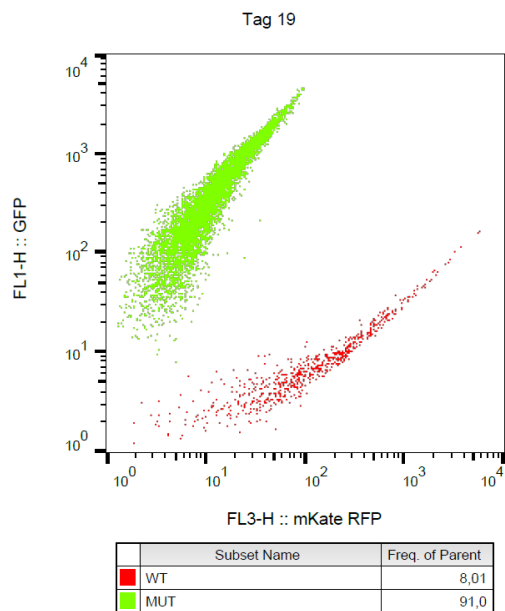
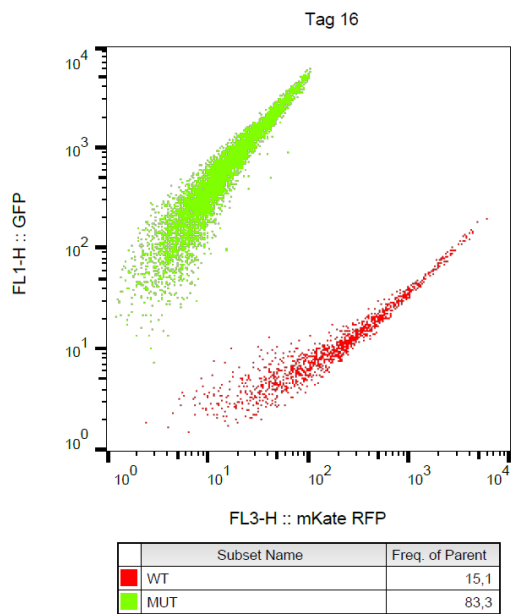
	Subset Name	Freq. of Parent
■	WT	88,4
■	MUT	11,4



Anhang 2.4. Vollständige Durchflusszytometrie -Auswertung von Ansatz 2.1

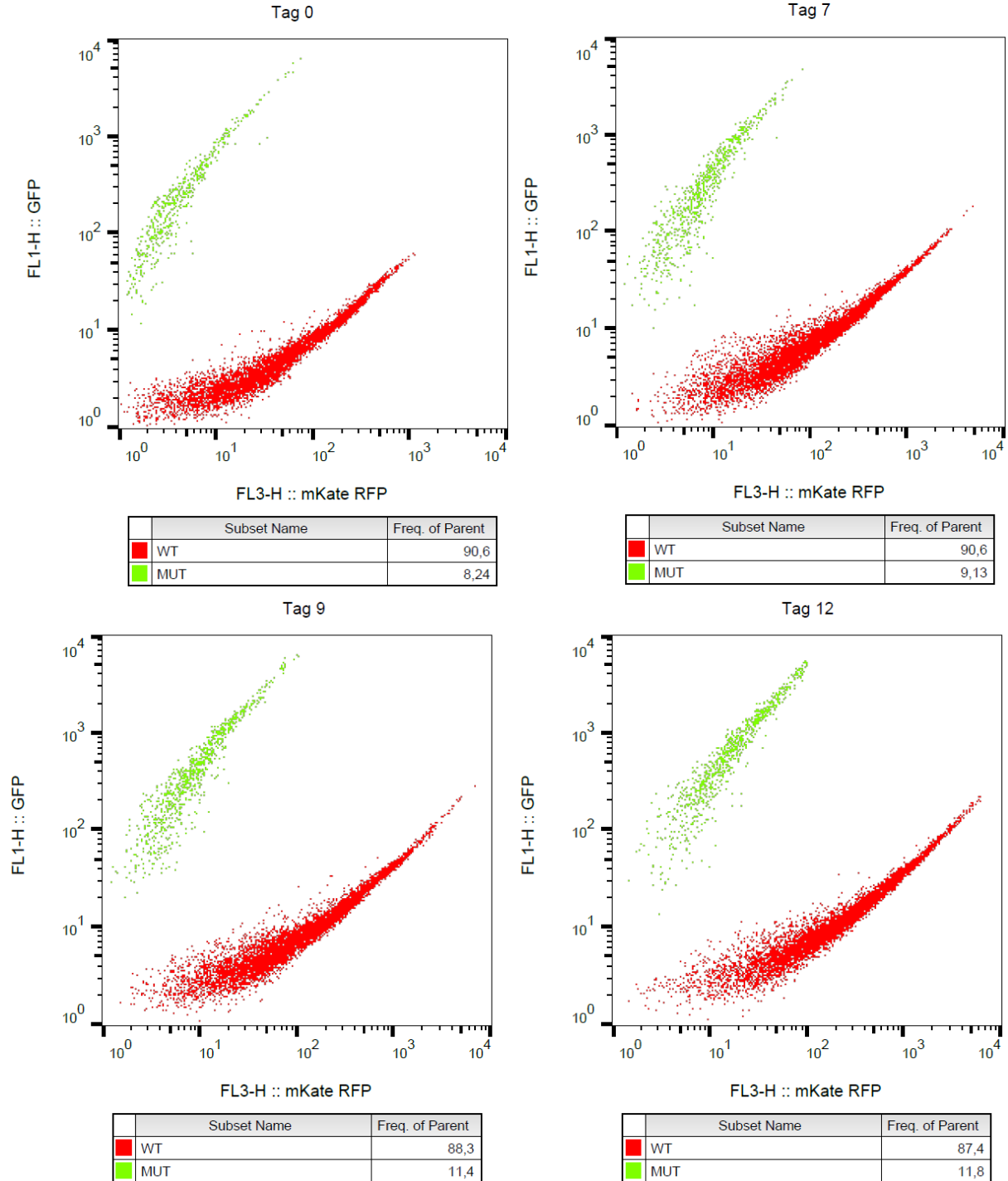
Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 bis 50. Die rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT sind im Anhang 2.4 rot dargestellt. Grün fluoreszierende Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation A152T werden im Anhang 2.4 grün dargestellt.

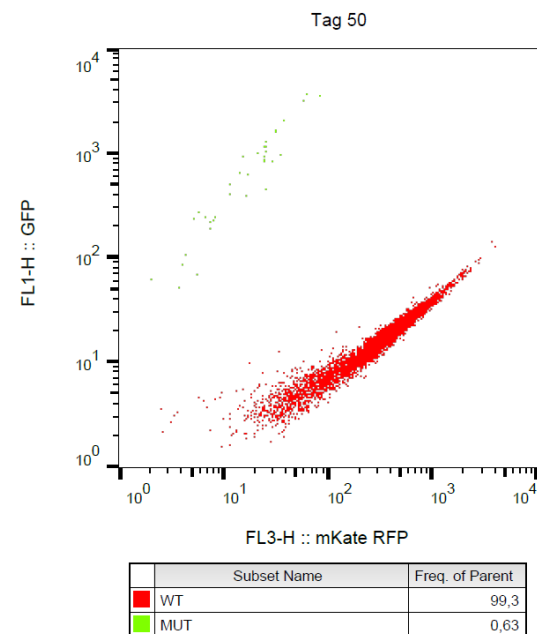
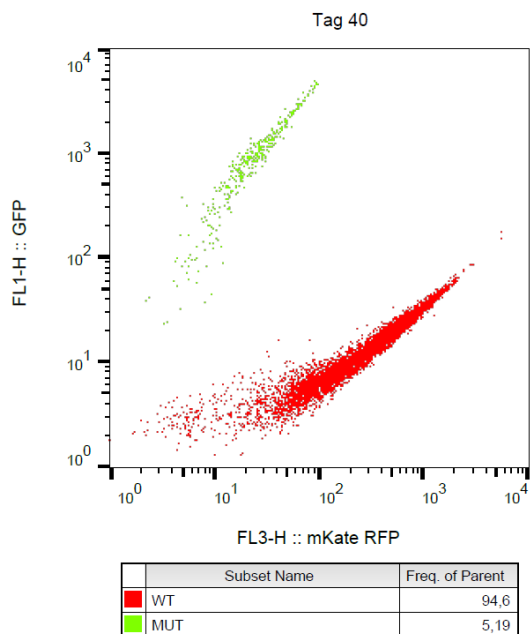
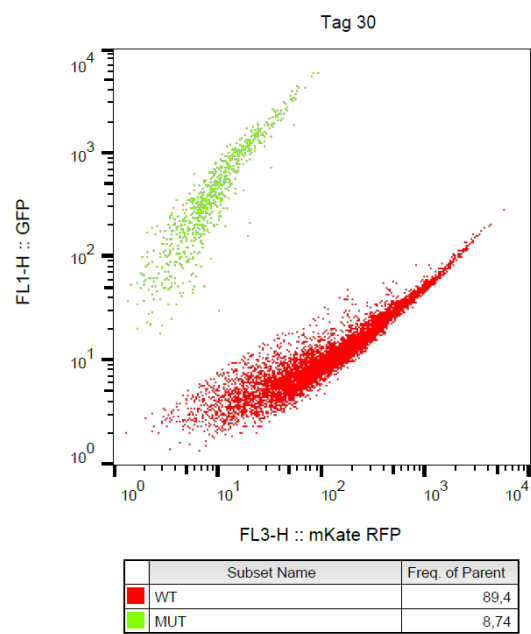
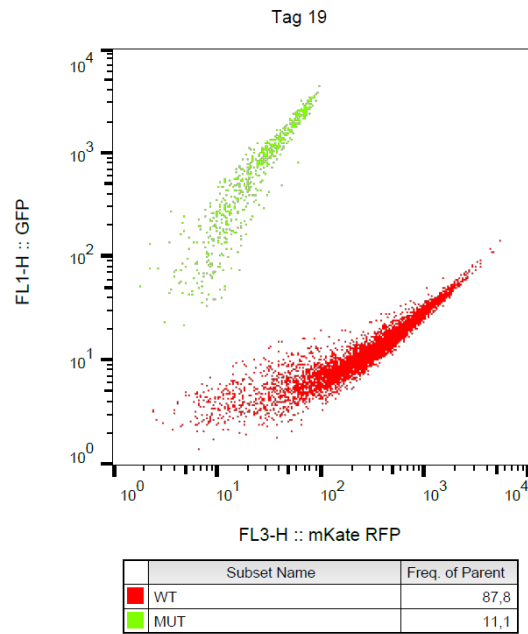
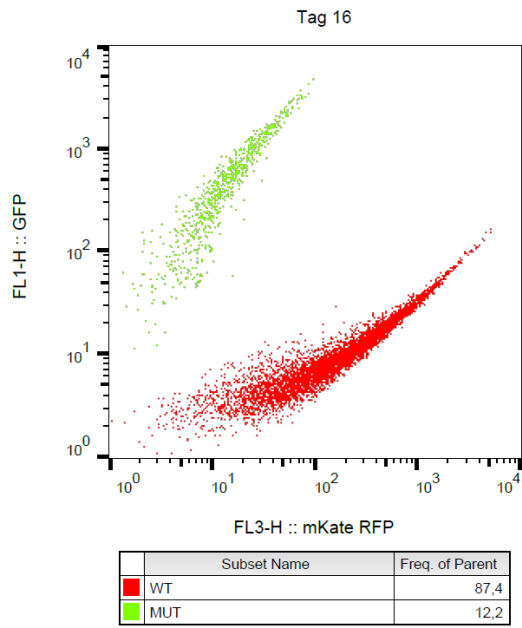




Anhang 2.5. Vollständige Durchflusszytometrie -Auswertung von Ansatz 2.2

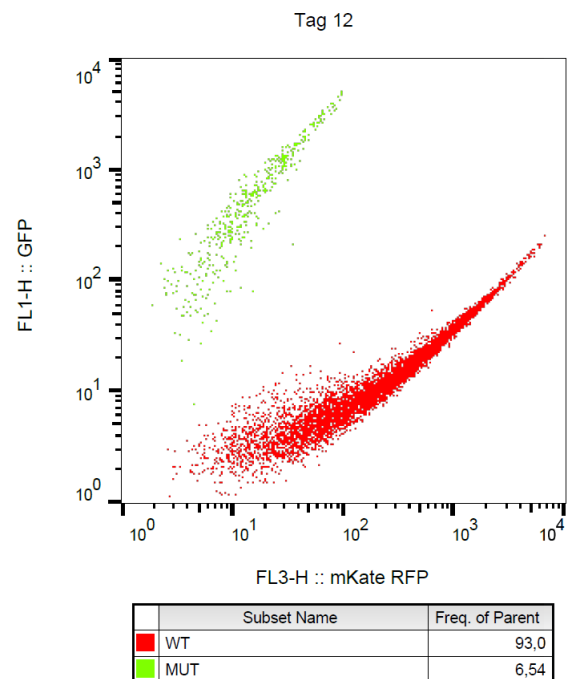
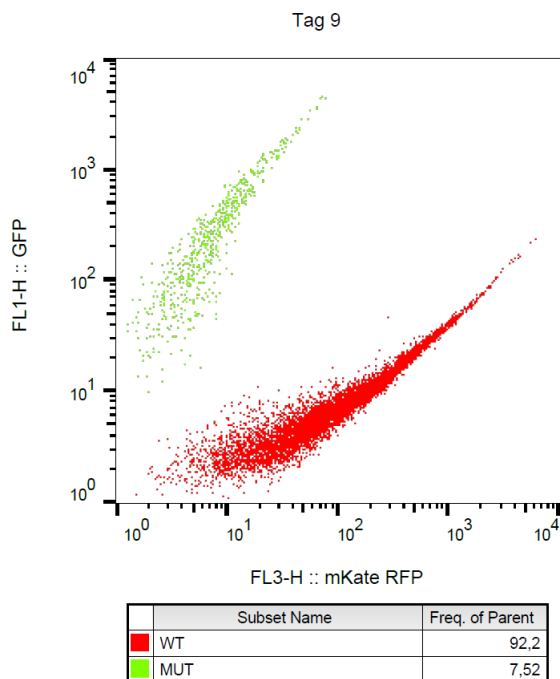
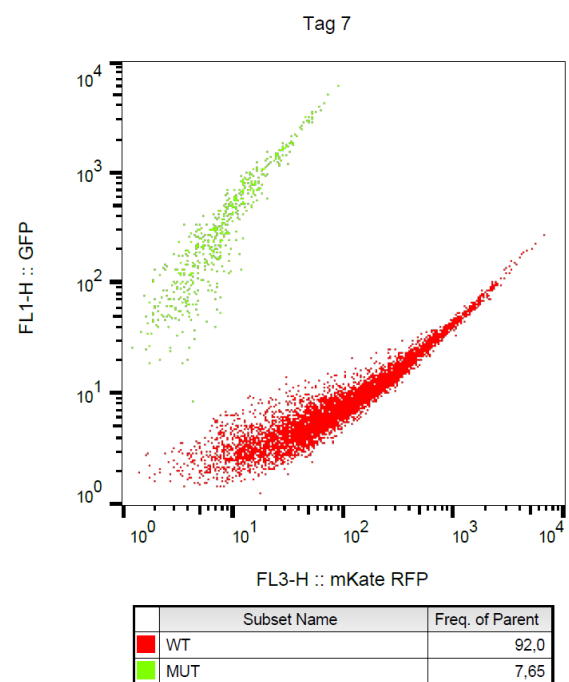
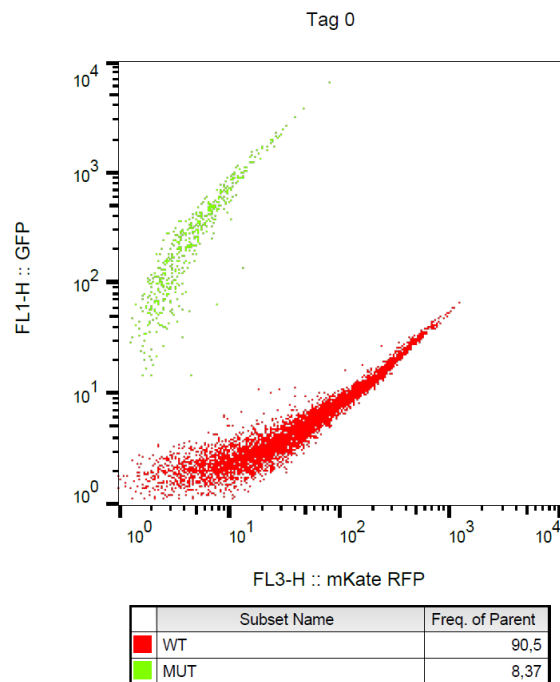
Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 bis 50. Die rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT sind im Anhang 2.5 rot dargestellt. Grün fluoreszierende Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation E170D werden im Anhang 2.5 grün dargestellt.



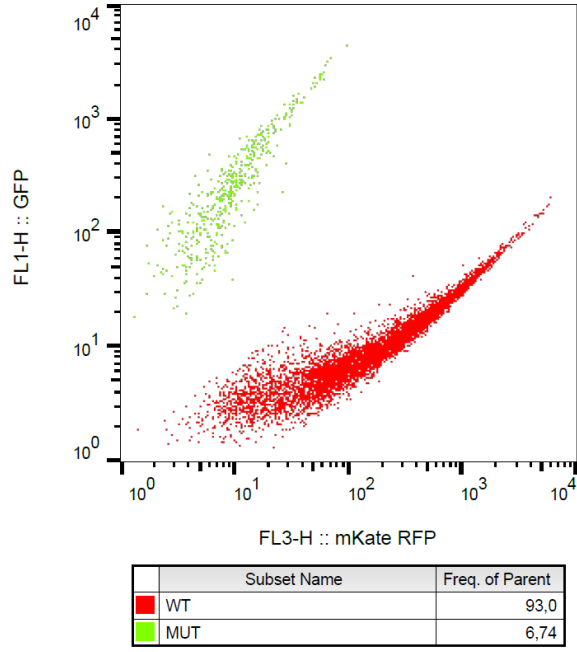


Anhang 2.6. Vollständige Durchflusszytometrie -Auswertung von Ansatz 2.3

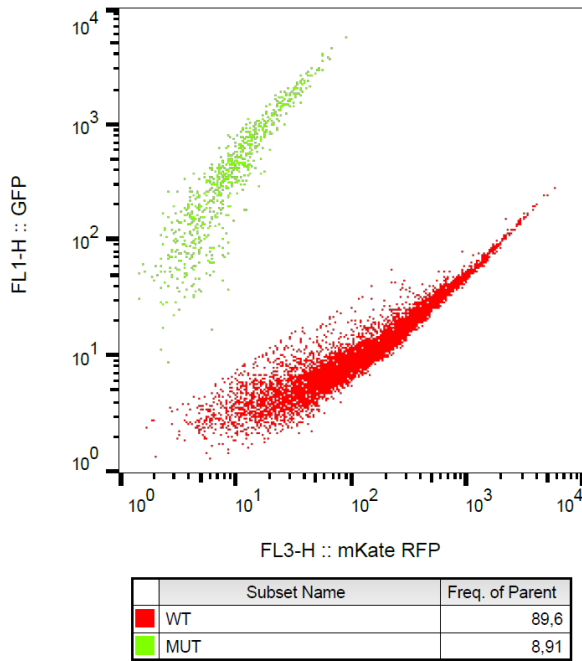
Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 bis 80. Die rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT sind im Anhang 2.6 dargestellt. Grün fluoreszierende Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation R439H werden im Anhang 2.6 grün dargestellt.



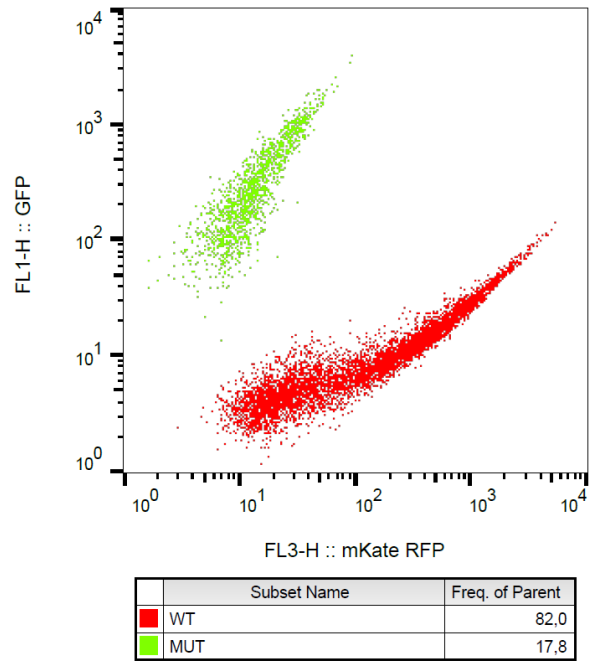
Tag 16



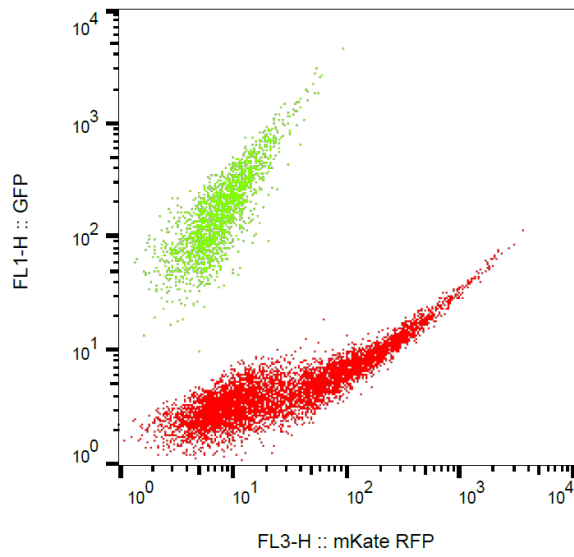
Tag 19



Tag 30

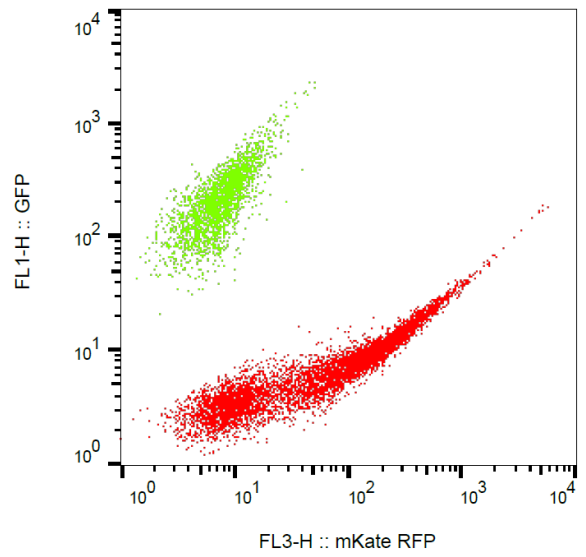


Tag 40



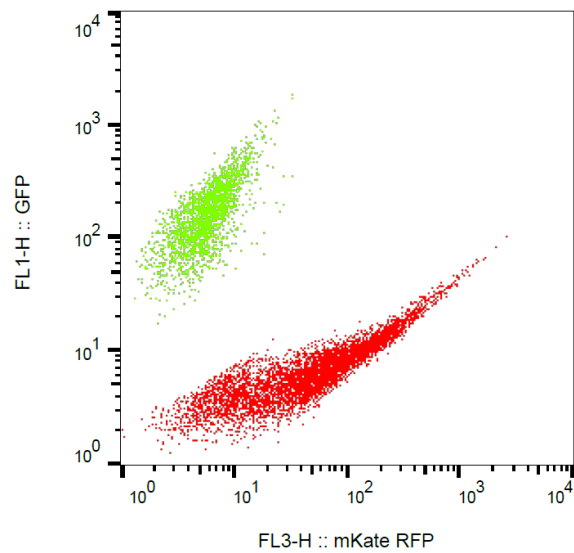
	Subset Name	Freq. of Parent
■	WT	77,1
■	MUT	22,4

Tag 50



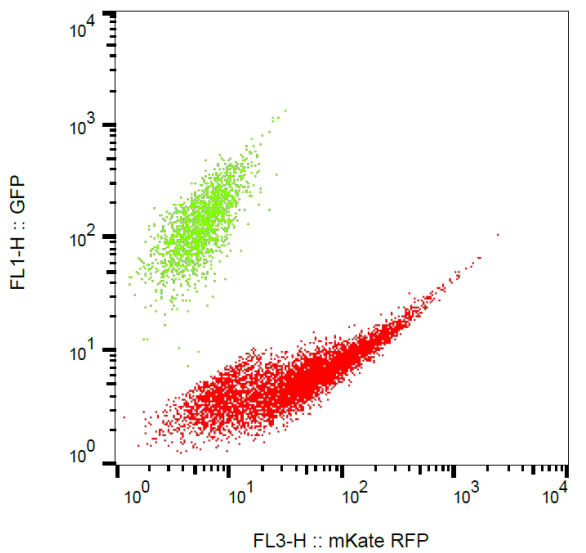
	Subset Name	Freq. of Parent
■	WT	71,2
■	MUT	28,4

Tag 58



	Subset Name	Freq. of Parent
■	WT	71,4
■	MUT	27,9

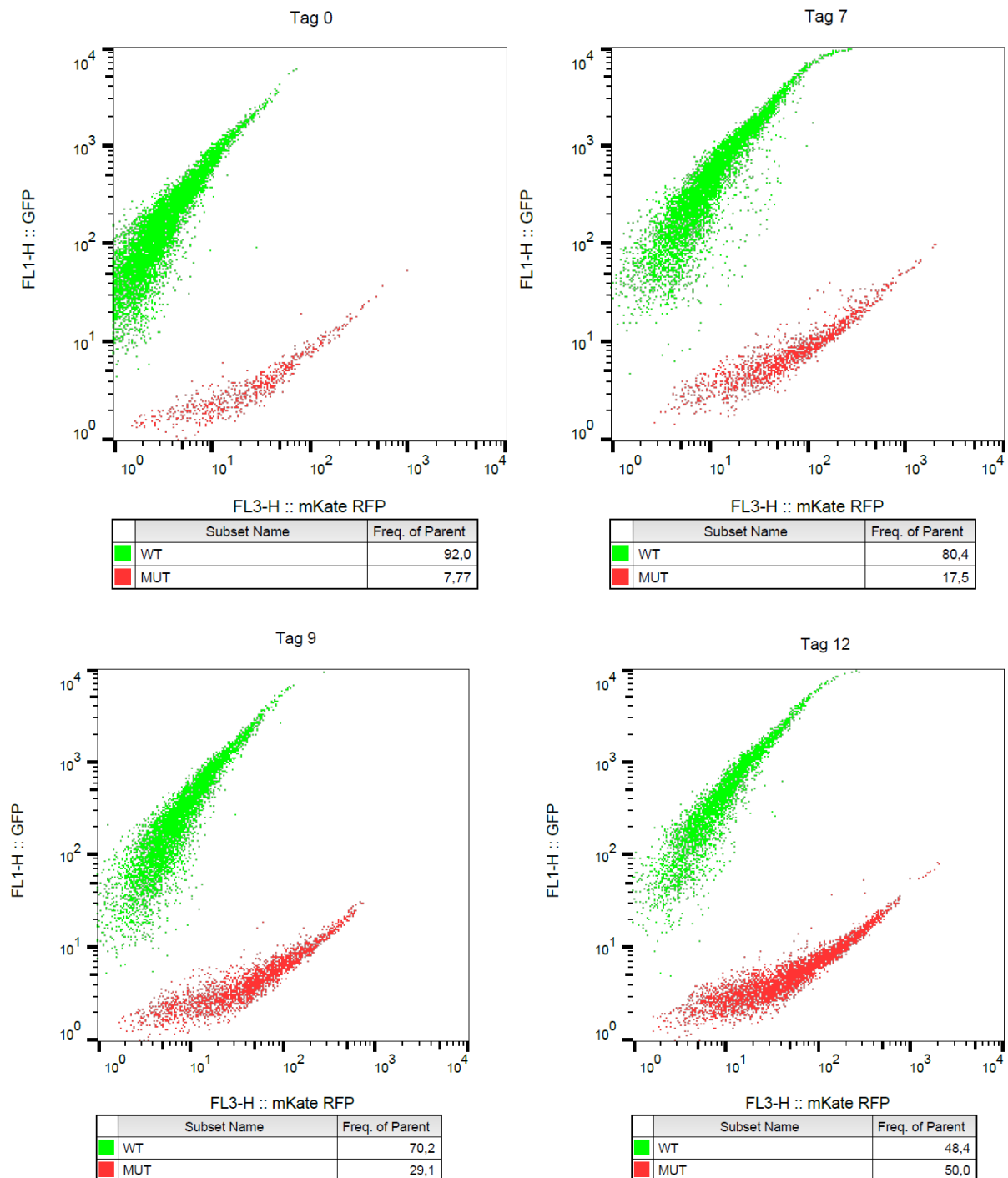
Tag 80

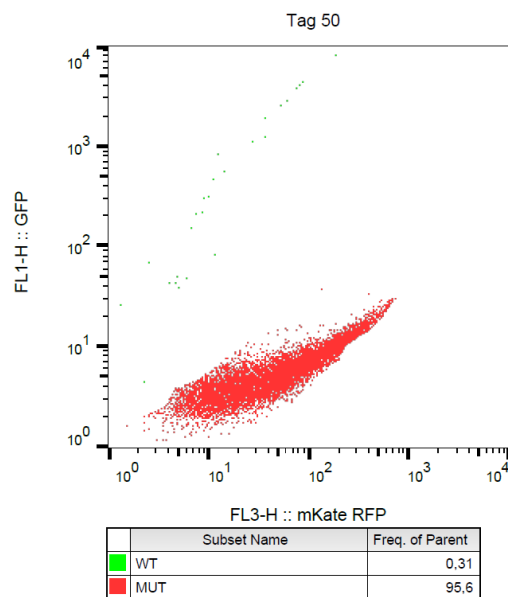
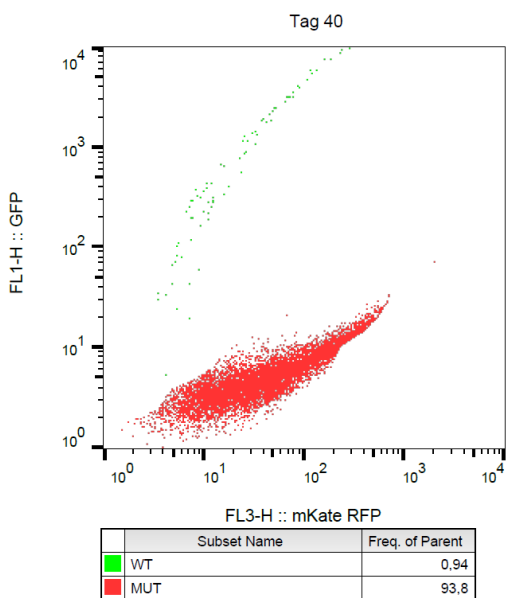
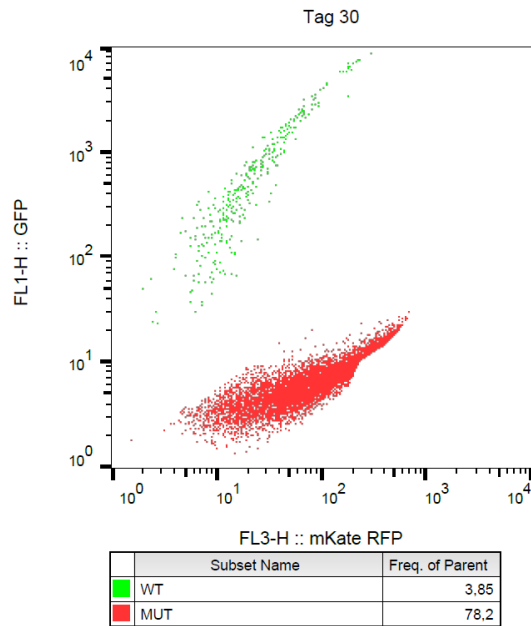
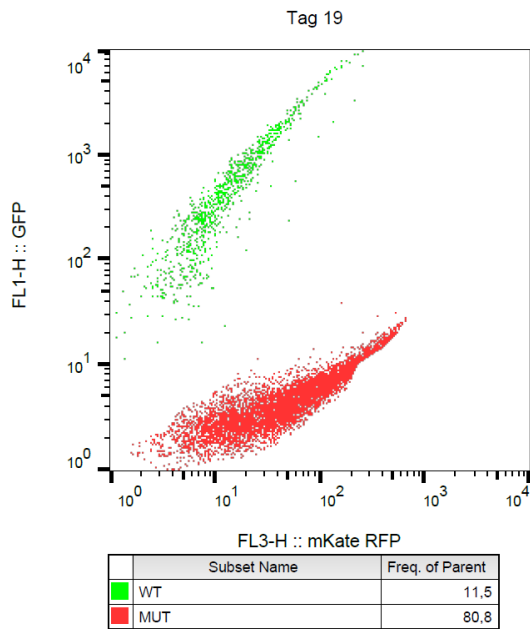
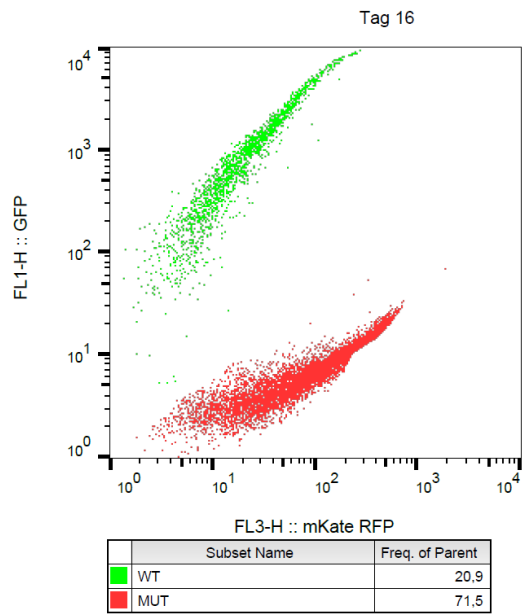


	Subset Name	Freq. of Parent
■	WT	77,3
■	MUT	21,7

Anhang 2.7. Vollständige Durchflusszytometrie -Auswertung von Ansatz 3.1

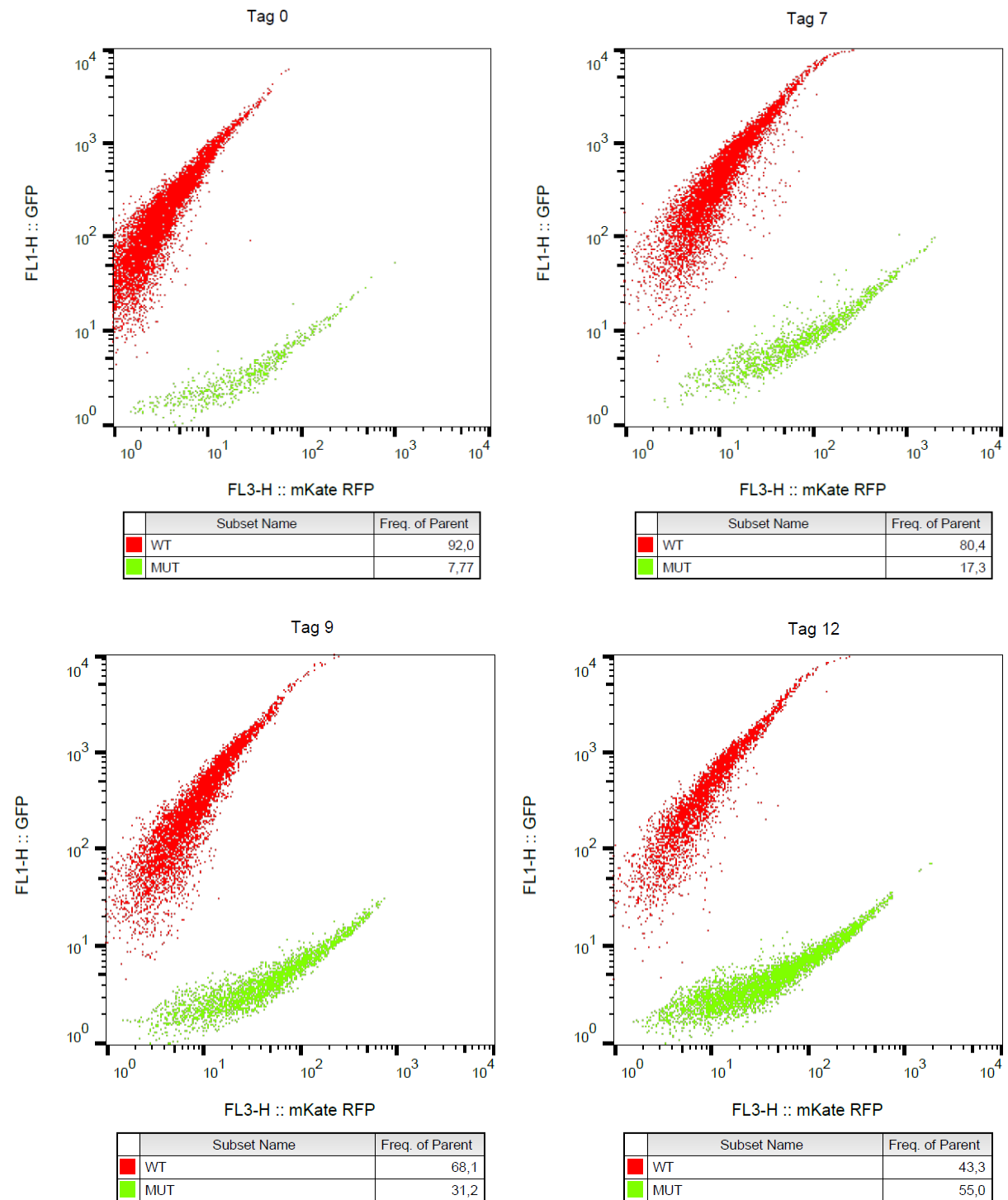
Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 bis 50. Die grün fluoreszierenden Zellen (EGFP) mit *IKZF1* WT sind im Anhang 2.7 grün dargestellt. Rot fluoreszierende Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* Mutation A152T werden im Anhang 2.7 rot dargestellt.

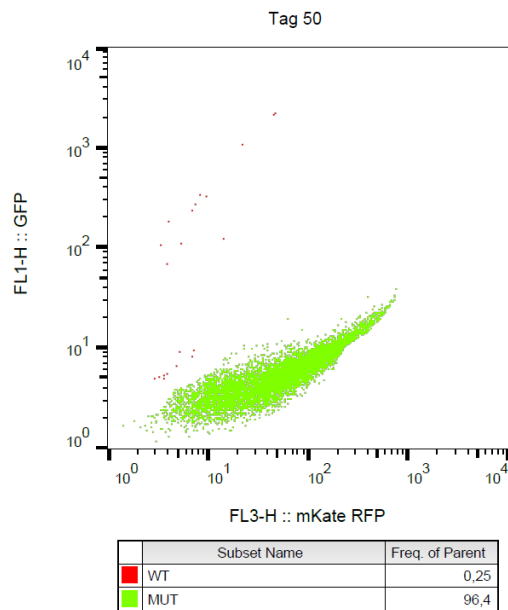
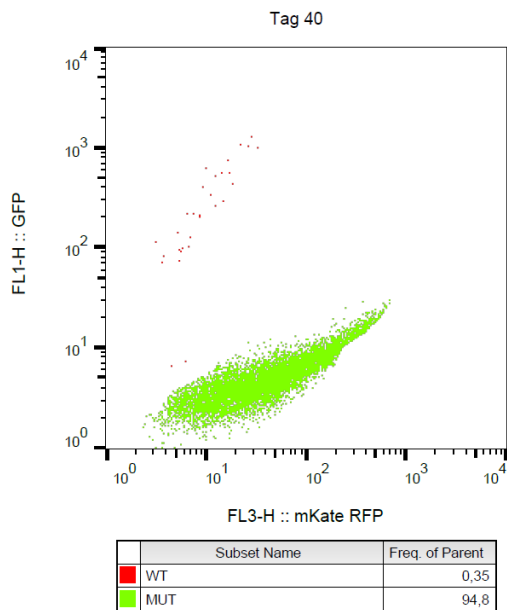
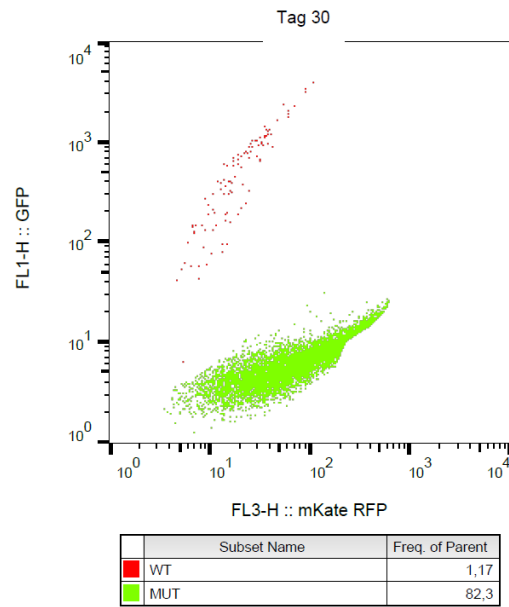
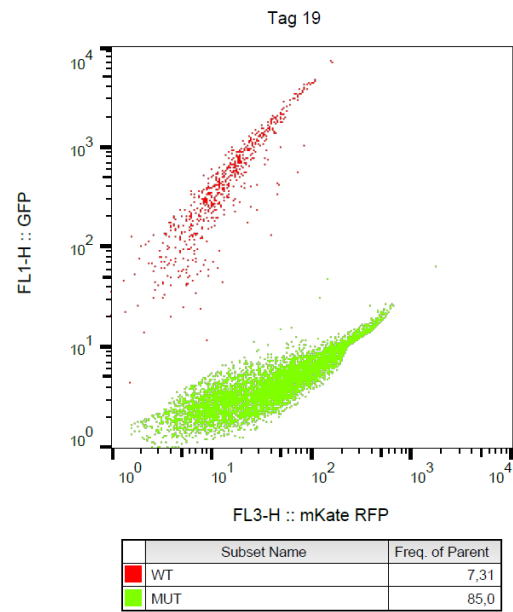
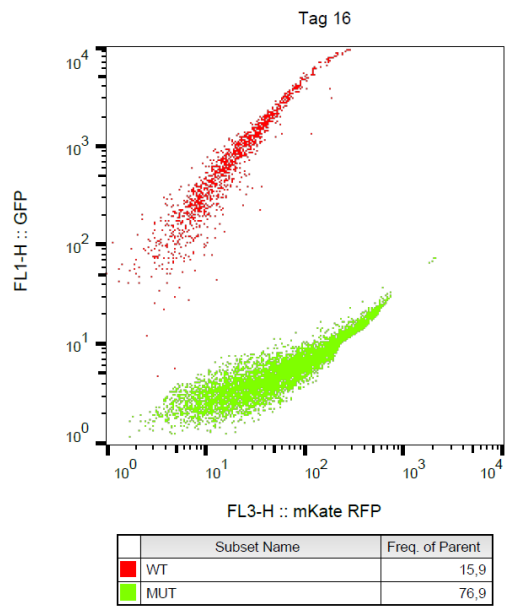




Anhang 2.8. Vollständige Durchflusszytometrie -Auswertung von Ansatz 4.1

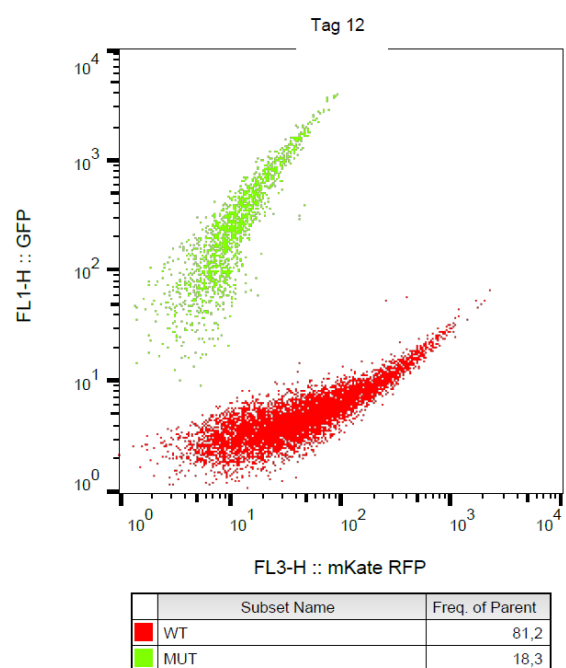
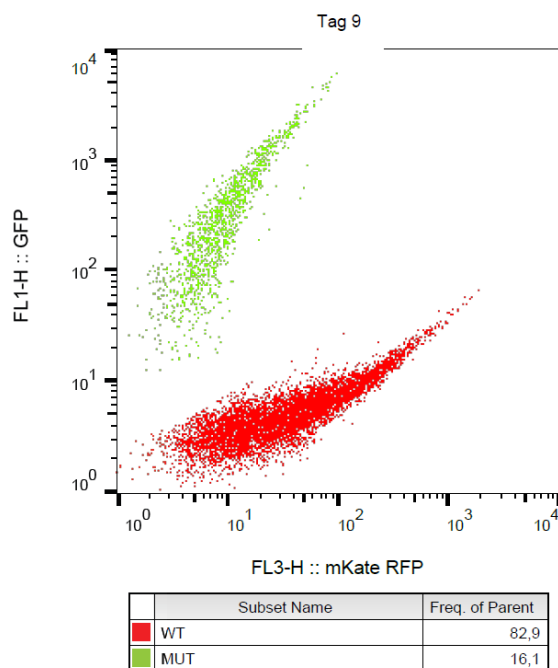
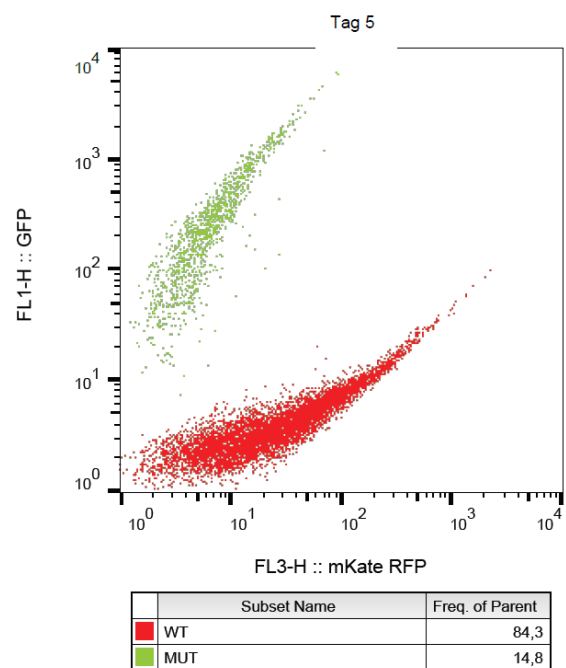
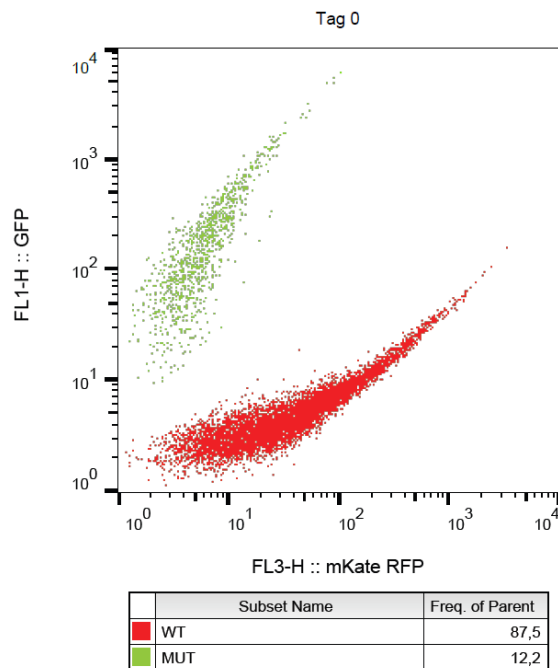
Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 bis 50. Die grün fluoreszierenden Zellen (EGFP) mit *IKZF1* WT sind im Anhang 2.8 rot dargestellt. Rot fluoreszierende Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* Mutation A152T werden im Anhang 2.8 grün dargestellt.

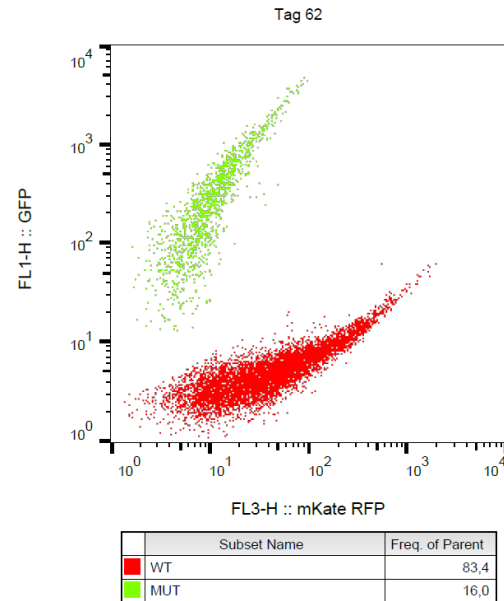
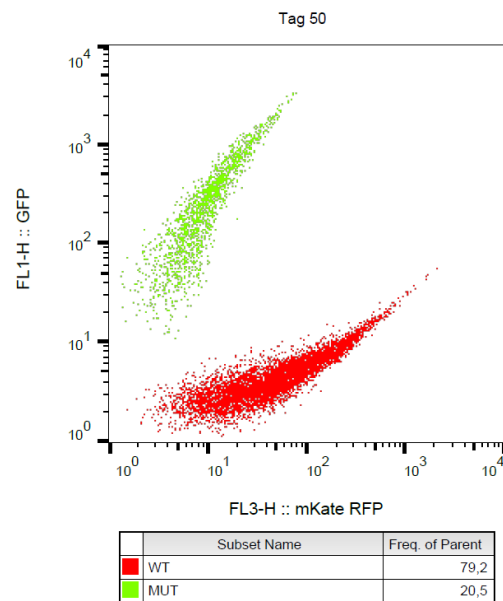
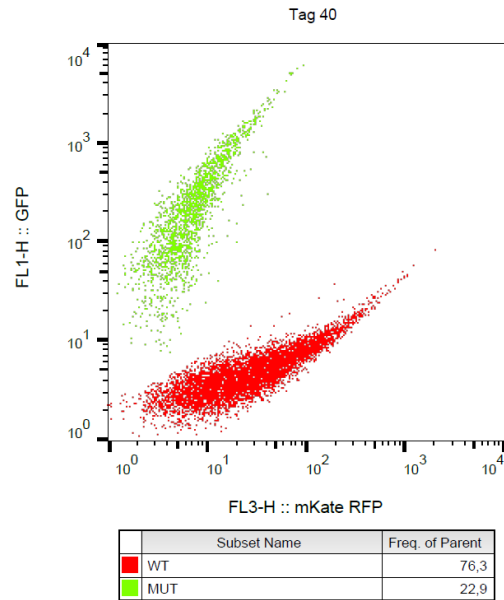
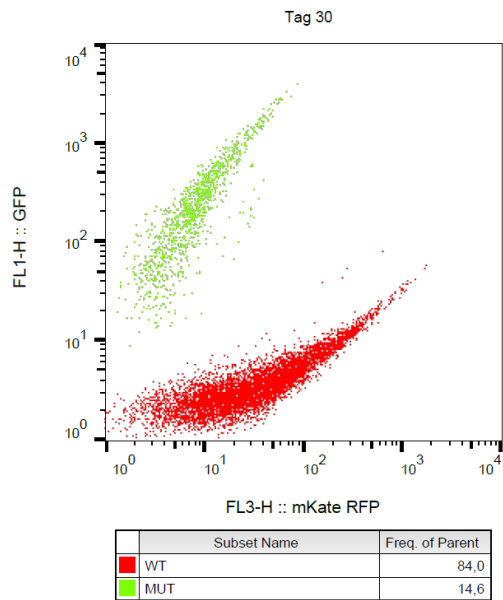
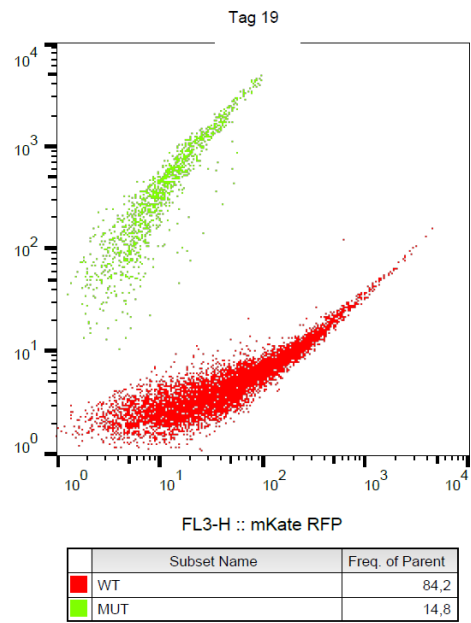
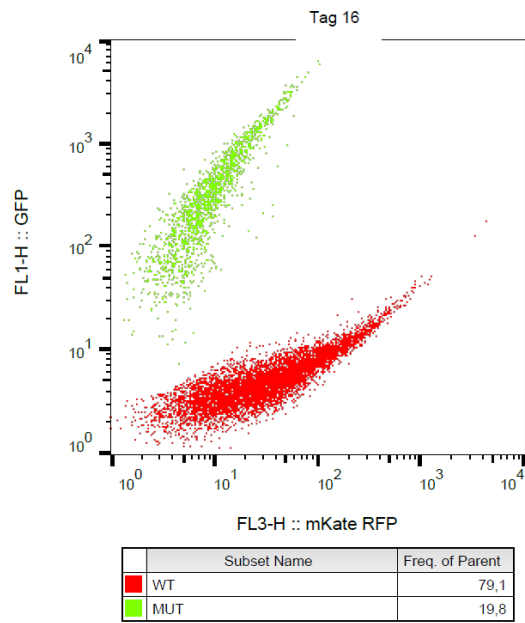




Anhang 2.9. Vollständige Durchflusszytometrie -Auswertung von Ansatz 5.1

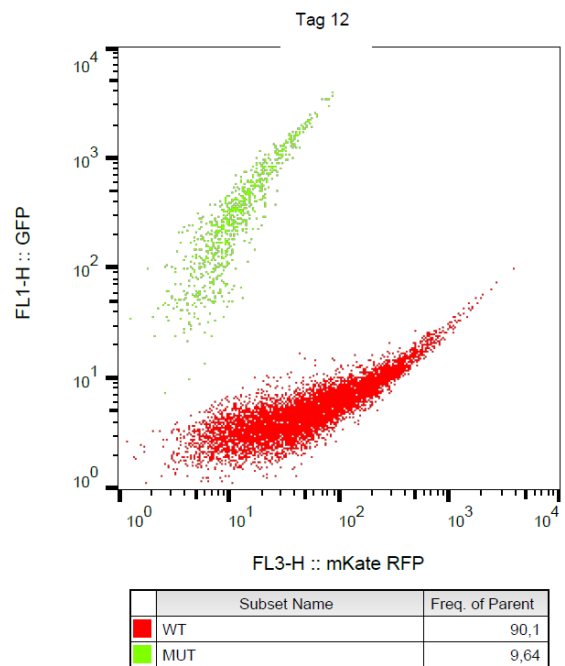
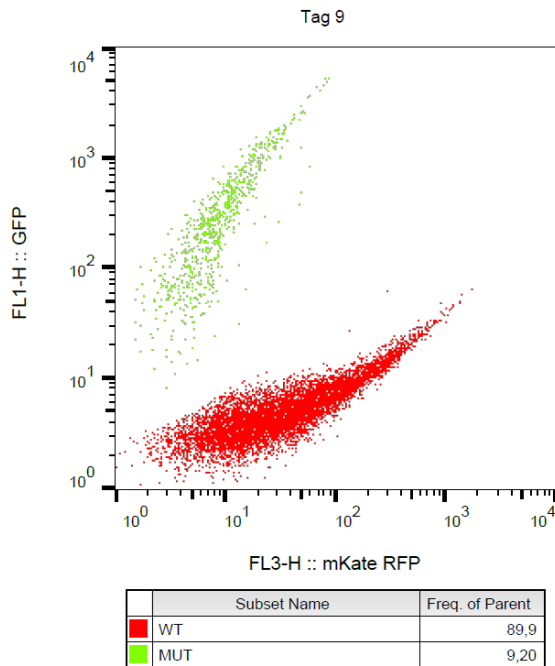
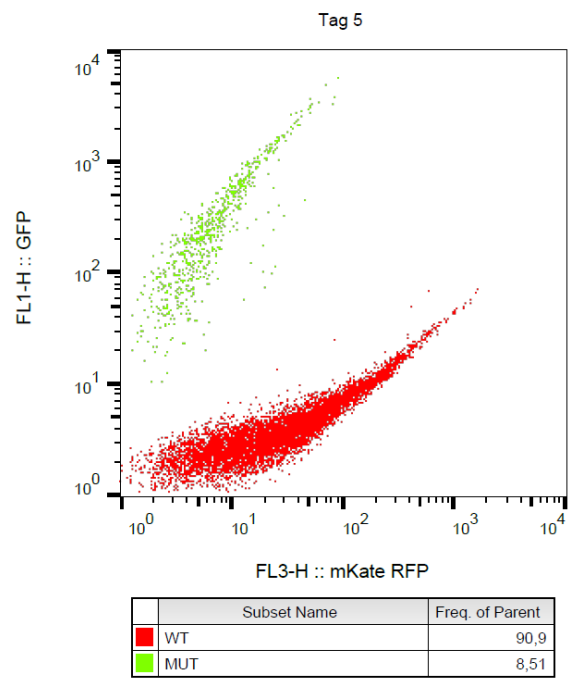
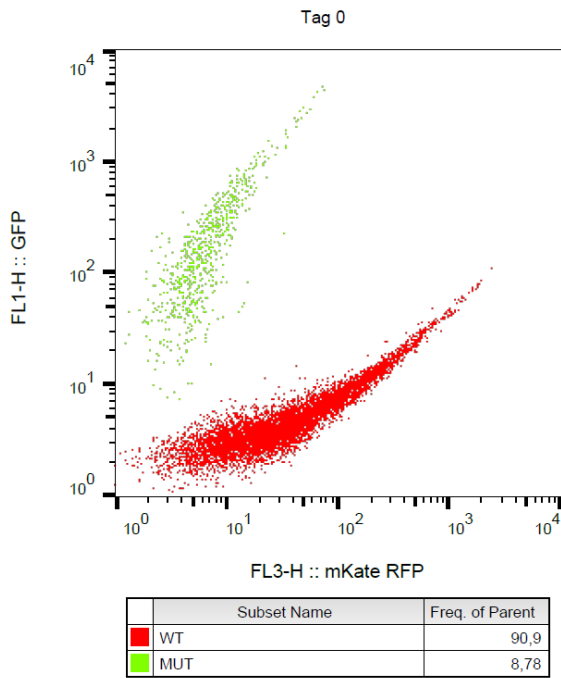
Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 bis 50. Die rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT sind im Anhang 2.9 rot dargestellt. Grün fluoreszierende Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation A152T werden im Anhang 2.9 grün dargestellt.

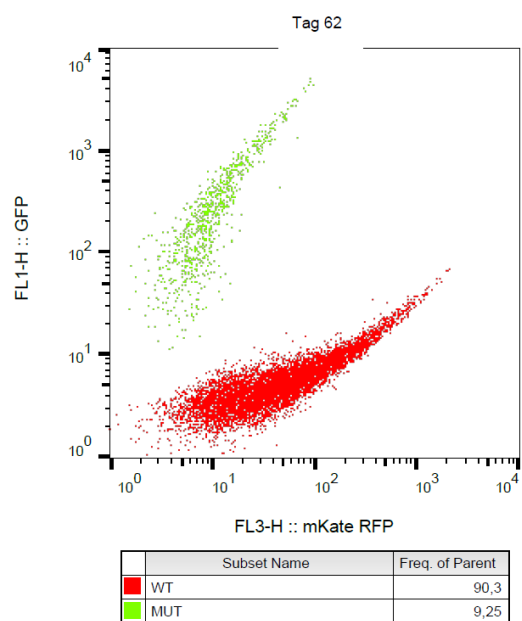
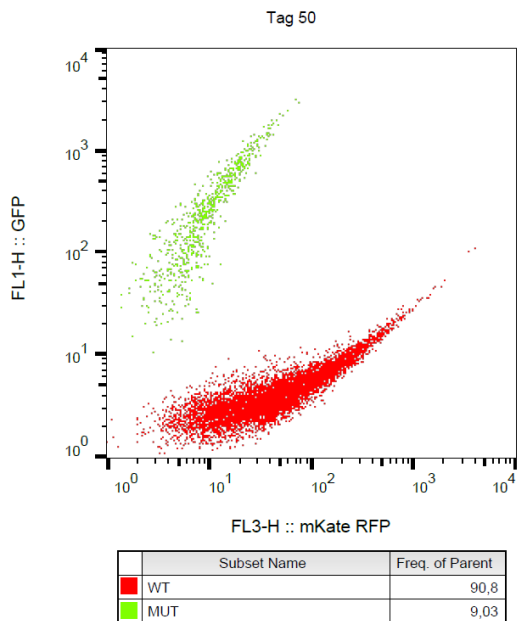
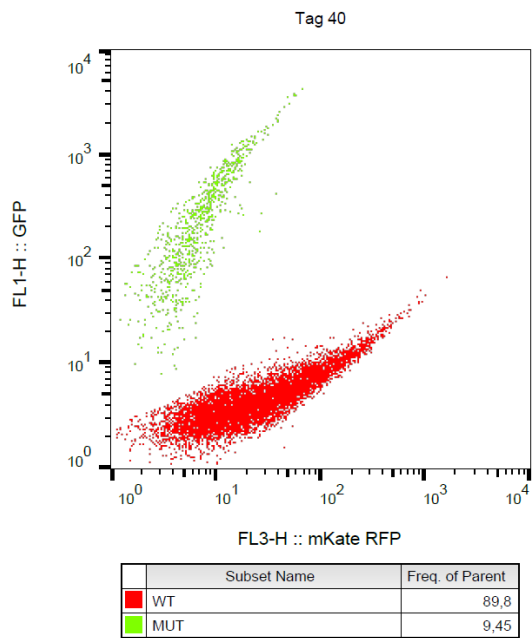
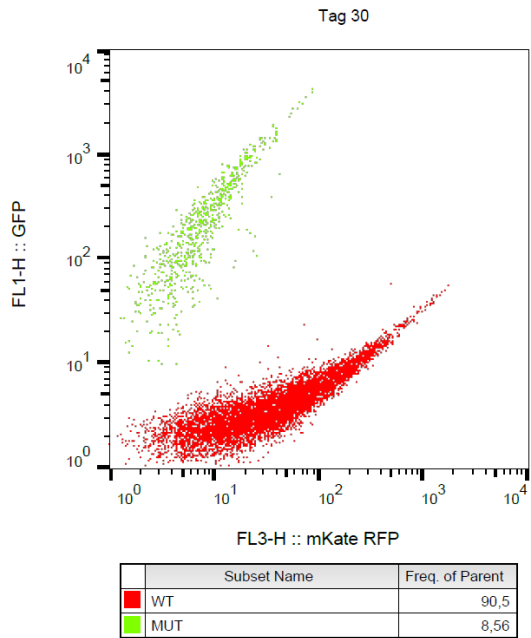
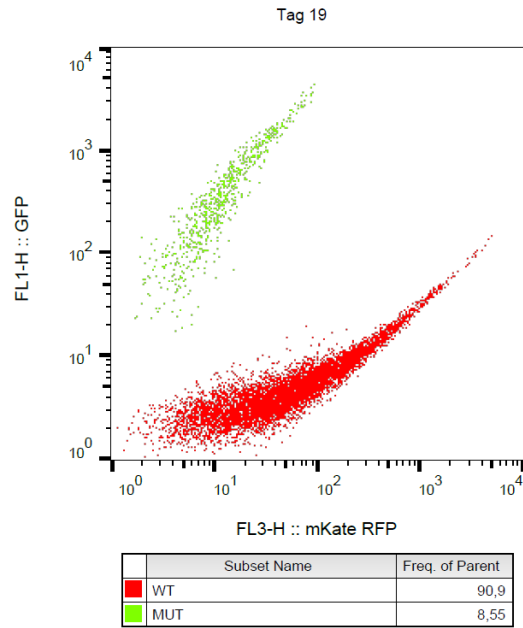
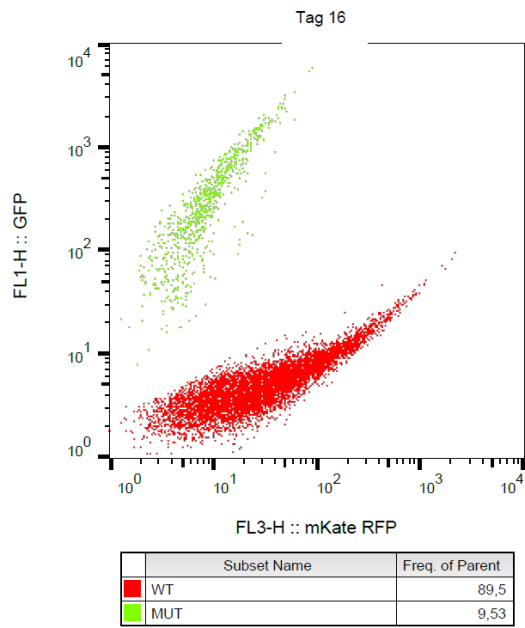




Anhang 2.10. Vollständige Durchflusszytometrie -Auswertung von Ansatz 5.2

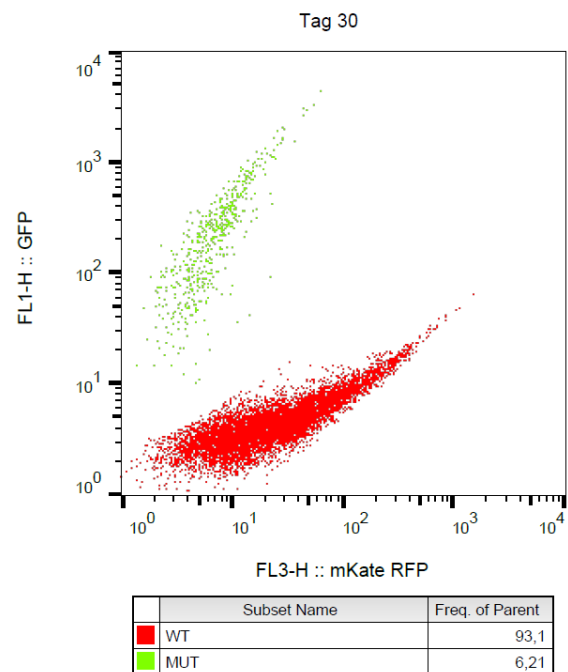
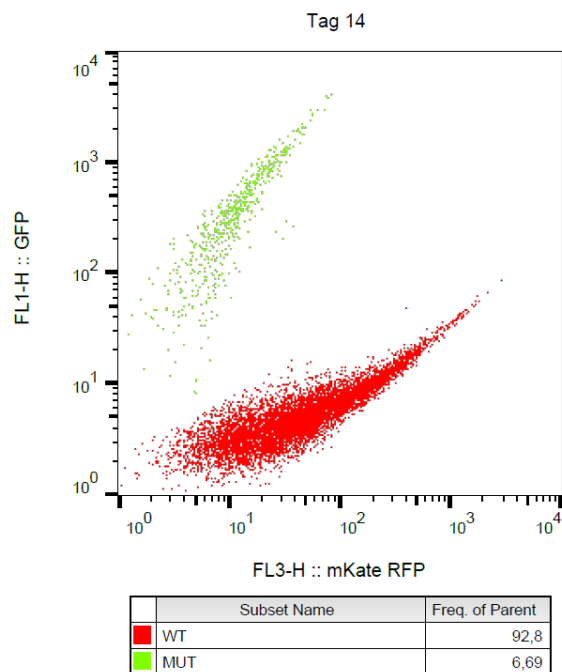
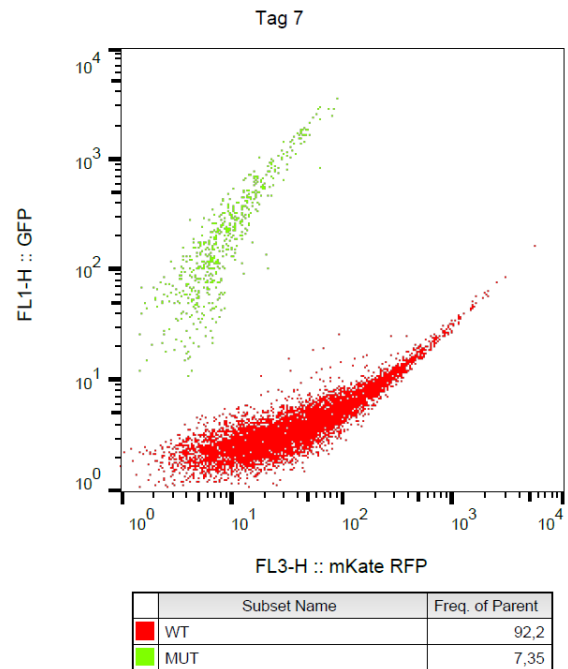
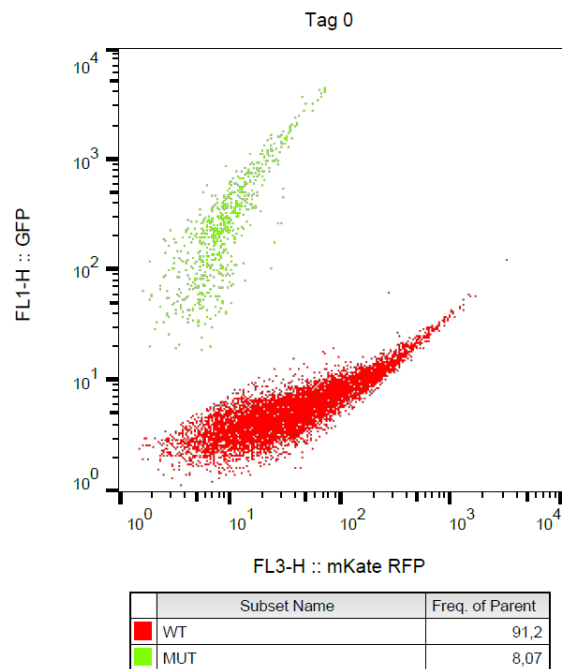
Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 bis 50. Die rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT sind im Anhang 2.10 rot dargestellt. Grün fluoreszierende Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation E170D werden im Anhang 2.10 grün dargestellt.

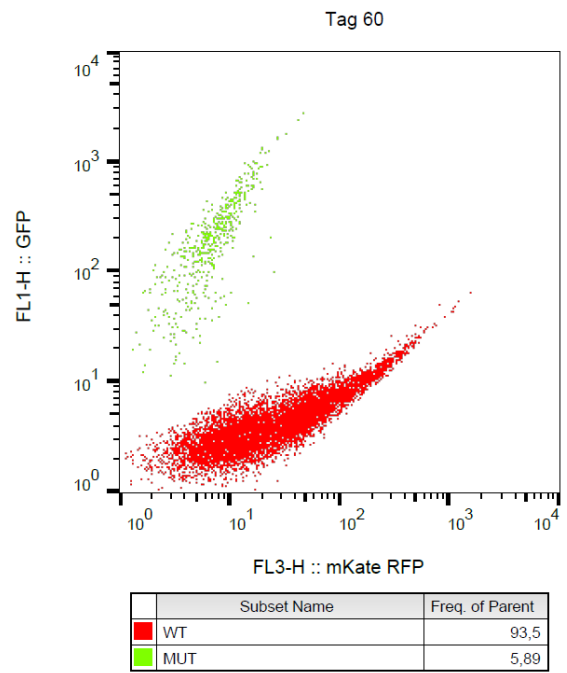
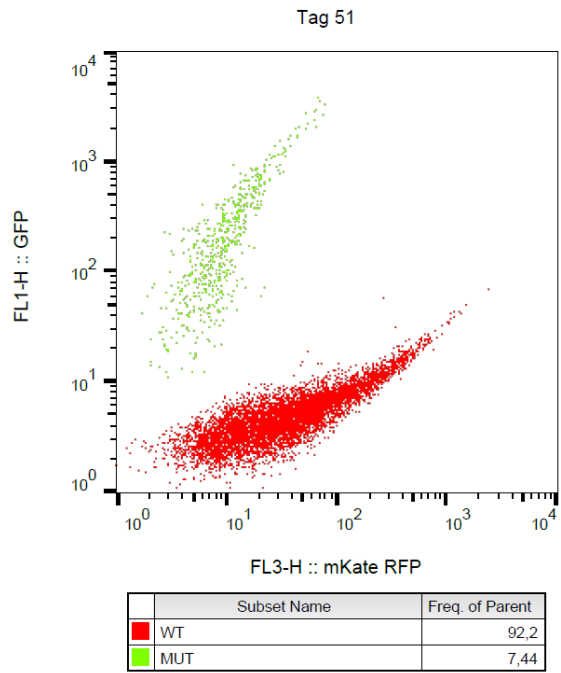
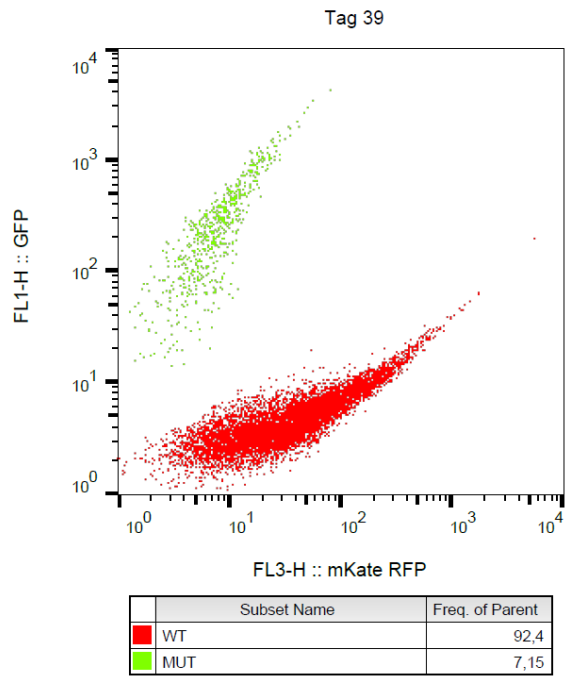




Anhang 2.11. Vollständige Durchflusszytometrie -Auswertung von Ansatz 5.3

Dargestellt sind die Durchflusszytometrie-Analysen von Tag 0 bis 51. Die rot fluoreszierenden Zellen (LSSmKate2) mit *IKZF1* WT sind im Anhang 2.11 rot dargestellt. Grün fluoreszierende Zellen (EGFP) mit *IKZF1* Mutation R439H werden im Anhang 2.11 grün dargestellt.





Anhang 3. Auswertungsdaten der Durchflusszytometrie -Analyse

Anhang 3.1. Durchflusszytometrie -Auswertungsdaten Ansatz 1.1

Tage	WT	MUT
0	90,80%	7,67%
7	76,70%	21,30%
9	66,40%	33,00%
12	38,00%	60,80%
16	16,60%	80,90%
19	9,96%	89,10%
30	5,27%	91,60%
40	3,13%	95,60%
50	1,54%	97,60%

Anhang 3.2. Durchflusszytometrie -Auswertungsdaten Ansatz 1.2

Tage	WT	MUT
0	90,60%	8,24%
7	89,60%	9,93%
9	87,20%	12,40%
12	86,10%	13,00%
16	85,50%	14,00%
19	83,40%	16,20%
30	85,60%	14,10%
40	87,00%	11,30%
50	92,60%	7,15%

Anhang 3.3. Durchflusszytometrie -Auswertungsdaten Ansatz 1.3

Tage	WT	MUT
0	90,50%	8,37%
7	93,10%	6,53%
9	92,30%	7,45%
12	94,10%	5,35%
16	94,20%	5,53%
19	94,50%	5,39%
30	88,40%	11,40%
40	88,50%	11,40%
50	90,80%	7,53%
58	96,50%	3,39%
80	96,90%	2,93%

Anhang 3.4. Durchflusszytometrie -Auswertungsdaten Ansatz 2.1

Tage	WT	MUT
0	90,80%	7,67%
7	77,60%	20,50%
9	66,30%	33,00%
12	40,50%	58,70%
16	15,10%	83,30%
19	8,01%	91,00%
30	2,91%	94,50%
40	0,98%	98,40%
50	0,85%	98,50%

Anhang 3.5. Durchflusszytometrie -Auswertungsdaten Ansatz 2.2

Tage	WT	MUT
0	90,60%	8,24%
7	90,60%	9,13%
9	88,30%	11,40%
12	87,40%	11,80%
16	87,40%	12,20%
19	87,80%	11,10%
30	89,40%	8,74%
40	94,60%	5,19%
50	99,30%	0,63%

Anhang 3.6. Durchflusszytometrie -Auswertungsdaten Ansatz 2.3

Tage	WT	MUT
0	90,50%	8,37%
7	92,00%	7,65%
9	92,20%	7,52%
12	93,00%	6,54%
16	93,00%	6,74%
19	89,60%	8,91%
30	82,00%	17,80%
40	77,10%	22,40%
50	71,20%	28,40%
58	71,40%	27,90%
80	77,30%	21,70%

Anhang 3.7. Durchflusszytometrie -Auswertungsdaten Ansatz 3.1

Tage	WT	MUT
0	92,00%	7,77%
7	80,40%	17,50%
9	70,20%	29,10%
12	48,40%	50,00%
16	20,90%	71,50%
19	11,50%	80,80%
30	3,85%	78,20%
40	0,94%	93,80%
50	0,31%	95,60%

Anhang 3.8. Durchflusszytometrie -Auswertungsdaten Ansatz 4.1

Tage	WT	MUT
0	92,00%	7,77%
7	80,40%	17,30%
9	68,10%	31,20%
12	43,30%	55,00%
16	15,90%	76,90%
19	7,31%	85,00%
30	1,17%	82,30%
40	0,35%	94,80%
50	0,25%	96,40%

Anhang 3.9. Durchflusszytometrie -Auswertungsdaten Ansatz 5.1

Tage	WT	MUT
0	87,50%	12,20%
5	84,30%	14,80%
9	82,90%	16,10%
12	81,20%	18,30%
16	79,10%	19,80%
19	84,20%	14,80%
30	84,00%	14,60%
40	76,30%	22,90%
50	79,20%	20,50%
62	83,40%	16,00%

Anhang 3.10. Durchflusszytometrie -Auswertungsdaten Ansatz 5.2

Tage	WT	MUT
0	90,90%	8,78%
5	90,90%	8,51%
9	89,90%	9,20%
12	90,10%	9,64%
16	89,50%	9,53%
19	90,90%	8,55%
30	90,50%	8,56%
40	89,80%	9,45%
50	90,80%	9,03%
62	90,30%	9,25%

Anhang 3.11. Durchflusszytometrie -Auswertungsdaten Ansatz 5.3

Tage	WT	MUT
0	91,20%	8,07%
7	92,20%	7,35%
14	92,80%	6,69%
30	93,10%	6,21%
39	92,40%	7,15%
51	92,20%	7,44%
60	93,50%	5,89%

I Abkürzungsverzeichnis

aCHG	Array-vergleichende genomische Hybridisierung
ADC	Antibody-Drug-Conjugate
ASCT	autologe Stammzelltransplantation
BCMA	B-Cell Maturation Antigen
bp	Basenpaare
CAR-T	Chimäre-Antigen-Rezeptor-T-Zellen
CBM	Cereblon bindendes Molekül
CBMs	Cereblon bindende Moleküle
CCB1	DNA Damage Binding Protein 1
CNAs	copy number Variants
CRBN	Cereblon
CUL4B	Cullin-4B
DACIs	Histon-Deacetylase-Inhibitor
DaraVMP	Daratumumab, Bortezomib, Melphalan, Prednisolon
DaraVTD	Daratumumab, Bortezomib, Dexamethason, Thalidomid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure / deoxyribonucleic acid
DRd	Daratumumab, Lenalidomid, Dexamethason
DSMM	Deutsche Studiengruppe Multiples Myelom
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGFP	enhanced green fluorescent protein

FISH	Fluorescence in situ hybridization (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GIMEMA	Gruppo Italiano Malattie EMatologiche dell'Adulto
GMMG	German-Speaking Myeloma Multicenter Group
GWAS	genome-wide association studies
HDT	Hochdosischemotherapie
Ide-cel	Idecabtagene Vicleucel
IFM	Intergroupe Francophone du Myélome
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
<i>IKZF</i>	ikaros family zinc finger protein (Zinkfinger-Protein 1 der Ikaros-Familie)
IMiDs	Immunmodulatoren
IRF4	Interferon Regulatory Factor 4
ISS	International Staging System
KM	Knochenmark
LDH	Laktatdehydrogenase
mAbs	Monoklonale Antikörper
MGUS	monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MM	Multiples Myelom
MRT	Magnetresonanztomographie
mSMART	Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy
MUT	Mutation
NGF	Next Generation Flow Cytometry
NGS	Next Generation Sequencing
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

PCR	Polymerase-Kettenreaktion / polymerase chain reaction
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie - Computertomographie
PETHEMA	spanische Myelom Gruppe PETHEMA
PIs	Proteasom-Inhibitoren
Rd	Lenalidomid, Dexamethason
ROC1	Cullin-Regulator 1
ROTI	related organ or tissue impairment
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
SMM	Schwelendes Myelom, smouldering myeloma
β_2 M	beta ₂ -Mikroglobulin
SVs	strukturellen Varianten
TWAS	multi-tissue transcriptome-wide association study (TWAS)
UV	Ultraviolettstrahlung
VCD	Bortezomib, Cyclophosphamid, Dexamethason
VMP	Bortezomib, Melphalan, Prednisolon
VRd	Bortezomib, Lenalidomid, Dexamethason
VTD	Bortezomib, Dexamethason, Thalidomid
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
WT	Wildtyp / wild type
XPO-1	Exportin-1-Protein

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Behandlungsübersicht der Erstlinientherapie des Multiplen Myeloms	12
Abbildung 2: CRL4-CRBN E3 Ubiquitin Ligase Komplex	22
Abbildung 3: Lebensfähigkeit der L363 <i>IKZF1</i> Sublinien nach sechstägiger Behandlung mit 10 μ M Lenalidomid.....	23
Abbildung 4: Western-Blot, unterschiedliche molekulare Expression von <i>IKZF1</i> nach Übernachtbehandlung mit 10 μ M Lenalidomid, der L363- <i>IKZF1</i> Sublinien	24
Abbildung 5: Vektor pT2-DC	43
Abbildung 6: Vektor TST-210-pT2SVneo-CMV-EGFP.....	44
Abbildung 7: Plasmid pLSSmKate2-N1	46
Abbildung 8: Plasmid mTagBFP2-pBAD.....	48
Abbildung 9: Übersicht des Erstellungswegs der fluoreszierenden Farbvektoren	49
Abbildung 10: Vektor pT2-DC-Neo (Erstellungsjahr 2018)	50
Abbildung 11: Übersicht der Einzelfarbenvektoren.....	52
Abbildung 12: Vektor pT2-mKate-Neo (Erstellungsjahr 2018)	52
Abbildung 13: Vektor pT2-EGFP-Neo (Erstellungsjahr 2018).....	54
Abbildung 14: Vektor pT2-mTag-Neo (Erstellungsjahr 2018).....	55
Abbildung 15: Übersicht der Zweifarbenvektoren.....	57
Abbildung 16: Vektor pT2-EGFP-mKate-Neo (Erstellungsjahr 2018)	57
Abbildung 17: pT2-EGFP-mTag-Neo (Erstellungsjahr 2018).....	59
Abbildung 18: Vektor pT2-mTag-mKate-Neo (Erstellungsjahr 2018).....	60
Abbildung 19: Veranschaulichung der drei Ansätze aus Ansatzgruppe 1	63
Abbildung 20: Veranschaulichung der drei Ansätze aus Ansatzgruppe 2	64
Abbildung 21: Veranschaulichung des Ansatzes aus Ansatzgruppe 3	65
Abbildung 22: Veranschaulichung des Ansatzes aus Ansatzgruppe 4	65
Abbildung 23: Veranschaulichung der drei Ansätze aus Ansatzgruppe 5	66
Abbildung 24: Durchflusszytometrie-Auswertung von Ansatz 1.1	69

Abbildung 25: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 1.1.....	70
Abbildung 26: Durchflusszytometrie-Auswertung von Ansatz 1.2.....	71
Abbildung 27: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 1.2.....	72
Abbildung 28: Durchflusszytometrie-Auswertung von Ansatz 1.3.....	73
Abbildung 29: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 1.3.....	74
Abbildung 30: Durchflusszytometrie-Auswertung von Ansatz 2.1.....	75
Abbildung 31: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 2.1.....	76
Abbildung 32: Durchflusszytometrie-Auswertung von Ansatz 2.2.....	77
Abbildung 33: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 2.2.....	78
Abbildung 34: Durchflusszytometrie-Auswertung von Ansatz 2.3.....	79
Abbildung 35: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 2.3.....	80
Abbildung 36: Durchflusszytometrie -Auswertung von Ansatz 3.1.....	82
Abbildung 37: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 3.1.....	83
Abbildung 38: Durchflusszytometrie-Auswertung von Ansatz 4.1.....	84
Abbildung 39: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 4.1.....	85
Abbildung 40: Durchflusszytometrie -Auswertung von Ansatz 5.1.....	86
Abbildung 41: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 5.1.....	87
Abbildung 42: Durchflusszytometrie-Auswertung von Ansatz 5.2.....	88
Abbildung 43: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 5.2.....	89
Abbildung 44: Durchflusszytometrie -Auswertung von Ansatz 5.3.....	90
Abbildung 45: Wachstumskurven der beiden Zellpopulationen in Ansatz 5.3.....	91

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: SliM-CRAB Kriterien	2
Tabelle 2: Diagnosekriterien für MGUS	4
Tabelle 3: Diagnosekriterien für das schwelende Multiple Myelom	5
Tabelle 4: Risikofaktoren des 2/20/20 des Risikostratifizierungsmodell bei SMM	5
Tabelle 5: Risikokategorien und 2-Jahres-Progressionsrisiko des SMM.....	6
Tabelle 6: Diagnosekriterien für das symptomatische Multiple Myelom.....	6
Tabelle 7: Erstdiagnostik bei Multiplem Myelom	9
Tabelle 8: Internationales Staging System und Prognose	10
Tabelle 9: Definition des klinischen Rezidivs.....	15
Tabelle 10: Definition des signifikanten Paraproteinrezidivs	16
Tabelle 11: Charakteristika der Zelllinien L363	25
Tabelle 12: Charakteristika der Zelllinie L363	25
Tabelle 13: Primer	26
Tabelle 14: Materialliste.....	27
Tabelle 15: TAE Puffer	30
Tabelle 16: Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS).....	30
Tabelle 17: Gebrauchsgegenstände	30
Tabelle 18: Geräte	31
Tabelle 19: Komponenten und Ablauf des Ausschneidens beider Vektorabschnitte	33
Tabelle 20: Komponenten für die PCR zur Anbringung von Restriktionsstellen und Amplifikation	34
Tabelle 21: PCR-Programm zur Anbringung von Restriktionsstellen.....	34
Tabelle 22: Komponenten für Kolonie-PCR zur Kontrolle der Transformation und Ligation	37
Tabelle 23: Kolonie-PCR Programm	37

IV Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Professor Dr. med. Martin Kortüm danken. Durch seine Leitung und stetige Unterstützung wurde diese Arbeit erst möglich.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Umair Munawar und Dr. Santiago Barrio für die durchgehende Betreuung herzlich bedanken. Ein besonderer Dank gilt Cornelia Vogt für die umfassende Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, Anleitung der Softwares und Erstellung dieser Arbeit. Ohne diese unbegrenzte Hilfsbereitschaft wäre die Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich möchte mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und die umfassende Unterstützung bedanken.

Des Weiteren möchte ich Dr. Thorsten Stühmer für die fachliche Beratung und praktische Unterstützung danken.

Zuletzt gilt mein Dank meinem persönlichen Umfeld, das mich bedingungslos unterstützt.

V Eigene Veröffentlichungen

Barrio, S., Munawar, U., Zhu, Y. X., Giesen, N., Shi, C., Viá, M. D., ... Kortüm, K. M. (2019). *IKZF1/3* and *CRL4^{CRBN}* E3 ubiquitin ligase mutations and resistance to immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Haematologica*, 105(5), e237-e241. doi:10.3324/haematol.2019.217943

Munawar, U., Rasche, L., Müller, N., Vogt, C., Da-Via, M., Haertle, L., ... Barrio, S. (2019). Hierarchy of mono- and biallelic TP53 alterations in multiple myeloma cell fitness. *Blood*, 134(10), 836-840. doi:10.1182/blood.2019000080