



Etablierung eines stabilen induzierbaren Multikassetten-Systems für shRNA-Knockdown-Konstrukte in Myelom Zelllinien und Anwendung zur Analyse des NFκB Signalwegs

Establishment of a stable and inducible Multicassette-shRNA-Knockdown System in Myeloma Cell Lines and Adaption to the Evaluation of the NFκB-Pathway in Multiple Myeloma

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Sektion Clinical Sciences

Vorgelegt von

Laurens Zugelder

aus

Bad Mergentheim

Würzburg, Juli 2018



Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Andreas Rosenwald

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

2. Betreuer: Prof. Dr. Jürgen Löffler

3. Betreuer: Prof. Dr. Andreas Schlosser

4. Betreuer: Dr. Thorsten Stühmer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Die Klinik des Multiplen Myeloms	1
1.1.1.	Definition	1
1.1.2.	Epidemiologie	2
1.1.3.	Klinisches Erscheinungsbild	4
1.1.4.	Diagnostik	5
1.1.5.	Klinische Stadieneinteilung und Prognose.....	8
1.1.6.	Therapie.....	11
1.2.	Die Pathogenese des Multiplen Myeloms	15
1.2.1.	Die physiologische Entwicklung der B-Zelle	15
1.2.2.	Das Stufenmodell der onkogenen Transformation.....	17
1.2.3.	Das onkogene Signalnetzwerk im Multiplen Myelom.....	21
1.3.	Der NFκB-Signalweg	22
1.3.1.	Komponenten des Signalwegs	23
1.3.2.	Signaltransduktion.....	24
1.3.3.	NFκB im Multiplen Myelom.....	27
1.4.	Zielsetzung der Arbeit	29
2.	MATERIAL UND METHODEN	32
2.1.	Zellbiologische Methoden	32
2.1.1.	Myelom Zelllinien.....	32
2.1.2.	Kulturbedingungen.....	33
2.1.3.	Bestimmung der Zelldichte	33
2.1.4.	Einfrieren von Zellen	33
2.1.5.	Nachweis von Mykoplasmen mittels PCR.....	33
2.1.6.	Transfektion durch Elektroporation	35
2.1.7.	Durchflusszytometrie	37
2.1.8.	Beurteilung der Zellviabilität: alamarBlue Assay	38
2.2.	Molekularbiologische Methoden.....	38
2.2.1.	Induzierbarkeit: Das tet-Repressor System	39
2.2.2.	Das <i>Sleeping Beauty</i> Transposon System	40
2.2.3.	short hairpin RNA: Design und Funktionsweise.....	44
2.2.4.	Annealing von DNA-Oligonukleotiden	46
2.2.5.	Phosphorylierung der Doppelstrang-Oligonukleotide	46
2.2.6.	DNA-Restriktionsverdau.....	47
2.2.7.	Vektorpräparation: Dephosphorylierung und DNA-Fällung	48

2.2.8.	Insertpräparation: Gelextraktion	49
2.2.9.	Ligation und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	49
2.2.10.	Selektion ausgewählter Klone mittels PCR.....	50
2.2.11.	DNA-Gelelektrophorese.....	51
2.2.12.	Plasmidextraktion mittels Qiagen Plasmid Kits	51
2.2.13.	DNA-Sequenzierung	51
2.3.	Proteinbiochemische Methoden: Western Blot	52
2.3.1.	Ernten und Lysieren der Zellen	52
2.3.2.	Auftrennung mittels SDS-PAGE	53
2.3.3.	Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran	54
2.3.4.	Immunchemische Färbung und Analyse von Proteinbanden.....	54
2.4.	Liste der Materialien.....	56
3.	ERGEBNISSE.....	64
3.1.	Etablierung des stabilen, induzierbaren Mehrfachknockdowns	66
3.1.1.	eGFP als Frühmarker selektionswürdiger Transfektionen.....	66
3.1.2.	Transfektion stabiler tetR-Sub-Zelllinien.....	67
3.1.3.	Erstinduktion eines Mehrfachkonstrukts.....	69
3.1.4.	Doxyzyklin als Induktionsagens	72
3.1.5.	Zellphysiologische Effekte des MMEE-Knockdowns	78
3.2.	Anwendung auf den NFκB-Signalweg.....	81
3.2.1.	Knockdown von p65 (RelA) und p52	82
3.2.2.	Einzelknockdown von NIK.....	84
3.2.3.	Kombinierter Knockdown von p65, p52 und NIK.....	89
4.	DISKUSSION	94
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	109
6.	SUMMARY	111
7.	ANHANG.....	113
8.	LITERATUR.....	125
9.	ABBILDUNGEN	134
10.	DANKSAGUNG.....	135
11.	LEBENS LAUF	136
12.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	137

1. EINLEITUNG

1.1. Die Klinik des Multiplen Myeloms

1.1.1. Definition

Das Multiple Myelom (MM) ist eine hämatologische Systemerkrankung, welche der Gruppe der indolenten B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome zugerechnet wird und sich durch eine multilokuläre Infiltration des Knochenmarks durch antikörpersezernierende, monoklonale Plasmazellen auszeichnet. Auch wenn in den vergangenen beiden Jahrzehnten im Hinblick auf die verfügbaren Behandlungsoptionen durchaus signifikante Fortschritte erzielt werden konnten und zudem aktuelle klinische Studien nahelegen, dass neue immuntherapeutische Ansätze zukünftig einen weiteren bedeutenden Beitrag zur Verbesserung der Myelomtherapie leisten werden, muss das MM dabei bis heute als eine primär unheilbare Erkrankung betrachtet werden.¹⁻² Dies liegt zum einen an der Tatsache, dass die Diagnose klinisch anhand der durch die Antikörpersekretion der Myelomzellen (sog. Paraproteine) bedingten Endorganschäden gestellt wird. Somit kann die Therapie oft erst eingeleitet werden, nachdem bereits Krankheitsfolgen eingetreten sind, welche sich negativ auf die Therapiefähigkeit und somit auf den Behandlungserfolg und das Gesamtüberleben der Patienten auswirken. Dieses Vorgehen stammt aus der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts als die Therapieoptionen limitierter und gleichzeitig deutlich nebenwirkungsreicher waren. Die Fortschritte sowohl im diagnostischen wie im therapeutischen Bereich spiegeln sich in der Erweiterung der Krankheitsdefinition durch die International Myeloma Working Group aus dem Jahr 2014 wider (vgl. 1.1.4).³

Zum anderen erschwert die multifaktorielle Genese der Erkrankung die Identifikation und damit eine selektive Blockade bestimmter, für Überleben und Wachstum der Tumorzellen essenzieller onkogener Signalwege. Um das gegenwärtige Behandlungsspektrum jedoch um potenziell kurative Therapieansätze und verbesserte Therapieoptionen für rezidierte Patienten erweitern zu können, ist eine Vertiefung der Kenntnisse über diese Signalwege von maßgeblicher Bedeutung.

1.1.2. Epidemiologie

Mit einer Inzidenz von bis zu 6 Neuerkrankungen/100.000 Einwohnern pro Jahr ist das MM für 17% aller hämatologischen Neoplasien und 1,8% aller neu diagnostizierten Malignome verantwortlich. Weiterhin sind 17% aller hämatologischen sowie 2% aller Krebstodesfälle auf die Erkrankung zurückzuführen.⁴ Männer sind in einem Verhältnis von 4:3 gegenüber Frauen betroffen, außerdem ist eine gehäufte Inzidenz bei Menschen mit schwarzer Hautfarbe beschrieben.⁴⁻⁵ Beim MM handelt es sich um eine Erkrankung des höheren Lebensalters mit einem durchschnittlichen Alter von ungefähr 70 Jahren bei Erstdiagnose und einem Inzidenzgipfel in der 6. Dekade. Erkrankungen vor dem 40. Lebensjahr stellen eine seltene Ausnahme (<2% aller Fälle) dar.⁶⁻⁷

Das MM zählt zu den Monoklonalen Gammopathien, welchen die Sekretion von funktionslosen Immunglobulinen, den sogenannten Paraproteinen, durch einen klonal maligne transformierter Plasmazellen gemein ist. Dabei stellt die Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) eine prä-maligne Vorstufe dar, die dem MM fast immer vorausgeht.⁸ Die MGUS stellt in der Regel eine laborchemische Zufallsdiagnose dar, welche per definitionem keine klinische Symptomatik zeigt und einen Paraproteinspiegel von 30 g/L im Serum nicht übersteigt. Außerdem muss der Anteil monoklonaler Zellen im Knochenmark unter 10% liegen. Alle monoklonalen Gammopathien lassen sich einer Immunglobulinklasse (IgG, IgA, IgD, Bence-Jones-Leichtketten) zuordnen. Dabei geht das MM zu 80% aus einer Nicht-IgM-MGUS und zu 20% aus einer Leichtketten-MGUS hervor. MGUS vom Typ IgM präsentieren sich im Falle eines malignen Progresses in der Regel als Makroglobulinämie (Morbus Waldenström). Die MGUS zeigt wie das MM eine altersabhängig steigende Inzidenz mit einer Prävalenz von 3,2% in der Altersgruppe über 50 Jahren und über 5% bei Patienten über 70 Jahren sowie eine Gesamtprogressionsrate hin zur symptomatischen Erkrankung von 1%/Jahr.⁹⁻
¹⁰ Diese vergleichsweise geringe Zahl muss jedoch im Kontext mit Progressionsraten von 17%, 34% und 39% nach 10, 20 und 25 Jahren und vor allem mit in jüngerer Vergangenheit identifizierten Risikofaktoren für einen Übergang in die symptomatische Erkrankung gesehen werden.¹¹ So ist das Progressionsrisiko beispielsweise abhängig vom Paraproteinspiegel bei Erstdiagnose und dem Typ des sezernierten Immunglobulins (IgA > IgG).¹² Weiterhin wurde ein abnormales Verhältnis freier Leichtketten der Typen

Lambda und Kappa als Risikofaktor identifiziert (vgl. 1.1.4). Angesichts der geringen Gesamtprogressionsrate in die maligne Erkrankung und mangels zuverlässiger Parameter zur Identifikation von Risikogruppen ist eine Therapie der MGUS jedoch bis heute nicht indiziert.¹³⁻¹⁴

Eine Übergangsstufe zwischen MGUS und MM stellt das sog. Schwelende Multiple Myelom (Smoldering Multiple Myeloma, SMM) dar. Wie bei der MGUS zeigen sich hier noch keine Endorganschäden, allerdings liegen die Grenzwerte für Paraproteinspiegel (>30 g/L) und Plasmazellanteil im Knochenmark (10-60%) höher. Diese Gruppe ist als biologisch und prognostisch sehr heterogen zu betrachten, da sie aus einer Untergruppe von Patienten mit prämaligen Veränderungen (MGUS) und einer malignen Untergruppe vor Eintreten von Endorganschäden besteht (vgl. Abbildung 1).¹⁵ Die Identifikation der zur letzteren Gruppe gehörenden Patienten ist essenziell, um Patienten noch vor dem Eintreten der Prognose-verschlechternden Endorganschäden therapieren zu können.¹⁶ Leider fehlen bislang pathologische oder molekularbiologische Marker um die beiden Untergruppen im SMM-Stadium hinreichend voneinander unterscheiden zu können. Einige Biomarker, welche mit einem Progressionsrisiko von >80% innerhalb von 2 Jahren assoziiert sind, haben jedoch Eingang in die überarbeitete Krankheitsdefinition der International Myeloma Working Group (IMWG) gefunden (vgl. Kapitel 1.1.4.).

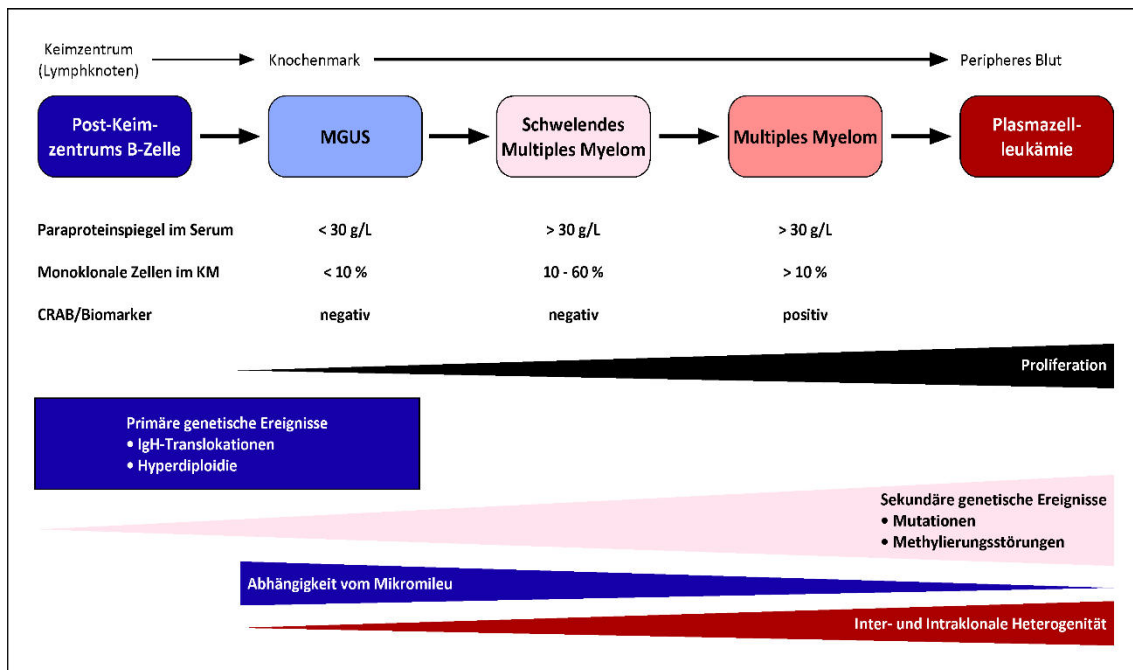


Abbildung 1

Übersicht über die verschiedenen klinischen Erscheinungsbilder monoklonaler Gammopathien:

Ein immortalisierendes Primäreignis führt zur klonalen Expansion einer prä-malignen Zellpopulation (MGUS). Durch Akkumulation weiterer genetischer Alterationen wird dieser Zellklon im weiteren Verlauf sukzessive dereguliert. Während die Proliferationsrate und die genetische Heterogenität innerhalb der Population ansteigt, sinkt die Abhängigkeit von extrazellulären Signalen. Die maligne Transformation resultiert in der Ausbildung klinischer Symptome und schließlich der Ausschwemmung maligner Zellen in die Peripherie (nach Morgan et al. (2012) und Dhodapkar et al. (2016)).¹⁷⁻¹⁸

1.1.3. Klinisches Erscheinungsbild

Die klinische Symptomatik wird einerseits durch die sezernierten Paraproteine und andererseits durch die Knochenmark-verdrängende und Osteoklasten-stimulierende Aktivität der Myelomzellen selbst hervorgerufen.¹⁹

Letztere führt über direkten Zellkontakt und Zytokinsekretion durch ein Verschieben des physiologischen Gleichgewichts zwischen Knochenabbau und -aufbau zu Osteolysen vor allem im Bereich des Schädels, des Stammskeletts und der proximalen Extremitätenknochen.²⁰ Im Bereich der Läsion selbst resultiert dies in Schmerzen und pathologischen Frakturen, während das aus dem Knochen mobilisierte Calcium kumulativ die Nieren schädigt und in Extremfällen gastrointestinale und zentralnervöse Akutsymptome im Sinne einer hyperkalzämischen Krise zur Folge haben kann.

Die Infiltration des Knochenmarks durch die monoklonalen Plasmazellen kann im Verlauf der Erkrankung durch Verdrängung der Hämatopoese zu einer Verminderung aller Blutzellsysteme führen. Eine insuffiziente Erythropoese äußert sich im Sinne einer Anämie zum Beispiel durch Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Blässe, während sich eine Thrombopenie als erhöhte Blutungsneigung manifestiert. Eine Leukopenie führt zu einer gesteigerten Infektanfälligkeit, welche durch die Sekretion funktionsloser Immunglobuline durch die Myelomzellen und das resultierende Antikörpermangelsyndrom zusätzlich verstärkt wird. Eine Anämie wird beim MM deutlich häufiger beobachtet als eine Verminderung von Thrombo- oder Leukozyten.

Die Paraproteinämie kann außerdem ein Hyperviskositätssyndrom mit Mikrozirkulationsstörungen sowie durch direkte Toxizität im Bereich der Nierentubuli eine Verschlechterung der Nierenfunktion zur Folge haben. Diese wird, sofern eindeutig durch das MM bedingt, als Myelomniere bezeichnet und kann im Rahmen einer Cast-Nephropathie zu einem nephrotischen Syndrom bis hin zu einer dialysepflichtigen Niereninsuffizienz führen.

Die Ablagerung von Paraproteinen in Niere und anderen Organsystemen führt überdies in ungefähr 10% der Fälle zu einer systemischen Leichtketten-Amyloidose oder zu einer Polyneuropathie.

Die führenden Endorganschäden sind als CRAB-Kriterien (**I**ncreased **C**alcium, **R**enal **I**nsufficiency, **A**nemia, **B**one **L**esions) ein elementarer Bestandteil der Krankheitsdefinition.²¹

1.1.4. Diagnostik

Das diagnostische Spektrum setzt sich beim MM im Wesentlichen aus laborchemischen Auffälligkeiten in Serum und Urin sowie bildgebenden und histopathologischen Begutachtungen zusammen. In den letzten Jahren gelang zudem die Identifikation einiger prognostischer Marker auf molekulargenetischer Ebene. Da diese zwar einen zunehmend wichtigeren Parameter im Rahmen der Risikostratifizierung von Myelompatienten darstellen (vgl. 1.1.5.), bei der Diagnosestellung bislang jedoch keine Rolle spielen, werden sie im Kapitel Pathogenese aufgeführt (vgl. 1.2.).

Bei der Untersuchung des Patientenserums kann zunächst eine unspezifische Erhöhung der Gesamteiweißkonzentration auffallen. Der genaue Nachweis der sezernierten

Immunglobuline gelingt mittels Immunfixation und Serumelektrophorese. Bei letzterer kann der schmalbasige, für das MM pathognomonische sog. M-Gradient als Ausdruck der **monoklonalen** Immunglobulinproduktion festgestellt werden. Er findet sich in der Regel in der γ -Globulin-Fraktion, kann beim IgA-Myelom aber auch in der β -Fraktion verborgen sein bzw. beim Leichtketten- oder dem seltenen asekretorischen Myelom vollständig fehlen. Eine Serum-Immunfixation kann hier auch geringe Mengen der möglicherweise in der Serumelektrophorese verborgenen Paraproteine nachweisen und ermöglicht eine eindeutige Subtypenzuordnung (Immunglobulin-Klasse bzw. Leichtkettentyp).

In die überarbeiteten Diagnosekriterien der IMWG von 2014 (siehe Abbildung 2) hat zudem das mittels Immunnephelometrie gemessene Verhältnis freier Leichtketten κ/λ (FLC-Ratio) Eingang gefunden.³ Dieses liegt physiologischerweise zwischen 0.26 und 1.65. Bei den monoklonalen Gammopathien wird im Rahmen der Paraproteinsekretion einer der beiden Leichtkettentypen, die sogenannte „involved chain“, im Übermaß gegenüber der „uninvolved chain“ produziert. Larsen et al. (2013) konnten nachweisen, dass eine Ratio involved:uninvolved von größer 100 bei fehlenden CRAB-Kriterien, also im MGUS- oder SMM-Stadium, mit einer Progressionsrate von über 80% binnen 2 Jahren in ein symptomatisches MM verbunden ist.²² Die Studienlage führte zur Aufnahme dieses Biomarkers in die überarbeiteten Diagnosekriterien von 2014.³

Weitere Serumwerte wie Nierenretentionsparameter, β_2 -Mikroglobulinfraktion oder Calcium korrelieren mit der Tumormasse oder Endorganschäden und sind Teil der Diagnosekriterien sowie der klinischen Stadieneinteilung (vgl. 1.1.5).

Außerdem ist die Analyse des Blutbilds zur Feststellung von Zytopenien durch Verdrängung der Hämatopoese Teil der Basisdiagnostik.

Der Urin wird mittels der etablierten laborchemischen Untersuchungen auf Anzeichen einer Nierenfunktionsstörung sowie spezifisch mittels Immunfixation auf die Ausscheidung von Leichtketten (Bence-Jones-Proteinurie) untersucht. Diese findet sich bei allen Patienten mit Leichtketten-Myelom sowie in bis zu zwei Dritteln der Myelome vom Subtyp IgG und IgA.

In der bildgebenden Diagnostik zum Nachweis osteolytischer Läsionen haben neuere Techniken wie das Low-Dose-Ganzkörper-CT oder das MRT das konventionelle Röntgen nach Pariser Schema weitgehend abgelöst. Der Nachweis einer osteolytischen Läsion reicht hierbei für die Diagnose einer Myelom-assoziierten Knochenbeteiligung im Sinne der CRAB-Kriterien aus. Der Nachweis einer Osteoporose oder der von Kompressionsfrakturen der Wirbelsäule in Verbindung mit einer monoklonalen Gammopathie fehlt in den überarbeiteten Diagnosekriterien, da beide Merkmale bei älteren MGUS-Patienten mit einer altersbedingten Osteoporose zu Überdiagnosen eines MM führen würden.³

Die Untersuchung von Knochenmarkbiopsien und -aspiraten dient zum einen der Durchführung von molekulargenetischen Untersuchungen zur Identifikation und Evaluation potentieller Risikofaktoren mittels Zytogenetik und Immunphänotypisierung. Im Rahmen der überarbeiteten Diagnosekriterien ist die Knochenmarkuntersuchung jedoch auch essenzieller Bestandteil der Krankheitsdefinition des MM. Um die Fehldiagnose MM bei MGUS-Patienten, welche ohne Assoziation mit der prämaligen Gammopathie z.B. eine Nierenfunktionsstörung oder Anämie aufweisen, zu vermeiden, wird nun ein Anteil klonaler Plasmazellen am Knochenmark von mindestens 10% gefordert. Weiterhin wird analog zur FLC-Ratio ein Plasmazellanteil im Knochenmark von über 60% auch ohne Erfüllung eines CRAB-Kriteriums als für die Diagnose MM ausreichend angesehen, nachdem gezeigt werden konnte, dass auch diese Patienten in >80% der Fälle binnen 2 Jahren in die symptomatische Erkrankung fortschreiten.²³

Überarbeitete Diagnosekriterien der International Myeloma Working Group (2014)

Definition des Multiplen Myeloms

Anteil monoklonaler Zellen im Knochenmark > 10% oder durch Biopsie gesichertes knöchernes oder extramedulläres Plasmozytom und eines oder mehrere der nachfolgenden Myelom-definierenden Charakteristika:

- Nachweis von Endorganschäden, welche auf die zugrunde liegende myeloproliferative Erkrankung zurückgeführt werden können (CRAB-Kriterien):
 - Hypercalzämie
 - Niereninsuffizienz (renal insufficiency)
 - Anämie
 - Knochenläsionen (bone lesions)
- Einer oder mehrere der folgenden biochemischen Malignitätsmarker
 - Anteil monoklonaler Zellen im Knochenmark > 60%
 - Verhältnis freier Leichtketten im Serum involved:uninvolved > 100
 - > 1 fokale Läsionen (> 5mm) im MRT

Definition des Schwelenden Multiplen Myeloms

Beide Kriterien müssen erfüllt sein:

- Paraprotein im Serum > 30 g/L oder Paraprotein im Urin > 500 mg/24h und/oder Anteil monoklonaler Zellen im Knochenmark 10-60%
- Fehlen Myelom-definierender Charakteristika oder einer Amyloidose

Abbildung 2

Überarbeitete Diagnosekriterien der International Myeloma Working Group (IMWG) nach Rajkumar et al. (2014)³

1.1.5. Klinische Stadieneinteilung und Prognose

Für nahezu alle malignen Erkrankungen existieren Stagingssysteme, welche Patienten anhand etablierter Parameter verschiedenen Krankheitsstadien zuordnen. Diese sind in der Regel mit unterschiedlichen Prognosen assoziiert, was im Sinne einer Nutzen-Risiko-Abwägung Therapieentscheidungen beeinflussen kann, die Patientenkommunikation erleichtert und in das Design und die Interpretation von Studien einfließt.

Die Prognose für Patienten mit MM ist bei einem durchschnittlichen Gesamtüberleben von 7 bis 8 Jahren nach Erstdiagnose höchst variabel und reicht von weniger als 6 Monaten bis hin zu über 10 Jahren.²⁴⁻²⁵ Dieses weite Spektrum basiert neben der großen Heterogenität der Erkrankung selbst auch auf der Varianz verschiedener Patienten-assoziiertes Merkmale.²⁶⁻²⁷

Die erste klinische Stadieneinteilung wurde 1975 von Durie und Salmon etabliert.²⁸ Sie konnten zeigen, dass sich anhand von vier Kriterien die Tumorzellmasse extrapolieren

lässt. Zusätzlich floss die Nierenfunktion als Suffix A oder B ein. Die Klassifikation nach Durie und Salmon (vgl. Tabelle 1) erlaubte allerdings keine prognostische Einschätzung.

<u>Stadium I:</u> (niedrige Tumorzell- masse: <0,6)	Alle 4 Kriterien erfüllt: <ul style="list-style-type: none"> • Hämoglobin > 10 g/dl • Serumcalcium normal • Normaler Röntgenbefund oder eine solitäre Osteolyse • Geringe Paraproteinkonzentration: <ul style="list-style-type: none"> ○ IgG < 5 g/dl ○ IgA < 3 g/dl ○ Leichtketten (Urin): < 4 g/24h
<u>Stadium II:</u>	Weder Stadium I noch III
<u>Stadium III:</u> (hohe Tumorzell- masse: >1,2)	≥ 1 Kriterium erfüllt: <ul style="list-style-type: none"> • Hämoglobin < 8,5 g/dl • Serumcalcium erhöht • Fortgeschrittene Osteolysen • Hohe Paraproteinkonzentration: <ul style="list-style-type: none"> ○ IgG > 7 g/dl ○ IgA > 5 g/dl Leichtketten (Urin): < 12 g/24h

Tabelle 1

Stadieneinteilung des MM nach Salmon und Durie mit Angabe der Tumorzellmasse (Zellen x 10¹²/m² Körperoberfläche). Nach der Nierenfunktion erfolgte zusätzlich die Bezeichnung mit A oder B (Serumkreatinin </> 2 mg/dl).²⁸

Das 2005 von Greipp et al. veröffentlichte International Staging System (ISS, vgl. Tabelle 2) konnte Patienten erstmals in 3 Kategorien mit deutlich unterschiedlichem Gesamtüberleben einordnen und lieferte somit die erste prognostische Stadieneinteilung des MM.²⁵ Hierbei spiegelte ein hoher β2-Mikroglobulinwert im Serum eine hohe Tumorzellmasse und eine renale Dysfunktion wider, während ein erniedrigtes Serumalbumin auf die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine durch die

Myelomzellen zurückgeführt wurde. Die der prognostischen Relevanz dieser beiden Parameter zugrunde liegenden Mechanismen sind allerdings nicht vollständig geklärt.

	Kriterien	Ø-ÜL
Stadium I:	β2-M < 3,5 mg/l Albumin ≥ 3,5 g/dl	62
Stadium II:	Weder I noch III	44
Stadium III:	β2-M > 5,5 mg/l	29

Tabelle 2

International Staging System (ISS) nach Greipp et al. (Ø-ÜL entspricht dem medianen Überleben in Monaten)²⁵

Eine überarbeitete Version der ISS (Revised-ISS, R-ISS) nach Palumbo et al. (2015, siehe Tabelle 3) erweitert die ISS-Klassifikation um 2 weitere Parameter.²⁹ Zum einen fließt das Vorliegen bzw. Fehlen dreier chromosomaler Aberrationen (CA) ein, welchen durch mehrere Studien ein erhöhtes Risiko für einen aggressiven Krankheitsverlauf attestiert werden konnte:

Hohes Risiko: Vorliegen von ≥ 1 aus

- del(17p)
- t(4;14)
- t(14;16)

Standard Risiko: keine der oben genannten

Außerdem wird der Serum-Laktatdehydrogenase-Spiegel (LDH) als Biomarker berücksichtigt. Eine erhöhte LDH spricht ebenfalls für einen aggressiven Verlauf des MM und ist außerdem mit einer erhöhten Tumorzellmasse assoziiert.

	<u>Kriterien</u>	<u>5J-ÜL</u>	<u>Ø-ÜL</u>
Stadium I	ISS Stadium I + normale LDH + CA: Standard	82%	-
Stadium II	Weder R-ISS I noch III	62%	83 Mo.
Stadium III	ISS III <u>und</u> LDH erhöht <u>und/oder</u> Hochrisiko CA	40%	43 Mo.

Tabelle 3

Überarbeitete ISS-Klassifikation (R-ISS) nach Palumbo et al. (2015): 5J-ÜL entspricht der 5-Jahres Überlebensrate, Ø-ÜL entspricht dem durchschnittlichen Überleben in Monaten (Follow-up über 5 Jahre)²⁹

1.1.6. Therapie

Da das MM in der überwiegenden Anzahl der Fälle weiterhin als nicht heilbare Erkrankung angesehen werden muss, liegt der Fokus der Therapie auf der Verlängerung des Überlebens bei möglichst guter Lebensqualität. Dies soll durch ein möglichst vollständiges Zurückdrängen des malignen Plasmazellklons und somit der Vermeidung beziehungsweise der Reduktion der assoziierten Komplikationen erreicht werden. Hierbei ist stets ein kritisches Abwägen zwischen Krankheits- und Therapie-assoziierten Einschränkungen der Lebensqualität notwendig. Die Kriterien nach denen der Nutzen verschiedener Therapieoptionen bewertet wird, stellen ebenso wie das zu bevorzugende Therapiedesign ein kontroverses Diskussionsthema dar.³⁰⁻³¹ Eine Behandlungsindikation besteht, sobald ein Patient die überarbeiteten Diagnosekriterien der IMWG für das MM erfüllt.³ In den letzten beiden Jahrzehnten konnten durch die Zulassung neuer Medikamente große Fortschritte hinsichtlich des Gesamtüberlebens nach Erstdiagnose erzielt werden. Während die Erkrankung unbehandelt nach durchschnittlich 4-11 Monaten zum Tod führt, können heute für bestimmte Patientengruppen 5-Jahres-Überlebensraten von über 80% erreicht werden.²⁹

Dabei spielte die Erweiterung des Therapiearsenals auch deshalb eine große Rolle, weil die Patienten nach initialem Therapieansprechen in aller Regel Rückfälle erleiden und

somit auf wirksame Zweit- und Drittlinientherapien angewiesen sind. Einen ausführlichen Überblick über die Entwicklung der Myelomtherapie liefern Kyle et al. (2008).¹

Mitte des 20. Jahrhunderts wurden Kortikosteroide und das Alkylans Melphalan zunächst unabhängig voneinander als wirksame Therapieoptionen für das MM identifiziert. Durch die Kombination aus Melphalan und Prednisolon (MP), nach dem Erstbeschreiber Alexanian-Protokoll genannt, konnte eine Verlängerung des durchschnittlichen Gesamtüberlebens auf ungefähr 3 Jahre erreicht werden.³²⁻³³ Versuche, durch Kombination von MP mit anderen konventionellen Chemotherapeutika weitere Verbesserungen zu erzielen, blieben weitestgehend erfolglos.³⁴ Allerdings konnte für Melphalan-resistente Patienten ein alternatives Chemotherapieschema bestehend aus Vincristin, dem Alkaloid Doxorubicin und Dexamethason (VAD) etabliert werden, während die hochdosierte Dexamethason-Monotherapie als nebenwirkungsärmere Option nachgewiesen wurde.³⁵⁻³⁶

Den nächsten Meilenstein in der Myelomtherapie stellte die Einführung der autologen Stammzelltransplantation dar. Hierbei wird das Knochenmark des Patienten nach Sammlung autologer Stammzellen durch eine hochdosierte Chemo- oder Radiotherapie eradiziert und die gesammelten Stammzellen anschließend re-infundiert.³⁷⁻³⁸ Die autologe Stammzelltransplantation im Rahmen verschiedener Induktions- und Erhaltungsschemata ist bis heute ein wichtiger Baustein der Myelomtherapie, während die allogene Stammzelltransplantation aufgrund der hohen Transplantat-assoziierten Mortalität nur in seltenen Fällen in Studiensettings zum Einsatz kommt.³⁹

Die Zulassung der immunmodulatorischen Substanzen Thalidomid und Lenalidomid (immunomodulatory drugs, IMiD) sowie des Proteasominhibitors (PI) Bortezomib bedeutete zur Jahrtausendwende einen weiteren signifikanten Fortschritt in der Therapie des MM.⁴⁰⁻⁴² Im Rahmen der Etablierung des R-ISS konnten Palumbo et al. (2015) zeigen, dass sich das durchschnittliche Gesamtüberleben in allen prognostischen Stadien seit der Einführung des ISS im Jahr 2005 signifikant verbessert hatte (z.B. für ISS II von 44 auf 87 Monate).²⁹ Über alle Stadien hinweg konnte das durchschnittliche Gesamtüberleben von 3-4 Jahren mit MP auf 7-8 Jahre gesteigert werden.²⁴ Dies wurde vor allem auf die Verfügbarkeit der neuen Substanzen für alle Myelompatienten zurückgeführt.⁴³

Für die Erstlinientherapie wird gegenwärtig zwischen Hochdosistherapie-fähigen Patienten und solchen, deren Allgemeinzustand eine solche Therapie nicht zulässt, unterschieden. Erstere werden einer Induktionschemotherapie unterzogen, erhalten nach Stammzellmobilisation und -sammlung eine myeloablative Hochdosischemotherapie mit Melphalan und schließlich eine autologe Stammzelltransplantation. Während zur Induktion klassischerweise VAD eingesetzt wurde, werden heute bevorzugt Kombinationen mit einer oder mehreren der neuen Substanzen (z.B. Bortezomib, Thalidomid, Dexamethason, VTD) verwendet. Für nicht-Hochdosis-fähige Patienten in schlechterem Allgemeinzustand werden momentan vor allem Kombinationen aus Bortezomib, Melphalan und Prednisolon (VMP) sowie aus Lenalidomid und niedrig-dosiertem Dexamethason (Rd) empfohlen. Der Nutzen einer Konsolidierungs- oder Erhaltungstherapie ist in beiden Settings Gegenstand aktueller Studien, wird bis dato aber nicht allgemein empfohlen.

In jüngerer Vergangenheit wurden neuere Proteasominhibitoren (Carfilzomib, Ixazomib), IMiDs (Pomalidomid) oder monoklonale Antikörper (Daratumumab, Elotuzumab) für die Myelomtherapie zugelassen. Diese Substanzen zeigen zwar als Monotherapeutika keine signifikante Effizienz und sind in der Regel auch in Kombination den etablierten PIs oder IMiDs unterlegen, weswegen sie nicht in der Erstlinientherapie eingesetzt werden. Durch die Erweiterung des Therapiearsenals erhöhen sie allerdings die Behandlungsmöglichkeiten für rezidierte oder gegenüber der Erstlinientherapie refraktäre Patienten und tragen somit dazu bei das MM in eine chronische Erkrankung zu verwandeln. Eine detaillierte Zusammenfassung der aktuellen Therapieschemata liefern Moreau et al. (2017).⁴⁴

Die Wirkmechanismen bereits zugelassener oder gegenwärtig untersuchter Substanzen sind zum Teil nicht vollständig geklärt und analog zur großen genetischen Heterogenität des MM äußerst vielfältig und sollen an dieser Stelle deshalb nur grob skizziert werden. Eine übersichtliche Darstellung findet sich in dem Artikel von Ocio et al. (2014).⁴⁵

Für IMiDs wie Lenalidomid sind tumortoxische, immunmodulatorische und antiangiogene Effekte beschrieben, welche einerseits die malignen Zellen direkt schädigen und andererseits das Immunsystem aktivieren und in die Interaktion der

Plasmazellen mit ihrem Mikromilieu eingreifen. Die Hemmung des proteosomalen Abbaus ubiquitinerter Proteine durch Proteasominhibitoren wie Bortezomib führt unter anderem zu einer Akkumulation von Tumorsuppressorproteinen, Cyclin-abhängigen Kinasen und Inhibitoren des in Myelomzellen häufig deregulierten NFκB-Signalwegs (vgl. 1.3). Vor allem hat die Proteasominhibition jedoch eine Beeinträchtigung des Abbaus fehlgefalteter Proteine (unfolded protein response, UPR) zur Folge. Dies führt in den Myelomzellen aufgrund der massenhaften Produktion funktionsloser Immunglobuline zu einer toxischen Überladung und induziert somit indirekt die Apoptose dieser Zellen.⁴⁶⁻⁴⁷

Ein weiterer Ansatz ist die Entwicklung monoklonaler Antikörper, deren Wirkung entweder auf direkter Tumortoxizität oder auf einer Aktivierung des Immunsystems durch Antigen- oder Komplement-induzierte Effekte basiert. Zugelassen sind hier der CD38-Antikörper Daratumumab sowie Elotuzumab, ein Antikörper, der gegen das auf Plasmazellen vermehrt exprimierte Glykoprotein GS1 gerichtet ist. Andere monoklonale Antikörper sind aktuell Gegenstand von Phase-I- und -II-Studien.

Im Zuge der zunehmenden Erkenntnisse über die genetische Vielfalt des MM und die Identifikation verschiedener deregulierter Signalwege (vgl. 1.2) ergibt sich eine große Anzahl neuer potenziell vielversprechender Zielmoleküle und Substanzen, denen allerdings trotz zum Teil vielversprechender Ergebnisse in präklinischen Versuchen bislang kaum klinische Effizienz attestiert werden konnte. Dies gilt beispielsweise für Wirkstoffe aus den Klassen der Kinase-, Deacetylase- oder HSP-90-Inhibitoren, die jedoch weiterhin Gegenstand der Forschung sind und gegebenenfalls als Baustein von Kombinationstherapien klinische Relevanz erreichen könnten.

Aktuelle klinische Studien weisen darauf hin, dass in Zukunft neue immuntherapeutische Ansätze einen weiteren signifikanten Beitrag zur Verbesserung der Therapie des MM leisten könnten. So zeigen beispielsweise autologe T-Zellen, welche *ex vivo* mit einem chimären Antigenrezeptor (CAR) gegen ein vorwiegend auf gesunden und malignen Plasmazellen exprimiertes Antigen (B-Cell Maturation Antigen, BCMA) transduziert wurden, in klinischen Phase-I-Studien an rezidierten Patienten eine vielversprechende Anti-Myelom-Wirkung.²

Angesichts der bereits erzielten Fortschritte im Bereich des Krankheitsverständnisses und den daraus hervorgegangenen neuen Therapieansätzen ist eine weitere Untersuchung der zugrunde liegenden Signalwege und ihrer Mutationen essenziell, um das Therapiearsenal um neue Substanzen erweitern zu können und außerdem eine gezieltere Therapie von Myelompatienten anhand des genetischen Profils ihrer Erkrankung zu ermöglichen. Studienergebnisse, welche beispielsweise für Bortezomib eine erhöhte Suszeptibilität in Patienten mit der Translokation t(4;14), einem etablierten Marker für einen aggressiven Krankheitsverlauf, oder mit Mutationen des alternativen NFκB-Signalwegs zeigen konnten, können als erste Schritte in diese Richtung gewertet werden.⁴⁸⁻⁵⁰

Neben der Reduktion der Tumorlast spielen supportive Maßnahmen eine wichtige Rolle bei der Symptomkontrolle und der Verbesserung der Lebensqualität. Hier kommen unter anderem Bisphosphonate, Vertebro-/Kyphoplastie und Radiotherapie zur Behandlung schmerzhafter osteolytischer Läsionen, synthetisches Erythropoetin und G-CSF zur Therapie einer symptomatischen Knochenmarkinsuffizienz oder Maßnahmen zur Infektionsprophylaxe und -therapie zum Einsatz.⁴⁴

1.2. Die Pathogenese des Multiplen Myeloms

Die Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen über B-Vorläufer- bis hin zu differenzierten B-Zellen wird von verschiedenen genetischen Mechanismen zur Etablierung der Antigen-spezifität sowie von vielfältigen Umgebungsfaktoren bestimmt, welche die Grundlagen der humoralen Immunität darstellen. Die Pathogenese des MM und der monoklonalen Gammopathien beruht maßgeblich auf Fehlern und Dysregulationen in diesem komplexen Differenzierungsablauf, dessen Grundzüge zunächst dargestellt werden sollen (siehe Abbildung 3).

1.2.1. Die physiologische Entwicklung der B-Zelle

Als erster Reifungsschritt der Vorläufer-B-Zelle erfolgt im Knochenmark die Generierung der variablen Domäne des membranständigen Antigen-Rezeptors (IgM) durch VDJ-

Rekombination, welche den Grundstock der Antikörpervielfalt bildet. Hierbei werden je ein V-(variable), D-(diversity) und J-(junction)-Segment durch somatische Rekombination zusammengelagert. Die codierenden Gene für die unterschiedlichen Typen von Immunglobulinketten sind in Clustern auf verschiedenen Chromosomen codiert (H-Kette auf Chromosom 14, κ -L-Kette C2, λ -L-Kette C22). Die unreifen B-Zellen verlassen anschließend das Knochenmark und wandern in Lymphknoten, wo sie sich durch Antigenkontakt zu aktivierten Lymphoblasten entwickeln. Diese differenzieren sich entweder als Teil der primären humoralen Immunantwort zu IgM-sezernierenden, kurzlebigen Plasmazellen mit niedriger Antigenspezifität oder wandern in das Keimzentrum des Lymphknotens, wo sie sich dem Prozess der Affinitätsreifung unterziehen.⁵¹ Diese steigert die Antigenspezifität der Immunglobuline durch somatische Hypermutation (in der Regel Punktmutationen) der Antigen-bindenden Domäne und anschließend erneute Präsentation des jeweiligen Antigens durch eine Antigen-präsentierende Zelle.⁵² Zellen mit einem hochaffinen Antigenrezeptor werden klonal selektioniert und differenzieren sich entweder zu B-Gedächtnis- oder zu Post-Keimzentrums-B-Zellen. Letztere führen durch IgH-Switch-Rekombination einen Wechsel der Immunglobulinklasse durch, bevor sie als langlebige Plasmazellen ins Knochenmark rezirkulieren um von dort Antikörper zu sezernieren.⁵³ Diese ausdifferenzierten, nicht-proliferierenden Plasmazellen können in ihrer Knochenmarknische abhängig von dem umgebenden Mikromilieu und extrazellulären Signalen für Monate bis Jahre überleben und bilden das serologische Gedächtnis. Sowohl der somatischen als auch der IgH-Switch-Rekombination liegen von einem Enzym namens Aktivitätsinduzierte Cytidin-Desaminase (AID) induzierte Doppelstrangbrüche (DSB) im Bereich der Immunglobulin-Loci zugrunde, welche bei physiologischem Ablauf der Rekombination lokal repariert werden.⁵⁴⁻⁵⁵

Im Reifeprozess der B-Zellen stellen das Abschalten von nicht länger benötigten Prozessen wie zum Beispiel des Zellzyklus und der Proliferation, die Aktivierung der Antikörperproduktion und -sekretion sowie die Einleitung der Apoptose, falls keine rezepptive Knochenmarknische das langfristige Überleben ermöglicht, entscheidende Herausforderungen dar.¹⁷

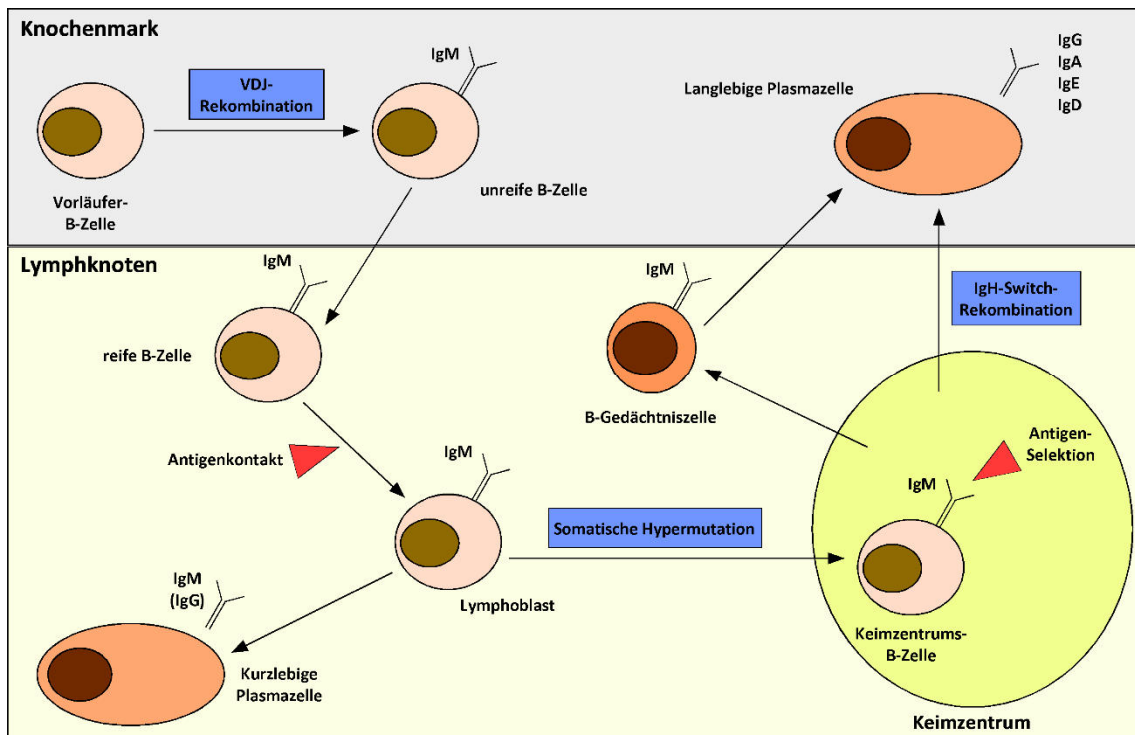


Abbildung 3

Die physiologische Entwicklung der B-Zelle nach Kuehl und Bergsagel (2002)⁵¹

Aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen entstehen im Knochenmark Vorläufer-B-Zellen, welche durch VDJ-Rekombination einen membranständigen Antigenrezeptor ausbilden und als reife B-Zellen in einen Lymphknoten auswandern. Durch Antigenkontakt entwickeln sie sich zu aktivierten Lymphoblasten, welche daraufhin zum Teil im Keimzentrum des Lymphknotens durch somatische Hypermutation ihrer Immunglobulingene den Prozess der Affinitätsreifung durchlaufen. Die entstehenden Keimzentrums-B-Zellen differenzieren sich nun terminal entweder zu B-Gedächtniszellen oder zu langlebigen Plasmazellen. Letztere führen durch IgH-Switch-Rekombination einen Wechsel ihrer Immunglobulinklasse durch und wandern zurück ins Knochenmark, wo sie für Monate bis Jahre überleben können und Antikörper sezernieren.

1.2.2. Das Stufenmodell der onkogenen Transformation

Analog zum klinischen Progress der monoklonalen Gammopathien von einer prämaligen Form (MGUS) über Stadien der intramedullären Malignität (SMM, MM) bis hin zur extramedullären Plasmazelleukämie beruht das molekulargenetische Verständnis der Pathogenese auf der schrittweisen Entartung eines Plasmazellklons im Sinne eines Stufenmodells (siehe Abbildung 4). Hierbei führt eine initiale Mutation zur Immortalisierung des Klons (Myeloma Propagating Cell, MPC), der in der Folge durch

weitere Mutationen sukzessive dereguliert wird, was sich in der Ausbildung der klinischen Symptomatik, der zunehmenden Unabhängigkeit von extrazellulären Signalen und schließlich der Ausschwemmung in die Peripherie widerspiegelt. Während hierfür lange Zeit ein linearer Prozess vermutet wurde, geht man heute vielmehr von einem verzweigten Pathomechanismus nach dem Vorbild der darwinistischen Evolutionstheorie aus. Diese Annahme liegt darin begründet, dass es sich beim MM und den verwandten Erkrankungen nicht um die unkontrollierte Proliferation eines rein monoklonalen Zellklons handelt, wie es die Bezeichnung Monoklonale Gammopathie suggeriert, sondern vielmehr um eine heterogene Mischung von Subklonen einer gemeinsamen MPC von denen je nach Umgebungsfaktoren einer oder mehrere zu verschiedenen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs dominieren. Hierdurch kann unter anderem der rezidivierende Charakter der Erkrankung erklärt werden.¹⁷

Eine zusammenfassende Übersicht über die molekulare Pathogenese des MM bieten die Artikel von Morgan et al. (2012)¹⁷ sowie Chesi et al. (2015).⁵⁶

Primäre genetische Ereignisse

Die Konstanz hinsichtlich der Immunglobulinklasse innerhalb der verschiedenen Subklone einer jeden monoklonalen Gammopathie spricht dafür, dass das immortalisierende Primäreignis die Ebene der Post-Keimzentrums-B-Zelle betrifft, da hier keine physiologische IgH-Switch-Rekombination mehr stattfindet.^{17, 54} Es finden sich zwei unterschiedliche Formen dieser Primäreignisse, welche nicht zusammen auftreten und die jeweils in allen Subklonen einer MPC vorhanden sind: Einerseits MPCs mit einem hyperdiploiden Genom zwischen 48 und 75 Chromosomen (in der Regel 49-56 mit Trisomien 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und/oder 21), generell mit einer besseren Prognose assoziiert, sowie solche mit aberranten IgH-Translokationen und schlechterem Outcome. Bei letzteren erfolgt im Sinne einer fehlerhaften IgH-Switch Rekombination ein DNA-Doppelstrangbruch auf dem nicht-funktionalen IgH-Allel von Chromosom 14 (Position q32), der allerdings nicht wie beim physiologischen Vorgang lokal repariert wird, sondern durch eine einfache reziproke Translokation ein Proto-Onkogen (z.B. *CCND 1/3*, *FGFR3*, *MMSET*, *MAF*, *MAFB*) unter die Kontrolle eines starken Immunglobulin-Enhancers stellt.^{54, 57} Die direkten molekularbiologischen Konsequenzen eines hyperdiploiden Chromosomensatzes, der vermutlich analog zu anderen

hyperdiploiden hämatologischen Erkrankungen im Zuge einer „katastrophalen“ Mitose zustande kommt, sind bislang nicht geklärt.^{17, 58} Allerdings stellt eine überschießende Expression verschiedener *Cyclin D* Isoformen und somit die Deregulation des G1/S-Phase-Übergangs ein gemeinsames Merkmal der beiden primären Mutationstypen dar.⁵⁹

Sekundäre genetische Ereignisse

Für das MM sind eine Vielzahl verschiedener genetischer Mutationen beschrieben, die in der Regel mit steigender Frequenz von der MGUS über SMM und MM bis hin zur extramedullären Erkrankung nachweisbar sind, und somit als Progressionsfaktoren angesehen werden können. Hierbei spielen unter anderem Genamplifikationen und -deletionen, Verlust der Heterozygotie, sekundäre Translokationen und epigenetische Phänomene eine Rolle. Dabei scheint für Entstehung und Progress der Erkrankung weniger die Mutation einzelner Gene relevant zu sein, wie es zum Teil bei anderen hämatologischen Malignomen der Fall ist (z.B. *BCR-ABL* bei CML), sondern vielmehr die kumulative Deregulation ganzer Signalwege durch ein Zusammenwirken genetischer Effekte und extrazellulärer Signale.¹⁷ Dies wird durch die Beobachtung untermauert, dass das MM mit einer durchschnittlichen Anzahl von 35 Mutationen zwischen simpleren hämatologischen Malignomen wie den akuten Leukämien (≈ 8) und komplexen epithelialen Tumoren wie dem Lungenkarzinom (≈ 540) liegt.⁶⁰⁻⁶²

So zeigt beispielsweise das Onkogen *c-MYC* in MM-Proben ein erhöhtes Expressionslevel im Vergleich zu Proben von MGUS-Patienten, während die sporadische Aktivierung von *MYC* im Mausmodell in der Mehrzahl der Versuche in einem Übergang von einer MGUS zu einem MM resultierte.⁶³⁻⁶⁴ Mutationen, die *MYC* unter den Einfluss einer Vielzahl verschiedener Super-Enhancer stellen, konnten sowohl als IgH-basierte Translokationen als auch als solche, die andere Genloci betreffen, nachgewiesen werden. Dies sowie die Tatsache, dass Alterationen von *MYC* fast nie in MGUS, zu 15% in nicht-therapiertem und zu 50% in rezidiertem oder refraktärem MM nachgewiesen werden konnten, sprechen für eine herausgehobene Bedeutung des Onkogens als Progressionsfaktor.⁵⁶

Eine weitere Gruppe genetischer Mutationen, denen eine Rolle im Krankheitsprogress zugesprochen wird, sind chromosomale Deletionen und Amplifikationen. So tritt eine Deletion von Chromosom 13 zwar bereits im Rahmen von primären genetischen

Translokationen (z.B. t(4;14)- oder t(14;16)-MGUS) auf, kommt aber auch als sekundäres Progressionsereignis vor und kann im MM-Stadium in 58% aller Fälle nachgewiesen werden.⁶⁵ Als relevante Genloci werden hier das Tumorsuppressorgen *RB1* sowie das für eine Untereinheit des Exosomkomplexes codierende *DIS3*-Gen vermutet.⁵⁶ Weitere prognostisch negative chromosomale Aberrationen, die abhängig vom Krankheitsprogress in jeweils steigender Frequenz zu finden sind, sind Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 17 (del17p, codiert für Tumorsuppressorprotein p53) sowie Deletion 1p (potenzielle Effektoren *CDKN2C* und *FAM46C*) und Amplifikation 1q (add1q), wobei letztere häufig gemeinsam auftreten.⁶⁵⁻⁶⁸

Auch aktivierenden und somit proliferationssteigernden Mutationen im Ras/MAPK-Signalweg wird aufgrund eines sprunghaften Prävalenzanstiegs zwischen der MGUS und dem MM eine tragende Rolle im Krankheitsprogress zugewiesen. Während Mutationen von *KRAS* und *NRAS* in der MGUS nicht bzw. in 7% der Fälle nachgewiesen werden konnten, lag der Anteil in MM-Proben bei jeweils knapp 20%.⁵⁶ Auch in anderen Komponenten der Signalkaskade wie beispielsweise *BRAF* sind Mutationen beschrieben.⁶⁰ Zu den Signalwegen, für die im Rahmen der malignen Entartung von MPCs verschiedene Mutationen und Deregulationsmechanismen dokumentiert sind, gehören außerdem der PI3K- (vor allem über gesteigerte Spiegel von phosphoryliertem AKT und DEPTOR) sowie der NFκB-Signalweg (vgl. 1.3).^{17, 69-70}

Epigenetische Alterationen im Rahmen der Krankheitsprogression stellen eine allgemeine Hypomethylierung und eine Gen-spezifische Hypermethylierung dar.⁷¹ Die Rolle dieser Methylierungsveränderungen für das Fortschreiten der Erkrankung und ihr etwaiger Zusammenhang mit Therapieresistenzen bedarf allerdings weiterer Aufklärung.

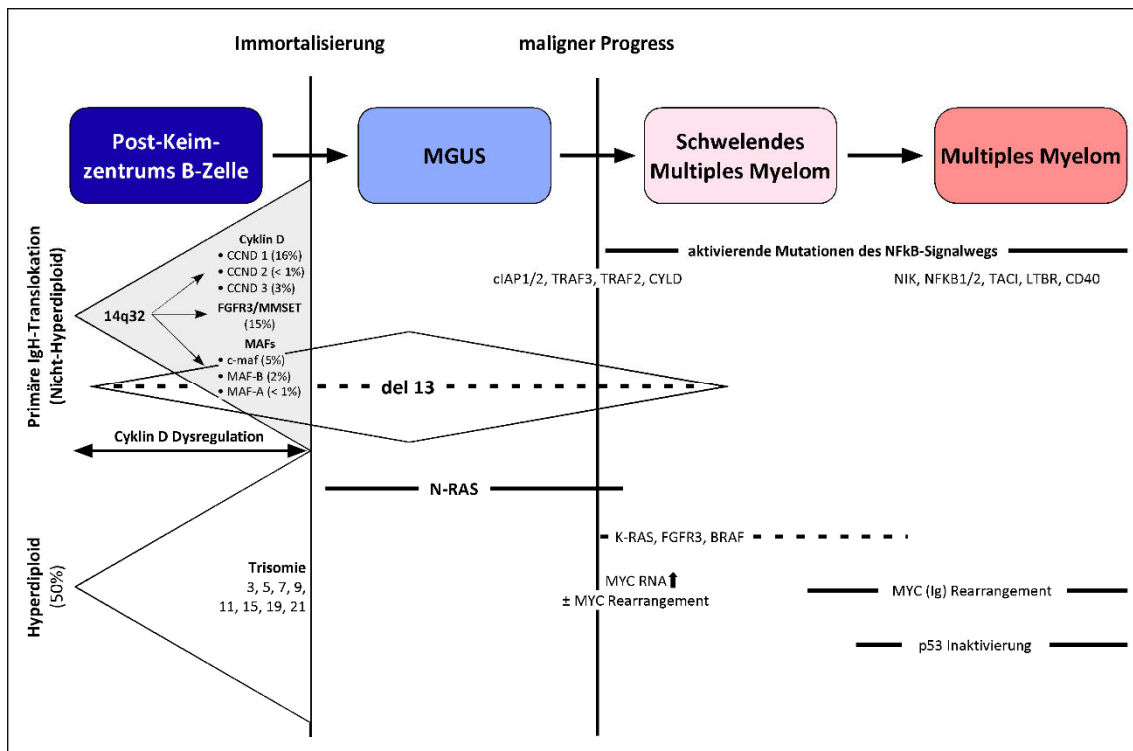


Abbildung 4

Modell der molekularen Pathogenese der monoklonalen Gammopathien nach Chesi et al. (2015)⁵⁶

Es existieren 2 unterschiedliche Möglichkeiten der immortalisierenden Primärmutation (IgH-Translokation bzw. Trisomien), welche nicht zusammen auftreten, in einer überschießenden *Cyclin D* Expression resultieren und somit eine Deregulation des G1/S-Phase-Übergangs zur Folge haben. Wichtige molekulargenetische Korrelate des Progresses in ein malignes Erkrankungsstadium stellen unter anderem eine gesteigerte Expression des Onkogens *c-MYC*, Mutationen im Ras/MAPK-Signalweg sowie eine Deletion des Chromosoms 13 dar. Zudem sind einige Progressionsfaktoren für den Übergang in die symptomatische Erkrankung aufgeführt.

1.2.3. Das onkogene Signalnetzwerk im Multiplen Myelom

Die Analyse von Patientenproben im Rahmen genomweiter Sequenzierungsstudien offenbarte auf der einen Seite eine extreme genetische Heterogenität mit vielfältigen Mutationen in verschiedenen Signalwegen (vgl. 1.2.2), die zum Teil neu entdeckt wurden und weiterer Abklärung hinsichtlich ihrer zellbiologischen Relevanz bedürfen (z.B. *BRAF* oder *add1q*).⁶⁰ Des Weiteren zeigten Untersuchungen zu verschiedenen Erkrankungszeitpunkten die Präsenz von Subklonen und deren Therapie-bedingte

Selektion.⁷² Neben den genetischen Veränderungen spielt besonders in den intramedullären Erkrankungsstadien die Interaktion mit der Extrazellulärmatrix im Knochenmark eine entscheidende Rolle. Als Beispiel hierfür kann die Überexpression von *MAF* herangezogen werden. So kann eine aktivierende Mutation von *MAF* nur in 4,8% der Patienten nachgewiesen werden (t(14;16) und t(14;20)), während in 30% eine Überexpression des Gens dokumentiert ist.¹⁷ Diese vermittelt über verschiedene Effektoren eine Veränderung von Zell-Zell-Interaktionen und wirkt sich positiv auf das Überleben der Plasmazelle in ihrer Knochenmarknische aus.⁷³⁻⁷⁴

Während aufgrund des komplexen und heterogenen Mutationsmusters die Entwicklung gezielter Therapieansätze für das MM problematisch erscheint, könnte die kombinierte Beeinflussung dieser verknüpften Signalkaskaden das „genetische Chaos“ deutlich vereinfachen und so den Weg zu einem praktikablen molekularen Behandlungskonzept ebnen. Voraussetzung hierfür ist allerdings eine genauere Kenntnis der molekularbiologischen Relevanz einzelner Signalwegskomponenten und ihrer vielfältigen Mutationen für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Erkrankung.

1.3. Der NFκB-Signalweg

NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) ist ein Signalsystem, das die zelluläre Antwort auf verschiedene rezeptorvermittelte Extrazellulärstimuli vor allem durch die Induktion anti-apoptotischer Signale und die Regulation der Produktion und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine vermittelt sowie eine Rolle bei der Lymphozytendifferenzierung spielt.^{50, 75-77} Zu den Rezeptoren, die eine Aktivierung von NFκB bewirken, gehören neben den B- und T-Zell-Rezeptoren auch solche aus den Superfamilien der Toll-Like- (TL-R), TNF- (TNF-R) und Interleukin-1-Rezeptoren (IL-1-R).⁷⁸⁻⁷⁹ Die Signaltransduktionskaskade gliedert sich in einen sogenannten klassischen und einen später entdeckten alternativen Signalweg. Die durch die Aktivierung der jeweiligen Transkriptionsfaktoren induzierten Gensets zeigen sowohl Überschneidungen als auch Unterschiede zwischen den beiden Signalkaskaden, die unter anderem durch verschiedene Liganden und durch die Interaktion mit anderen Signalwegen sowie untereinander weiter moduliert werden (vgl. Abbildung 5).⁸⁰

1.3.1. Komponenten des Signalwegs

Die Proteine der NFκB-Transkriptionsfaktorfamilie, welche phylogenetisch hochkonserviert bereits in der Fruchtfliege *Drosophila* und einfacheren Organismen wie Nesseltieren (Cnidaria, z.B. Seeanemonen und Korallenarten) gefunden werden konnten, besitzen als gemeinsames Merkmal eine N-terminale Rel-Homology Domäne (RHD).⁸¹⁻⁸³ Diese enthält zum einen Sequenzen, die der Bindung an spezifische DNA-Abschnitte dienen sowie die Zusammenlagerung verschiedener Rel-Proteine zu Homo- und Heterodimeren ermöglichen. Weiterhin fungiert sie als Bindungsstelle für inhibitorische IκB-Proteine und vermittelt durch eine nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS) die Translokation der aktivierten Transkriptionsfaktordimere in den Zellkern.^{76, 84} Dort beeinflussen die aktivierten Transkriptionsfaktordimere die Transkription von Zielgenen durch Bindung innerhalb von Promotor- oder Enhancerbereichen an sogenannte κB-Erkennungssequenzen von 9-10bp Länge.⁸⁵⁻⁸⁶

Anhand ihrer N-terminalen Domäne lassen sich die 5 Transkriptionsfaktoren in zwei Untergruppen einteilen. Auf der einen Seite stehen die Rel-Proteine p65 (RelA), RelB und c-Rel, denen eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) gemein ist, welche die Transkription von Zielgenen induziert. Die beiden anderen Proteine p105 (Gen: *NFκB1*) und p100 (Gen: *NFκB2*) besitzen dort statt einer TAD eine Abfolge von Ankyrin-Repeats, welche autoinhibitorisch wirken indem sie eine zytoplasmatische Lokalisation der Transkriptionsfaktoren vorschreiben. Durch limitierte Proteolyse werden diese zu den reifen - kerngängigen - Transkriptionsfaktoren p50 bzw. p52 prozessiert.⁸⁷ Da die Proteine der NFκB-Unterfamilie keine eigene TAD besitzen, hängt ihr Effekt auf die Transkription von Zielgenen davon ab, ob sie als Homodimere ohne TAD und somit als Transkriptionsrepressoren fungieren oder als Heterodimere mit einem Protein der Rel-Unterfamilie vorliegen und als Aktivatoren wirken.⁷⁶

Die Aktivität der 5 Transkriptionsfaktoren beziehungsweise ihrer Vorläufermoleküle unterliegt im physiologischen Zustand einer genauen Regulation. Hauptverantwortlich hierfür sind die inhibitorischen IκB-Proteine (Inhibitor of κB) α und β, welche unterschiedliche Affinität für die verschiedenen Transkriptionsfaktorproteine besitzen und im gebundenen Zustand deren NLS sowie κB-Bindungssequenzen blockieren. Sie bestehen analog zur C-terminalen Domäne der NFκB-Proteine hauptsächlich aus

Ankyrinrepeats.⁸⁸ Durch Phosphorylierung zweier Serinreste werden bei Aktivierung des Signalwegs durch verschiedene Kinasen (u.a. I κ B-Kinasen IKK α und IKK β sowie NF κ B-inducing kinase, NIK) die I κ B-Proteine für den proteasomalen Abbau markiert. Teil des Kinasekomplexes ist zudem das regulatorische Protein NEMO (NF κ B essential modulator, auch I κ B γ).

Im nicht-aktivierten Zustand liegen die Transkriptionsfaktoren vorwiegend als Heterodimere p50-p65 (RelA) mit inhibitorischem I κ B α (klassischer Signalweg) beziehungsweise als p100-RelB mit autoinhibitorischer Komponente (C-Terminus von p100, alternativer Signalweg) im Zytosol vor. Hierbei wird ein Fließgleichgewicht zwischen Zytosol und Kern angenommen, das im nicht aktivierten Zustand aufgrund der oben genannten Eigenschaften der I κ B-Proteine (NLS und κ B-Blockade) sowie einer zusätzlichen Nuclear Export Sequence (NES) in I κ B α und p65 fast ausschließlich auf Seiten des Zytosols liegt.^{76, 89} Den Transkriptionsfaktoren übergeordnet stehen die Kinasekomplexe in ihrem nicht-induzierten Zustand.

1.3.2. Signaltransduktion

Die Grundstruktur der NF κ B-Signalkaskade besteht aus einem aktivierenden Rezeptor-Ligand-Komplex, verschiedenen Gruppen von Rezeptor-nahen Adaptermolekülen, welche das Aktivierungssignal an die IKK weiterleiten, die wiederum durch Phosphorylierung (auto-) inhibitorischer Komponenten die Translokation der Transkriptionsfaktordimere in den Zellkern bewirken.

Während der alternative Signalweg ausschließlich von Rezeptoren der TNF-R-Superfamilie aktiviert wird, erfolgt die Stimulation des klassischen Signalwegs über ein breiteres Spektrum von Ligand-Rezeptor-Interaktionen.⁸⁹⁻⁹² Diese rekrutieren verschiedene Adaptermoleküle, deren Vielfalt die verschiedenen Liganden und somit die unterschiedlichen für die Aktivierung verantwortlichen Extrazellulärbedingungen widerspiegelt. Für die Signalweiterleitung in beiden Signalwegen spielen Proteine der TRAF-Familie (TNF-receptor associated factor) eine zentrale Rolle. Diese katalysieren durch ihre E3-Ligaseaktivität die Ubiquitinierung von Zielmolekülen, welche abhängig vom Subtyp und der Interaktion mit weiteren Adapterproteinen als Positiv- oder Negativregulatoren des jeweiligen Signalwegs wirken.⁹³ Im klassischen Signalweg sind

außerdem unter anderem CYLD-Deubiquitinasen und die NEMO-bindenden RIPs (receptor-interacting proteins) mit Caspaseaktivität an der Signalübermittlung beteiligt, während im alternativen Signalweg weitere Ubiquitin-Ligasen aus der cIAP-Familie (cellular inhibitor of apoptosis) relevant sind.⁷⁶

Die Aktivierung der jeweiligen IKK-Komplexe erfolgt durch von den übergeordneten Signalstrukturen induzierte Phosphorylierung der IKK-Untereinheiten. Sowohl der genaue Mechanismus als auch die Zusammensetzung der Komplexe ist nicht abschließend geklärt. Während der IKK-Komplex im klassischen Signalweg aus je einer IKK α - und einer IKK β -Untereinheit im Verbund mit 2 regulatorischen NEMO-Proteinen zu bestehen scheint, ist für den alternativen Signalweg lediglich bewiesen, dass die Aktivierung unabhängig von NEMO und IKK β erfolgt.⁹⁴⁻⁹⁵ Im alternativen Signalweg akkumuliert das sehr kurzlebige Protein NIK durch Inhibition seiner Negativregulatoren TRAF3, cIAP1 und cIAP2. NIK phosphoryliert und aktiviert daraufhin im Sinne einer IKK-Kinase IKK α , welches wiederum die proteolytische Prozessierung von p100 zu p52 katalysiert, und somit die Translokation des p52-RelB-Dimers in den Zellkern erlaubt.^{76, 91, 95-96} Ob die Aktivierung von IKK β im klassischen Signalweg analog oder vielmehr durch Transautophosphorylierung erfolgt ist unklar. IKK β induziert durch Phosphorylierung den proteasomalen Abbau der inhibitorischen I κ B α -Untereinheit und ermöglicht so die Translokation des p50-p65-Dimers in den Zellkern.^{76, 91}

Die beiden dargestellten Transduktionskaskaden sind jedoch eher als Modelle denn als originalgetreue und vollständige Abbildung der Realität zu verstehen. So sind sowohl Interaktionen zwischen den beiden NF κ B-Signalwegen (z.B. via NIK) als auch die Beeinflussung anderer Signalwege durch NIK und die IKKs dokumentiert.⁹⁵

Die induzierten Gensets unterscheiden sich trotz gewisser Überschneidungen nicht nur abhängig vom aktiven Transkriptionsfaktordimer, sondern werden auch durch die übergeordnet wirkenden Adaptermoleküle moduliert. Gemeinsam sind ihnen jedoch verschiedene Varianten der negativen Rückkopplung zur Beendigung des Signals. So ist beispielsweise I κ B α ein Zielgen von p65 (RelA).⁹⁷

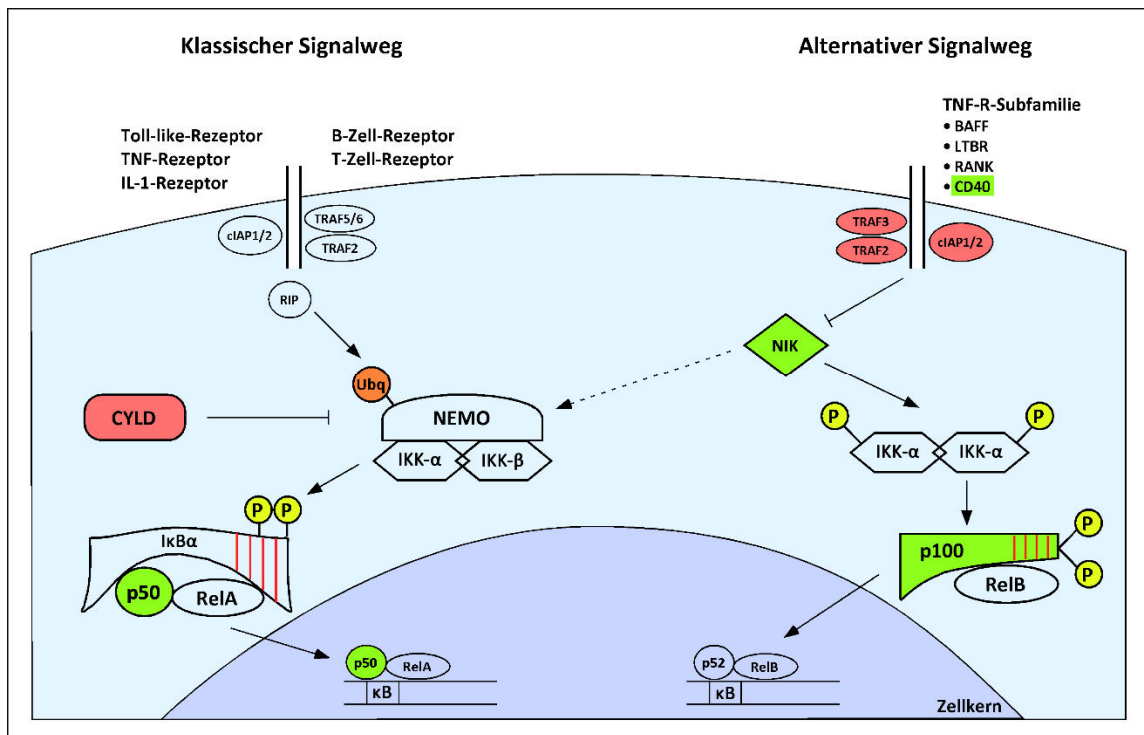


Abbildung 5

Übersicht über den NFκB-Signalweg im MM nach Demchenko et al. (2010) und Hinz et al. (2014)^{69, 95}

Der alternative Signalweg wird lediglich durch einige Mitglieder der TNF-R-Familie stimuliert, während der klassische durch ein breites Spektrum an Rezeptoren aktiviert werden kann. Im klassischen Signalweg wirken TRAF2, TRAF 5/6 und cIAP 1/2 über RIPs durch Ubiquitinierung von NEMO als Aktivator des IKK-Komplexes aus dem regulatorischen NEMO-Dimer und IKKα und -β. Als Gegenspieler und Negativregulator fungieren die CYLD-Deubiquitinasen. Die aktivierte IKKβ induziert den proteasomalen Abbau des inhibitorischen IκBα-Proteins und ermöglicht so die Translokation des Transkriptionsfaktordimers p50-p65(RelA) in den Zellkern, wo es an κB-Erkennungssequenzen bindet.

Im alternativen Signalweg führt die Rezeptor-vermittelte Inhibition der Negativregulatoren TRAF3, TRAF2 und cIAP1/2 zur Akkumulation von NIK. Diese vermittelt über die Aktivierung von IKKα den partiellen proteolytischen von p100, sodass das Transkriptionsfaktordimer p52-RelB in den Zellkern translozieren kann.

Farblich dargestellt sind gain-of-function-Mutationen von Positiv- (grün) und loss-of-function-Mutationen von Negativregulatoren (rot) des Signalwegs.

1.3.3. NFκB im Multiplen Myelom

Dysregulationen im NFκB-Signalweg konnten für verschiedene B-Zell-Neoplasien, unter anderem für Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome nachgewiesen werden. Diese betreffen jedoch fast ausschließlich den klassischen Signalweg.⁶⁹ Des Weiteren wird NFκB in Kontrast zu immortalisierenden und pro-proliferativen Effekten im Sinne einer onkogenen Wirkung auch eine Rolle als Tumorsuppressionsfaktor attestiert, weshalb seine genaue Bedeutung für die Entwicklung und Aufrechterhaltung maligner Neoplasien nicht abschließend geklärt ist.⁸⁰

Im MM sind Anomalien in der NFκB-Signalkaskade sowohl auf genetischer Ebene als auch in der Interaktion mit dem Mikromilieu bekannt. Es wird vermutet, dass in frühen Krankheitsstadien das umgebende Stroma über Zytokine und Wachstumsfaktoren eine Überaktivierung des Signalwegs bewirkt, der im weiteren Verlauf durch Mutationen sukzessive von diesen Extrazellulärsignalen entkoppelt und konstitutiv aktiviert bleibt. Diese Hypothese wird zum Beispiel durch die Beobachtung untermauert, dass MM-Zelllinien mit genetischen Alterationen des NFκB-Signalwegs in Ko-Kultur mit Knochenmarksstromazellen eine erhöhte Expression von relevanten Zielgenen aufweisen als in einer Kultur ohne diese „Helferzellen“.⁹⁸

Die Rolle genetischer Mutationen wird in den Arbeiten von Keats et al. (2007)⁵⁰ und Annunziata et al. (2007)⁹⁹ eingehend beleuchtet. Anhand von genomweiten Analysen konnte gezeigt werden, dass mindestens 20% aller Patientenproben und 40% aller MM-Zelllinien eine potenzielle zellautonome Aktivierung von NFκB aufgrund genetischer Läsionen aufweisen können, wobei dies im Gegensatz zu anderen B-Zell-Neoplasien sowohl den klassischen als auch den alternativen Signalweg betrifft.⁷⁷ Einzelne Mutationen treten dabei in einer relativ geringen Frequenz auf und betreffen eher selten die Ebene der Transkriptionsfaktoren oder der IKKs sondern in der Regel die übergeordneten Adaptermoleküle und Rezeptoren. So konnten aktivitätsfördernde gain-of-function-Mutationen in den Genen für Positivregulatoren wie *CD40*, *LTBR* und *TACI*, *NIK* sowie seltener in *NFKB1* und *NFKB2* nachgewiesen werden. In Genen für Negativregulatoren wie zum Beispiel *TRAF2*, *TRAF3*, *ciAP1*, *ciAP2* und *CYLD* fanden sich dagegen vor allem inhibierende loss-of-function-Mutationen.^{50, 60, 72, 99} Die Mehrzahl dieser Mutationen resultiert nach dem gegenwärtigen Verständnis des Signalwegs dabei

unter anderem in einer Stabilisierung des NIK-Proteins, dem neben seiner zentralen Rolle für die Aktivierung des alternativen auch Interaktionen mit dem klassischen Signalweg attestiert werden (vgl. 1.3.2). Die naheliegende Vermutung, dass eine Stabilisierung von NIK mit einer erhöhten Expression von NFκB-Zielgenen einhergeht, wird sowohl durch funktionelle Analysen als auch durch eine Anomalie in der MM-Zelllinie JJN-3 unterstützt.^{50,99} Aufgrund einer Translokationsmutation existiert in dieser Zelllinie ein NIK-Allel, dessen Produkt die Interaktionsdomäne mit dem Negativregulator TRAF3 fehlt. Trotz hoher TRAF3-Levels zeigt diese Zelllinie ein erhöhtes NFκB-Expressionsprofil und verdeutlicht somit die Relevanz von NIK für die Dysregulation des Signalwegs im MM.⁵⁰

Ob die Hauptwirkung der dokumentierten Mutationen allerdings im NFκB-Signalweg selbst und nicht vielmehr in der Interaktion mutierter Komponenten mit anderen Signalwegen zu suchen ist, ist bis heute nicht hinreichend geklärt.

Hinsichtlich der klinischen Relevanz einer Blockade des NFκB-Signalwegs legt die gesteigerte Suszeptibilität für eine Therapie mit Bortezomib bei Patienten mit Mutationen in diesem Signalweg einen potenziellen therapeutischen Nutzen nahe, kann aber aufgrund der pleiotropen Wirkweise der Proteasominhibitoren nicht ausschließlich bzw. nicht einmal vordringlich der Inhibition von NFκB zugerechnet werden (vgl. 1.1.6). Des Weiteren führte die mehr oder weniger selektive Inhibition des klassischen Signalwegs mit verschiedenen IKKβ-Inhibitoren in Zellkultur- und Tierexperimenten zwar zu einer messbaren Verringerung des Tumorwachstums, diese war jedoch variabel und mit zunehmender Spezifität der Inhibitoren geringer ausgeprägt.⁹⁹⁻¹⁰¹ Schließlich sind für pharmakologische Inhibitoren stets vom eigentlichen Zielmolekül entkoppelte, konzentrationsabhängige Toxizitätseffekte zu berücksichtigen.¹⁰²

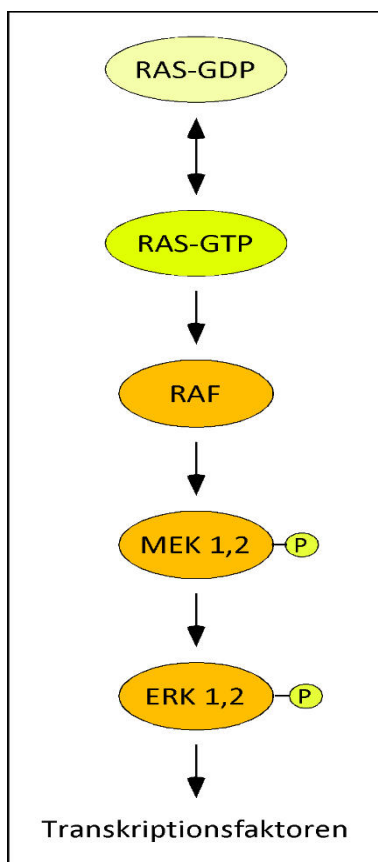
1.4. Zielsetzung der Arbeit

Genomweite Analysen zeigen die schier unüberschaubare genetische Heterogenität innerhalb des Multiplen Myeloms, welche die Entwicklung gezielter molekularer Therapieansätze, von denen vor allem therapierefraktäre und rezidivierte Patienten profitieren würden, als eine fast unmögliche Aufgabe erscheinen lässt. Um dieses „genetische Chaos“ vereinfachen zu können, stellen funktionelle molekularbiologische Analysen nach selektiver Inhibition von Komponenten der vermutlich relevanten Signalwege ein wichtiges Werkzeug dar. Im Hinblick auf die Evaluation möglicher Therapieoptionen wäre dabei insbesondere die Möglichkeit einer kombinierten Blockade von Zielstrukturen innerhalb eines oder mehrerer Signalwege wünschenswert. Während für viele Moleküle verschiedene und zum Teil hochspezifische Inhibitoren verfügbar sind, stellen unspezifische Toxizitätseffekte eine schwer zu beurteilende Variable da, welche sich bei einem gemeinsamen Einsatz mehrerer Substanzen noch vergrößert. Des Weiteren wirken pharmakologische Inhibitoren auf alle Zellen einer inkubierten Kultur, was beispielsweise bei Ko-Kulturen von Myelomzellen und Knochenmarksstromazellen die Evaluation von Einflüssen des Mikromilieus erschwert. Ein auf RNA-Interferenz beruhender Ansatz unter Verwendung von *short-hairpin*-RNA-Sequenzen stellt hierbei eine sinnvolle Alternative dar mit dem in der Arbeitsgruppe bereits umfangreiche Erfahrungen bestehen. Die Transfektion von Myelomzellen gelingt dabei hinreichend durch Elektroporation mit Plasmidvektoren. Im transienten Setting halten Transfektionseffekte jedoch nur für ungefähr eine Woche an, da keine Integration in das Zellgenom erfolgt, und erlauben somit weder deren Beobachtung über einen längeren Zeitraum noch die Generierung größerer Zellmengen zur Durchführung einer breiten Palette an Experimenten.¹⁰³ Außerdem gestaltete sich in der Vergangenheit besonders die transiente Transfektion mit Mehrfachkonstrukten problematisch, wobei analog zu Variablen beim Einsatz pharmakologischer Inhibitoren shRNA-vermittelte Effekte nur unzureichend von unspezifischen Toxizitäten wie zum Beispiel solchen durch die Elektroporation selbst getrennt werden konnten. Hieraus ergab sich der Wunsch nach einem stabilen und induzierbaren System, also der dauerhaften Integration der jeweiligen shRNA-Expressionskassette in das Zellgenom verbunden mit der Möglichkeit deren Transkription gezielt an- und abschalten zu

können. Dies sollte durch die Kombination des *Sleeping Beauty* Transposon Systems zur stabilen Expression von Zielsequenzen mit einem Tetrazyklin-Repressor-System erreicht werden (vgl. 2.2). Im Rahmen der vorangegangenen Promotionsarbeit von Severin Fink konnte dieses Vorhaben erstmals für ein shRNA-Einzelkonstrukt realisiert werden.

Das Induktionsprinzip soll nun für Mehrfachkonstrukte gezeigt und in seiner Handhabung optimiert werden. Der Ras/MAPK-Signalweg erfüllt hierfür verschiedene Voraussetzungen: Er besteht aus mehreren Zielstrukturen, für die aus transienten Versuchen sowohl funktionierende shRNA-Sequenzen als auch selektive Antikörper zur Detektion mittels Western-Blot-Analyse verfügbar sind. Außerdem konnte anhand von Experimenten mit pharmakologischen Inhibitoren und shRNAs gezeigt werden, dass der Signalweg nicht essenziell für das kurzfristige Überleben von Myelomzellen ist und seine Blockade in Interleukin-6-unabhängigen Zelllinien keine anti-proliferativen Auswirkungen hat.¹⁰⁴⁻¹⁰⁵

Schließlich soll das System gegen verschiedene Zielstrukturen des NFκB-Signalwegs in MM Zelllinien angewendet werden.



Der Ras/MAPK-Signalweg

Ras-GTP induziert die Phosphorylierungskaskade durch Aktivierung von Raf, was die Phosphorylierung und Aktivierung von MEK1,2, ERK1,2 und schließlich von nachgeschalteten Transkriptionsfaktoren zur Folge hat.

Abbildung 6

Folgende Ziele wurden im Rahmen der Promotionsarbeit verfolgt:

- I. Nachweis der universellen Anwendbarkeit der Methodik durch primäre stabile Transfektion des tet-Repressor(tetR)-Proteinexpressionsvektors in verschiedenen MM Zelllinien, Selektion erfolgreich transponierter Zellen und Nachweis der Expression des tet-Repressorproteins (=Generierung von tetR-(Sub)-Zelllinien). Anschließend Anlegen kryokonservierter Vorratskulturen zur regelmäßigen Erneuerung der laufenden Kultur.
- II. Stabile Transfektion tet-Repressor-exprimierender Zellen mit einem neu zu klonierenden induzierbaren shRNA-Vierfachkonstrukt gegen ERK1, ERK2 sowie MEK1, MEK2, Optimierung von Selektion und Induktion für verschiedene MM Zelllinien
 - Vergleich mit Knockdownergebnissen aus transienten Experimenten mittels Western Blot
 - Funktionelle Analyse der Transfektionseffekte durch Proliferationsassays und Zelltodmessungen
- III. Übertragen des Prinzips auf den NFκB-Signalweg durch stabile Transfektion tet-Repressor-exprimierender Zellen mit Einzel- und Mehrfachkonstrukten gegen p52, p65 (RelA) und NIK, Selektion und Induktion
 - Nachweis suffizienter Knockdowns durch Western Blot Analyse von zytosolischen Proteinlysaten und Vergleich mit transienten Experimenten
 - Funktionelle Analyse mittels Proliferationsassays und Zelltodmessungen

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Zellbiologische Methoden

2.1.1. Myelom Zelllinien

Für die Experimente dieser Arbeit wurden etablierte Myelom Zelllinien verwendet, welche im Vergleich zu sogenannten Primärzellen, die aus Knochenmarkaspiraten erkrankter Patienten gewonnen werden können, verschiedene Vorteile bieten. Zum einen sind Zelllinien kommerziell erhältlich, wodurch ihre Beschaffung mit einem deutlich geringeren logistischen wie bürokratischen Aufwand verbunden ist. Des Weiteren ermöglichen sie es, Kulturen nach einer gewissen Zeit, üblicherweise nach 3-4 Monaten, komplett zu verwerfen und aus in Flüssigstickstoff gelagerten Zellbanken neu anzulegen. Dies verhindert die dauerhafte Etablierung von Kontaminationen mit anderen Zellen oder Mykoplasmen oder von neuen genetischen Mutationen und wirkt sich somit positiv auf die Kontinuität und Reproduzierbarkeit von Experimenten und Ergebnissen aus. Schließlich erlauben Zelllinien dank ihres unbegrenzten Wachstums die zügige Generierung großer Zellmengen und somit die Durchführung verschiedener Experimente in kurzer Zeit.

Die humanen Myelom Zelllinien AMO-1, JIN-3 und L-363 stammen aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig). AMO-1 wurde 1984 aus der Aszitesflüssigkeit einer 64-jährigen Patientin mit einem IgA- κ -Plasmozytom gewonnen. Die Zellen wachsen in Suspension und stellen sich morphologisch rund dar.¹⁰⁶ JIN-3 stammt aus dem Knochenmark einer 57 Jahre alten Patientin mit Plasmazellleukämie (Typ IgA1- κ) bei Erstdiagnose im Jahr 1987. Es präsentieren sich runde bis ovale Zellen, welche semiadhärent in Suspension wachsen.¹⁰⁷ Aus dem peripheren Blut einer 36-jährigen Patientin mit Plasmazellleukämie vom Typ IgG konnte 1977 die Zelllinie L-363 etabliert werden. Mikroskopisch zeigen sich hier im Kulturmedium suspendierte, runde bis morphologisch sehr heterogene und im Vergleich zu den bereits genannten Linien eher etwas kleinere Zellen.¹⁰⁸

Alle verwendeten Zelllinien sind als EBV-negativ charakterisiert.¹⁰⁹

2.1.2. Kulturbedingungen

Die Zellkulturen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI-1640 Nährlösung kultiviert, welche zusätzlich folgende Komponenten enthielt: 10% fetales Rinderserum (FBS), 1mM Natriumpyruvat, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin.

Bei einer Zelldichte von maximal 1x10⁶/ml wurden die Kulturen abhängig von den geplanten Experimenten, in der Regel in einem Verhältnis 1:2 bis 1:8, gesplittet, wobei ein Teil der Zellen verworfen wurde und der verbleibende Rest mit frischem Medium aufgefüllt wurde.

2.1.3. Bestimmung der Zelldichte

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mithilfe des Vitalfarbstoffes Trypanblau. Da nur geschädigte Zellen permeabel für den Farbstoff sind, lassen sich diese anfärben, während intakte Zellen ungefärbt bleiben. Hierzu wurden 20µl einer Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau versetzt und unter dem Mikroskop die Anzahl der lebenden Zellen/ml mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.1.4. Einfrieren von Zellen

Zur Kryokonservierung von MM-Zellen wurde zunächst die Zellzahl bestimmt, daraufhin je 5-10 x 10⁶ Zellen in 50ml Falcons pipettiert und anschließend für 5 Minuten bei 1.200rpm zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde verworfen, die Zellpellets in je 1ml Einfriermedium, bestehend aus 0,9ml FBS und 0,1ml DMSO, re-suspendiert, in Kryoröhrchen überführt und schließlich bei -80°C tiefgefroren. Längerfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Einzufrierende Kulturen wurden grundsätzlich auf die Abwesenheit von Mykoplasmen überprüft (s.u.).

2.1.5. Nachweis von Mykoplasmen mittels PCR

Mykoplasmen sind Bakterien, die dank des Nährstoffüberangebots in Zellkulturen gut gedeihen und aufgrund ihrer Zellwandlosigkeit gegen die üblicherweise eingesetzten Antibiotika resistent sind. Die Kontamination bleibt ohne regelmäßige Überprüfung

häufig unbemerkt, da Mykoplasmen aufgrund ihrer geringen Größe von 0,15-0,3µm lichtmikroskopisch nicht erkennbar sind und nicht zum Tod der eigentlich kultivierten Zellen führen. Allerdings greifen sie aufgrund ihrer parasitären Lebensweise in verschiedene Facetten des Zellmetabolismus ein und können somit auf vielfältige Weise Ergebnisse verfälschen.¹¹⁰

Eine sensitive und spezifische Möglichkeit, Mykoplasmen in der Zellkultur nachzuweisen, bietet die Analyse von Medienüberständen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Zur Probenvorbereitung wird 1ml der zu analysierenden Zellsuspension abpipettiert und in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Zentrifugieren bei 4.000rpm für 4 Minuten wird der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, für 5 Minuten auf 99°C erhitzt und anschließend erneut zentrifugiert. Der PCR-Ansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

2,5µl	10x Dream Taq buffer
2,5µl	MgCl ₂
2,5µl	dNTP-Mix
1µl	MykoPrimer-Mix 5'
1µl	MykoPrimer-Mix 3'
0,3µl	Dream Taq
14,2µl	dH ₂ O
1µl	Probe

Neben den zu analysierenden Proben wurden eine Positivkontrolle sowie eine probenfreie Negativkontrolle angesetzt und für 35 Zyklen dem folgenden PCR-Reaktionsschema unterzogen:

Denaturierung:	94°C, 30sec
Primeranlagerung:	60°C, 30sec
Elongation:	72°C, 1min

Anschließend wurden die Proben zusammen mit je einer Positiv- und einer Negativkontrolle bei 80V per Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 2.2.11) analysiert (siehe Abbildung 7).

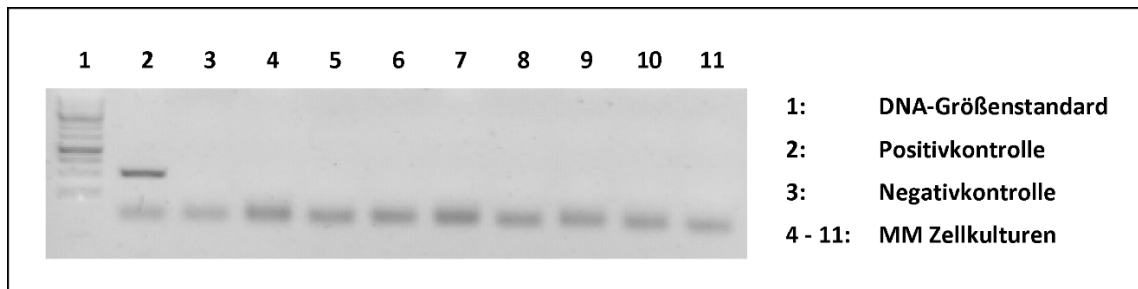


Abbildung 7

Ergebnis einer Mykoplasmen-PCR: In Lane 2 (Positivkontrolle) ist eine deutliche Bande sichtbar. Die getesteten MM Zellkulturen (Lane 4-11) weisen ebenso wie die Negativkontrolle (Lane 3) keine Bande auf, sind also frei von Mykoplasmen.

2.1.6. Transfektion durch Elektroporation

Da Myelom Zelllinien in die Gruppe der schwer zu transfizierenden Zellen fallen, wurde die Elektroporation gewählt um durch Plasmidvektoren Expressionskassetten für shRNAs und/oder Proteine in die Zellen einzubringen. Im Vergleich zur Selektion von Einzelklonen nach zufälliger Plasmidintegration ist die stabile Transfektion mit dem *Sleeping Beauty* Transposon System deutlich effizienter und weniger zeitaufwändig, während ein lentiviraler Ansatz den Nachteil des Arbeitens unter S2-Bedingungen mit sich bringen würde. Weiterhin erfolgt bei der Transfektion mit *Sleeping Beauty* der Einbau der eingebrachten Ladung in das Genom der Zielzelle fast vollständig zufällig, was ein deutlich geringeres Risiko für Veränderungen im natürlichen Genexpressionsmuster und für das Auslösen von Mutationen im Vergleich zu lentiviralen Transfektionssystemen zur Folge hat, da letztere ihre Ladung bevorzugt in codierende Genabschnitte integrieren. Schließlich besitzt *Sleeping Beauty* eine deutlich größere Ladekapazität im Vergleich zu viralen Systemen (vgl. 2.2.2).

Bestandteile des Elektroporationsansatzes waren die gewünschte Anzahl an Myelomzellen, die für die Transfektion benötigten Reagenzien sowie als Basis frisches RPMI-1640 Medium (ohne Zusätze). Zunächst wurden die Myelomzellen pelletiert und in frischem RPMI-1640 Medium gewaschen (1.200rpm, 5min). Dabei wurden für

Testexperimente (z.B. Voltreihen) $1-3 \times 10^6$ und für stabile Transfektionen $10-30 \times 10^6$ Zellen pro Ansatz verwendet. Die gewaschenen Zellen wurden in 500µl Frischmedium resuspendiert, mit den Elektroporationsreagenzien versetzt und durch vorsichtiges Pipettieren gemischt. Für stabile Transfektionen mit dem *Sleeping Beauty* Transposon System waren dies immer ein spezifisch modifizierter *Sleeping Beauty* Vektor [20µg/ml] sowie der Expressionsvektor für das Enzym Transposase [30µg/ml].

Zudem wurde stets ein Proteinexpressionsplasmid für eGFP in einer Konzentration von 10µg/ml (ko-)transfiziert. Dies erlaubte im Rahmen von Voltreihen die Bestimmung der optimalen Elektroporationsspannung für die jeweilige Zelllinie, also dem bestmöglichen Verhältnis zwischen lebendigen und gleichzeitig eGFP-positiven Zellen. Bei stabilen Transfektionen mit shRNA- oder Proteinexpressionsplasmiden erwies sich die Ko-Transfektion mit eGFP als geeigneter Frühmarker für selektionswürdige Elektroporationen (vgl. 3.1.1).

Der Elektroporationsansatz wurde daraufhin in eine 4mm-Küvette pipettiert, bei 300V (AMO-1, JJN-3) bzw. 320V (L-363) elektroporiert (Kondensatorkapazität 960µF) und zügig in 500µl frisches RPMI sowie nach Abschluss der Versuchsreihe in vorbereitete Zellkulturplatten mit 3-5ml Vollmedium überführt.

Stabile Elektroporationen, welche anhand der Stärke ihrer eGFP-Positivität als selektionswürdig zur Etablierung stabil transfizierter Kulturen befunden wurden, wurden nach 1-3 Tagen mit einem geeigneten Antibiotikum versetzt und über einen Zeitraum von 2 Wochen selektioniert. Abhängig von der jeweiligen Zelllinie wurden hierfür folgende Konzentrationen verwendet:

G418:

AMO-1	750µg/ml
L-363	1.000µg/ml
JJN-3	500µg/ml

Puromycin:

AMO-1	1,25µg/ml
L-363	0,6µg/ml
JJN-3	0,6µg/ml

2.1.7. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt durch hydrodynamische Fokussierung die Analyse von Einzelzellen hinsichtlich ihrer Streulicht- und Fluoreszenzmissionen nach Durchtritt durch einen Laserstrahl der Wellenlänge 488nm. Dabei beschreibt das vom Zellvolumen abhängige Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) die Beugung des Lichts im flachen Winkel, während das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) ein Maß für die Ablenkung des Lichts im rechten Winkel darstellt und von der Granularität der analysierten Zelle bestimmt wird. Die zu untersuchenden Zellen werden in einer Trägerflüssigkeit aufgenommen, der weitere Reagenzien zur Analyse von Fluoreszenzeigenschaften zugesetzt werden können. Alle Messungen wurden an einem FACSCalibur mit der Software CellQuest durchgeführt und mit dem Programm FlowJo analysiert.

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Untersuchung von Zellvitalität und Transfektionseffizienz verwendet.

Die Untersuchung der Zellvitalität erfolgte mittels PI und Annexin V-FITC. Propidiumiodid (PI) ist ein Rotfarbstoff mit einem Emissionsmaximum bei 590nm im ungebundenen Zustand, welches sich bei Interkalierung in DNA zu 617nm verschiebt. Da die Zellwand vitaler Zellen für PI nicht permeabel ist, markiert die PI-Fluoreszenz spät-apoptotische und nekrotische Zellen, deren Wände im Rahmen des Zelluntergangs durchlässig für Propidiumiodid werden.

Mit dem grün-fluoreszierenden Farbstoff FITC gekoppeltes Annexin-V erlaubt zusätzlich die Detektion früh-apoptotischer Zellen. Annexin-V bindet Ca^{2+} -abhängig mit hoher Affinität an negativ geladene Phospholipidbestandteile der Zellmembran, welche sich physiologischerweise auf der Membraninnenseite befinden und sich somit der Bindung durch Annexin V entziehen. Bereits in frühen Stadien der Apoptose kommt es allerdings zur Translokation von negativ geladenen Phosphatidylserin-Molekülen von der Membraninnen- zur -außenseite, sodass sich eine Unterscheidung in vitale (PI negativ, Annexin negativ), früh apoptotische (-/+) und spät apoptotische/nekrotische Zellen (+/+) ergibt.

Hierfür wurden die Zellen nach Ernte 1x in PBS gewaschen und anschließend in 200µl kaltem Annexin V Bindepuffer (Zusammensetzung vgl. 2.4) resuspendiert. Weiterhin wurde dem Ansatz 1µl Annexin V-FITC-Lösung sowie 1µg/ml PI zugesetzt und die Mischung für 10 Minuten lichtgeschützt inkubiert, woraufhin die Messung erfolgte.

Außerdem wurde die Durchflusszytometrie zur Beurteilung der Transfektionseffizienz und zur Auswahl selektionswürdiger Elektroporationen verwendet (vgl. 3.1.1, Abbildung 11).

2.1.8. Beurteilung der Zellviabilität: alamarBlue Assay

Um die Auswirkungen der verschiedenen shRNA-vermittelten Knockdowns und Knockdown-Kombinationen auf die Zellviabilität - also auf Zellmetabolismus, Proliferation und Zelltod - zu evaluieren, wurde auf den alamarBlue Assay (MorphoSys, Oxford, Großbritannien) zurückgegriffen. Dieser beruht auf der natürlichen Fähigkeit gesunder Zellen das bläuliche, nicht-fluoreszierende Reagens alamarBlue (Resazurin), welches zellwandpermeabel und nicht zytotoxisch ist, in das hellrot fluoreszierende Resorufin umzuwandeln.

Hierfür wurden Triplicate von je 25.000 Zellen/Well in frischem Vollmedium in einer 96-Wellplatte ausgesät und für 3 Tage unter normalen Kulturbedingungen gehalten. Anschließend wurde der Herstelleranleitung gemäß jedem Well 20µl alamarBlue Reagens zugesetzt und nach 1-4 Stunden Inkubation die Absorption bei 570 und 600nm im Mikroplattenreader gemessen und zu den Kontrollwerten in Relation gesetzt.¹¹¹

2.2. Molekularbiologische Methoden

Um das Ziel eines stabilen und induzierbaren Knockdown Systems zu erreichen, wurden verschiedene etablierte molekularbiologische Methoden kombiniert und in ein variables und leicht zu handhabendes Vektordesign übersetzt.

Um eine stabile Expression von shRNAs beziehungsweise Proteinen in den Myelom Zelllinien zu erreichen wurde das plasmidbasierte Transposon System *Sleeping Beauty* gewählt. Die Kombination mit einem Doxyzyklin-regulierten tet-Repressor-System sollte

die Induzierbarkeit gewährleisten, während für die selektive Herunterregulation spezifischer Zielgene, den sogenannten Knockdown, auf die Verwendung von shRNA-Expressionskassetten zurückgegriffen wurde, mit denen in der Arbeitsgruppe bereits gute Erfahrungen bestanden und für die größtenteils bereits funktionierende Sequenzen bekannt und verfügbar waren.

Im Folgenden sollen zunächst das Vektordesign und anschließend die einzelnen Klonierungsschritte erläutert werden.

2.2.1. Induzierbarkeit: Das tet-Repressor System

Der Wunsch nach Induzierbarkeit entstand einerseits aus der Notwendigkeit einer eindeutigen Trennung zwischen potenziell Apoptose-induzierenden oder viabilitätshemmenden Auswirkungen von Elektroporation und Selektion auf der einen Seite und den zu evaluierenden Effekten durch den shRNA-vermittelten Knockdown von Zielproteinen auf der anderen. Außerdem hatte sich in vorhergehenden Experimenten vor allem bei kombiniertem Knockdown verschiedener Zielproteine die Generierung ausreichender Zellmengen als problematisch erwiesen.

Um dies zu erreichen wurde auf das aus zwei Komponenten bestehende Tetrazyklin-Repressor System zurückgegriffen (vgl. van de Wetering et al., 2003).¹¹² Hierfür erfolgte zunächst die stabile Transfektion der Myelom Zelllinien mit einem Proteinexpressionsvektor für das tet-Repressor Protein (tetR) und die Selektion der erfolgreich transponierten Zellen mit Puromycin.

Die shRNA-Expressionskassetten wurden im Promotorbereich unmittelbar 5' der für die shRNA codierenden Genabschnitte durch gezielte Mutation so gestaltet, dass dort zwei sogenannte tet-Operator Sequenzen liegen. Die den tet-Repressor exprimierenden Zelllinien wurden daraufhin in einem zweiten Elektroporationsschritt mit derartigen shRNA-Expressionsvektoren stabil transfiziert und einer Selektion mit G418 unterzogen. Im nicht induzierten Zustand bindet das tet-Repressor Protein an die tet-Operator-Sequenzen im Promotorbereich der shRNA-Expressionskassette und verhindert somit deren Transkription durch die RNA-Polymerase III. Durch die Zugabe von Doxzyklin zur Zellkultur wird die shRNA-Produktion induziert, da das tet-Repressorprotein das

Antibiotikum bindet und nach Dissoziation von der tet-Operator Sequenz die Transkription der Zielgene freigibt (siehe Abbildung 8).

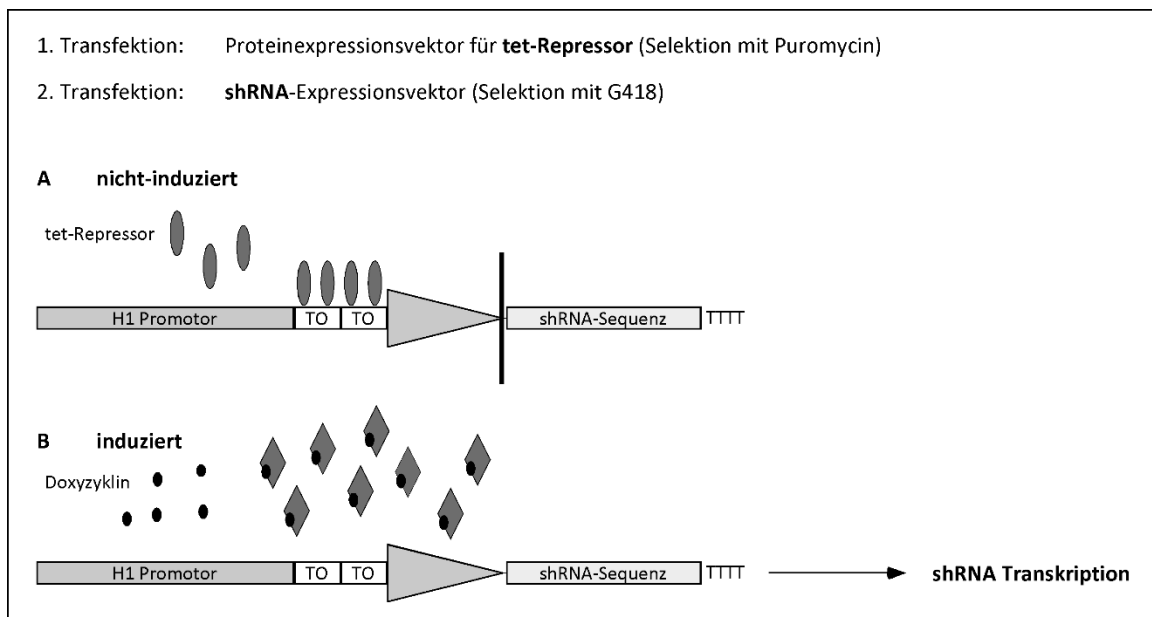


Abbildung 8

Übersicht über das induzierbare shRNA-Expressionssystem nach van de Wetering et al. (2003)¹¹²

In Zellen, welche nach zweizeitiger Transfektion sowohl das Proteinexpressionsplasmid für den tet-Repressor als auch die jeweilige(n) shRNA-Expressionskassette(n) stabil in ihr Genom integriert haben, bindet der tet-Repressor im nicht-induzierten Zustand (A) an die tet-Operator-Sequenzen im Bereich des H1-Promotors der shRNA-Expressionskassette und verhindert somit deren Transkription. Durch Zugabe von Doxzyklin, welches das tet-Repressorprotein bindet, wird der Promotor de-reprimiert und es erfolgt die Transkription der shRNA (B).

2.2.2. Das *Sleeping Beauty* Transposon System

Als Transposons werden DNA-Abschnitte bezeichnet, die durch einen cut&paste Mechanismus von einem Genlocus zu einem anderen transferiert werden können. Dieser Gentransfer wird von einem Enzym namens Transposase katalysiert, welches das Transposon anhand von Wiederholungssequenzen (inverted repeats, IR) erkennt und ausschneidet, im Komplex mit diesem aktiv in den Zellkern der Zielzelle transloziert und dort den stabilen Einbau in deren Genom vermittelt (siehe Abbildung 9).

Für die Experimente dieser Arbeit wurde das *Sleeping Beauty* Transposon System verwendet. Im Vergleich mit viralen Vektoren (vgl. 2.1.6) bietet es verschiedene

Vorteile. So ist die Transposase-vermittelte Integration von Zielgenen in das Genom mit einem deutlich geringeren Mutationsrisiko verbunden als dies bei viralen Vektoren der Fall ist. Zum einen erfolgt der Einbau von mit *Sleeping Beauty* eingebrachten Genkassetten fast völlig zufällig, da die Transposase die Ladung in TA-Dinukleotide integriert, wodurch die Zielsequenzen häufiger in inaktive DNA-Abschnitte transponiert werden als dies bei viralen Vektoren der Fall ist, welche bevorzugt in codierende Sequenzen integrieren. Zum anderen ist die virale reverse Transkriptase selbst mit einer gewissen Mutagenitätstendenz verbunden, welche bei plasmidbasierten Verfahren nicht beschrieben ist. Außerdem erlaubt *Sleeping Beauty* den Transfer deutlich größerer Ladungen (>10kB) und zeigt im Vergleich zu viralen Methoden kaum eigene Promotor- oder Silencer-Eigenschaften, greift somit also deutlich weniger in die natürliche Genexpression der Zielzelle ein.¹¹³

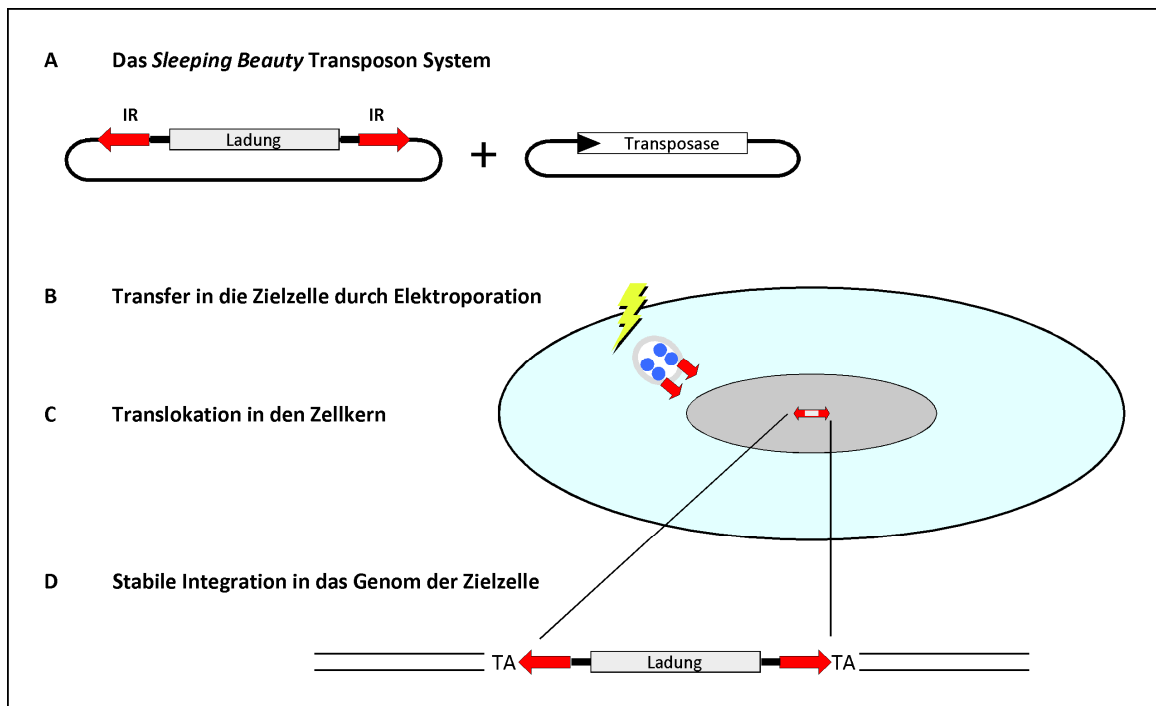


Abbildung 9

Das *Sleeping Beauty* Transposon System nach Izsvák et al. (2009)¹¹³

(A) Das System wurde im Rahmen dieser Arbeit in trans-Konfiguration verwendet: Die Transposase wird durch ein eigenes Expressionsplasmid codiert, welches gleichzeitig mit dem Plasmid für die Ladung (dem *Sleeping Beauty* Vektor) in die Zelle eingebracht wird. Der Bereich für die Ladung wird beidseits von Erkennungssequenzen für die Transposase (inverted repeats, IR) flankiert. (B) Durch Elektroporation wird der Eintritt der beiden Plasmide in die Zelle ermöglicht, woraufhin die vorübergehend synthetisierte Transposase (blaue Kugeln) an die IRs

bindet und diese aus dem Vektor ausschneidet. (C) Die nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS) der Transposase vermittelt den Eintritt des Komplexes in den Zellkern, wo die Transposase den zufälligen Einbau der Ladung in eine TA-Dinukleotidsequenz katalysiert (D).

Für die Klonierungs- und Transfektionsversuche dieser Arbeit wurden 3 verschiedene Basisvektoren mit unterschiedlichen Charakteristika verwendet, welche durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe aus kommerziell erhältlichen Plasmidvektoren hergestellt wurden (für Karten aller in dieser Arbeit verwendeten Vektoren siehe Anhang). Alle verwendeten Vektoren verfügen über ein Ampicillin-Resistenzgen, welches die selektive Anzucht erfolgreich transformierter *E. coli*-Bakterien auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ermöglicht (vgl. Kapitel 2.2.9).

(I) war dies ein *Sleeping Beauty* Proteinexpressionsvektor für die Expression des tet-Repressorproteins (pT2-BN-SVPuro-CAG-beta-tTR, Vektorkarte vgl. Abbildung 23). Zudem ist im transponierbaren Ladungsbereich ein Puromycin-Resistenzgen lokalisiert, welches nach der Transfektion die Selektion erfolgreich stabil transfizierter Zellen ermöglichen sollte.

(II) wurde ein weiterer Grundvektor für die Zusammenstellung einzelner und multipler shRNA-Expressionskassetten verwendet (pSUSTER2, Schnittstellensystem siehe Abbildung 10, Vektorkarte vgl. Abbildung 24). Dieser verfügt über einen H1-Promotor mit 2 tet-Operator Sequenzen, welche die Steuerbarkeit der downstream liegenden shRNA-Kodierungssequenz in Abhängigkeit von tet-Repressorprotein und Doxzyklin ermöglicht (vgl. 2.2.1). Die spezifische shRNA-Kodierungssequenz wird dabei als ds-Oligonukleotid (vgl. 2.2.3-2.2.5) unmittelbar hinter der Promotor-Operator-Sequenz inkloniert (Schnittstellen *Bgl* II und *Sac* I, vgl. Abbildung 10, A und B).

Diese shRNA-Expressionskassette wird von einer 5' gelegenen *Sac* I-kompatiblen *Bst* XI- und einer 3' gelegenen *Sac* I-Schnittstelle flankiert. Durch Restriktionsverdau eines pSUSTER2-Vektors mit diesen beiden Restriktionsenzymen kann die gesamte shRNA-Expressionskassette herausgeschnitten und in einen anderen, nur mit *Bst* XI geschnittenen, pSUSTER2-Vektor inkloniert werden (siehe Abbildung 10, C). Dies erlaubt die Zusammenstellung beliebig vieler nach diesem System gestalteter shRNA-

Expressionskassetten in einem Vektor. Um dies zu ermöglichen ist das Design der *Bst* XI-Schnittstelle so gewählt, dass bei der Klonierung die beiden Schnittstellen zwischen den Kassetten zerstört werden, sodass der resultierende Vektor somit weiterhin lediglich über eine *Bst* XI-Schnittstelle 5' des shRNA-Expressionskassettenkomplexes und eine *Sac* I-Schnittstelle an dessen 3'-Ende verfügt.

(III) wurde ein *Sleeping Beauty* shRNA-Expressionsvektor (pT2-NB, Vektorkarte siehe Abbildung 25) zur stabilen Transfektion von MM Zelllinien verwendet. Dieser besitzt eine zu dem *Bst* XI/*Sac* I-Mechanismus des pSUSTER2-Vektors kompatible *Bst* XI-Schnittstelle, sodass in pSUSTER2 zusammengestellte und durch DNA-Restriktionsverdau mit *Bst* XI und *Sac* I aus diesem herausgeschnittene Einzel- und Mehrfach-shRNA-Expressionskassetten wiederum in den mit *Bst* XI geschnittenen *Sleeping Beauty* shRNA-Expressionsvektor einkloniert werden können. Zum anderen verfügt der Vektor über ein G418-Resistenzgen. Hierdurch können Zellen, die sowohl das tet-Repressorprotein-Expressionsplasmid (Puromycinresistenz) als auch das shRNA-Expressionsplasmid (G418-Resistenz) stabil in ihr Genom integriert haben, selektioniert werden.

Zur Verifizierung der eingefügten Zielsequenzen in pSUSTER2 wurden die universellen T7- und T3-Primer eingesetzt, für pT2-Vektoren wurden selbst entworfene Primer (pT2-5' und pT2-3', alle Primersequenzen siehe Liste der Materialien) verwendet.

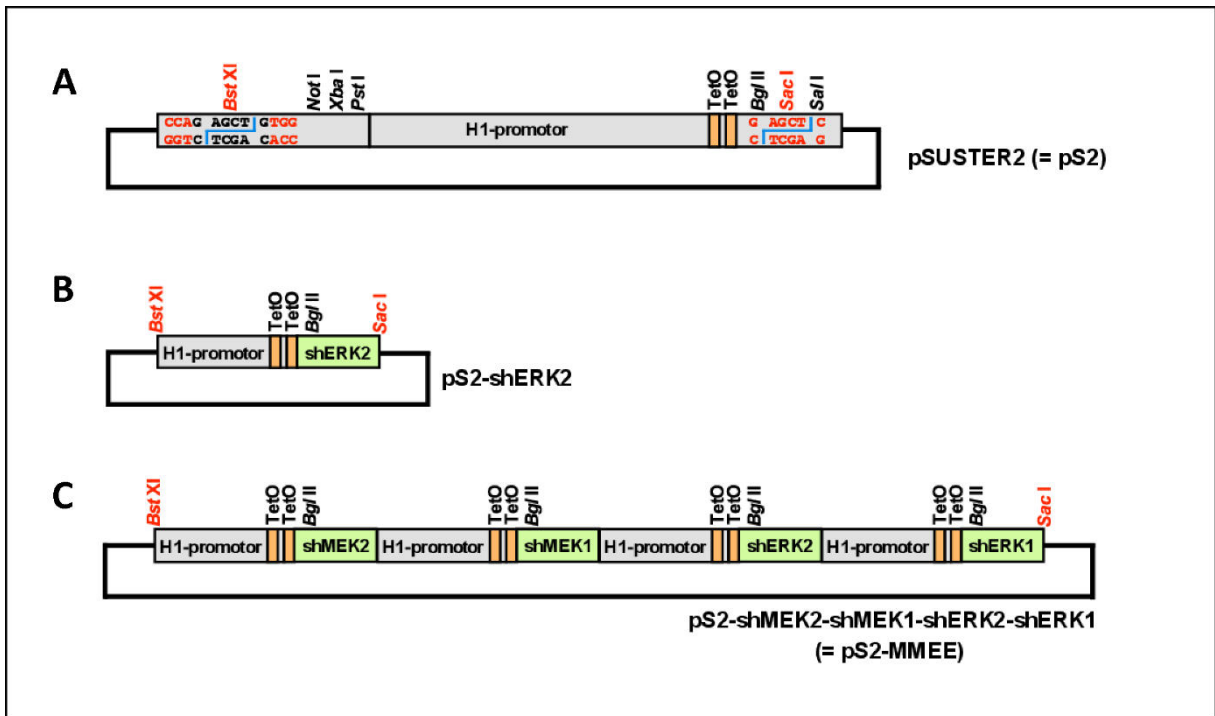


Abbildung 10

Schematische Darstellung des Designs der shRNA-Expressionskassetten aus Fink et al. (in Vorbereitung)¹¹⁴

Durch Restriktionsverdau des pSUSTER2-Vektors mit *Bgl* II und *Sac* I (A) kann ein beliebiges kompatibles ds-DNA-Fragment, welches für eine shRNA codiert (vgl. 2.2.3-2.2.5.; im oben gezeigten schematischen Beispiel gegen ERK2 gerichtet) in den Vektor inkloniert werden (B). Anschließendes Herausschneiden der gesamten shRNA-Expressionskassette mit *Bst* XI und *Sac* I erlaubt das Einklonieren in einen anderen Vektor vom pSUSTER2-Typ, wenn dieser nur mit *Bst* XI geschnitten wurde. Dabei werden an der Grenze zwischen den beiden Kassetten sowohl die *Bst* XI- als auch die *Sac* I-Schnittstelle zerstört, während am 5'-Ende der inklonierten Kassette die *Sac* I-kompatible *Bst* XI-Schnittstelle regeneriert wird. Dieser Vorgang kann beliebig oft wiederholt werden, im gezeigten Beispiel zum Aufbau eines Vektors mit shRNA-Expressionskassetten gegen MEK2, MEK1, ERK2 und ERK1 (C).

2.2.3. short hairpin RNA: Design und Funktionsweise

Die hochselektive Unterdrückung der Expression von Zielgenen durch short hairpin RNAs beruht auf dem Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi). Hierbei verhindern Doppelstrang(ds)-RNA-Sequenzen, deren antisense-Strang sich nach nukleärer Prozessierung komplementär an die mRNA des Zielgens anlagert, die Translation in das entsprechende Protein durch Abbau der mRNA in Kern und Zytoplasma.¹¹⁵ Diese ds-

RNA-Sequenzen können beispielsweise als sogenannte small interfering RNAs (siRNA) in einer Länge von 21 oder 22 Nukleotiden (nt) in Zellen eingebracht werden und vermitteln eine starke und spezifische Unterdrückung der Genexpression. Die Anwendbarkeit synthetisch hergestellter siRNAs ist jedoch durch ihre transiente Wirkung begrenzt.¹¹⁶

Dieses Problem soll durch die Verwendung von shRNA-Expressionskonstrukten, welche unter Verwendung des *Sleeping Beauty* Transposon Systems stabil in das Genom von Myelom Zelllinien integriert werden, umgangen werden. Hierfür wurden den von Brummelkamp et al. (2002)¹¹⁷ aufgestellten Kriterien entsprechend zunächst Oligonukleotid-Einzelstränge bei der Firma Sigma-Aldrich (München) bestellt. Die Sequenzmuster lauten 5'-GATCTCC-X-TTCAAGAGA-Y-TTTTTGGAAGAGCT-3' (Sense, 68bp) und 5'-CTTCCAAAA-X-TCTCTTGAA-Y-GGA-3' (Antisense, 60bp), wobei X für die Ziel- und Y für die reverse Komplementärsequenz von jeweils 19-nt Länge steht. Die Sequenzen basieren auf Sequenzabschnitten der jeweiligen humanen cDNA und waren sowohl für die Zielstrukturen im Ras/MAPK- als auch die im NFκB-Signalweg in vorangegangenen Experimenten im transienten Setting als effektiv identifiziert worden. Die 5 aufeinanderfolgenden Thymidine am 3'-Ende (Sense-Strang) dienen als Stoppsignal für die RNA-Polymerase III. Die komplementären Sequenzen werden durch einen 9-nt langen Abschnitt getrennt. Dieser hat nach Transkription des Gens und Umfaltung der RNA die Ausbildung einer Loop-Struktur (= short hairpin RNA) zur Folge, die im Anschluss im Rahmen des RNAi-pathway zunächst vom Enzym *DICER* zu einer doppelsträngigen siRNA ohne die Schleifenstruktur prozessiert wird. Diese ds-siRNA bildet daraufhin mit weiteren Proteinen den sogenannten *RNA-induced silencing complex (RISC)*, welcher den RNA-Doppelstrang zu zwei Einzelsträngen prozessiert, von denen nur einer als Teil des *RISC* verbleibt und somit wiederum die Anlagerung einer komplementären mRNA ermöglicht. Dies induziert den Abbau der gebundenen mRNA und unterbindet somit die Neusynthese des betroffenen Proteins auf der Translationsebene.¹¹⁸

Die terminalen Sequenzabschnitte der Oligonukleotide sind derart gewählt, dass das nach Zusammenlagerung entstehende ds-DNA-Insert 5'-*Bgl* II- und 3'-*Sac* I-kompatible Enden aufweist, die zur Klonierung in den pSUSTER2-Vektor dienen.

2.2.4. Annealing von DNA-Oligonukleotiden

Die einzelsträngigen DNA-Oligonukleotide wurden zunächst in dH₂O gelöst (Stammlösung: 100µM) und folgendermaßen angesetzt um eine komplementäre Anlagerung zu induzieren:

1,5µl	Forward Oligo
1,5µl	Reverse Oligo
47µl	1x Oligonukleotid Annealing Buffer (OAB, siehe Materialliste)

Nach gründlichem Vortexen wurde der Ansatz in ein auf 95°C erhitztes Wasserbad gegeben und kühlte hierin langsam auf Raumtemperatur ab. Die langsame Temperaturreduktion stellt eine komplementäre Zusammenlagerung der Oligonukleotide im Gegensatz zum intramolekularen Annealing sicher, welches erst bei niedrigeren Temperaturen erfolgt.

2.2.5. Phosphorylierung der Doppelstrang-Oligonukleotide

Um die spätere Ligation der Oligonukleotide in den geschnittenen und dephosphorylierten Vektor zu ermöglichen, erfolgte im Anschluss an das Annealing die Phosphorylierung der ds-Oligonukleotide mittels der ATP-abhängigen Polynukleotidkinase:

2µl	ds-Oligonukleotide
1µl	T4-Polynukleotidkinase (PNK)
1µl	10x PNK buffer A
1µl	10mM ATP
5µl	dH ₂ O

Das Reaktionsgemisch wurde nach gründlichem Vortexen für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 Minuten auf 70°C erhitzt. Der letzte Schritt dient der Hitzeinaktivierung der Polynukleotidkinase, sodass im Ligationsschritt (s.u.) keine Re-Phosphorylierung des dephosphorylierten Vektors stattfinden kann.

2.2.6. DNA-Restriktionsverdau

Um die Plasmidvektoren entweder für den Einbau von ds-Oligonukleotiden oder kompletten shRNA-Expressionskassetten zu „öffnen“ beziehungsweise diese Kassetten im Sinne eines Inserts aus Vorgängervektoren herauszuschneiden, wurden die Plasmide mit verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt.

Das Grundgemisch sah wie folgt aus:

Ansatzvolumen: 50µl für Vektor-, 20µl für Insertverdau

1-6µl (je) 0,5µl	Plasmidlösung (abhängig von der Ausgangskonzentration) Restriktionsenzym Puffer (Typ abhängig von den verwendeten Restriktionsenzymen, Menge abhängig von Ansatzvolumen und Puffertyp z.B.: 5µl eines 10x Puffers für 50µl Reaktionsgemisch)
Rest	dH ₂ O

Das Gemisch wurde nach gründlichem Vortexen bei 37°C inkubiert. Die Dauer richtete sich nach den verwendeten Restriktionsenzymen (in der Regel über Nacht).

Im Folgenden sind beispielhaft einige häufig verwendete Ansätze aufgeführt:

- Vektorpräparation von pSUSTER2 mit *Bgl* II und *Sac* I zum Einfügen von ds-Oligonukleotiden:

1µl	pSUSTER2 [6,2µg/µl]
0,5µl	<i>Bgl</i> II
0,5µl	<i>Sac</i> I
5µl	10x Puffer Tango
43µl	dH ₂ O

- Vektorpräparation des *Sleeping Beauty* shRNA-Leervektors (pT2-NB) mit *Bst* XI zum Einfügen von Einfach- oder Mehrfach-shRNA-Expressionskassetten aus pSUSTER2-Vektoren:

1µl	pT2-NB [2µg/µl]
0,5µl	<i>Bst</i> XI
5µl	10x Puffer Orange
43,5µl	dH ₂ O

- Insertpräparation einer shRNA-Kassette aus einem pSUSTER2-Vektor via *Bst* XI und *Sac* I am Beispiel von pSusTer2-shMEK2-shMEK1-shERK2-shERK1 (=MMEE)

3µl	pSUSTER2-MMEE [2,2µg/µl]
0,5µl	<i>Bst</i> XI
0,5µl	<i>Sac</i> I
2µl	10x Puffer Tango
14µl	dH ₂ O

2.2.7. Vektorpräparation: Dephosphorylierung und DNA-Fällung

Um die Re-Ligation von Plasmiden ohne Insert im Ligationsschritt zu vermeiden wurden die Schnittenden der „geöffneten“ Vektoren zunächst dephosphoryliert. Hierfür wurde das Reaktionsgemisch nach dem Restriktionsverdau durch 1µl Shrimp-Alkalische-Phosphatase (SAP) ergänzt und für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz abhängig von den verwendeten Restriktionsenzymen einem Hitzeinaktivierungsschritt unterzogen.

Um die DNA aus dem Reaktionsansatz zu fällen wurde dieser mit 125µl Ethanol (96%) und 5µl 3M Natriumacetat versetzt und bei -80°C für 20 Minuten durchgefroren. Nach Zentrifugation bei 13.000rpm für 20 Minuten wurde die flüssige Ethanolphase vorsichtig abpipettiert und das verbleibende DNA-Pellet kurz luftgetrocknet. Das Pellet wurde nun in einer geeigneten Menge dH₂O aufgenommen. Schließlich wurde die Qualität des

geschnittenen Vektors via Gelelektrophorese auf einem 1,5%-Agarosegel überprüft. Die Konzentration wurde näherungsweise aus der verwendeten DNA-Menge und dem Lösungsvolumen nach der Fällung berechnet.

2.2.8. Insertpräparation: Gelextraktion

Zunächst erfolgte analog zur Vektorpräparation die Hitzeinaktivierung der verwendeten Restriktionsenzyme. Anschließend wurde der gesamte Ansatz per Gelelektrophorese (1,5%-Agarosegel) aufgetrennt und die mit dem Insert korrespondierende Bande mit einem Skalpell möglichst genau ausgeschnitten. Die enthaltene DNA wurde mittels des QIAquick-Gelextraktionskits (Qiagen) aus dem Gelfragment gelöst und ihre Reinheit erneut durch Gelelektrophorese geprüft.

2.2.9. Ligation und Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Für die durch das Enzym T4 DNA Ligase katalysierte kovalente Bindung zwischen dem dephosphorylierten Vektor und dem phosphorylierten Insert (ds-Oligonukleotid bzw. shRNA-Expressionskassette) wurde folgendes Reaktionsgemisch erstellt und für mindestens 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert:

Vektor DNA	20-100ng
Insert DNA	1:1 bis 5:1 im Vergleich zu Vektor DNA
10x T4 DNA Ligase Puffer	2µl
T4 DNA Ligase	1µl
dH ₂ O	ad 20µl

Im Anschluss an die Inkubation wurden 2µl des Ligationsansatzes zu 50µl auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli* XL-1 Blue Zellen gegeben, die Suspension auf einer vorgewärmten Ampicillin-haltigen Agarplatte ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C bebrütet. Diejenigen *E. coli*, welche im Rahmen der Transformation die Plasmid-DNA inklusive des Ampicillin-Resistenzgens aufgenommen hatten, konnten auf der Agarplatte wachsen und replizieren zusätzlich zu ihrem eigenen Genom auch das

aufgenommene Plasmid. Dies konnte am Folgetag anhand des Koloniewachstums beurteilt werden.

2.2.10. Selektion ausgewählter Klone mittels PCR

Da das Wachstum auf der Ampicillin-haltigen Agarplatte lediglich die erfolgreiche Aufnahme eines Plasmids beweist, jedoch keine Aussage über den Einschluss eines Inserts ermöglichte, erfolgte im nächsten Schritt die Selektion einzelner Klone nach PCR-Analyse. Durch Auswahl geeigneter Primer konnten durch PCR-Amplifikation und Gelelektrophorese vielversprechende Klone identifiziert werden, d.h. Klone, deren PCR-Produkt die erwartete Größe besaß.

Hierfür wurden die gewachsenen Kolonien mit einem Zahnstocher gepickt und in den folgenden PCR-Ansatz (je Template) überführt:

2,5µl	10x Dream Taq Puffer
0,5µl	dNTP-Mix
0,1µl	Vorwärts-Primer
0,1µl	Rückwärts-Primer
0,15µl	Dream Taq Polymerase
20µl	dH ₂ O

Zusätzlich wurde eine Leerkontrolle ohne Template angesetzt und für 35 Zyklen folgendem PCR-Schema unterzogen:

Denaturierung:	94°C, 30sec
Primeranlagerung:	55°C, 30sec
Elongation:	72°C, 30sec je 500bp

Anschließend wurden die Proben auf einem 1,5%-Agarosegel analysiert.

2.2.11. DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese beruht auf der unterschiedlich schnellen Wanderung negativ geladener DNA-Moleküle durch ein Agarosegel von Kathode zu Anode abhängig von ihrer Größe. Kleinere Fragmente passieren das Gel dabei schneller als größere, da diese stärker von der Gelmatrix zurückgehalten werden. Hierfür werden zu analysierende lineare DNA-Fragmente (z.B. PCR-Produkte, geschnittene Vektorpräparationen) mit einem Ladepuffer versetzt und neben einem DNA-Größenstandard sowie entsprechenden Kontrollen auf ein 1,5% Agarosegel aufgebracht. UV-Beleuchtung des mit HD-Green versetzten Gels hebt die durch den Fluoreszenzfarbstoff markierten DNA-Banden hervor (vgl. Kapitel 2.1.5, Abbildung 7).

2.2.12. Plasmidextraktion mittels Qiagen Plasmid Kits

Um die neu klonierten Plasmide sequenzieren und schließlich für Transfektionen verwenden zu können ist es notwendig, sie aus den identifizierten *E.coli*-Klonen zu extrahieren. Je nach benötigter Plasmidmenge wurden hierfür verschiedene Kits der Firma Qiagen verwendet.

Zunächst wurden die ausgewählten Kolonien semisteril mit einem Zahnstocher gepickt und in LB-Medium mit Ampicillin-Zusatz bei 37°C und 220rpm über Nacht im Schüttler kultiviert. Das Kulturvolumen hing dabei von der benötigten Plasmidmenge ab, z.B. 10ml für DNA Mini Präparationen oder 500ml für DNA Maxi Präparationen.

Die Plasmidextraktionskits basieren auf dem Prinzip der DNA-Aufreinigung mittels alkalischer Lyse (für genaue Instruktionen, Materiallisten und verwendete Volumina siehe Qiagen Plasmid Purification Handbook).

Anschließend wurde die Konzentration der erhaltenen Plasmidlösung durch Nukleinsäuremessung mittels NanoDrop bestimmt.

2.2.13. DNA-Sequenzierung

Da die nach Ligation durchgeführte PCR-Analyse lediglich die Aussage erlaubt, dass ein Insert der ungefähr erwarteten Größe in den Vektor eingebaut wurde, jedoch keinen Ausschluss von Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen ermöglicht, welche

besonders im Bereich der für die shRNA codierenden Sequenzabschnitte Konsequenzen für das Gelingen und die Aussagekraft der nachfolgenden Experimente hätten, wurden die relevanten Sequenzabschnitte vor Verwendung der gewonnenen Plasmide per DNA-Sequenzierung überprüft.

Hierfür wurden die Plasmide in einer Konzentration von 100ng/μl an LGC Genomics, Berlin, zur Sequenzierung verschickt und anschließend mit den entsprechenden Datenbanken verglichen.

2.3. Proteinbiochemische Methoden: Western Blot

Western Blotting ist ein Verfahren zur qualitativen Analyse zellulärer Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper. Hierfür werden Zellen zunächst lysiert und der zytosolische Proteinanteil mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgt das eigentliche Blotting, also der Transfer der nach Größe aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran im Semi-Dry-Verfahren. Durch Inkubation mit Primärantikörpern können Zielproteine hochspezifisch markiert und schließlich durch eine Sekundärantikörper-vermittelte Lichtreaktion auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden.

2.3.1. Ernten und Lysieren der Zellen

Zur Herstellung von zytosolischen Lysaten wurde zunächst die Zelldichte der zu analysierenden Kulturen bestimmt und die gewünschte Zellmenge bei 1.200rpm für 5 Minuten pelletiert. Statt einer chemischen Proteinquantifizierung wurde stets die Ernte gleicher ausgezählter Zellmengen für gemeinsam zu analysierende Kulturen vorgenommen um eine vergleichende Beurteilung der relativen Proteinmengen zu ermöglichen. Diese lagen in der Regel zwischen 50.000 und 200.000 Zellen pro Sample. Nach Zentrifugation wurden die Zellpellets einmal in PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Den gefrorenen Zellpellets wurden pro 100.000 Zellen 10μl Laemmli-Ladepuffer (Zusammensetzung siehe Materialliste) zugesetzt und das Gemisch für 30 Sekunden mit einem UP50H-Homogenisator sonifiziert um die Zellmembranen zu zerstören und die

genomische DNA zu scheren. Anschließend erfolgte die Denaturierung der zellulären Proteine bei 98°C für 3 Minuten.

Bei Experimenten mit shRNA-vermitteltem Knockdown der NFκB-inducing kinase (NIK) wurden die Zellen vor dem Ernten für 3-4 Stunden bei 37°C mit dem Proteasominhibitor MG132 (20mM Stock in DMSO, Verdünnung 1:1.000) inkubiert. Dies war notwendig um das NIK-Protein im Western Blot nachweisen zu können, da der physiologische Spiegel von NIK aufgrund des hohen Turnovers sehr niedrig ist.

2.3.2. Auftrennung mittels SDS-PAGE

Die Natrium-Dodecylsulphate-Polyacrylamide-Gel-Electrophoresis (SDS-PAGE) mit der Methode nach Laemmli¹¹⁹ führt zur Auftrennung linearisierter Proteine abhängig von ihrer molaren Masse. Durch verschiedene Schritte werden die zellulären Proteine dabei auf ihre Primärstruktur reduziert. So vermittelt der den Zellpellets zugesetzte Laemmli-Puffer über das enthaltene β-Mercaptoethanol die Spaltung von Disulfidbrücken durch Reduktion, welche Teil der Sekundärstruktur der Proteine sind. Das sowohl im Laemmli-Puffer als auch in den Elektrophorese-Gelen enthaltene anionische Reagens SDS (Natriumdodecylsulfat) sorgt einerseits durch die Anlagerung an die hydrophoben Regionen der Proteine für eine Linearisierung durch Auflösung von Sekundär- und Tertiärstruktur und maskiert andererseits die Eigenladung der Proteine. Diese Mechanismen erlauben eine Separierung der denaturierten Proteine nach ihrer molekularen Masse, da größere Proteine bei Durchwandern des Gels von der Kathode zur Anode stärker im Gel zurückgehalten werden als kleinere. Da schmale Proteinbanden, d.h. die möglichst präzise Fokussierung von Proteinen gleicher Größe, essenziell für die Aussagekraft der antikörpervermittelten Proteinsignale ist, erfolgt bei der verwendeten diskontinuierlichen Form der SDS-PAGE zunächst die Konzentrierung der aufgetragenen Proteine in einem grobmaschigen Sammelgel mit neutralem pH-Wert (80V, 15 Minuten) bevor im basischen und kleinporigeren Trenngel bei 110V die eigentliche Separierung der Proteine erfolgt. Um eine größtmögliche Auftrennung der Proteine zu erreichen, erfolgt die Elektrophorese im Trenngel so lange bis die Lauffront, welche durch das im Laufpuffer enthaltene Bromphenolblau markiert wird, den unteren Teil des Gels erreicht hat. Die Elektrophorese erfolgte in 1xTGS-Laufpuffer.

Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel (Ansatz für je 2 Gele):

	Sammelgel	Trenngel (10%)
Rotiphorese (Acrylamid)	1,0 ml	4,7 ml
4x Sammelgelpuffer pH 6,8 (0,5M TRIS; 0,015M SDS)	1,3 ml	-
Trenngelpuffer pH 8,8 (1,5M TRIS; 0,015M SDS)	-	2,9 ml
dH ₂ O (autoklaviert)	2,9 ml	4,1 ml
APS 10%	63 µl	195 µl
TEMED	5,25 µl	16,1 µl

Tabelle 4

2.3.3. Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss durch Semi-Dry Blotting auf eine proteinbindende Trägermembran übertragen um die Detektion einzelner Proteine durch Antikörperbindung zu ermöglichen. Hierfür wurde das Gel blasenfrei auf einer Membran aus Nitrozellulose platziert und im Sandwichverfahren von beiden Seiten Filterpapier aufgelegt. Der Transfer erfolgte durch Anlegen einer vertikalen Spannungsquelle bei 100V für 60 Minuten in Blottingpuffer (siehe Materialliste). Um die Blotqualität und die Beladung zu kontrollieren/dokumentieren, erfolgte nun zunächst die Färbung mit dem Azofarbstoff Ponceau S, welcher den unspezifischen Nachweis von Proteinen durch reversible Bindung an Aminogruppen ermöglicht. Um diesen auszuwaschen und unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran anschließend unter Agitation für 30 Minuten mit 5% in TBS-T-Puffer gelöstem Magermilchpulver inkubiert.

2.3.4. Immunchemische Färbung und Analyse von Proteinbanden

Das Prinzip des immunchemischen Nachweises von Proteinen beruht auf der spezifischen Bindung eines Primärantikörpers an das nachzuweisende zelluläre Protein

und dem Sichtbarmachen dieser Bindung durch Anheftung eines Sekundärantikörpers an den Fc-Teil des Primärantikörpers. Die Spezifität des Sekundärantikörpers richtet sich dabei nach der Spezies aus der der Primärantikörper gewonnen wurde (Kaninchen, Ratte, Maus). Der Zweitantikörper ist an Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt, welche durch eine Lichtreaktion den Nachweis auf Röntgenfilm ermöglicht.

Der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1.000 bis 1:5.000 (siehe Materialliste) in TBS-T-Puffer mit 5% Magermilchpulver und 0,1% Natriumazid angesetzt und zur Inkubation über Nacht bei 4°C auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Nach dreimaligem Waschen für 5 Minuten mit TBS-T wurde die Membran für 1-2 Stunden mit dem jeweiligen Sekundärantikörper in 5% Magermilch-TBS-T-Lösung (Verdünnung 1:20.000) behandelt und danach erneut 3x für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper wurde die Membran anschließend für 1 Minute mit Enhanced Chemiluminescence-Lösung (ECL, s. Materialliste) bedeckt und nach Entfernen der Lösung in einer Dunkelkammer zur Exposition von Röntgenfilm verwendet. Die an den Sekundärantikörper gebundene HRP vermittelt eine lokale Lichtemission und führt hierdurch zu einer Schwarzfärbung des Films im Bereich der markierten Proteinbanden.

2.4. Liste der Materialien

Geräte und Zubehör

Produkt	Hersteller
Elektroporationsgerät (GenePulser)	Bio-Rad, München, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
UP50H-Homogenisator	Hielscher, Teltow, Deutschland
Western Blot Apparatur	Bio-Rad

Software

Adobe Photoshop CS2	Adobe Systems, München, Deutschland
Canvas X	Canvas GFX, Fort Lauderdale, USA
Cell Quest	BD Biosciences
Endnote	Adept Software, Deutschland
FlowJo	Tree Star Inc., Ashland, USA
GraphPad Prism	Graphpad Software, La Jolla, USA
Microsoft Office	Microsoft, Seattle, USA

Chemikalien

Adenosintriphosphat (ATP, 10mM)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
alamarBlue	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Annexin V-FITC	Bender MedSystems, Wien, Österreich
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
dNTP-Mix	Fermentas
Ethanol 96%	Apotheke Uni Würzburg

G418 (Genitacin)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glycerin	Merck
Glycin	Roth
HD Green DNA Dye	Intas Science Imaging, Göttingen, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Apotheke Uni Würzburg
Kaliumacetat	Merck
Luminol	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	real.-
Magnesiumacetat	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
Methanol	Sigma-Aldrich
MG132	Selleck Chemicals EU, München, Deutschland
Natriumacetat (3M)	Roth
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid	Roth
p-Coumarsäure	Sigma-Aldrich
Ponceau-S	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Puromycin	Calbiochem (Merck), Darmstadt, Deutschland
Rotiphorese	Roth
Salzsäure (HCl) 37%	Merck, Darmstadt, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween 20	Roth
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth
β-Mercaptoethanol	Roth

Zellkulturmedien und Zusätze

Produkt	Menge/End- konzentration	Hersteller
RPMI-1640		Sigma-Aldrich
Fötales Rinderserum (FBS)	10%	Biochrom, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	2mM	Invitrogen
Penicillin	100U/ml	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Streptomycin	100µg/ml	Pan Biotech
Natriumpyruvat	1mM	Pan Biotech

Lösungen und Puffer

Agarplatten (á 30ml)	500ml LB-Medium	(s. dort)
	500ml Aqua dest.	
	15g Bacto Agar	Sigma-Aldrich
	0,1mg/ml Ampicillin	Sigma-Aldrich
Annexin V Bindepuffer	10mM HEPES/NaOH	Sigma-Aldrich
	pH 7,4	
	140mM NaCl	Roth
	2,5mM CaCl ₂	Merck
Blottingpuffer (2l)	400ml Methanol	Sigma-Aldrich
	28,8g Glycin	Roth
	6g TRIS	Roth
	Aqua dest.	
ECL-Lösung	100mM TRIS-HCl pH	Roth
	8,8	
	2,5mM Luminol	Sigma-Aldrich
	0,2mM p-Coumarsäure	Sigma-Aldrich
	3mM H ₂ O ₂	Roth

Laemmli-Puffer (4x, 10ml)	1ml Glycerin	Merck
	1ml 20% SDS	Fluka
	0,6ml TRIS-HCl pH6,8	Roth
	1ml β -Mercapto-ethanol	Roth
	0,1ml Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
	6,3ml Aqua dest	
LB-Medium (+Ampicillin)	5g/l Hefeextrakt	Roth
	10g/l Trypton	Roth
	10g/l NaCl	Roth
	(0,1mg/ml Ampicillin	Sigma-Aldrich)
Oligonukleotid Annealing Buffer (OAB)	100mM Kaliumacetat	Merck
	30mM HEPES; pH 7,4	Sigma-Aldrich
	2mM	Roth
	Magnesiumacetat	
Puffer für Restriktionsenzyme (Tango, Orange, Red, Green, Blue)	10x	Fermentas
T4 DNA Ligase Puffer	10x	Fermentas
T4 PNK Puffer	10x	Fermentas
TBS-Waschpuffer (10x, 1l) (Gebrauch als 1x TBS-T mit Aqua dest. und 1% Tween)	24,4g TRIS-HCl	Roth
	80g NaCl	Roth
	Aqua dest.	
	HCl: ad pH 7,6	Merck
TGS-Laufpuffer (10x, 2l) (Gebrauch als 1xTGS mit Aqua dest.)	60g TRIS-HCl	Roth
	284g Glycin	Roth
	20g SDS	Fluka
	Aqua dest.	

Enzyme

Dream Taq Polymerase	5U/ μ l	Thermo Scientific
----------------------	-------------	-------------------

Restriktionsenzyme	10U/ μ l	Fermentas
- <i>Bgl</i> II		
- <i>Bst</i> XI		
- <i>Eco</i> RI		
- <i>Hin</i> dIII		
- <i>Nhe</i> I		
- <i>Not</i> I		
- <i>Sac</i> I		
- <i>Xba</i> I		
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	1U/ μ l	Fermentas
T4 DNA Ligase	5U/ μ l	Fermentas
T4 Polynukleotidkinase	5U/ μ l	Fermentas

Antikörper

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
ERK1 (K-23, detektiert beide Isoformen) (sc-94)	Kaninchen	1:5.000	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
HSP90- β (SP A-845)	Maus	1:5.000	Stressgen, Ann Arbor, USA
I κ B α (#4814)	Maus	1:2.000	Cell Signaling, Frankfurt/Main, Deutschland
MEK1, 2 (#9122)	Kaninchen	1:2.000	Cell Signaling
NIK (#4994)	Kaninchen	1:2.000	Cell Signaling
p52 (#05-361)	Maus	1:2.000	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Phospho-ERK1, 2 (#9101)	Kaninchen	1:2.000	Cell Signaling

Phospho-MEK1, 2 (#9154)	Kaninchen	1:2.000	Cell Signaling
p65 (RelA) (#4764)	Kaninchen	1:2.000	Cell Signaling
Tet-Repressor (AB-3541)	Kaninchen	1:1.000	Merck Millipore
Tubulin	Ratte	1:10.000	Biozol, Eching, Deutschland

Sekundärantikörper

Kaninchen, HRP- konjugiert (#111-036-045)	Ziege	1:20.000	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien
Maus, HRP-konjugiert (#115-063-003)	Ziege	1:20.000	Jackson ImmunoResearch
Ratte, HRP-konjugiert (#112-036-062)	Ziege	1:20.000	Jackson ImmunoResearch

Längenstandards

DNA-Marker (GeneRuler™ 1kB DNA Ladder)	Fermentas
Protein Marker (Page Ruler™ Unstained Protein Ladder)	Thermo Scientific

DNA-Oligonukleotidsequenzen: (Synthese: Sigma-Aldrich)

Die Doppelstrang-Oligonukleotidfragmente wurden aus einem 68mer langen Sense- (F) und einem 60mer langen Antisensestrang (R) hergestellt (vgl. 2.2)

Sequenz (F/R)	Basenfolge (5' nach 3')
NIK-F	GATCTCCGGATTGACCTCACCCAGAATTCAAGAGATTCTG GGTGAGGTCAATCCTTTTTGGAAGAGCT
NIK-R	CTTCCAAAAAGGATTGACCTCACCCAGAATCTCTTGAATT CTGGGTGAGGTCAATCCGGA
p65-F	GATCTCCGATTGAGGAGAAACGTAAATTCAAGAGATTTAC GTTTCTCCTCAATCCTTTTTGGAAGAGCT
p65-R	CTTCCAAAAAGATTGAGGAGAAACGTAAATCTCTTGAATT TACGTTTCTCCTCAATCGGA
p52(2)-F	GATCTCCGTAGACACGTACCGACAGATTCAAGAGATCTGT CGGTACGTGTCTACTTTTTGGAAGAGCT
p52(2)-R	CTTCCAAAAAGTAGACACGTACCGACAGATCTCTTGAATC TGTCGGTACGTGTCTACGGA
p52(3)-F	GATCTCCAGACGAGTGTGGTGAGCTTTTCAAGAGAAAGCT CACCACACTCGTCTTTTTTGGGAAGAGCT
p52(3)-R	CTTCCAAAAAAGACGAGTGTGGTGAGCTTTCTCTTGAAAA GCTCACCACACTCGTCTGGA
ERK1-F	GATCTCCGCCATGAGAGATGTCTACATTCAAGAGATGTAG ACATCTCTCATGGCTTTTTGGAAGAGCT
ERK1-R	CTTCCAAAAAGCCATGAGAGATGTCTACATCTCTTGAATG TAGACATCTCTCATGGCGGA
ERK2-F	GATCTCCGAGGATTGAAGTAGAACAGTTCAAGAGACTGTT CTACTTCAATCCTCTTTTTGGAAGAGCT
ERK2-R	CTTCCAAAAAGAGGATTGAAGTAGAACAGTCTCTTGAACT GTTCTACTTCAATCCTCGGA
MEK1-F	GATCTCCGAGGGAGAAGCACAAGATCATTCAAGAGATGA TCTTGTGCTTCTCCCTCTTTTTGGAAGAGCT (70bp)
MEK1-R	CTTCCAAAAAGAGGGAGAAGCACAAGATCATCTCTTGAA TGATCTTGTGCTTCTCCCTCGGA (62bp)

MEK2-F	GATCTCCGAAGGAGAGCCTCACAGCATTCAAGAGATGCT GTGAGGCTCTCCTTCTTTTTGGAAGAGCT
MEK2-R	CTTCCAAAAGAAGGAGAGCCTCACAGCATCTCTTGAATG CTGTGAGGCTCTCCTTCGGA

Sequenzierungsprimer

Primer (Anwendung)	Basenfolge (5' nach 3')
T7-Primer (pSUSTER2-Vektoren, Hauptstrang)	TAATACGACTCACTATAGG
T3-Primer (pSUSTER2-Vektoren, Gegenstrang)	AATTAACCTCACTAAAGG
pT2-5'-Primer (pT2-Vektoren, Hauptstrang)	GGCTTTAGAAGCTTCCCAC
pT2-3'-Primer (pT2-Vektoren, Gegenstrang)	CTTCCACACCTGGTTGC

Plasmide: (modifizierte Plasmide: s. Vektorkarten im Anhang)

pEGFP-N3	Clontech
Transposase: pCMV(CAT)T7-SB100 (#34879)	Addgene, Cambridge, USA

Zelllinien

AMO-1	DMSZ, Braunschweig, Deutschland
JJN-3	DMSZ
L-363	DMSZ

Reaktionssets (Kits)

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Maxiprep Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen

3. ERGEBNISSE

Der Projektauftrag dieser Dissertation fußt auf den vorangegangenen Arbeiten von Bernhard Roth und Severin Fink zur Entwicklung von induzierbaren Mehrfach-shRNA-Kassetten-Systemen, wobei die vier Komponenten des MEK/ERK-Moduls des Ras/MAPK-Signalwegs als Zielgene dienen. Diese Vorarbeiten sollen deshalb zunächst kurz dargestellt werden.

Bernhard Roth konnte zeigen, dass der Knockdown mehrerer Zielgene durch die plasmidbasierte transiente Transfektion mehrerer, in einem einzigen Vektor hintereinandergeschalteter shRNA-Expressionskassetten ohne funktionelle Einschränkungen möglich ist. Hierfür wurde der kommerziell erhältliche pSUPER-Vektor zunächst derart modifiziert, dass er den Einbau mehrerer shRNA-Expressionskassetten durch einen wiederholbaren cut&paste-Mechanismus erlaubte. Funktionell taugliche shRNA-Sequenzen waren teilweise bekannt (ERK1, 2), andere wurden im Rahmen der Arbeit etabliert (MEK1, 2).¹⁰⁴ Die transiente Transfektion durch Elektroporation erfolgte nach dem Protokoll von Steinbrunn et al. (2014)¹⁰³. Im Ergebnis konnte nachgewiesen werden, dass der Knockdown mehrerer Zielstrukturen mit dem Multikassettenvektor äquivalent zu dem jeweiligen Einzelknockdown in der Beurteilung im Western Blot war, es also weder Positionseffekte noch summarische Verschlechterungen in der Knockdowneffizienz gab.

Severin Fink war maßgeblich für das Vektordesign des stabilen und induzierbaren Systems verantwortlich (vgl. 2.2). Dies erforderte die Konstruktion und den Nachweis der uneingeschränkten Funktion von tet-Operator-Sequenzen tragenden shRNA-Expressionskassetten in *Sleeping Beauty* Vektoren, sowie die Klonierung und Adaptation eines tet-Repressorprotein(tetR)-Expressionsvektors zur Verwendung in stabil transfizierten Myelomzellen. Nach der Etablierung von stabilen nicht-induzierbaren Einzelknockdowns waren schließlich für die Zelllinie J2N-3 auch erste Doxozyklin-vermittelte Induktionen mit einem Einzelkonstrukt gegen ERK2 erfolgreich.¹¹⁴

Um diese Arbeiten zu komplettieren und somit die Etablierung der Methode abzuschließen, sollte im Rahmen dieser Dissertation zunächst das Induktionsprinzip in verschiedenen Zelllinien für Mehrfach-shRNA-Konstrukte im Ras/MAPK-Signalweg

gezeigt, in seiner Handhabung standardisiert und vereinfacht sowie anschließend in Verbindung mit ersten funktionalen Analysen auf den NFκB-Signalweg angewandt werden.

3.1. Etablierung des stabilen, induzierbaren Mehrfachknockdowns

3.1.1. eGFP als Frühmarker selektionswürdiger Transfektionen

Die Ko-Transfektion eines Expressionsplasmids für eGFP (vgl. 2.1.6) ließ bereits am Folgetag Aussagen darüber zu, ob und in welchem Ausmaß stark transfizierte und dennoch lebende Zellen in den jeweiligen Elektroporationsansätzen vorhanden waren. Die Stärke der eGFP-Fluoreszenz dient dabei als einfacher Anzeiger dafür, in welchem Umfang auch andere Plasmide eines Elektroporationsmixes (hier das transiente Expressionsplasmid für die Transposase und das jeweilige *Sleeping Beauty* Konstrukt) erwartungsgemäß in diese Zellen aufgenommen werden. Insofern sollte aus der FACS-Analyse eine grobe Abschätzung des Ausmaßes letztendlich erfolgreicher Transpositionereignisse möglich sein.¹⁰³ Tatsächlich korrelierte die Rate stark eGFP-positiver Zellen in den schnell wachsenden MM Zelllinien JJN-3, AMO-1 und L-363 in hohem Maße mit der erfolgreichen Selektion stabil transfizierter Zellen innerhalb eines Zeitraums von ungefähr 2 Wochen und konnte somit als valider Indikator für erfolgreiche Transpositionen etabliert werden (siehe Abbildung 11).

Es zeigte sich, dass auch aus Transfektionsansätzen mit einer sehr geringen Rate (<2%) an stark transfizierten Zellen durchaus erfolgreich transponierte Kulturen selektioniert werden können, wobei im Vergleich zu effizienteren Transfektionen lediglich der benötigte Selektionszeitraum etwas länger war.

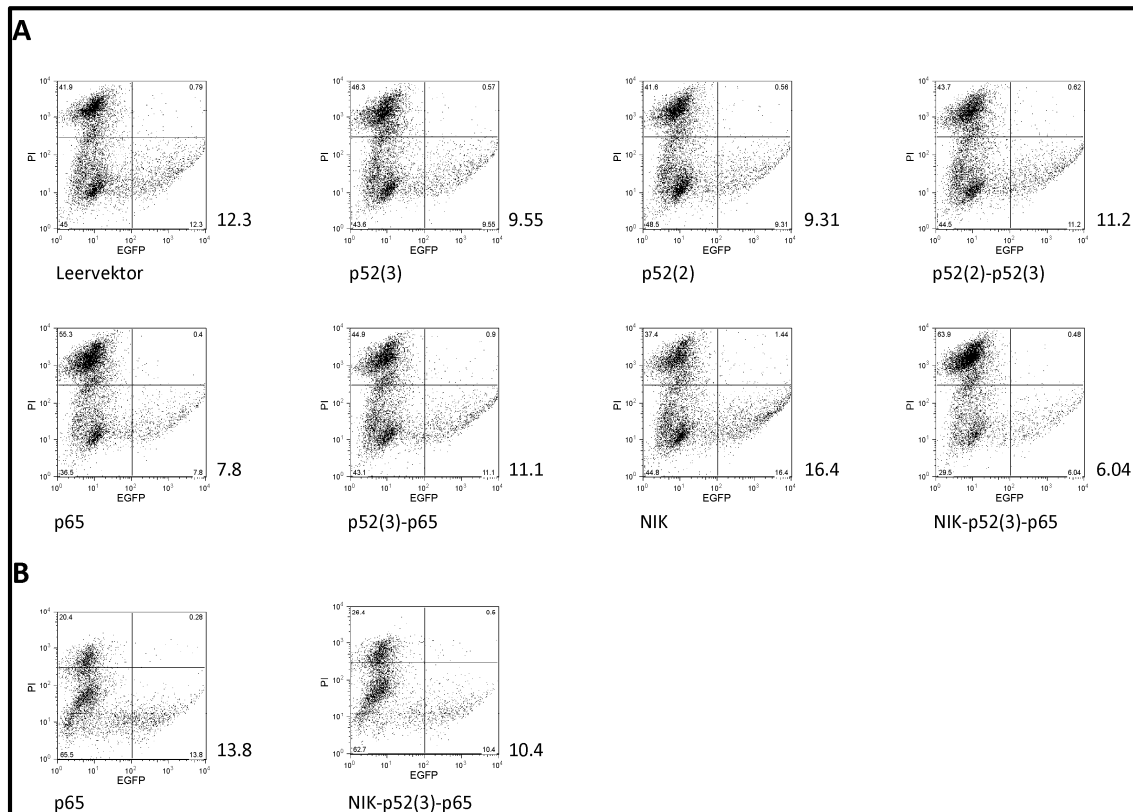


Abbildung 11

FACS-Analyse an Tag 1 (A) bzw. 3 (B) nach Elektroporation verschiedener shRNA-Expressionsplasmide gegen Proteine des NF κ B-Systems in die (Sub-)Zelllinie JN3-tTR

(A) Bei der ersten Transfektion wuchs analog zum Anteil stark eGFP-positiver Zellen der Ansatz JN3-tTR-shNIK am schnellsten aus der Selektion mit G418 heraus, während aus JN3-tTR-shp65 und -shNIK-shp52(3)-shp65 keine erfolgreich transponierten Zellen selektioniert werden konnten.

(B) Nach erneuter Transfektion dieser beiden Konstrukte konnten bei deutlich besserer Transfektionseffizienz im üblichen Zeitrahmen problemlos stabile Populationen selektioniert werden. (x-Achse: EGFP; y-Achse: PI)

3.1.2. Transfektion stabiler tetR-Sub-Zelllinien

Die Generierung von Myelom-Sub-Zelllinien, welche das tet-Repressor-Protein (tetR) stabil exprimieren, erfolgte aus verschiedenen Gründen. Da die Transfektion durch Elektroporation mit beträchtlichem Zellstress verbunden ist und längst nicht alle Zellen, die nach Elektroporation vital sind, auch das transfizierte Plasmid stabil in ihr Genom integriert haben und somit antibiotisch selektionierbar sind, erschien es sinnvoller, den Ansatz einer zweizeitigen Transfektion von tet-Repressorprotein- und der jeweiligen

shRNA-Expressionskassette(n) zu verfolgen. Weiterhin wäre vor allem bei zeitgleicher Transfektion des tet-Repressors mit potenziell zytotoxischen shRNA-Kombinationen unklar, ob die tetR-Expression schnell genug erfolgen würde um die shRNA-Transkription ausreichend früh unterdrücken. Die Elektroporation von induzierbaren shRNA-Expressionsplasmiden in Zellen mit konstitutiver tetR-Expression soll sicherstellen, dass ihre Transkription von Beginn an bestmöglich reprimiert wird, sodass eine Selektion erfolgreich transponierter Zellen ohne Selektionsvor- oder -nachteile durch shRNA-vermittelte Effekte möglich wird.

Hierfür erfolgte zunächst die Transfektion der Zelllinien JJN-3, AMO-1 und L-363 mit dem tetR-Proteinexpressionsvektor (pT2-SVPuro-CAG- β -tTR, vgl. Abbildung 23, alle Vektorkarten siehe Anhang). Ab Tag 2 nach Elektroporation wurden die Zellen für 11 Tage mit Puromycin selektioniert. Obwohl die Spiegel des tet-Repressorproteins nicht für einen Nachweis im Western Blot ausreichten (nicht gezeigt), konnte für alle Zelllinien, die im Anschluss mit dem Einzel-shRNA-Expressionskonstrukt gegen ERK2 (pT2-shERK2, vgl. Abbildung 26) transfiziert wurden, nach Puromycin- und G418-Selektion eine vollständige Repression der shRNA-Expressionskassette erreicht werden, d.h. im nicht-induzierten Zustand war im Western Blot kein Unterschied im Hinblick auf den ERK2-Spiegel im Vergleich zu untransfizierten Kulturzellen zu erkennen (vgl. Abbildung 12). Nach Induktion mit 2 μ g/ml Doxzyklin über einen Zeitraum von 3 Tagen konnte dagegen eine deutliche und selektive Abnahme des ERK2-Spiegels beobachtet werden, welche gleichwertig war zu jener in lediglich stabil mit der shRNA-Expressionskassette gegen ERK2 transponierten Zellen und dementsprechend dauerhafter shRNA-Expression. Dies darf einerseits als funktioneller Nachweis des tet-Repressors gewertet werden und beweist andererseits die Funktionalität des Repressions-/Induktionssystems und des damit verbundenen selektiven RNAi-Effekts. Daraufhin wurden nach negativ verlaufener Überprüfung auf eine Kontamination mit Mykoplasmen kryokonservierte Vorrats-Zellbanken angelegt, um die tetR-Sublinien nach dem Vorbild der Original-Zelllinien in regelmäßigen Intervallen erneuern zu können (vgl. 2.1).

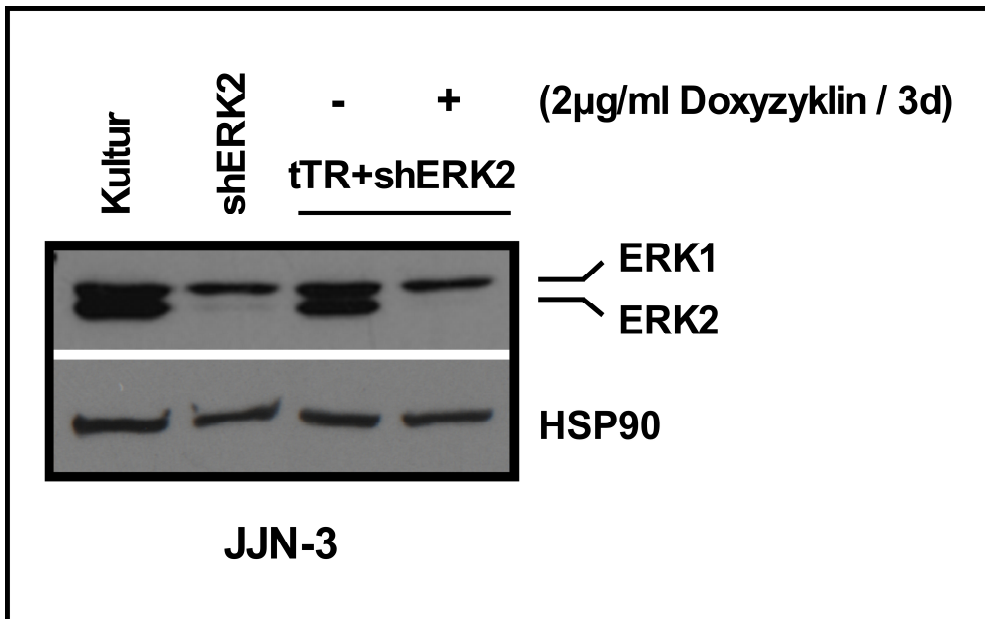


Abbildung 12

Western Analyse eines induzierten Einzelknockdowns von ERK2 im Vergleich mit untransfizierten Kulturzellen sowie Zellen mit einem stabilen Einzelknockdown von ERK2 nach Fink et al. (in Vorbereitung)¹¹⁴

JJN-3-Zellen wurden zweizeitig mit dem Proteinexpressionsplasmid für das tet-Repressorprotein und der induzierbaren shRNA-Expressionskassette gegen ERK2 transponiert (tTR+shERK2). Nach Selektion erfolgreich mit beiden Konstrukten transponierter Zellen mittels G418 und Puromycin zeigt sich im nicht-induzierten Zustand (d.h. ohne Doxyzyklin) ein zu JJN-3-Originalzellen (=Kultur) äquivalenter ERK-2-Spiegel. Nach Induktion der Zellen mit 2 µg/ml Doxyzyklin über einen Zeitraum von 3 Tagen konnte eine deutliche Absenkung des ERK2-Spiegels nachgewiesen werden, welche derjenigen in lediglich stabil mit der shRNA-Expressionskassette gegen ERK2 (=shERK2) transfizierten Zellen (d.h. mit dauerhafter Expression der shRNA) ebenbürtig war.

3.1.3. Erstinduktion eines Mehrfachkonstrukts

Da ein stabiler und durch Doxyzyklin induzierbarer Knockdown von ERK2 in verschiedenen MM Zelllinien verlässlich funktionierte, wurde im Folgenden das gesamte MEK/ERK-Modul als Zielstruktur eines einzigen *Sleeping Beauty* RNAi-Plasmids anvisiert. Dazu wurde das neu klonierte und sequenzbestätigte Konstrukt aus vier hintereinanderklonierten induzierbaren shRNA-Expressionskassetten – shMEK2-shMEK1-shERK2-shERK1 (=shMMEE, vgl. Abbildung 27, alle Vektorkarten siehe Anhang) – zusammen mit dem transienten Transposase-Expressionsplasmid in die (Sub-)Zelllinie

JJN-3-tTR transfiziert. Anschließend erfolgte die antibiotische Selektion mit Puromycin und G418, wobei binnen 10 Tagen eine Kultur erfolgreich transponierter Zellen etabliert werden konnte. Für den Induktionsversuch wurden daraufhin Teilkulturen von je 5×10^6 Zellen in 15ml frischem Vollmedium angelegt. Diesen wurde Doxyzyklin in einer Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$ Medium zugesetzt. Abgesehen von JJN-3-tTR-shMMEE wurden als Kontrollansätze untransfizierte JJN-3 sowie JJN-3-tTR Zellen verwendet. Um die Effizienz der Knockdowneffekte des shMMEE-Konstrukts abschätzen zu können wurden zudem zeitgleich transfizierte JJN-3-tTR-shERK2 Zellen induziert, sodass im Hinblick auf ERK2 stellvertretend für die vier Proteine des MEK/ERK-Moduls ein direkter Vergleich zwischen dem Quadrupel- und dem Einzel-shRNA-Kassettenvektor gezogen werden konnte.

24 Stunden nach Induktion wurde das Doxyzyklin aus den Kulturen entfernt. Dies geschah durch Zentrifugieren der Zellen, zweimaliges Waschen in 1x PBS-Lösung und Re-Suspension der gewaschenen Zellen in frischem Vollmedium. Im weiteren Verlauf des Versuchs wurden die Induktionsansätze unter den üblichen Kulturbedingungen gehalten und an Tag 3 und 6 jeweils Zellen für die Analyse im Western Blot geerntet.

Im Western Blot zeigten sich deutliche Knockdowns für ERK1, ERK2 und MEK deren Spiegel sowohl mit denen des induzierbaren Einzelkonstrukts gegen ERK2 als auch mit den in transienten Experimenten erreichten vergleichbar waren. Trotz suboptimaler Beladung kann für beide Konstrukte an Tag 6 nach Induktion eine deutlichere Herabregulation im Vergleich zu Tag 3 postuliert werden (siehe Abbildung 13). Letzteres steht in Einklang mit den Beobachtungen von Severin Fink bei der Induktion des Einzelkonstrukts gegen ERK2 (Severin Fink, persönliche Kommunikation).

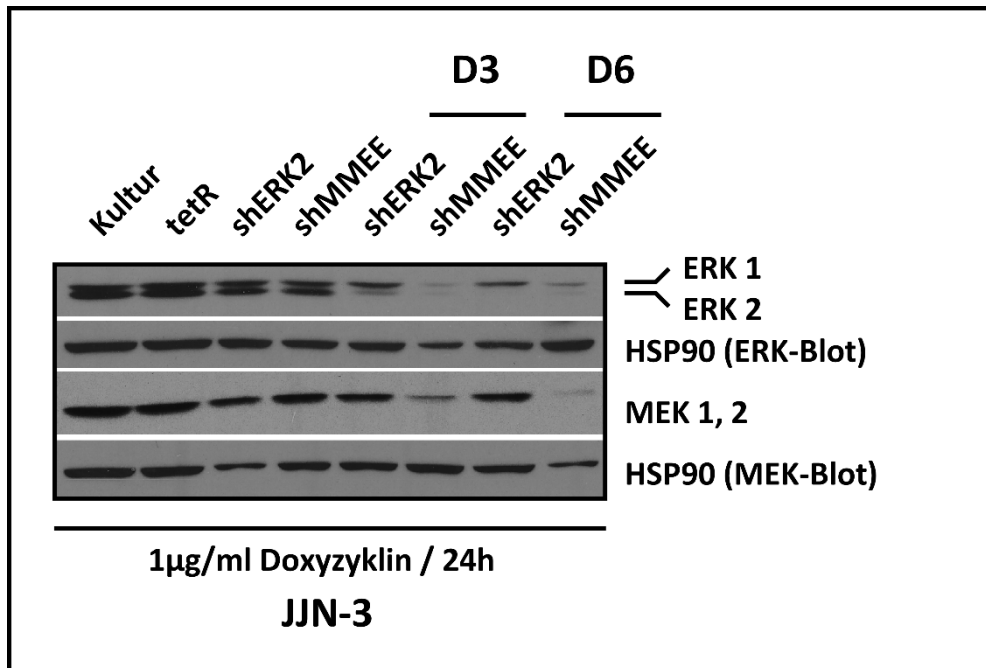


Abbildung 13

Western Analyse der Knockdowneffekte für das induzierte stabil transponierte shMMEE-Konstrukt im Vergleich mit dem induzierten Einzelknockdown von ERK2 in JLN3-tTR Zellen Trotz z.T. suboptimaler Beladung (vgl. HSP90 als Ladekontrolle) zeigt sich für shMMEE (=shMEK2-shMEK1-shERK2-shERK1) ein mindestens äquivalenter ERK2-Knockdown im Vergleich mit dem Einzelkonstrukt gegen ERK2 (=shERK2). Darüber hinaus depletiert das Quadrupelkonstrukt außerdem die Spiegel der anderen Zielproteine ERK1 und MEK1, 2 im erwarteten Ausmaß. Die Knockdowns an Tag 6 erscheinen noch etwas stärker als die an Tag 3.

Obwohl MEK analog zu ERK aus 2 Isoformen besteht, können diese in PAA-Gelen nicht hinreichend getrennt werden, sodass die verwendeten Antikörpern im Western Blot stets pan-MEK1+2-Signale darstellen. Sofern nicht anders gekennzeichnet schließt die Bezeichnung MEK in dieser Arbeit deshalb jeweils beide Isoformen ein.

Der grundlegende Ablauf der Induktion (Aussaat von Testpopulationen gleicher Zellmenge in frischem Vollmedium, Zugabe von Doxyzyklin, anschließendes Auswaschen und Re-Suspension in frischem Vollmedium) wurde in den weiteren Versuchen beibehalten, sodass im Folgenden nur Dosis und Dauer der Doxyzyklininkubation aufgeführt werden.

Auch das Konzept des gemeinsamen Einsatzes von G418 und Puromycin zur Etablierung von polyklonalen Kulturen mit stabil transfizierten shRNA-Expressionskassetten mit

Sleeping Beauty Vektoren in tetR-Subzelllinien wurde nicht verändert. Der Einsatz von Puromycin ist dabei als Sicherheitsmaßnahme zu verstehen, da die Puromycinresistenz die Anwesenheit der *Sleeping Beauty* tetR-Proteinexpressionskassette erzwingt, welche ansonsten möglicherweise bei der Transposition der shRNA-Kassetten-Vektoren verloren gehen könnte (vgl. 3.1.2).

3.1.4. Doxyzyklin als Induktionsagens

Um die Methode möglichst praktikabel und reproduzierbar zu gestalten, galt es nach dem grundsätzlichen Nachweis der Machbarkeit den Versuchsablauf zu optimieren und zu standardisieren. Eine wichtige Stellschraube stellte dabei der Einsatz des Doxyzyklins als Induktionsagens dar. Um einen möglichst starken Knockdown bei möglichst geringer Substanz-vermittelter Toxizität zu erreichen, wurden verschiedene Versuchsanordnungen hinsichtlich Dosierung und Dauer der Doxyzyklinbehandlung getestet.

Um die Toxizität des Doxyzyklins unabhängig von shRNA-vermittelten Effekten zu untersuchen, wurden zunächst JJN-3-tTR Zellen einerseits mit einem Leervektor (pT2-NB, vgl. Abbildung 25) und andererseits mit einer Einzel-shRNA-Expressionskassette gegen NIK (vgl. 3.2.2., Vektorkarte siehe Abbildung 33) transfiziert und selektioniert. Anschließend wurden die Zellen 4 Tage lang mit 5µg/ml, 10µg/ml sowie ohne Doxyzyklin kultiviert. An Tag 0, 1, 2 und 4 wurden Zelltodmessungen mittels FACS-Analyse durchgeführt. Während für 5µg/ml allenfalls eine geringfügig erhöhte Rate an apoptotischen Zellen gegenüber der unbehandelten Kultur beobachtet wurde, zeigten die mit 10µg/ml inkubierten Zellen bereits an Tag 1 einen massiv erhöhten Anteil toter Zellen, welcher in den folgenden Tagen weiter zunahm (siehe Abbildung 14). Im Folgenden wurden daraufhin Dosierungen von 1 und 5µg/ml Doxyzyklin über verschiedene Zeiträume evaluiert.

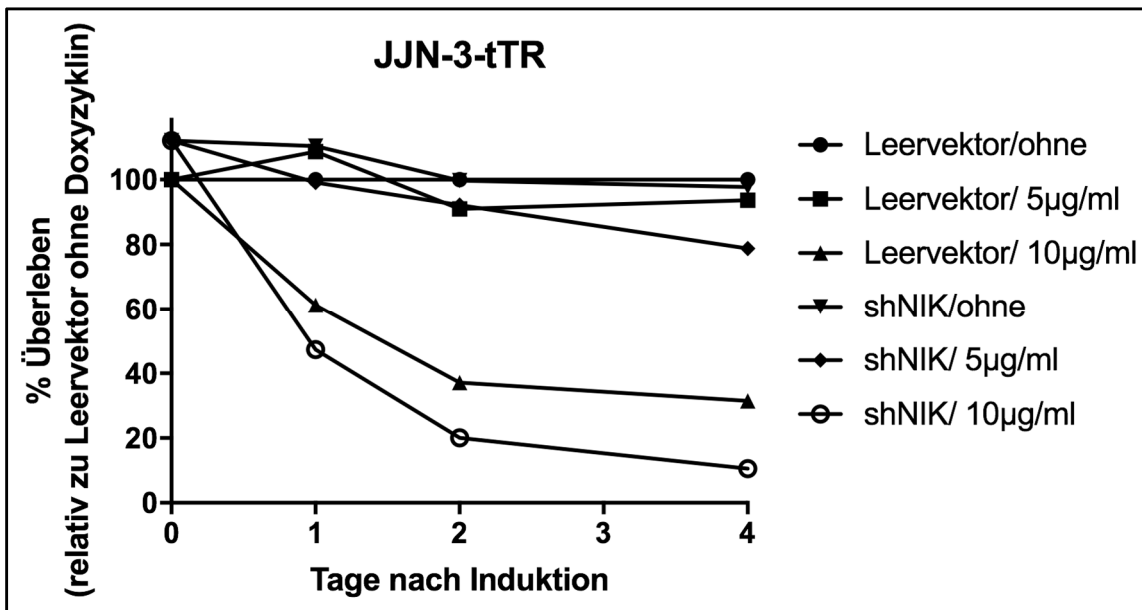


Abbildung 14

Zelltodmessung durch FACS-Analyse in Zellpopulationen mit unterschiedlicher Doxyzyklin-Dosierung

Aus mit einem Leervektor bzw. einer shRNA gegen NIK (vgl. 3.2.2) stabil transponierten JJN-3-tTR Zellen wurden je 3 Testpopulationen angelegt. Je eine wurde für 4 Tage ohne, mit 5µg/ml und 10µg/ml Doxyzyklin gehalten. Zelltodmessungen erfolgten an Tag 0, 1, 2 und 4 (der 100% Überleben-Wert ist immer auf die Leervektor-Population ohne Doxyzyklin am jeweiligen Messtag bezogen).

Für die beiden mit 10µg/ml inkubierten Kulturen zeigte sich eine starke Apoptoseinduktion, die in den mit 5µg/ml behandelten Kulturen nicht auftrat. Im Vergleich zwischen der Induktion von shNIK mit 5µg/ml Doxyzyklin im Vergleich zur entsprechenden Leervektorpopulation zeigte sich ein lediglich leicht gesteigerter Anteil apoptotischer Zellen durch die Blockade von NIK an Tag 4. Dennoch muss aus diesen Ergebnissen der Schluss gezogen werden, dass es wünschenswert wäre, mit noch niedrigeren Konzentrationen von Doxyzyklin arbeiten zu können.

Um die Dauer des induzierten Knockdowneffekts bis zur vollständigen Re-Repression der shRNAs darzustellen, wurden JJN-3-tTR-shMMEE Zellen (Quadrupelkonstrukt shMEK2-shMEK1-shERK2-shERK1, Vektorkarte siehe Abbildung 27) für 24 Stunden mit 1µg/ml Doxyzyklin induziert. An Tag 6 nach Induktion, dem Tag an dem der Erfahrung nach der induzierte Knockdown am stärksten ausgeprägt war, sowie an Tag 9 wurden Proben für die Western Analyse geerntet. Nach dem fast vollständigen Knockdown von

ERK1, 2 und MEK an Tag 6 zeigten sich die Proteinlevels an Tag 9 bereits weitgehend restituiert (lediglich geringfügig erniedrigter ERK-2-Spiegel, siehe Abbildung 15).

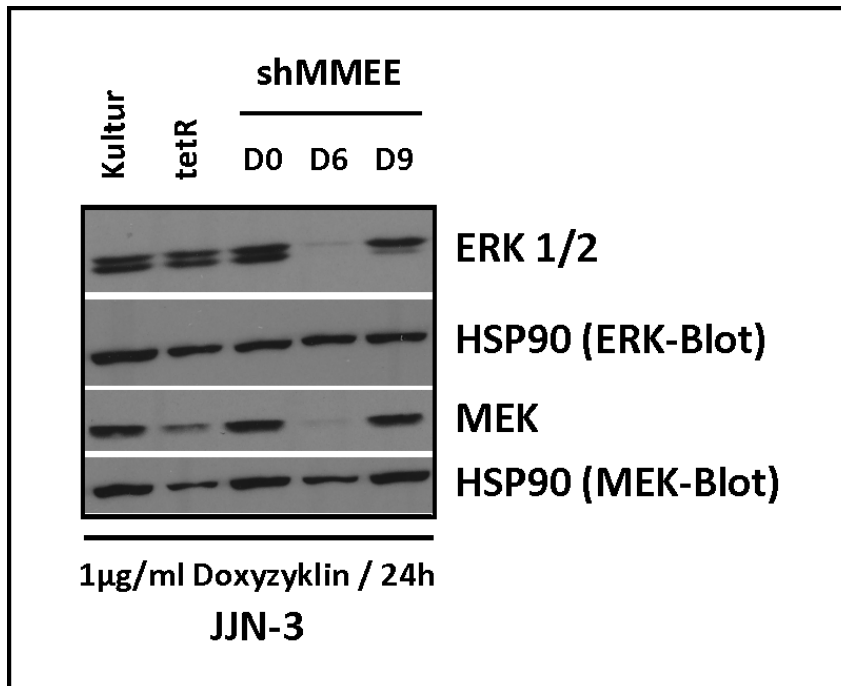


Abbildung 15

Western Analyse mit Darstellung der Re-Repression nach transientser (24h) Induktion von JLN-3-tTR-shMMEE Zellen mit 1µg/ml Doxyzyklin

Nach einer deutlichen Herabregulation der Proteinspiegel von ERK1, 2 und MEK an Tag 6 nach Induktion der JLN-3-tTR-shMMEE-Zellen mit 1µg/ml Doxyzyklin über 24 Stunden zeigt sich an Tag 9 eine weitgehende Restitution der Proteinspiegel. Lediglich der ERK2-Spiegel erscheint im Vergleich zu den Kontrollen noch minimal erniedrigt.

In Bezug auf den gegenüber den JLN-3-Kulturzellen erniedrigten Spiegel von MEK in den JLN-3-tetR-Zellen sowie die fast vollständige Abwesenheit von MEK in den JLN-3-tTR-shMMEE Zellen an Tag 6 nach Induktion ist die geringere Beladung in diesen beiden Proben (vgl. entsprechende Ladekontrollen mit HSP90) relativierend zu berücksichtigen.

Die Analyse der Proteinspiegel nach transientser Induktion der JLN-3-tTR-shMMEE Zellen mit Doxyzyklin erlaubt dabei einen indirekten Rückschluss auf die An- bzw. Abwesenheit der induzierten shRNAs. So kann die Beobachtung in diesem und weiteren Versuchen im Ras-/MAPK-Signalweg (vgl. Abbildung 15 sowie Abbildungen 13, 16A und 17A, B), dass die Spiegel derjenigen Proteine, gegen welche die induzierten shRNAs gerichtet sind, ihr Minimum zwischen Tag 3 und Tag 6 nach Induktion mit Doxyzyklin erreichen dahingehend interpretiert werden, dass die Induktion der shRNA den post-

transkriptionellen Abbau der entsprechenden mRNA bewirkt und somit die Translation in das resultierende Protein verhindert. In der Western Analyse werden die minimalen Spiegel der entsprechenden Proteine jedoch erst dann erreicht, wenn die vor Induktion der shRNA bestehenden Proteine im Rahmen der physiologischen zellulären Prozesse abgebaut sind.

Im Hinblick auf die Re-Repression ist hingegen ein enger zeitlicher Zusammenhang zwischen der Abwesenheit der induzierten shRNAs und der daraus resultierenden erneut ungehinderten Translation der entsprechenden mRNAs in die jeweiligen Proteine anzunehmen.

In einem weiteren Versuch wurde neben verschiedenen Induktionszeiträumen (24 Stunden und 3 Tage) die Frage untersucht, inwieweit die Qualität der Transfektion sowie die Dosis der danach angelegten Selektion Auswirkungen auf die erreichten Knockdownspiegel besitzen. Hierfür wurden je 2 Induktionskulturen aus zwei unterschiedlichen Transfektionen des shMMEE-Konstrukts (Quadrupelkonstrukt shMEK2-shMEK1-shERK2-shERK1) in die Zelllinie AMO-1-tTR angelegt. Die Doxyzyklin-Dosierung betrug für alle Ansätze 5µg/ml, wobei je eine Population für 24 Stunden und die andere über einen Zeitraum von 3 Tagen induziert wurde. Während es nachvollziehbar erscheint, dass sich die Dauer der Induktionseffekte ausdehnt, je länger Doxyzyklin in der Kultur verbleibt, sollte mit dieser Versuchsanordnung vor allem untersucht werden, ob eine längere Induktionsdauer eine stärkere Herabregulation der Zielgene zur Folge hat. Schlussendlich jedoch zeigte sich in diesem direkten Vergleich (siehe Abbildung 16), wie auch in der Zusammenschau der übrigen Induktionsversuche, dass bereits eine eintägige Pulsinduktion der shRNA-Expressionskassetten zum maximal erreichbaren Knockdown der vier Zielgene des MEK/ERK-Moduls innerhalb der folgenden Tage führte.

Neben der Testung unterschiedlicher Induktionsintervalle diente die Versuchsanordnung außerdem der Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Selektionsbedingungen. Bei vergleichbaren Transfektionsansätzen in Bezug auf die Elektroporationsspannung sowie die Menge an Reagenzien und eingesetzten Zellen ergaben sich mitunter dennoch unterschiedliche Transfektionseffizienzen, wobei die

Rate an eGFP-positiven und vitalen Zellen meist zwischen 5-20% lag (vgl. Abbildung 16B sowie Abbildung 11).

Es wurde außerdem getestet, ob durch Selektion mit einer höheren Dosis von G418 möglicherweise nochmals eine Verstärkung des induzierbaren Knockdowns erreicht werden kann. Hintergrund war die Annahme, dass eine Selektion auf die Zellen mit der stärksten Antibiotikumsresistenz diejenigen stabilen Integrationsereignisse isolieren könnte, die zur höchsten Expression des resistenzvermittelnden Neomycinphosphotransferase-Gens führen, und dass sie somit möglicherweise in einem genetischen Umfeld liegen, das auch besonders förderlich für die Expression von shRNA-Kassetten nach Induktion ist. Unter dieser Hypothese wurde die 2. Transfektion (shMMEE(2)) mit der dreifachen Standarddosis von G418 selektioniert, während der 1. Transfektion (shMMEE(1)) die übliche Selektionsdosis (750µg/ml für AMO-1 Zellen, vgl. 2.1.6) verabreicht wurde. Beide Populationen wuchsen im üblichen Zeitraum (ca. 14 Tage) aus der Selektion heraus. In der Western Analyse des anschließenden Induktionsversuchs zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der erzielten Herabregulation der Zielproteine zwischen den beiden Selektionsregimes (siehe Abbildung 16A).

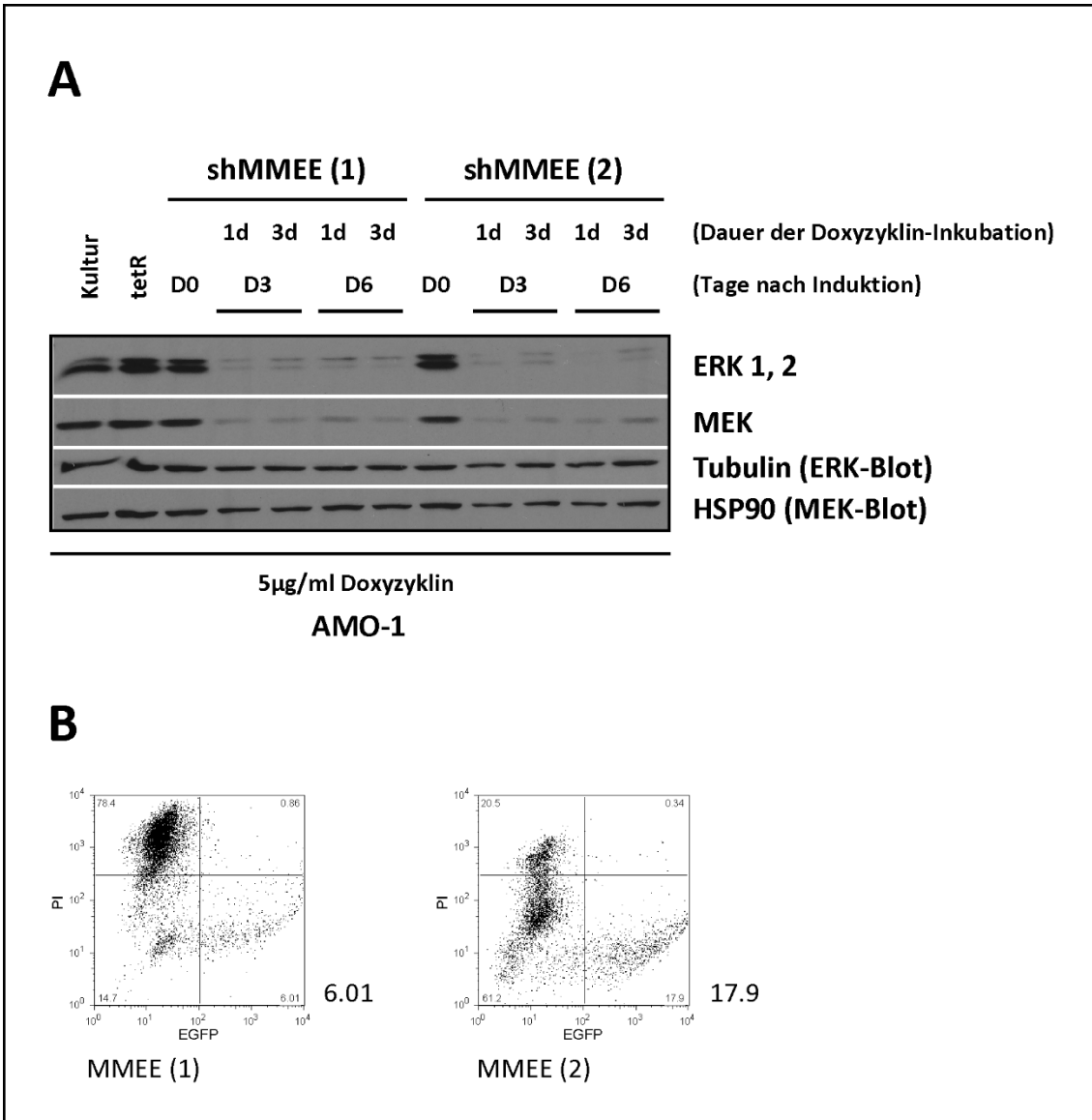


Abbildung 16

Western Analyse eines Induktionsversuchs mit zwei unterschiedlichen Transfektionen des shMMEE-Konstrukts in JJN-3-tetR-Zellen über verschiedene Induktionsintervalle

(A) Im Western Blot zeigen sich weder für die verschiedenen Selektionsregimes (shMMEE (1) und (2)) noch in Bezug auf die unterschiedlichen Induktionsintervalle von 24h bzw. 3 Tagen signifikante Unterschiede hinsichtlich der erzielten Knockdowns, welche für die 3 Zielproteine ERK1, 2 und MEK deutlich ausgeprägt waren und somit vollständig im Rahmen der Erwartungen lagen.

(B) shMMEE (1) zeigte eine geringere Transfektionseffizienz gegenüber shMMEE (2) und wurde mit G418-Standarddosis selektioniert; shMMEE (2) mit dreifacher Dosis.

3.1.5. Zellphysiologische Effekte des MMEE-Knockdowns

Anschließend wurde untersucht, inwieweit der induzierte Quadrupelknockdown von MEK2, MEK1, ERK2 und ERK1 in zellphysiologischer Hinsicht den etablierten Effekten einer Blockade dieser Zielstrukturen einzeln oder in Kombination mit dem pharmakologischen MEK-Inhibitor PD0325901 oder transient exprimierten shRNAs gleichkommt (Fink et al., in Vorbereitung).¹¹⁴ Eine vollständige Blockade des Ras/MAPK-Signalwegs durch transient exprimierte shRNAs gegen ERK1, 2 und MEK1, 2 führt dabei zu einer verstärkten Phosphorylierung des verbleibenden MEK-Proteins (=phospho-MEK), was als funktioneller Readout des Quadrupelknockdowns verstanden werden kann. Ein Einfluss auf das Überleben von MM Zellen wurde dagegen zumindest mittelfristig (4-5 Tage) nicht beobachtet.¹¹⁴

In den stabil mit dem induzierbaren shMMEE-Expressionskonstrukt transponierten AMO-1 Kulturen ergaben die Zelltodmessungen mittels FACS ebenfalls keine Hinweise auf eine signifikante pro-apoptotische Wirkung durch die induzierten shRNAs (Abbildung 17C). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Erwartungen und unterstreichen, dass weder die Expression von immerhin vier verschiedenen shRNAs aus einer stabilen Konstellation heraus noch die Verwendung von Doxyzyklin als Induktionsagens (bis 5 µg/ml, vgl. 1.4 und 3.1.4) zu signifikanten unspezifischen Toxizitätseffekten führen muss.

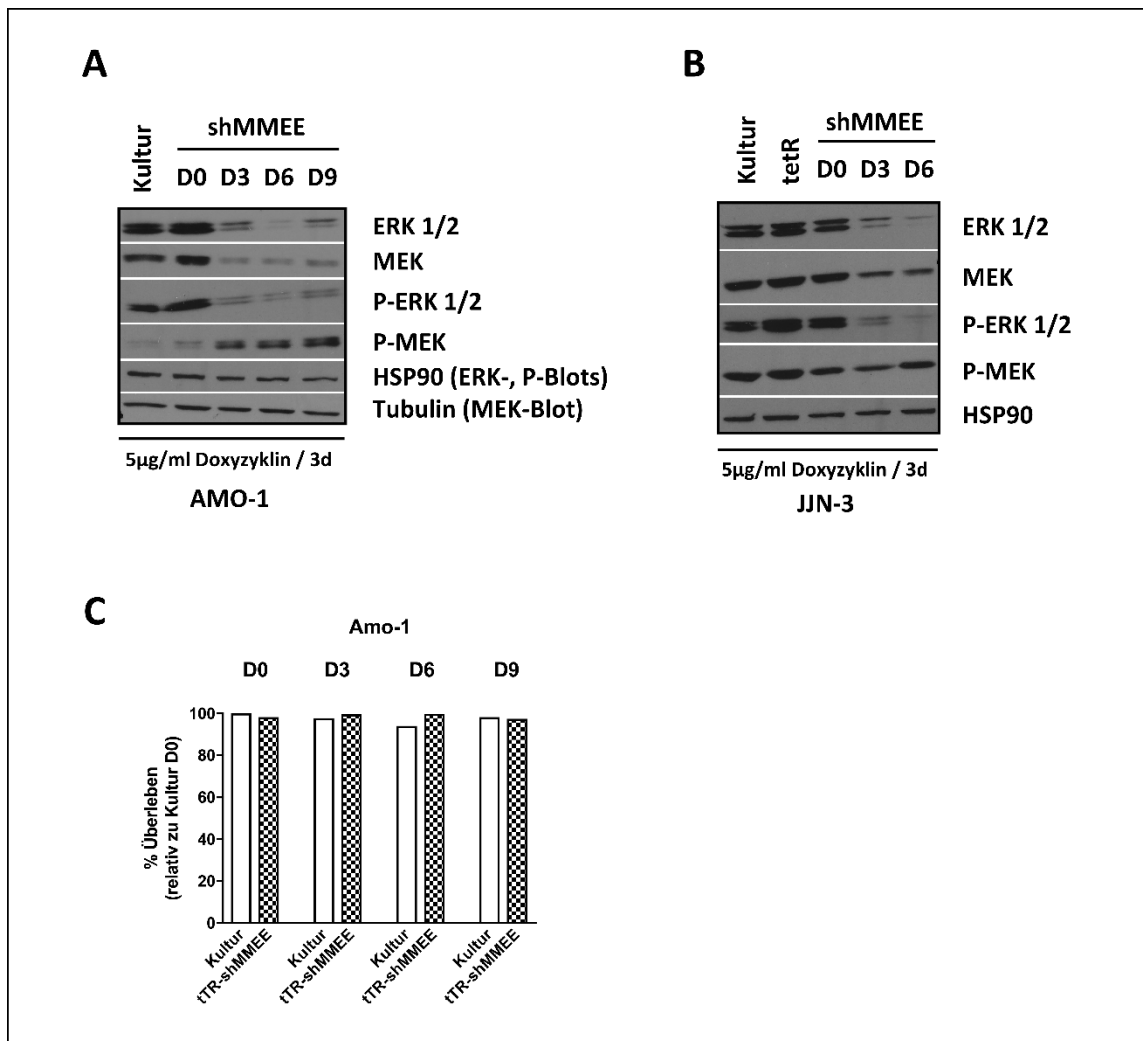


Abbildung 17

Analyse zellphysiologischer Effekte des shMMEE-Knockdowns

(A, B) Im Western Blot zeigen sich für beide Zelllinien deutliche induzierte Knockdowns von ERK1, ERK2 und MEK. Phospho-ERK1, 2 ist analog zur nicht-phosphorylierten Isoform kaum nachweisbar. Im Gegensatz dazu nimmt phospho-MEK im Verhältnis zur nicht-phosphorylierten Form des Proteins in beiden Zelllinien deutlich zu. Markanter ist dieser Effekt in der Zelllinie AMO-1, welche in der Original-Kultur und im nicht-induzierten Zustand kaum phospho-MEK aufweist. Dessen Spiegel steigt nach Induktion der shRNA gegen MEK mit der Abnahme des nicht-phosphorylierten MEK signifikant an. Dies entspricht den in transienten Versuchen beobachteten Ergebnissen.¹¹⁴

(C) In den Zelltodmessungen mittels FACS-Analyse von Annexin V-FITC zeigt sich keine signifikante Apoptoseinduktion durch das shMMEE-Konstrukt im Vergleich zu den Kontrollpopulationen (100% Überleben beziehen sich auf die Kontrollpopulation an Tag 0).

Analog zur pharmakologischen MEK-Blockade konnte Bernhard Roth zeigen, dass transient transfizierte JJN-3 Zellen auf einen starken Knockdown der MEK/ERK-Komponenten mit verstärkter Phosphorylierung des verbliebenen MEK1,2 reagieren (Fink et al., in Vorbereitung).¹¹⁴ Dieser Effekt konnte in Induktionsversuchen dieser kombinierten Quadrupelblockade (d.h. Knockdown von MEK2, MEK1, ERK2, ERK1 durch shMMEE) für JJN3-Zellen reproduziert werden (siehe Abbildung 17B). Für die Zelllinie AMO-1 fiel dieser Effekt sogar noch markanter aus (Abbildung 17A). Dabei ist zu beachten, dass die relativ kräftigen phospho-MEK-Spiegel in den induzierten Knockdown-Zellen vor dem Hintergrund eines stark verminderten MEK-Niveaus erreicht werden, also selbst noch bei Gleichwertigkeit mit der Kontrolle (wie bei JJN-3) eine funktionelle Verstärkung bedeuten. Dies liefert einen deutlichen Hinweis darauf, dass die Zellen die Verminderung der Signalwegsstärke durch verstärkten Input zu kompensieren versuchen. Da allerdings gleichzeitig der Knockdown von ERK1, 2 die nachfolgenden Signalwegskomponenten fast vollständig depletiert, gelingt dies bestenfalls auf sehr niedrigem Niveau. Auch dies entspricht den Ergebnissen aus transienten Experimenten und bestätigt somit die funktionelle Äquivalenz des stabilen und induzierbaren Versuchsaufbaus zu den transienten Transfektionen.¹¹⁴

3.2. Anwendung auf den NFκB-Signalweg

Parallel zu den shMMEE-Induktionen wurde mit der Übertragung des Verfahrens auf die Evaluation des NFκB-Signalsystems begonnen. Als Zielproteine wurden zum einen p65 (RelA) und p52 als wichtigste Transkriptionsfaktoren des klassischen bzw. alternativen Signalwegs gewählt. So sollten mit einem shp65- (vgl. Abbildung 31) und drei verschiedenen shp52-Konstrukten (shp52(2), shp52(3) sowie dem Doppelkonstrukt shp52(2)-shp52(3); alle Vektorkarten siehe Anhang, vgl. Abbildungen 27-29) die Effekte einer singulären Unterbrechung des klassischen bzw. alternativen Signalwegs evaluiert werden. Der Grund für die Testung zweier verschiedener shRNA-Sequenzen gegen p52 jeweils einzeln sowie in Kombination lag in der Tatsache, dass in zuvor durchgeführten transienten Versuchen vergleichsweise stark schwankende und im Allgemeinen nicht an die für andere Zielproteine erzielten Knockdownspiegel heranreichende Effekte beobachtet worden waren. Weiterhin wurde ein Doppelkonstrukt shp52(3)-shp65 (vgl. Abbildung 32) evaluiert, welches einer gemeinsamen Unterbrechung beider Arme des NFκB-Systems auf Transkriptionsfaktorebene diene. Als dritte Zielstruktur wurde der Knockdown der *NFκB-inducing kinase* (NIK) einzeln (shNIK, Vektorkarte siehe Abbildung 33) und im Rahmen eines Tripelkonstrukts mit den oben genannten shp52(3) und shp65 Elementen (shNIK-shp52(3)-shp65, vgl. Abbildung 34) getestet. Die Wahl von NIK erfolgte vor dem Hintergrund, dass ein vergleichsweise hoher Anteil der in MM Tumoren dokumentierten Mutationen des NFκB-Signalwegs in einer Stabilisierung von NIK resultieren, welches bei überschießender Expression nicht nur den alternativen sondern auch den klassischen Signalweg aktivieren kann. Zudem werden für die potentielle Relevanz überexprimierten NIKs für die Entstehung und Aufrechterhaltung des MM auch bisher nicht näher charakterisierte Interaktionen mit anderen Signalwegen diskutiert (vgl. 1.3.2-1.3.3).

Funktionell taugliche shRNA-Sequenzen aus transienten Versuchen waren bekannt; die entsprechenden *Sleeping Beauty*-Vektoren lagen teils bereits vor und wurden zum Teil nach dem Vorbild des shMMEE-Vektors neu kloniert (vgl. 2.2.4-2.2.13 und Vektorbeschreibungen im Anhang). Wie für das MEK/ERK-Modul galt es auch für die verschiedenen Einzel- und Mehrfachkonstrukte gegen das NFκB-System zunächst die Effizienz der induzierten Knockdowns zu analysieren. Im weiteren Verlauf sollten diese

mit ersten Untersuchungen der Auswirkungen dieser Knockdowns hinsichtlich proapoptischer und anti-proliferativer Effekte kombiniert werden. Schließlich sollten die Versuche auch die Ergebnisse zur allgemeinen Handhabung des Induktionsverfahrens erweitern und somit die Etablierung der Methode abschließen. Alle Versuche wurden mit der Zelllinie JJN-3 durchgeführt.

JJN-3 Zellen mit stabiler Expression des tetR-Proteins (JJN-3-tTR) wurden nach dem üblichen Elektroporationsprotokoll mit den oben genannten induzierbaren Einzel- und Mehrfach-shRNA-Expressionskonstrukten gegen die drei Zielgene transfiziert und anschließend mit Puromycin und G418 selektioniert. Für die Einzelkonstrukte shp52(2), shp52(3) und shNIK sowie die beiden Doppelkonstrukte shp52(2)-shp52(3) und shp52(3)-shp65 konnten dabei binnen 14 Tagen stabil transponierte Kulturen etabliert werden. Für das Einzelkonstrukt shp65 und das Tripelkonstrukt shNIK-shp52(3)-shp65 konnten aus diesem ersten Transfektionsansatz hingegen keine erfolgreich transponierten Kulturen selektioniert werden, was mit der FACS-Analyse der Transfektionseffizienz korrespondierte. Eine 2. Transfektion mit diesen beiden Konstrukten war im Verlauf im üblichen Zeitraum von ca. zwei Wochen erfolgreich (vgl. 3.1.1, Abbildung 11).

3.2.1. Knockdown von p65 (RelA) und p52

Zunächst erfolgte die Evaluation verschiedener induzierbarer Konstrukte gegen zwei der NFκB-Transkriptionsfaktoren. Für p52 (alternativer Signalweg) wurden dabei zwei verschiedene shRNA-Sequenzen, shp52(2) und shp52(3), jeweils einzeln und in Kombination getestet, nachdem die in transienten Versuchen erzielten Knockdownspiegel nicht vollständig zufriedenstellend gewesen waren. Außerdem wurde ein Doppelkonstrukt gegen p65 (RelA, klassischer Signalweg) und p52 evaluiert. Das Einzelkonstrukt gegen p65 befand sich zu diesem Zeitpunkt noch in Selektion und wurde später getestet (vgl. 3.2.3). Die Induktion erfolgte mit 5µg Doxyzyklin pro ml Medium für 24 Stunden. Als Kontrolle dienten mit dem *Sleeping Beauty*-Leervektor pT2-NB (Vektorkarte siehe Abbildung 25) transfizierte JJN-3-tTR Zellen.

Während bei den Induktionsversuchen im Ras-/MAPK-Signalweg die Knockdowns an Tag 6 nach Induktion im Allgemeinen ausgeprägter waren als an Tag 3, war die Herunterregulation der jeweiligen Zielproteine in diesem ersten NFκB-Versuch an beiden Tagen ungefähr gleichwertig und zum Teil an Tag 3 sogar etwas stärker. Als Konsequenz daraus wurde in den folgenden Versuchen über einen Zeitraum von drei Tagen induziert. Für alle Konstrukte zeigten sich deutliche Knockdowns, wobei die shp52(2)-Sequenz gegenüber shp52(3) in diesem Versuch eine noch etwas stärkere Absenkung des Proteinspiegels sowohl der inaktiven (p100) als auch der prozessierten aktiven Form (p52) des Transkriptionsfaktors bewirkte. Das Doppelkonstrukt aus diesen beiden gegen p52/p100 gerichteten shRNA-Expressionskassetten war den Einzelkassetten lediglich ebenbürtig, führte also nicht zu einer noch verstärkten Wirkung (vgl. Abbildung 18). Das Doppelkonstrukt aus shp52(3) und shp65 bewirkte ebenfalls einen mit dem Einzelkonstrukt shp52(3) vergleichbaren p52-Knockdown bei gleichzeitig gut ausgeprägter Herunterregulation von p65 (vgl. Abbildung 18). Dies bestätigte die mit den MEK/ERK-Knockdownkassetten gewonnene Erfahrung, dass das Versammeln mehrerer shRNA-Expressionskassetten in einem Vektor nicht zu nachteiligen Effekten auf die Expressionsspiegel der einzelnen Teilkomponenten führt. Insgesamt war der erreichte Zielproteinverlust für diese Transkriptionsfaktoren somit durchaus vergleichbar mit dem Absenken der Proteinspiegel in den Versuchen im Ras/MAPK-Signalweg (vgl. Abbildung 18 sowie Abbildung 13).

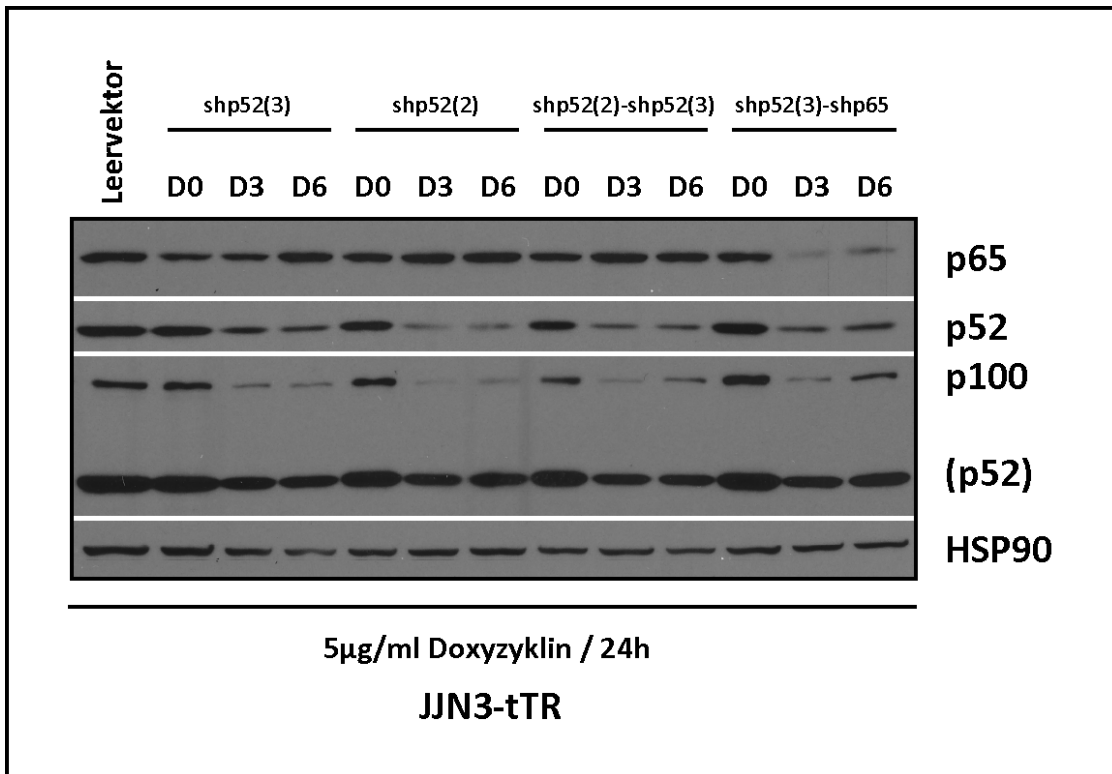


Abbildung 18

Induktionsversuch für verschiedene (Kombinationen von) stabil transponierten shRNA-Expressionskassetten gegen p65 und p52

Nach Induktion mit 5µg/ml Doxyzyklin über 24 Stunden zeigen sich an Tag 3 und 6 des Experiments jeweils ungefähr vergleichbare Knockdownspiegel der jeweiligen Zielproteine. Zum Teil erscheinen die Knockdowns an Tag 3 etwas stärker (z.B. für p100 in beiden Doppelkonstrukten). Das Einzelkonstrukt shp52(2) zeigt die deutlichste Herabregulation von p52, während die restlichen Konstrukte einen etwas weniger ausgeprägten und untereinander gleichwertigen Knockdown zeigen. Die Absenkung der p100-Spiegel korreliert jeweils mit derjenigen von p52. Für das Doppelkonstrukt shp52(3)-shp65 zeigt sich eine ausgeprägte Herunterregulation von p65. Als Kontrolle dienen jeweils nicht-induzierte Zellen der jeweiligen Populationen sowie mit dem Leervektor pT2-NB transfizierte JJN-3-tTR Zellen. Eine längere Belichtung mit dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper gegen p52/p100 detektiert dabei auch die niedrigeren Spiegel des inaktiven Vorläufermoleküls p100 (vgl. 2. Blotausschnitt von unten oberhalb der Ladekontrolle mit HSP90).

3.2.2. Einzelknockdown von NIK

Die Analyse des Knockdowns der *NFκB-inducing Kinase* (NIK) wird durch den hohen Turnover des Proteins erschwert, sodass das Wildtyp-Protein im Normalzustand der

Zelle mit den etablierten Antikörpern im Western Blot praktisch nicht detektierbar ist. Die mehrstündige Behandlung von Zellen mit dem Proteasominhibitor MG132 (vgl. 2.3.1) ermöglicht durch Akkumulation den Nachweis des Proteins. Allerdings ist der Effekt bei jeweils gleicher Dosierung und Inkubationsdauer durchaus variabel, sodass die Wahl geeigneter Kontrollen eine Herausforderung darstellt. Um dem Rechnung zu tragen und gleichzeitig Doxyzyklin hinsichtlich eventueller anti-proliferativer Effekte zu untersuchen wurden je 2 Testpopulationen von JJN-3-Originalzellen sowie JJN-3-tTR-shNIK angelegt. Je eine dieser Kulturen wurde für 3 Tage mit 5µg Doxyzyklin pro ml Medium behandelt während die jeweils andere ohne das Induktionsagens gehalten wurde.

In Bezug auf NIK ist für die Zelllinie JJN-3 dabei außerdem zu berücksichtigen, dass die Zellen neben der Wildtypversion des NIK-Proteins (wt-NIK, Molekulargewicht 104kDa) ein aberrantes Fusionsprotein höheren Molekulargewichts (132kDa) exprimieren, welches nicht dem hohen proteasomalen Turnover unterliegt und deshalb auch im Normalzustand der Zellen nachweisbar ist. Es entsteht durch eine Translokation des *EFTUD2*-Gens, welches für eine Untereinheit des Spliceosoms codiert, das an der Prozessierung von mRNAs beteiligt ist. Das resultierende Fusionsprotein besteht aus dem N-terminalen Anteil von EFTUD2, einer Domäne mit unbekannter katalytischer Aktivität, welche an das C-terminale Ende des regulären NIK-Proteins angeheftet ist.⁹⁹ Sowohl das Wildtyp- als auch das Fusionsprotein werden von dem in dieser Arbeit verwendeten NIK-Antikörper detektiert.

An Tag 3 und 6 nach Induktion wurden Zellen für die Western Analyse geerntet. Dafür wurden JJN-3-Originalzellen (ohne Doxyzyklin) und JJN-3-tTR-shNIK Zellen mit und ohne Doxyzyklin für 4 Stunden mit 20µM MG132 inkubiert und anschließend nach Standardprotokoll für den Western Blot aufbereitet. Um den Effekt von MG132 korrekt einzuschätzen, wurden an Tag 3 zudem JJN-3-Zellen mit einer äquivalenten Menge von DMSO (dem organischen Lösungsmittel für MG132) behandelt. Während das Wildtyp-NIK durch MG132 als zusätzliche spezifische Bande geringeren Molekulargewichts gegenüber der mit DMSO-behandelten Kontrolle sichtbar wird, zeigt sich das Fusionsprotein EFTUD2-NIK unbeeinflusst von der Inkubation der Zellen mit MG132. Die Induktion der gegen NIK gerichteten shRNA hat eine deutliche Herunterregulation des durch die MG132-Behandlung unbeeinflussten Fusionsproteins EFTUD2-NIK zur Folge

(vgl. Abbildung 19, Tag 3). Für wt-NIK, welches durch die Behandlung der Zellen mit MG132 heraufreguliert und somit in der Western Analyse nachweisbar gemacht wird, zeigt sich nach Induktion der shRNA-Expressionskassette gegen NIK eine deutlich geringere Heraufregulation im Vergleich zu untransfizierten Kulturzellen sowie zu den nicht-induzierten JIN-3-tTR-shNIK Zellen (vgl. Abbildung 19, Tag 3 und 6). Dies kann als indirekter Hinweis auf deutlich abgesenkte wt-NIK-mRNA-Spiegel durch die Induktion der gegen NIK gerichteten shRNA gewertet werden.

Der induzierte Knockdown beider NIK-Proteine ist vor allem an Tag 3 deutlich, an Tag 6 dagegen bereits etwas schwächer ausgeprägt, was dafür spricht, dass für einen längerfristig konstanten Knockdown dieses Proteins eine beständige Doxyzyklinpräsenz im Ansatz notwendig ist. Bemerkenswert ist die Herabregulation des NIK im alternativen Signalweg nachgeschalteten Transkriptionsfaktors p52 an Tag 3. Während diese nicht an den Knockdown durch gegen p52 selbst gerichtete shRNA-Konstrukte heranreicht, so ist die Herabregulation doch signifikant (siehe Abbildung 19A). Da im alternativen Signalweg die Prozessierung des inaktiven Vorläuferproteins p100 zum aktiven Transkriptionsfaktor p52 durch die übergeordnete Kinase IKK- α katalysiert wird, welche ihrerseits wiederum durch eine Akkumulation von NIK aktiviert wird, kann die Depletion von p52 somit als funktioneller Readout der induzierten shRNA gegen NIK gewertet werden.

Dagegen bleibt der Spiegel des Transkriptionsfaktors p65 (klassischer Signalweg) unbeeinflusst von der Herabregulation von NIK. Die zusätzliche durch den Antikörper gegen p65 detektierte Bande geringeren Molekulargewichts, welche im Vergleich zur DMSO-Kontrolle in den mit MG132 behandelten Proben zu sehen ist, ist möglicherweise ein Spaltprodukt, welches durch die Blockade des Proteasoms akkumuliert. Sie besitzt hier keine weitere Relevanz.

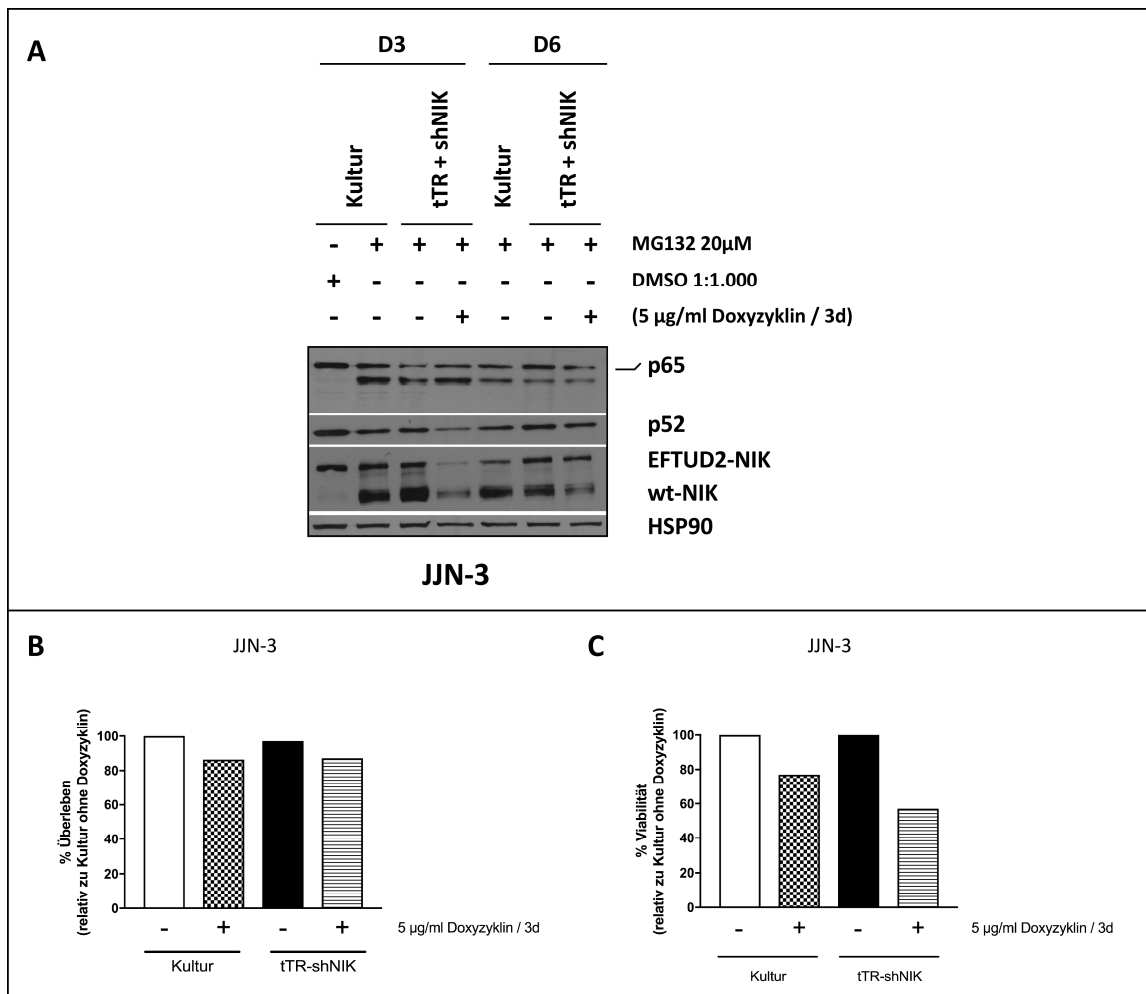


Abbildung 19

Induktionsversuch für die stabil transponierte Einzel-shRNA-Kassette gegen NIK

(A) Im Western Blot zeigt sich eine deutlich abgeschwächte Heraufregulation von wt-NIK unter MG132-Behandlung was an Tag 3 nach Induktion (= unter laufender Doxyzyklin-Behandlung) besser sichtbar ist als an Tag 6 (= 3 Tage nach Ende der Doxyzyklin-Behandlung) Der Spiegel des nachgeschalteten Transkriptionsfaktors p52 ist an Tag 3 deutlich reduziert, was als funktioneller Readout der NIK-Depletion gewertet werden kann.

Mit MG132 behandelte Proben zeigen im Vergleich mit dem organischen Lösungsmittel DMSO einerseits die Induktion des NIK-Wildtypproteins (wt-NIK, 104kDa). Zudem wird durch den Antikörper gegen NIK das der Zelllinie JLN-3 eigene Fusionsprotein EFTUD2-NIK nachgewiesen, dessen Spiegel unbeeinflusst von der Behandlung mit dem Proteasominhibitor bleibt. Beide Formen des Proteins werden durch die induzierte shRNA gegen NIK depletiert (vgl. Kulturproben und nicht induzierte shRNA gegen NIK mit der induzierten shNIK-Population an Tag 3).

Außerdem wird durch den Antikörper gegen p65 eine zusätzliche Bande dargestellt, die vermutlich ein Spaltprodukt darstellt, welches durch die Blockade des Proteasoms akkumuliert.

(B) Die Zelltodmessung mittels FACS an Tag 6 nach Induktion zeigt für beide Populationen eine gewisse nachhängende Apoptoseinduktion durch das an Tag 3 herausgewaschene Doxyzyklin im Vergleich zu den unbehandelten Vergleichskulturen. Die Blockade von NIK hat gegenüber den mit Doxyzyklin behandelten Kulturzellen keinen zusätzlichen Toxizitätseffekt.

(C) Der alamarBlue Assay weist zum einen auf eine leichte anti-Viabilitäts-(Nach)-Wirkung des Doxyzyklins hin. Im Vergleich von Doxyzyklin-behandelten Originalzellen mit dem induzierten shNIK-Konstrukt deutet sich für letzteres allerdings eine zusätzlich gesteigerte Viabilitätshemmung an (gemessen wurde die Entwicklung zwischen Tag 3 und 6 nach Induktion, also nach Entfernung des Doxyzyklins).

Im Hinblick auf erste zellphysiologische Untersuchungen der Auswirkungen des induzierten NIK-Knockdowns ist in der Zelltodmessung mittels FACS an Tag 6 nach Induktion lediglich ein geringer allgemeiner Toxizitätseffekt für die Doxyzyklin-behandelten Populationen zu sehen (vgl. Abbildung 19B).

Im alamarBlue Assay, durch den die Zellviabilität zwischen Tag 3 und 6 nach Induktion (also nach Auswaschen des Doxyzyklins aus den Induktionskulturen) gemessen wurde, ist eine allgemeine, nachhängende Viabilitätshemmung durch das Induktionsagens zu beobachten (vgl. Abbildung 19C, Kulturen ohne bzw. mit Doxyzyklinbehandlung). Dieser Effekt scheint in der Population mit induziertem NIK-Knockdown jedoch etwas ausgeprägter als in der korrespondierenden Kontrolle mit Doxyzyklin-behandelten Originalzellen und weist somit auf eine zusätzliche Viabilitätshemmung durch den induzierten Knockdown von NIK hin (vgl. Abbildung 19C, Doxyzyklin-behandelte Original- und shNIK-Zellen).

Neben der Tatsache, dass eine Pulsinduktion mit einer geringeren Doxyzyklindosis (z.B. 1µg/ml über 24h) sowohl ausreichend für die Induktion deutlicher Knockdowns durch die induzierbaren shRNA-Kassetten als auch wünschenswert im Hinblick auf die Vermeidung unspezifischer Toxizitäten durch das Doxyzyklin ist, kann hieraus außerdem abgeleitet werden, dass Kontrollen für Zelltodmessungen, Proliferationsassays und andere zellphysiologische Untersuchungen auch bei geringeren Dosierungen des Induktionsagens ebenfalls mit Doxyzyklin behandelt werden sollten, um durch das

Antibiotikum vermittelte Toxizität sicher von „echten“ shRNA-Effekten trennen zu können.

3.2.3. Kombiniertes Knockdown von p65, p52 und NIK

In einem weiteren Induktionsversuch wurden unter anderem das Einzelkonstrukt gegen p65 sowie ein Tripelkonstrukt gegen p65, p52 und NIK getestet. Alle Populationen wurden hierbei für drei Tage mit 5µg Doxzyklin pro ml Medium induziert.

Das Tripelkonstrukt wurde nach MG132-Behandlung im Vergleich mit dem Leervektor evaluiert. Hier zeigte sich eine zufriedenstellende Herabregulation der drei Zielproteine, welche an Tag 3 und 5 nach Induktion ungefähr gleichwertig war. Die deutliche Absenkung des IκBα-Spiegels, eines Proteins dem klassischen Arm des Signalwegs eine inhibitorische Funktion attestiert wird, kann als Hinweis auf eine zelluläre Reaktion auf den shRNA-vermittelten Knockdown von p65 gewertet werden (siehe Abbildung 20).

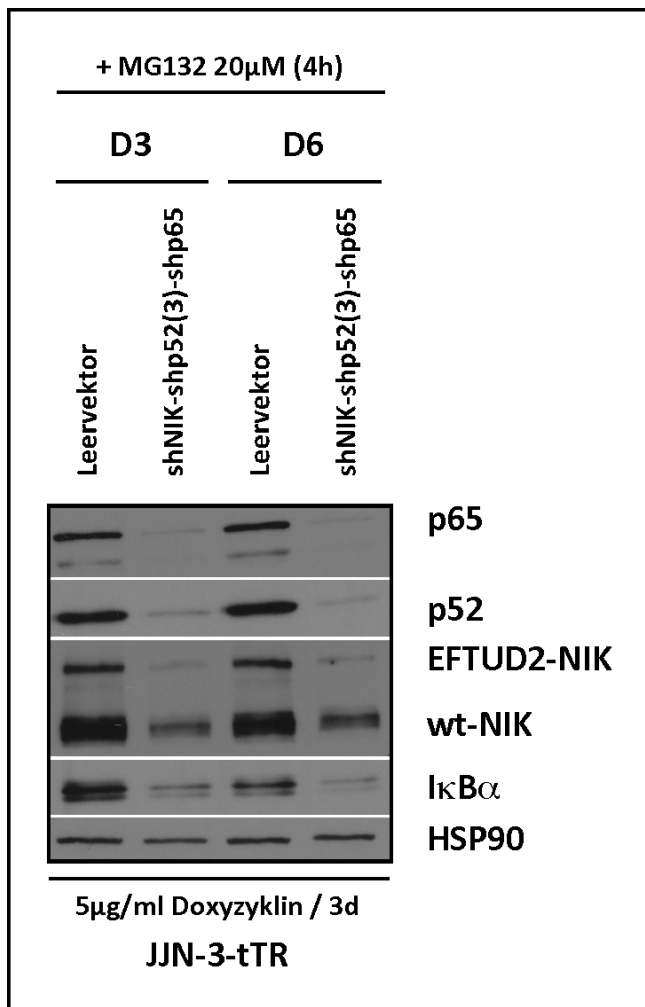


Abbildung 20

Western Analyse der Induktion des Tripelkonstrukts gegen p52, p65 und NIK

Für alle drei Zielproteine konnten ausgeprägte Knockdowns nachgewiesen werden; diese waren an Tag 3 und 5 nach Induktion ungefähr gleichwertig. Hervorzuheben ist die Depletion des inhibitorischen Proteins I κ B α (inhibiert im klassischen Signalweg p65) nach Induktion des Tripelkonstrukts. Als Kontrolle dienten mit dem *Sleeping Beauty* Leervektor transfizierte JJN-3-tTR Zellen; alle Proben wurden mit MG132 behandelt.

Für das Einzelkonstrukt gegen p65 konnte im Western Blot ein deutlicher Knockdown des Zielproteins nachgewiesen werden (siehe Abbildung 21A); dieser war jedoch im Gegensatz zu den anderen Proben in diesem und anderen Induktionsversuchen mit dem NF κ B-Panel an Tag 3 nach Induktion deutlich ausgeprägter als an Tag 5. Für die Einzelkonstrukte shp52(2) und shp52(3) sowie für das Doppelkonstrukt shp52(3)-shp65 konnten die Ergebnisse aus 3.2.1 (vgl. Abbildung 18) bestätigt werden.

Der hier gezeigte vollständige Knockdown von p52 und p65 für das Tripelkonstrukt muss vor dem Hintergrund der ungleichen Beladung im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle (vgl. Abbildung 21, Ladekontrolle mit HSP90) kritisch gesehen werden; für das Tripelkonstrukt sei stattdessen auf Abbildung 20 verwiesen.

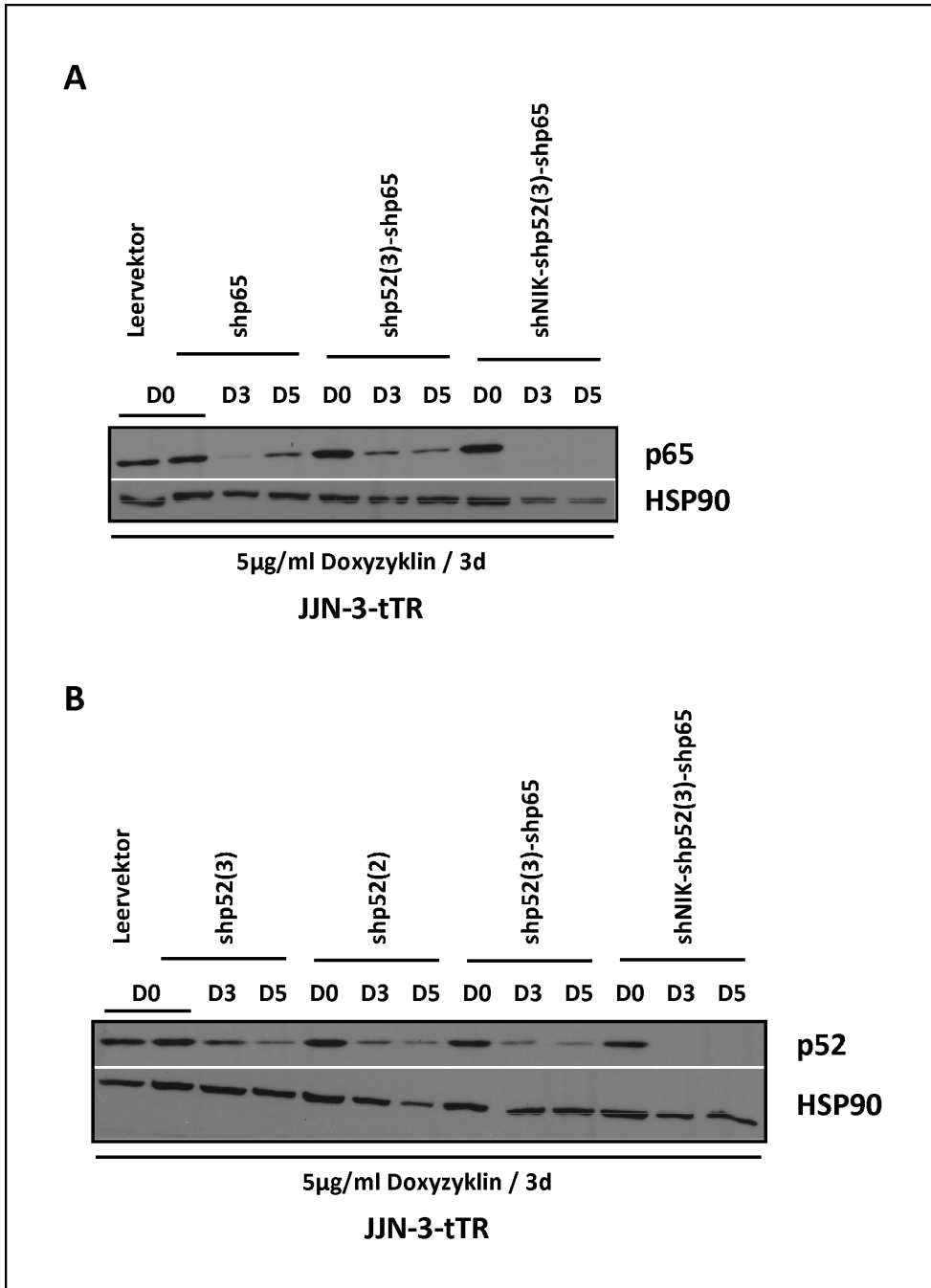


Abbildung 21

Induktion eines NFκB-Panels mit erstmaliger Evaluation des induzierbaren Einzelkonstrukts gegen p65

(A, B) Es zeigt sich ein deutlicher Knockdown von p65 durch das Einzelkonstrukt; dieser ist an Tag 3 nach Induktion stärker als an Tag 5. Die hier gezeigte vollständige Depletion von p52 und

p65 durch das Tripelkonstrukt ist angesichts der ungleichen Beladung im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle (vgl. HSP90) kritisch zu bewerten. Für das Tripelkonstrukt sei deshalb auf Abbildung 20 verwiesen. Für die anderen Konstrukte konnten die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.1 bestätigt werden.

Im alamarBlue Assay zeigten sich für die Einzelkonstrukte gegen p52 und p65 keine signifikanten viabilitätshemmenden Effekte. Für das Doppelkonstrukt shp52(3)-shp65 gegen beide Transkriptionsfaktoren konnte jedoch eine signifikant reduzierte Proliferation nachgewiesen werden, noch deutlich ausgeprägter war die anti-Viabilitätswirkung des induzierten Tripelkonstrukts gegen p52, p65 und NIK (siehe Abbildung 22). Die deutlich stärkere Viabilitätsminderung durch das Tripel- im Vergleich mit dem Doppelkonstrukt korreliert insofern mit der für das shNIK-Einzelkonstrukt beobachtete Viabilitätsreduktion durch isolierten Knockdown von NIK (vgl. Abbildung 19C)

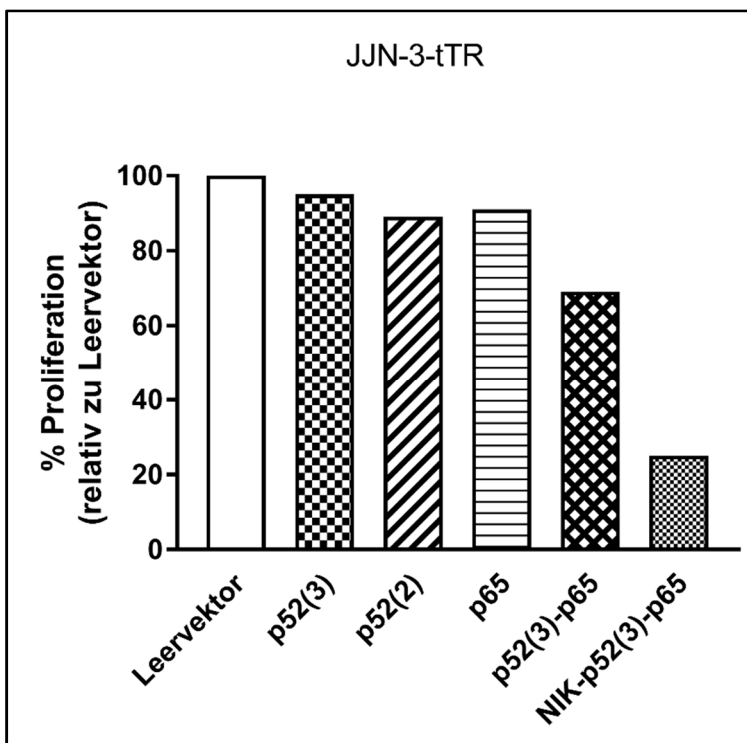


Abbildung 22

alamarBlue Assay des NFκB-Panels aus Abbildung 20 und Abbildung 21

Das Balkendiagramm zeigt die mit dem alamarBlue Assay gemessenen Viabilitätsraten zwischen Tag 3 und 7 nach Induktion (also nach Auswaschen des Doxyzyklins). Während die Einzelkonstrukte gegen p52 und p65 keine signifikante Reduktion der Viabilität zur Folge haben, ist für das Doppelkonstrukt shp52(3)-shp65 eine signifikante Abnahme zu beobachten. Noch

deutlich ausgeprägter ist diese für das Tripelkonstrukt (shNIK-shp52(3)-shp65). Als Kontrolle dienten mit dem *Sleeping Beauty* Leervektor transfizierte JJN-3-tTR Zellen; alle Ansätze wurden für 3 Tage mit 5µg/ml Doxyzyklin behandelt.

4. DISKUSSION

Das Multiple Myelom ist eine von maligne transformierten Plasmazellen ausgehende Systemerkrankung des höheren Lebensalters, welche der Gruppe der indolenten Non-Hodgkin-Lymphome zugerechnet wird. Trotz deutlich verbesserter Therapieoptionen, die in den letzten Jahren eine Verlängerung des durchschnittlichen Gesamtüberlebens auf 7-8 Jahre und eine Steigerung der 5-Jahres-Überlebensrate auf 50-70% ermöglicht haben, muss das MM in der weit überwiegenden Mehrzahl der Fälle weiterhin als eine unheilbare Erkrankung angesehen werden. Die Prognose ist – abhängig von der individuellen Tumorbilogie und Patienten-assoziierten Faktoren – sehr variabel und für einen Teil der Betroffenen auch mit den heutigen Behandlungsmöglichkeiten pessimistisch einzustufen.^{24, 120}

Dieser Umstand kann maßgeblich auf zwei pathogenetische Merkmale der Erkrankung zurückgeführt werden. Zum einen konnte durch genomweite Sequenzierungsstudien eine große interindividuelle Tumorerheterogenität zwischen Patienten gezeigt werden.^{17, 56, 60, 72} Die Vielfalt an unterschiedlichen Mutationen, welche in der Regel mit einer vergleichsweise geringen Frequenz auftreten, erschwert die Identifikation potenziell relevanter Zielstrukturen für molekulare Therapieansätze erheblich. Viele dieser genetischen Alterationen mit geringer individueller Frequenz lassen sich jedoch einigen wenigen Signalwegen zuordnen. Hieraus leitet sich die Hypothese ab, dass die Identifikation und Blockade einer überschaubaren Zahl von dysregulierten kritischen Zielsystemen (z.B. onkogene Signalwege in verschiedener Kombination) eine Möglichkeit darstellen könnte, das genetische Chaos des MM weitgehend zu ignorieren, um wirksame molekulare Behandlungsmöglichkeiten für größere Patientengruppen unabhängig von einzelnen Mutationen entwickeln zu können.^{17, 72}

Zum anderen hat die klonale Evolution von deregulierten Plasmazellen aus einer gemeinsamen immortalisierten Vorläuferzelle (sog. Myeloma Propagating Cell, vgl. 1.2.2) die Ausbildung von Subklonen mit unterschiedlichem genetischen Profil innerhalb eines Patienten (intraindividuelle Heterogenität) zur Folge.^{17, 72} Es liegt nahe, dass Subklone mit unterschiedlichem Mutationsmuster und somit variierender Abhängigkeit von den verschiedenen onkogenen Signalwegen auch unterschiedlich sensibel für die eingesetzten Medikamente und Therapieschemata sind. So kann ein bestimmtes

Therapieregime beispielsweise einen dominierenden Subklon wirksam zurückdrängen und eine teilweise oder gar vollständige Remission erzielen, während gleichzeitig eine Nische für eine dieser Behandlung gegenüber unempfindlichere Subpopulation geschaffen wird von der im weiteren Verlauf ein Rezidiv ausgehen kann. Diese Annahme wird durch longitudinale Sequenzierungsstudien untermauert, welche das Vorherrschen unterschiedlicher Subklone zu verschiedenen Erkrankungszeitpunkten und unter verschiedenen Therapieschemata zeigen.¹²¹ Hierin liegen sowohl der rezidivierende Charakter des MM als auch der damit verbundene Bedarf an wirksamen Optionen für die Zweit- und Drittlinientherapie begründet, um es von einer unheilbaren zumindest in eine chronische Erkrankung mit möglichst geringen Einschränkungen von Lebenserwartung und -qualität transformieren zu können.

Im Bemühen die Relevanz einzelner Mutationen für die Entstehung und Aufrechterhaltung einer Erkrankung zu beurteilen und kritische Zielstrukturen in dysregulierten Signalwegen zu identifizieren, stellt die Blockade einer oder weniger Komponenten und die Evaluation des resultierenden Phänotyps einen wichtigen Ansatz dar. Für die Durchführung dieser unter dem Begriff „reverse genetics“ zusammengefassten loss-of-function Experimente steht eine Vielzahl von Systemen zur Verfügung, welche mit ihren jeweils eigenen Vor- und Nachteilen verbunden sind und deren Spektrum in den letzten 5 Jahren um einige vielversprechende und zum Teil bereits fest etablierte Ansätze erweitert wurde.

Die meisten Systeme setzen sich dabei aus den Komponenten des inhibierenden Mechanismus selbst sowie aus Methoden, welche die Einführung dieser Inhibitoren in das jeweilige Versuchsobjekt vermitteln, zusammen. Die verschiedenen Möglichkeiten der Stummschaltung von Genen bzw. der durch sie codierten Proteine lassen sich in 3 Gruppen einteilen. Zunächst sind hier pharmakologische Inhibitoren zu nennen, deren Vorteile vor allem in ihrem schnellen Wirkeintritt und einer einfachen Handhabung liegen. So ist im Gegensatz zu den beiden anderen Gruppen keine Kombination mit einem Transfersystem notwendig, wenngleich die Formulierung gegebenenfalls an verschiedene Typen von Versuchsobjekten (z.B. Zellkultur, Versuchstiere u.a.) angepasst werden muss. Auf der anderen Seite stellen vor allem die variable Spezifität verschiedener Inhibitoren und unspezifische Toxizitätseffekte bei oft hohen

Dosierungen einen wichtigen Nachteil dar. So wurden zum Beispiel bei pharmakologischer Inhibition verschiedener Komponenten des NFκB-Signalwegs initial vielversprechende anti-MM Effekte beobachtet, welche im Verlauf durch den Einsatz zunehmend spezifischerer Inhibitoren und schließlich durch auf RNA-Interferenz (RNAi) basierende Ansätze relativiert wurden.^{100-102, 122-123}

Die vor knapp zwei Jahrzehnten etablierte RNAi-vermittelte Stummschaltung von Genen stellt dementsprechend die zweite wichtige Gruppe der Inhibitionsmethoden dar.¹²⁴⁻¹²⁵

Wie in Kapitel 2.2.3 skizziert, ermöglicht das Einbringen kurzer, zur cDNA der Zielstruktur komplementärer RNA-Sequenzen eine selektive und effiziente Depletion eines Proteins (Knockdown) durch posttranskriptionellen Abbau der entsprechenden mRNA über einen hochkonservierten endogenen Signalweg, der physiologischerweise über sog. microRNAs Steuerungsfunktionen auf die Genexpression ausübt. Die Dauer des vermittelten Knockdowns hängt dabei maßgeblich vom verwendeten Transfersystem ab (siehe unten).

In der dritten Gruppe werden die verschiedenen Methoden des sogenannten Genome Editing zusammengefasst. Diese setzen sich im Allgemeinen aus einer Komponente zur spezifischen Erkennung einer DNA-Zielsequenz und einer an diese gekoppelten oder durch sie rekrutierten Endonuklease zusammen. Letztere induziert DNA-Doppelstrangbrüche am Zielort, welche durch 2 verschiedene Mechanismen repariert werden können. Die Art der Reparatur bestimmt dabei den Effekt des Editiervorgangs. Während die „non-homologous end-joining repair“ (NHEJ) durch ihren, in diesem Fall gewünschten, fehleranfälligen Reparaturmechanismus zu einer Verschiebung des Leserasters (resultierend in funktionslosen Proteinen oder vorzeitigen Stoppsignalen) und somit zur Inaktivierung von Zielgenen (Knockout) führt, lassen sich durch Homologe Reparatur (homology directed repair, HDR) gezielte Mutationen oder größere DNA-Sequenzen in das Genom einfügen. In beiden Fällen ist eine dauerhafte Veränderung der Genexpression die Folge.

Es existiert eine große Vielfalt an Genome Editing Werkzeugen, deren wichtigste Vertreter Zinkfingernukleasen (ZFN), *transcription activator-like effector* Nukleasen (TALEN) und das *clustered regularly interspaced short palindromic repeat* (CRISPR)-*associated Cas9* (CRISPR/Cas9) System darstellen. TALEN und vor allem CRISPR/Cas9 sind dabei noch relativ junge Verfahren, die nichtsdestotrotz bereits als wichtige

Werkzeuge in Forschung und Therapie angesehen werden können.¹²⁶⁻¹²⁷ Vor allem CRISPR/Cas9 gilt dabei aufgrund einfacher Handhabung und Steuerbarkeit und geringer Kosten als „magic bullet“ der Stummschaltung von Genen und soll deshalb als Vergleich zu der in dieser Arbeit vorgestellten RNAi-basierten Methode dienen. Einen Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten des Genome Editing liefert das Review von Guha et al.¹²⁸

Um negativ geladenen Proteinen bzw. DNA- oder RNA-Sequenzen, welche die Blockade von Zielstrukturen durch RNAi bzw. Genome Editing vermitteln, die Passage der hydrophoben Membranen von Zelle und Kern zu ermöglichen, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. So können durch physikalische Manipulation wie bei der Elektroporation (vgl. 2.1.6) transiente Membranschäden induziert werden, durch die kleinere Proteine, Plasmide und Oligonukleotide in die Zelle und den Kern eindringen können. Eine weitere Möglichkeit stellt die Konjugation der negativen Ladung mit Lipiden (Lipofektion) oder natürlichen oder synthetischen Polymeren dar, welche diese neutralisieren und somit die Membranpassage ermöglichen.¹²⁹ Viralen Vektoren ist eine im Allgemeinen hohe Transfektionseffizienz gemein, wobei im Gegenzug die Notwendigkeit des Arbeitens unter S2-Bedingungen sowie ein vergleichsweise hohes Risiko für immunogene Effekte zu berücksichtigen sind. Außerdem besteht durch die bevorzugte Integration in codierende Sequenzen eine Neigung zur Veränderung der natürlichen Genexpression durch Interaktion mit Promotor- und Repressorsequenzen sowie eine erhöhte Mutagenitätstendenz.^{113, 130-131} Während Adenoviren keine Integration in das Zellgenom und dementsprechend eine nur transiente Expression transfizierter Sequenzen vermitteln, katalysieren retro-, lentivirale und Adenovirus-assoziierte Vektoren eine stabile Integration, letztere allerdings mit eher geringer Effizienz. Allerdings sind virale Vektoren teilweise stark von der Chromatinkonfiguration der zu transduzierenden Zellen abhängig und besitzen z.T. enge Limitierungen, was die Größe der Nutzladung anbelangt.¹³²

Wenngleich die Selektion und Amplifikation von Einzelzellklonen nach zufälliger stabiler Integration von Plasmid-codierten DNA-Sequenzen möglich ist, stellt sie eine sehr ineffiziente und zeitaufwändige Methode dar, die zudem aufgrund ihrer monoklonalen Genese nicht dazu geeignet ist, die Realität des MM hinsichtlich inter- und

intraindividuelle Heterogenität hinreichend abzubilden. Im Allgemeinen vermitteln plasmidbasierte Vektorsysteme jedoch keine stabile Integration ihrer Ladung in das Zielgenom und bedürfen in der Regel zudem der Kombination mit physikalischen Methoden wie Elektroporation oder Lipofektion um die Transfektionseffizienz zu erhöhen. Insofern stellt die in dieser Arbeit dargestellte stabile Transfektion von Kulturzellen durch Elektroporation mit einem plasmidbasierten Transposonsystem eine einfach zu handhabende Möglichkeit dar, die Vorteile nicht-viraler Transfektionssysteme gegenüber viralen Vektoren hinsichtlich Sicherheitsprofil und reduzierter Auswirkungen auf den physiologischen Zellmetabolismus mit einer stabilen Expression der transfizierten Sequenzen zu verbinden (vgl. 2.2.2.).

Das Konzept für ein induzierbares System zur selektiven Herabregulation einzelner oder multipler Komponenten mutmaßlich onkogener Signalwege in MM Zelllinien entstand aus Vorerfahrungen der Arbeitsgruppe mit pharmakologischen Inhibitoren und transienten RNAi-basierten Experimenten. Das Ziel war ein einfach zu handhabendes, kosteneffizientes sowie unter S1-Bedingungen durchführbares System, welches i) die zügige Generierung großer Zellmengen mit einem ii) möglichst langen Beobachtungszeitraum verbinden sollte. Hierdurch sollten nicht nur kurzfristige, (stark) pro-apoptische, sondern auch protrahierte und gegebenenfalls lediglich proliferationsverlangsamende Auswirkungen einer iii) möglichst selektiven Herabregulation von Zielstrukturen detektiert werden können. Weiterhin sollte es möglich sein, das System iv) mit möglichst geringem Aufwand auf verschiedene und idealerweise außerdem auf mehrere Zielstrukturen in einem Vektor zu „programmieren“. Schließlich wurde v) ein induzierbares System angestrebt, um Transfektions-assoziierte Effekte – also Zellstress durch die Elektroporation, Selektions- und Reinigungsprozeduren auf der einen sowie durch Belastung mit hohen DNA-Konzentrationen bei Verwendung von Vektormischungen auf der anderen Seite – möglichst gut von Auswirkungen der Herabregulation von Zielstrukturen selbst trennen zu können. Außerdem hatte sich die Selektion von Zellen, die mit konstitutiv exprimierten Mehrfach-shRNA-Konstrukten transponiert werden sollten, als problematisch herausgestellt, was allerdings aufgrund der Herabregulation von für den Metabolismus der Myelomzellen essenziellen Proteinen erwartet werden konnte.

Aufbauend auf den Arbeiten von Bernhard Roth und Severin Fink (vgl. 3.) sollte im Rahmen dieser Arbeit die Etablierung eines stabilen und induzierbaren Knockdownsystems auf RNAi-Basis abgeschlossen werden. Die Expression der Knockdown-vermittelnden shRNA-Sequenzen sollte durch Kombination mit dem tet-Repressor-System steuerbar gemacht und beide Komponenten durch Transfektion mit Plasmidvektoren des *Sleeping Beauty* Transposon Systems durch Elektroporation stabil in das Genom von MM Zelllinien integriert werden. Nachdem Severin Fink die prinzipielle Machbarkeit dieses Ansatzes durch Induktion eines Einzel-shRNA-Konstrukts gegen ERK2 nachgewiesen hatte, sollten im Ras/MAPK-Signalweg nun Mehrfachkonstrukte getestet, die Handhabung des Systems standardisiert und der Ansatz auf die Evaluation des NF κ B-Signalwegs in MM Zelllinien übertragen werden. Hierfür wurden die Zelllinien AMO-1, JJN-3 und L-363 zunächst stabil mit einem Proteinexpressionsvektor für das tet-Repressorprotein transfiziert und erfolgreich transponierte Zellen mittels Puromycin selektioniert. Das Protein konnte aus unbekanntem Gründen nicht im Western Blot nachgewiesen werden. Nach Transfektion der mit tet-Operator Sequenzen ausgestatteten shRNA-Expressionsvektoren gegen ERK2 sowie des neu klonierten Vierfachkonstrukts gegen ERK1, 2 und MEK1, 2 (=shMMEE; alle Vektorkarten siehe Anhang) in die tet-Repressor-exprimierenden (Sub-) Zelllinien JJN-3-tTR und AMO-1-tTR und Selektion mit G418 konnte jedoch sowohl eine vollständige Repression der shRNA-Transkription im nicht-induzierten Zustand als auch ein deutlicher Knockdown der Zielproteine nach Induktion der shRNA-Produktion durch Zugabe von Doxzyklin zur jeweiligen Zellkultur gezeigt werden (siehe Abbildungen 12, 13, 15, 16 und 17). Die Tiefe der erzielten Herabregulation war dabei durchweg mit zuvor in transienten und stabilen Versuchsanordnungen (mit konstitutiver shRNA-Expression, d.h. ohne Induktion) beobachteten Spiegeln vergleichbar. Außerdem konnten, analog zu den transienten Ergebnissen von Bernhard Roth, für das Mehrfachkonstrukt keine summarischen Verschlechterungen der erzielten Knockdowns im Vergleich zu Einzelkonstrukten festgestellt werden (vgl. Abbildung 13). Als zellphysiologisch funktioneller Effekt des Vierfachknockdowns und Nachweis der deutlich verringerten Aktivität des MEK/ERK-Moduls konnte zudem in beiden derart untersuchten MM Zelllinien eine verstärkte Phosphorylierung des verbleibenden MEK

verzeichnet werden (vgl. Abbildung 17). Diese Ergebnisse zeigten, dass die mit dem stabilen induzierbaren System erzielbaren Effekte als äquivalent zu den im transienten Setting erreichten betrachtet werden können. Dies ist durchaus bemerkenswert, da aufgrund der Funktionsweise des für die stabile Integration in das Zellgenom verwendeten *Sleeping Beauty* Transposonsystems lediglich wenige erfolgreiche Transpositionereignisse der transfizierten shRNA-Kassetten pro Zelle angenommen werden müssen. Im Vergleich dazu wurden in vorangegangenen transienten Versuchen deutlich mehr Plasmidmoleküle in die einzelne Zelle eingeschleust und von diesen zusätzlich durch anschließende Aufreinigungsprozesse nur die am stärksten transfizierten Zellen isoliert.¹⁰³⁻¹⁰⁴ Gleichzeitig konnten in diesen transienten Experimenten bereits sehr effektive Sequenzen für die vier Komponenten des MEK/ERK-Moduls identifiziert werden, welche in dieser Arbeit Verwendung fanden. Aus der Diskrepanz zwischen der im jeweiligen Setting vorliegenden Anzahl an Kopien der shRNA-Expressionskassetten und der dennoch gleichwertigen Depletion von Zielproteinen kann zudem die Hypothese abgeleitet werden, dass eine weitere Steigerung der Knockdowneffizienz im stabilen induzierbaren System durch ein mehrfaches Einklonieren derselben shRNA-Expressionskassette in einen Vektor möglich sein könnte.

Einen wichtigen Einfluss- und potenziellen Störfaktor für den praktischen Einsatz des Systems stellt das Doxyzyklin als Induktionsagens dar. Auf der einen Seite muss die Dosierung ausreichend hoch gewählt werden, um eine möglichst vollständige De-Repression der shRNA-Transkription zu ermöglichen. Andererseits ist das Risiko unspezifischer, d.h. von der Induktion der shRNA-Transkription unabhängiger, Effekte des Antibiotikums zu berücksichtigen. Der typischerweise in tet-kontrollierten Systemen verwendete Dosierungsrahmen liegt zwischen 100ng/ml und 5µg/ml, insofern bewegten sich die in dieser Arbeit gebrauchten Mengen im mittleren bis oberen Bereich (1 bzw. 5µg/ml).^{112, 133} In diesem Dosisbereich sind für die Behandlung humaner Zelllinien Veränderungen in der mitochondrialen Genexpression, eine Steigerung der Laktatproduktion und eine reduzierte Sauerstoffverwertung beschrieben.¹³³⁻¹³⁵ Weiterhin wurden eine verlangsamte Proliferation und eine signifikante Apoptoseinduktion nachgewiesen.¹³³ Während die zugrundeliegenden Mechanismen nicht vollständig geklärt sind, wird der bakterielle Ursprung der Mitochondrien mit all

diesen Beobachtungen in Verbindung gebracht. Die Effekte wurden als dosisabhängig charakterisiert und konnten jeweils für eine Mehrzahl, jedoch nicht alle, der getesteten Zelllinien gezeigt werden.¹³³ In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen wurden bei Inkubation von JIN-3-tTR Zellen mit einer Doxyzyklindosis von 5µg/ml über mehrere Tage eine geringe pro-apoptotische Wirkung (siehe Abbildung 14 und Abbildung 19) sowie eine moderate Viabilitätshemmung (Abbildung 19) beobachtet. Testpopulationen, die mit 10µg/ml Doxyzyklin inkubiert wurden, zeigten binnen weniger Tage einen deutlich erhöhten Anteil apoptotischer Zellen (Abbildung 14). Vor diesem Hintergrund erscheint in der Rückschau eine Induktion mit 1µg/ml Doxyzyklin ausreichend beziehungsweise angemessener.

Interessanter- und wichtigerweise zeigte sich in Bezug auf die Inkubationsdauer zwischen einer Behandlung über einen bzw. 3 Tage in verschiedenen Versuchen keine nennenswerte Differenz in der Effizienz des erreichten Knockdowns (Abbildung 16). Angesichts dieser Beobachtungen erscheint eine Pulsinduktion mit 1µg/ml Doxyzyklin über 24 Stunden sowohl als hinreichend im Hinblick auf das Erzielen einer möglichst starken Herabregulation von Zielproteinen, als auch als am günstigsten im Hinblick auf unspezifische Toxizitätseffekte des Doxyzyklins. Andererseits vermindert das Auswaschen des Doxyzyklins nach einer eintägigen Inkubation auch für höhere Konzentrationen die potenziellen Nebenwirkungen, während der induzierte Knockdown je nach Zielprotein zwischen 4 und 7 Tage anhalten kann (vgl. Abbildungen 15 und 17A). Niedrigere Doxyzyklindosierungen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht evaluiert, allerdings hatte sich in einem Parallelversuch für einen selektiven und gut charakterisierten Einzelknockdown von ERK2 in der Zelllinie JIN-3 eine Konzentration von 0,5µg/ml als nicht mehr sehr effizient erwiesen (T. Stühmer, pers. Kommunikation). Ohnehin empfehlen sich separate Versuche zur notwendigen Dosierung für jede Zielstruktur bzw. Kombination von Zielen.

Außerdem unterstreichen die unspezifischen Effekte des Antibiotikums die Bedeutung adäquater, d.h. in diesem Fall ebenfalls mit Doxyzyklin behandelter, Kontrollen vor allem für zellphysiologische Untersuchungen wie Proliferationsassays oder Apoptosemessungen.

Dem NFκB-Signalsystem wird durch verschiedene Publikationen eine potenziell wesentliche Rolle für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des MM zugeschrieben. Der Überaktivierung des Signalsystems und den damit verbundenen pro-proliferativen und anti-apoptotischen Impulsen für die Zelle liegt dabei in frühen Krankheitsstadien oder im prämaligen Zustand wohl eine gesteigerte Stimulation durch das umgebende Mikromilieu zugrunde.^{69, 98, 136} Eine zunehmende Entkopplung dieser erhöhten NFκB-Expression von extrazellulären Signalen durch aktivierende Mutationen, resultierend in einer konstitutiven Aktivierung des Signalwegs, gilt als relevantes Progressionsereignis der Erkrankung.^{50, 60, 99, 136} Wenngleich die individuellen Mutationen, wie in anderen mutmaßlich an der Pathogenese des MM beteiligten Signalwegen, mit vergleichsweise geringer Frequenz auftreten, konnten dennoch in mindestens 20% aller Patientenproben und in 40% aller MM Zelllinien aktivierende Mutationen im klassischen und/oder alternativen NFκB-Signalweg nachgewiesen werden.⁵⁰ Besonders verbreitet sind dabei einerseits gain-of-function Mutationen in 6 Positivregulatoren des Signalwegs und loss-of-function Mutationen in 5 Negativregulatoren auf der anderen Seite.^{50, 99} Eine exakte Bewertung der funktionellen Relevanz dieser Läsionen für die potenzielle Entwicklung molekularer Therapieoptionen für das MM wird allerdings dadurch erschwert, dass das NFκB-System bereits in der physiologischen B-Zell-Entwicklung sowie in der Plasmazellgenese eine wichtige Rolle spielt. Mutationen, die z.B. die Chance einer Plasmazellentartung einfach dadurch befördern, dass generell mehr Plasmazellen gebildet werden, wären dann quasi als historisches Zeugnis dieses Mechanismus, nicht aber als aktuelle Progressionsfaktoren der Erkrankung anzusehen. Auch das Zusammenspiel des klassischen und des alternativen NFκB-Signalwegs ist – gerade im onkogenen Zusammenhang – oft unübersichtlich, da die vermehrte Aktivierung/Inaktivierung von Signaltreibern bzw. –hemmern eines der beiden Wege entgegengesetzte Wirkungen auf den jeweils anderen Signalweg nach sich ziehen kann.⁸⁰

Im Bestreben die durch die Ergebnisse genomweiter Sequenzierungsstudien implizierte Relevanz des NFκB-Signalwegs für einen vergleichsweise hohen Anteil von MM Tumoren zu evaluieren und potenziell therapeutisch wirksame Zielstrukturen zu identifizieren, wurden in den vergangenen 20 Jahren im Rahmen verschiedener Publikationen vor allem die Effekte verschiedener pharmakologischer Inhibitoren auf die Viabilität von

Myelomzellen getestet. Während die Wirksamkeit von Proteasominhibitoren initial maßgeblich der Blockade der NFκB-Signaltransduktion durch einen verminderten Abbau und somit die Akkumulation inhibitorischer IκB-Proteine zugeschrieben wurde, so musste dies im weiteren Verlauf aufgrund der pleiotropen Wirkweise der PI relativiert werden (vgl. 1.1.6).^{46, 137-138} Studien, welche versuchten die Relevanz einzelner Komponenten des Signalwegs isoliert zu betrachten, lieferten hingegen zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. So wurden pharmakologischen Inhibitoren von IKKβ, welche im klassischen Signalweg die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung inhibitorischer IκB-Proteine vermittelt, in verschiedenen Publikationen eine hohe Wirksamkeit im Hinblick auf die Apoptoseinduktion in MM Zellen attestiert.^{100, 122, 139-140} Allerdings nahmen im Verlauf der Entwicklung besserer Wirkstoffe die beobachteten anti-MM Wirkungen in vitro mit steigender Spezifität der Inhibitoren ab und waren in ihrer Kinetik zudem stets Substanzen mit einem breiteren Wirkspektrum wie den Proteasominhibitoren unterlegen.^{123, 137, 141} Vielversprechendere Ergebnisse zeigen dagegen Inhibitoren verschiedener Strukturen auf der Ebene verschiedener Liganden (z.B. BAFF, APRIL) bzw. deren Rezeptoren (z.B. BMCA, TACI, BAFF-R), welche den NFκB-Signalweg aktivieren. So konnten für einen monoklonalen Antikörper gegen APRIL anti-proliferative Effekte auf Myelomzellen sowie auf deren Interaktion mit dem umgebenden Mikromilieu nachgewiesen werden, während für einen Inhibitor des TACI-Rezeptors im Rahmen einer Phase-I-Studie bereits klinische Wirksamkeit gezeigt werden konnte.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Hierbei gilt allerdings zu berücksichtigen, dass diese Ligand-Rezeptor-Interaktionen nicht exklusiv den NFκB-Signalweg aktivieren und ihre Wirkung somit nicht überwiegend oder gar ausschließlich auf eine Blockade der NFκB-Signaltransduktion zurückgeführt werden kann.

Die NFκB-inducing Kinase (NIK) gilt aus verschiedenen Gründen als eine weitere Zielstruktur, welche im Rahmen molekularer Therapieansätze potenziell klinische Relevanz erlangen könnte. Diese Hypothese leitet sich zum einen aus der Tatsache ab, dass ein vergleichsweise hoher Anteil der häufigeren Mutationen in der NFκB-Signalkaskade in einer Stabilisierung von NIK resultiert (z.B. *TRAF2/3*, *CIAP1/2*).^{60, 136} Während die Rezeptor-vermittelte Akkumulation von NIK den limitierenden Schritt in der Aktivierung des alternativen Signalwegs darstellt, kann im Rahmen von Mutationen konstitutiv überexprimiertes NIK in Myelomzellen auch den klassischen Signalweg

aktivieren.^{77, 145-147} Die pharmakologische Inhibition von NIK durch zwei verschiedene Substanzen resultierte *in vitro* in einer dosisabhängigen zytotoxischen und proapoptotischen Wirkung auf MM Zelllinien mit einer NIK-stabilisierenden Mutation.¹³⁶ In einer anderen Studie konnte mit einem RNAi-basierten Ansatz mit retroviralen Vektoren, unter anderem in der Zelllinie JJN-3, ebenfalls eine signifikante Apoptoseinduktion durch Knockdown von NIK gezeigt werden.⁹⁹ Ob die proapoptotische Wirkung einer NIK-Depletion in NIK-überexprimierenden Zelllinien allerdings alleine auf die Blockade des alternativen NFκB-Signalwegs zurückgeführt werden kann, erscheint angesichts der Tatsache, dass die Inhibition der nachgeordneten Kinase IKKα in denselben Zelllinien keine signifikante Apoptoseinduktion zur Folge hatte, zweifelhaft.⁹⁹ Diese Diskrepanz könnte beispielsweise auf der bereits erwähnten Co-Aktivierung des klassischen Signalwegs durch überexprimiertes NIK oder auf „crosstalk“ mit anderen Signalwegen beruhen, welche durch eine IKKα-Inhibition jeweils nicht beeinträchtigt würden.^{99, 136, 148} Angesichts dieser Ergebnisse erscheint eine Blockade von NIK, gegebenenfalls abhängig von der Tumorbiologie und in Kombination mit einem Inhibitor des klassischen Signalwegs (z.B. von IKKβ), als potenziell relevantes Ziel neuer molekularer Therapieansätze für das MM.¹³⁶

Für die Übertragung des stabilen und induzierbaren Knockdownsystems auf das NFκB-Signalsystem wurden als Zielstrukturen einerseits p65 und p52 als wichtigste Transkriptionsfaktoren des klassischen bzw. alternativen Signalwegs und andererseits NIK als therapeutisch potenziell attraktivste Struktur der übergeordneten Kinaseebene gewählt. Für alle 3 Proteine konnten jeweils deutliche und mit denen aus transienten shRNA-Expressionsexperimenten und der Etablierung der Methode im Ras-/MAPK-Signalweg vergleichbare Knockdownspiegel erzielt werden (siehe Abbildungen 18-21). Alle Konstrukte wurden dabei über einen Zeitraum von 3 Tagen mit 5μg/ml Doxyzyklin induziert. Erwähnenswert hierbei ist, dass im Gegensatz zu Versuchen mit demselben Induktionsschema und dem shMMEE-Konstrukt im Ras-/MAPK-Signalweg (vgl. z.B. Abbildungen 15, 16), die Knockdowns in diesen ersten NFκB-Induktionsversuchen an Tag 3 im Allgemeinen etwas stärker ausgeprägt waren als an Tag 6. Alle in dieser Arbeit gezeigten Versuche im NFκB-System wurden dabei mit der Zelllinie JJN-3 durchgeführt. Im Hinblick auf den NFκB-Signalweg ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, dass

diese Zelllinie neben der Wildtypversion des NIK-Proteins (104kDa), welches einem hohen proteasomalen Turnover unterliegt und deshalb nur nach Behandlung mit einem Proteasominhibitor (in dieser Arbeit wurde hierfür MG132 verwendet, vgl. 2.3.1) im Western Blot nachweisbar ist, ein aberrantes NIK-Fusionsprotein exprimiert. Dieses setzt sich aus der Wildtypversion von NIK und dem N-terminalen Anteil des EFTUD2-Proteins, einer Domäne mit unbekannter katalytischer Funktion, zusammen, wobei letzterer an den C-terminalen Anteil des NIK-Proteins angeheftet ist.⁹⁹ Das resultierende Fusionsprotein EFTUD2-NIK (132kDa) unterliegt nicht dem hohen Turnover der Wildtypversion, ist deshalb auch im Normalzustand der Zelle nachweisbar und bleibt von der Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG132 unbeeinflusst. Sowohl das Wildtyp- als auch das Fusionsprotein werden auf der entsprechenden Ebene sowohl von der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten shRNA-Sequenz gegen NIK getroffen und depletiert als auch von dem verwendeten Antikörper gegen NIK im Western Blot detektiert (vgl. Abbildung 19 und Abbildung 20).

Im Hinblick auf mögliche viabilitätshemmende Effekte der induzierten Knockdowns und -kombinationen konnte eine leichte Viabilitätsminderung für das Einzelkonstrukt gegen NIK und das Doppelkonstrukt gegen p52 und p65 gezeigt werden (siehe Abbildungen 19 und 22). Deutlich ausgeprägter war die anti-Viabilitätswirkung des Tripelkonstrukts gegen alle 3 Proteine (Abbildung 22). Eine signifikante Apoptoseinduktion durch das shNIK-Einzelkonstrukt konnte in der Zusammenschau zweier Versuchsansätze bis Tag 6 nach Induktion nicht gezeigt werden (vgl. Abbildungen 14 und 19).

Aufgrund des kürzeren Beobachtungszeitraums im Vergleich zu den oben erwähnten Ergebnissen nach pharmakologischer und RNAi-basierter Blockade von NIK in den Arbeiten von Annunziata et al. und Demchenko et al. können die hier gezeigten Induktionsversuche hinsichtlich der zellphysiologischen Untersuchungen nur bedingt eingeordnet werden. Während die pharmakologische Blockade in NIK-abhängigen MM Zelllinien bereits nach 3 Tagen einen deutlich gesteigerten Anteil toter Zellen zur Folge hatte, welcher nach 7 Tagen nochmals deutlich zugenommen hatte (unter 40% lebende Zellen im Vergleich zur Kontrolle), zeigte der shRNA-vermittelte Knockdown von NIK eine deutlich langsamere Kinetik.^{99, 136} Hier zeigten sich signifikante Unterschiede zu den Kontrollen erst nach 8 Tagen; für die in den Versuchen dieser Arbeit verwendete Zelllinie

JJN-3 konnte dabei eine Reduktion auf noch knapp 50% lebende Zellen gezeigt werden.⁹⁹ Vor diesem Hintergrund scheinen die durch den induzierten NIK-Knockdown gezeigten leichten pro-apoptotischen (Abbildung 14) und viabilitätsmindernden Effekte (Abbildung 19, hier allerdings keine gesteigerte Apoptose an Tag 6) durchaus den RNAi-basierten Ergebnissen von Annunziata et al. zu frühen Messzeitpunkten zu entsprechen. Eine weitere Beobachtung erschien aufgrund des gewählten Induktionsschemas wenig sinnvoll. Dieses war jedoch notwendig, da es das primäre Ziel war, solide Knockdownspiegel für alle 3 Zielproteine zu zeigen. Um die erwähnten Ergebnisse aus anderen Publikationen mit dieser Methode reproduzieren zu können, wäre ein Schema mit einer geringeren Doxyzyklindosierung über den gesamten Beobachtungszeitraum bzw. Pulsinduktionen im Abstand von 2-3 Tagen zu bevorzugen. Zum anderen stellt sich anhand der hier gezeigten anti-Viabilitätswirkung einer NIK-Blockade (Abbildung 19) bzw. der kombinierten Inhibition von NIK, p52 und p65 (Abbildung 22) die Frage, inwieweit dem in anderen Arbeiten gezeigten gesteigerten Anteil toter Zellen nach NIK-Blockade über einen mittelfristigen Zeitraum tatsächlich eine echte Apoptoseinduktion oder vielmehr eine reduzierte Proliferation bei normaler Hintergrundapoptose oder im Falle der pharmakologischen Inhibition eventuelle unspezifische Toxizitäten zugrunde liegen.

Um die potenzielle Relevanz des in dieser Arbeit vorgestellten stabilen und induzierbaren shRNA-Systems für Einzel- und Mehrfachknockdowns für den Einsatz in loss-of-function Experimenten mit MM Zelllinien einzuordnen, soll dieses abschließend kurz einem der oben erwähnten Genome Editing Werkzeuge gegenübergestellt werden. CRISPR/Cas9 leitet sich aus einem Mechanismus der erworbenen Immunität von Mikroorganismen ab und nimmt bereits heute eine wichtige Rolle in der Forschung ein. Das zweiteilige System setzt sich aus der Doppelstrangbrüche-induzierenden Endonuklease Cas9 und einer sequenzspezifischen single-guide RNA (sgRNA) zusammen. Diese ca. 18-20 Nukleotide lange Sequenz bindet komplementär an entsprechende genomische DNA und rekrutiert dadurch das Cas9-Enzym, welches erst nach Bindung an die sgRNA DNA-Doppelstrangbrüche induzieren kann. Im Anschluss wird die unterbrochene Sequenz durch den non-homology end joining Reparaturmechanismus (NHEJ) wieder hergestellt.¹²⁸ Hieraus resultieren Insertionen

oder Deletionen von Oligonukleotidsequenzen, welche bei einer Verschiebung des Leserasters fehlerhafte DNA-Transkripte und somit einen funktionellen Knockout des entsprechenden Gens zur Folge haben.¹⁴⁹ Hierin liegt ein wichtiger Unterschied zwischen RNAi- und Genome Editing Werkzeugen im Allgemeinen: Letztere vermitteln einen dauerhaften, erblichen Knockout und somit bei hinreichender Zerstörung der beiden üblicherweise vorhandenen Kopien eines Gens einen Null-Phänotyp, während der Knockdown von Zielstrukturen durch RNAi durch den posttranskriptionellen Abbau der Ziel-mRNA einen hypomorphen Phänotyp zur Folge hat. Dieser entspricht eher der Realität einer vorübergehenden medikamentösen Blockade und ist im Allgemeinen deshalb besser geeignet um potenziell therapeutisch attraktive Zielgene zu identifizieren.¹⁵⁰ Eine mögliche Notwendigkeit für einen echten Null-Phänotyp besteht allerdings beim Knockdown von Kinasen, die zum Teil auch bei einer Restexpression von 10% und weniger noch die normale Signalwegsaktivität aufrecht erhalten können.¹⁵¹ Die Frage, ob ein Knockdown tief genug ist, um zellphysiologische Konsequenzen zu provozieren ist bei jedem RNAi-basierten Ansatz individuell und immer wieder neu zu berücksichtigen und zu beurteilen.

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal stellt die Effizienz und damit letztendlich die Handhabung des Systems dar. Während die Knockdowneffizienz von zufällig gewählten shRNA-Sequenzen oft zu wünschen übrig ließ, existieren heute Algorithmen, welche die Identifikation funktioneller shRNAs erleichtern. Hiermit können ohne weitere Selektion zuverlässig Knockdowns von über 75% des Ausgangsspiegels erreicht werden.¹⁵¹ Das hier vorgestellte System kombiniert dies mit einer dauerhaften konstitutiven Expression des shRNA-Gens über mehrere Monate (in Zellen ohne tet-Repressorprotein; T. Stühmer, pers. Kommunikation) und der Möglichkeit der selektiven An- und Abschaltung der Transkription durch das Doxyzyklin-abhängige tet-Repressor-System. So können ausgehend von stabilen tet-Repressor-Zelllinien binnen 3 Wochen große polyklonale Zellpopulationen für spezifische und induzierbare Knockdowns generiert werden. Dagegen unterliegt die Effizienz des Genome Editing mittels CRISPR/Cas9 bis dato einer sehr breiten Streuung und liegt im Allgemeinen zwischen 10-40% pro Allel.¹⁵¹ Dies führt zu einer anderen Eigenschaft von RNAi, welche einen praktischen Vorteil des shRNA-Knockdownsystems gegenüber CRISPR/Cas9 bei reverse genetics Experimenten in Zellkulturen darstellt: Bei Betrachtung einer polyklonalen Zellpopulation vermittelt RNAi

einen vergleichsweise homogenen hypomorphen Phänotyp, da nur Zellen selektiert werden, welche das komplette System stabil in das Genom eingebaut haben. Um hingegen einen echten Null-Phänotyp mittels CRISPR/Cas9 zu generieren, müssen alle Kopien des jeweiligen Gens editiert werden. Dies stellt besonders bei der Verwendung von immortalisierten humanen Zelllinien ein Problem dar, da diese oft aneuploid oder polyploid sind, und somit in der Regel zusätzlichen Aufwands bedürfen um Zellklone mit vollständigem Knockout zu isolieren.^{149, 151}

Das stabile und induzierbare Einzel- und Multikassettensystem für shRNA-Knockdownkonstrukte stellt somit eine sinnvolle Alternative zu etablierten, auf RNAi oder Genome Editing basierenden Ansätzen zur Durchführung von loss-of-function Experimenten in MM Zelllinien dar. Es ermöglicht die Generierung großer Zellmengen mit spezifischen induzierbaren Knockdowns und Knockdownkombinationen binnen weniger Wochen und erlaubt die Evaluation des resultierenden Phänotyps über kurz- bis langfristige Zeiträume.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Multiple Myelom muss trotz stetiger Fortschritte im Hinblick auf die verfügbaren Therapieoptionen und die Krankheitsprognose weiterhin im Wesentlichen als eine unheilbare Erkrankung angesehen werden. Dies kann vor allem auf die große inter- und intraindividuelle Heterogenität des MM zurückgeführt werden, welche die Entwicklung gezielter molekularer Therapiestrategien erheblich erschwert. Hierbei stellen loss-of-function-Experimente, welche die Identifikation einzelner oder mehrerer potenziell therapeutisch relevanter Zielstrukturen durch die (kombinierte) Depletion von Proteinen ermöglichen, eine wichtige Säule dar, für deren Durchführung verschiedene Systeme mit jeweils eigenen Vor- und Nachteilen zur Verfügung stehen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Etablierung eines auf RNA-Interferenz basierenden stabilen und induzierbaren Knockdownsystems durch Elektroporation von MM Zelllinien mit Einzel- und Mehrfach-shRNA-Vektoren abgeschlossen werden. Die Transfektion von tet-Repressor-exprimierenden Zelllinien mit einer oder mehreren shRNA-Expressions-kassetten innerhalb eines Plasmidvektors ermöglicht durch die vollständige Repression der shRNA-Transkription im nicht-induzierten Zustand die Selektion erfolgreich transponierter Zellen ohne Effekt-vermittelte Bias und die Generierung großer Zellmengen für Versuchsreihen in vergleichsweise kurzer Zeit. Die Induktion der verschiedenen in dieser Arbeit evaluierten Einzel- und Mehrfach-shRNA-Konstrukte gegen (Kombinationen von) Zielstrukturen im Ras/MAPK- sowie im NFκB-Signalsystem mittels Doxyzyklin als Induktionsagens zeigte durchweg deutliche und den Erwartungen aus transienten Experimenten entsprechende Knockdownergebnisse. Auch die Resultate hinsichtlich funktioneller Readouts und zellphysiologischer Effekte der induzierten Knockouts stehen im Einklang mit vorangegangenen Experimenten und bestätigen somit die Äquivalenz des stabilen induzierbaren Systems zu transienten Ansätzen auf RNAi-Basis oder zu pharmakologischen Inhibitoren.

Der hierbei erzielte hypomorphe Phänotyp innerhalb einer polyklonalen Zellpopulation bildet die Realität einer medikamentösen Blockade einer oder weniger Zielstrukturen einer heterogenen MM Tumorpopulation näherungsweise ab, weshalb das vorgestellte System ein hilfreiches, kosteneffizientes und leicht zu handhabendes Werkzeug für die

Identifikation potenziell relevanter Zielstrukturen für molekulare Therapieansätze im Multiplen Myelom darstellt.

6. SUMMARY

Despite steady progress concerning the therapeutic arsenal available to and the improved prognosis for newly diagnosed patients, multiple myeloma still has to be regarded as an incurable malignancy in the overwhelming majority of cases. This is mainly due to the disease's high grade of inter- and intraindividual heterogeneity, which greatly complicates the development of molecular therapies. Loss-of-function studies, which enable researchers to identify individual or combinations of drug targets with a potential for clinical relevance by correlating the (combined) depletion of proteins with the resulting phenotype, represent an important cornerstone in the process of developing new molecular therapies, for the execution of which a broad variety of systems with their individual advantages and disadvantages is available.

During this thesis project, the establishment of a stable and inducible knockdown system by way of electroporation of myeloma cell lines with single- and multiple-shRNA-expression vectors was successfully completed. Transfecting cell lines which constitutively express the tet-repressor protein with a single plasmid vector carrying one or multiple shRNA expression cassettes allows for the selection of successfully transposed cells without any effect mediated bias and the creation of large amounts of cells for experiments in a comparatively short time, thanks to the full repression of the transcription of the transfected shRNA genes in an un-induced state. Inducing their transcription by adding doxycycline to the cell suspension resulted in strong and specific knockdowns for all single and multiple constructs against different (combinations of) targets in the Ras/MAPK- and the NF κ B-pathway which were tested in the experiments shown in this thesis. Results regarding knockdowns, functional readouts and alterations in cellular metabolism mirrored with experiments conducted previously with both transiently expressed shRNAs and pharmacological inhibitors and therefore attest to the universal applicability of the system.

The resulting polyclonal cell population with a hypomorphic phenotype depicts the reality conveyed by a pharmacological inhibition of one or more targets within a heterogenic myeloma tumour rather well and therefore this stable and inducible system represents a useful, economical and easily applicable tool for the identification of

potentially relevant targets for the development of new molecular therapies in multiple myeloma.

7. ANHANG

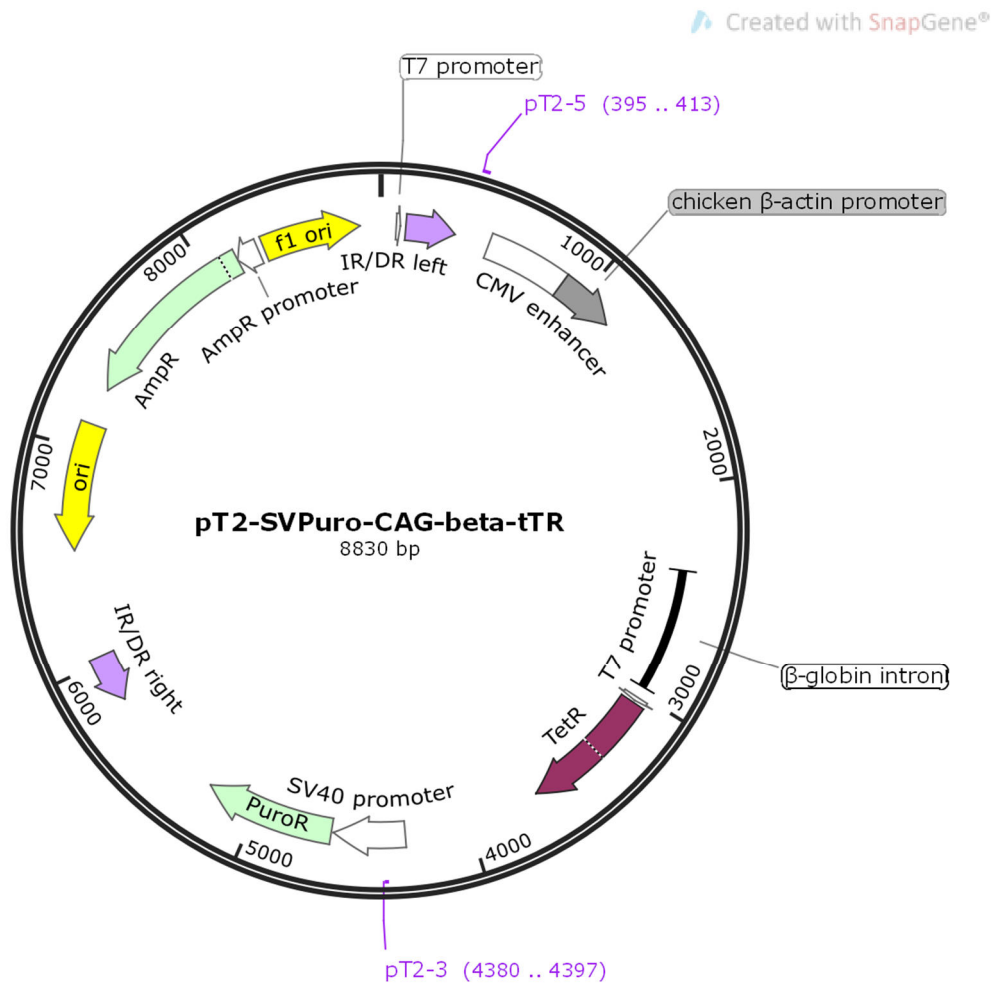


Abbildung 23

Vektorkarte pT2-SVPuro-CAG-beta-tTR: *Sleeping Beauty* Proteinexpressionsvektor für das tet-Repressorprotein (tetR). Die Expression des tetR wird von einem Chicken β -Actin Promotor (CAG) gesteuert; ein Puromycin-Resistenzgen (PuroR) ermöglicht die Selektion erfolgreich stabil transponierter Zellen. IR left/right bezeichnet sog. Inverted Repeats, die Erkennungssequenzen für die Transposase (vgl. 2.2.12.2.2).

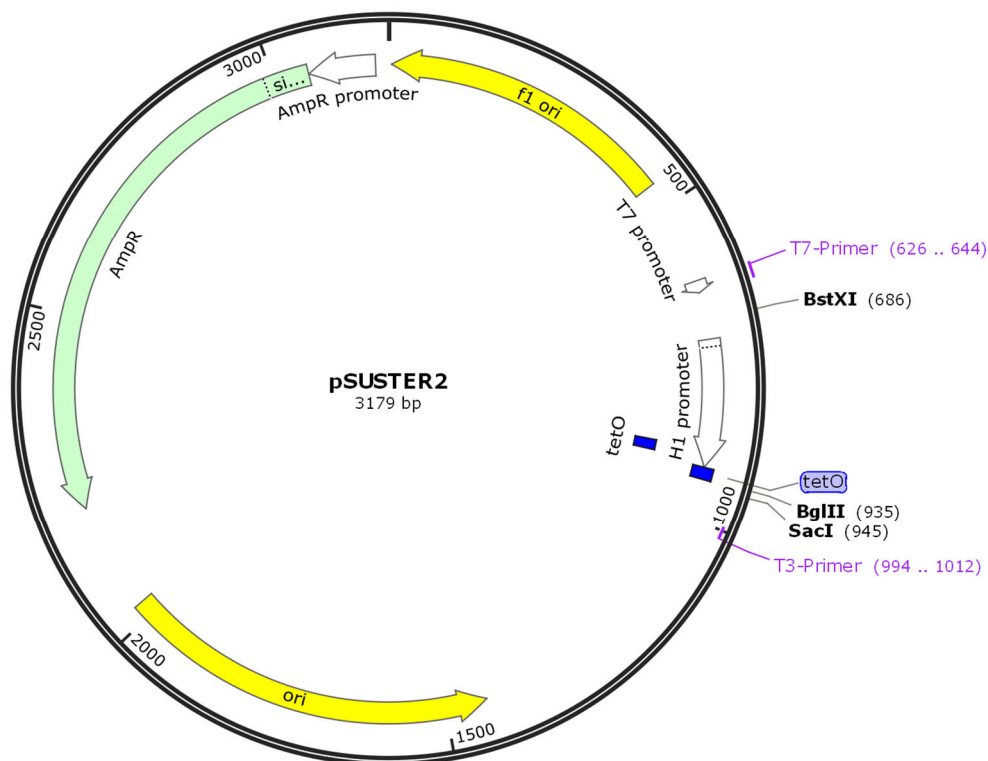


Abbildung 24

Vektorkarte pSUSTER2: Vektor für die Zusammenstellung induzierbarer Einzel- und Mehrfach-shRNA-Expressionskassetten. 5' des H1-Promotors mit 2 tet-Operator-Sequenzen (tetO) können durch DNA-Restriktionsverdau von mit *Bgl* II und *Sac* I kompatible, für spezifische shRNA-Sequenzen codierende ds-Oligonukleotide inkloniert werden. In pSUSTER2 zusammengestellte shRNA-Expressionskassetten wurden zumeist mit dem kommerziell erhältlichen T7-Primer verifiziert.

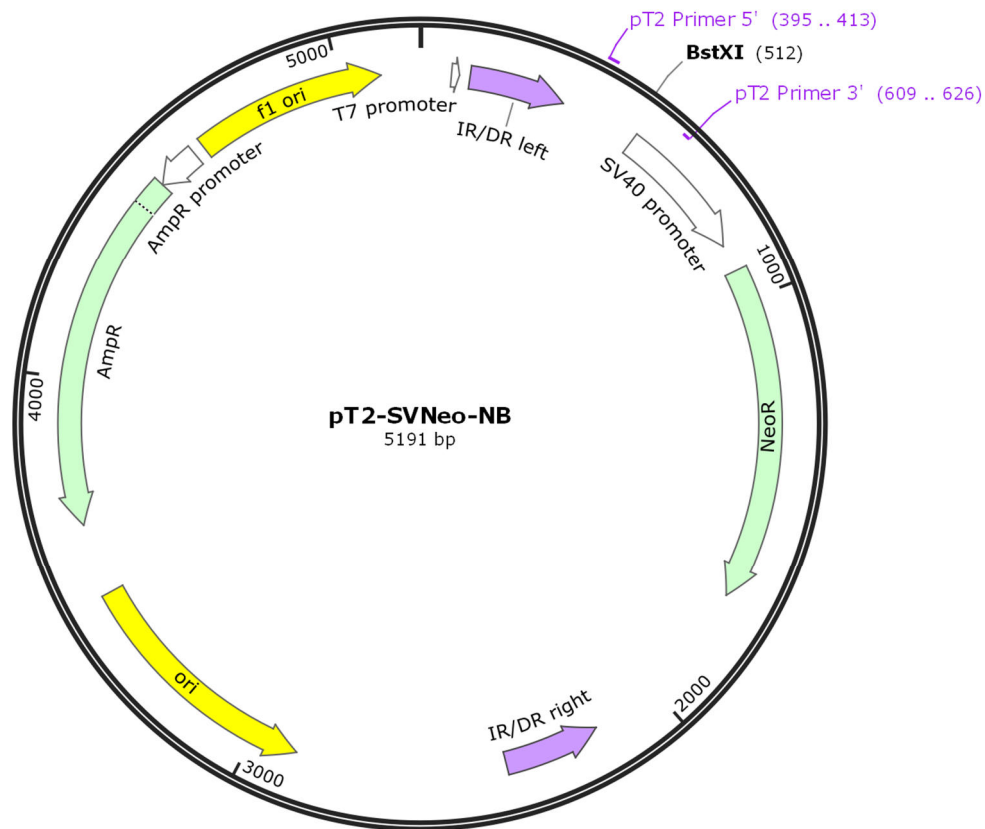


Abbildung 25

Vektorkarte pT2-SVNeo-NB: *Sleeping Beauty* shRNA-Leervektor zum Einklonieren von Einzel- und Mehrfach-shRNA-Expressionskassetten aus pSUSTER2. In den mit *Bst* XI geschnittenen pT2-SVNeo-NB-Vektor können aus pSUSTER2 mit *Bst* XI und *Sac* I herausgeschnittene shRNA-Expressionskassetten eingefügt werden. Ein Neomycin-Resistenzgen (NeoR) ermöglicht die Selektion erfolgreich stabil transponierter Zellen. In *Sleeping Beauty* eingefügte shRNA-Expressionskassetten wurden mit den Primern pT2-5' und pT2-3' sequenziert.

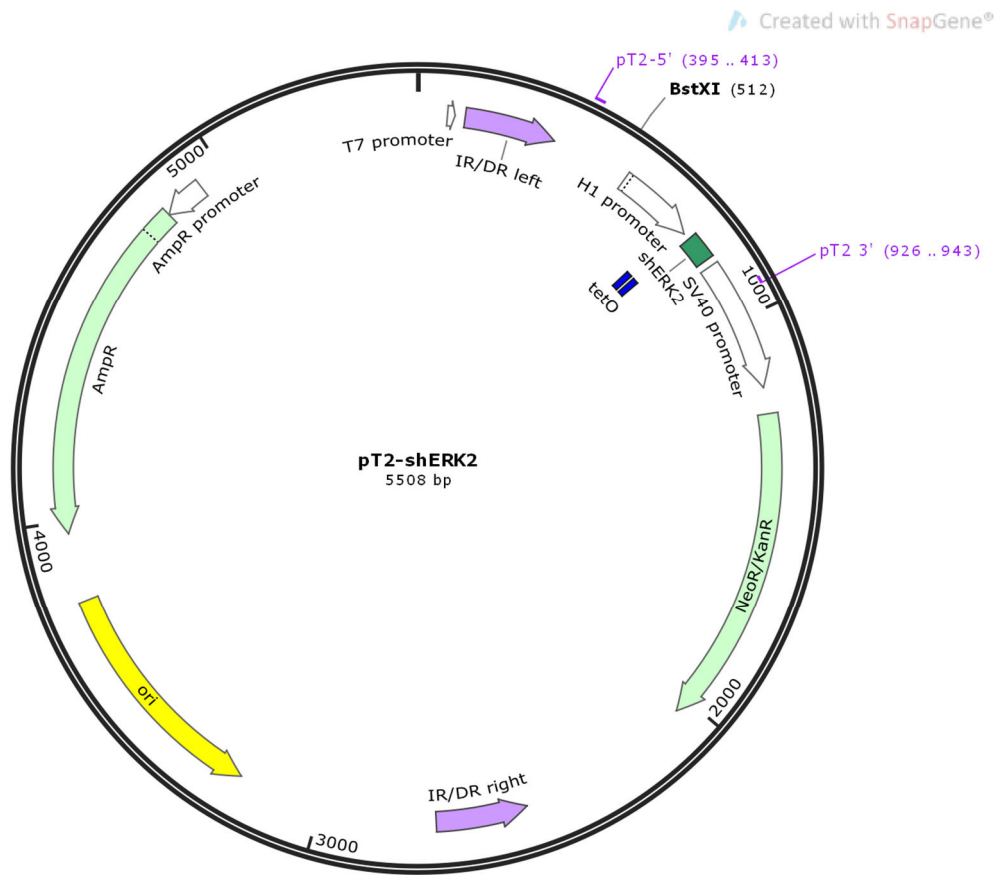


Abbildung 26

Vektorkarte pT2-shERK2: *Sleeping Beauty* Einzel-shRNA-Expressionsvektor für eine induzierbare shRNA gegen ERK2.

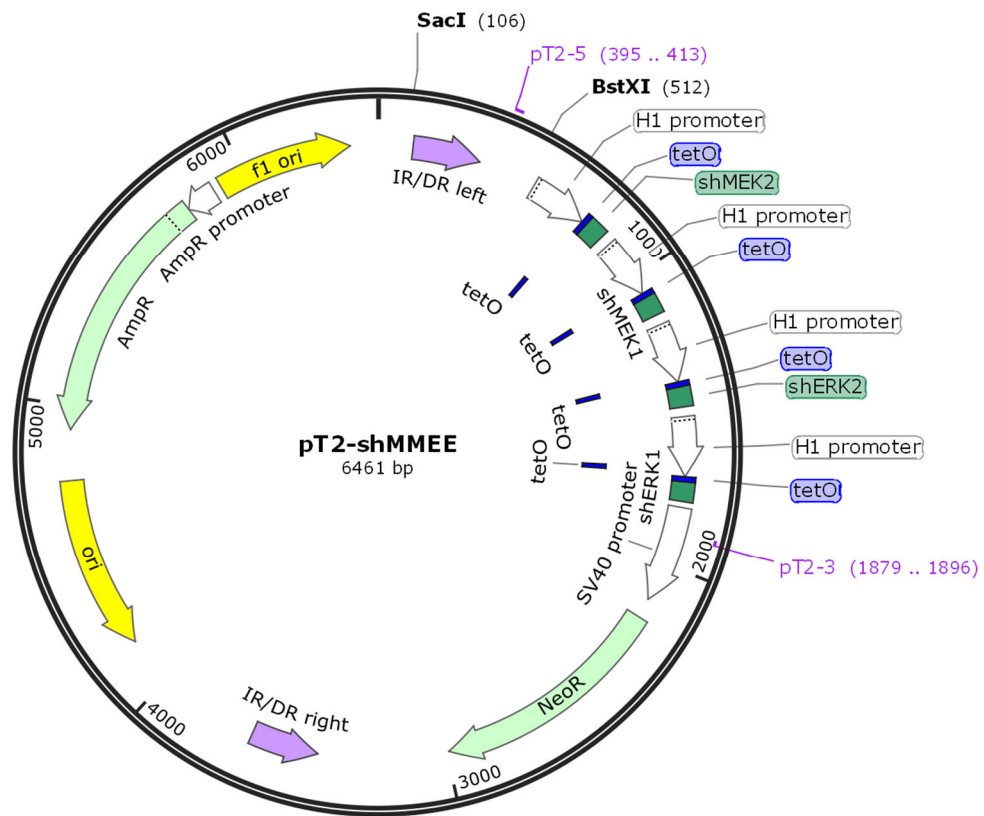


Abbildung 27

Vektorkarte pT2-shMMEE: *Sleeping Beauty* Vierfach-shRNA-Expressionsvektor für induzierbare shRNAs gegen die 4 Komponenten des MEK/ERK-Moduls im Ras/MAPK-Signalweg (shMEK2-shMEK1-shERK2-shERK1).

Das Plasmid wurde im Rahmen dieser Arbeit neu kloniert.

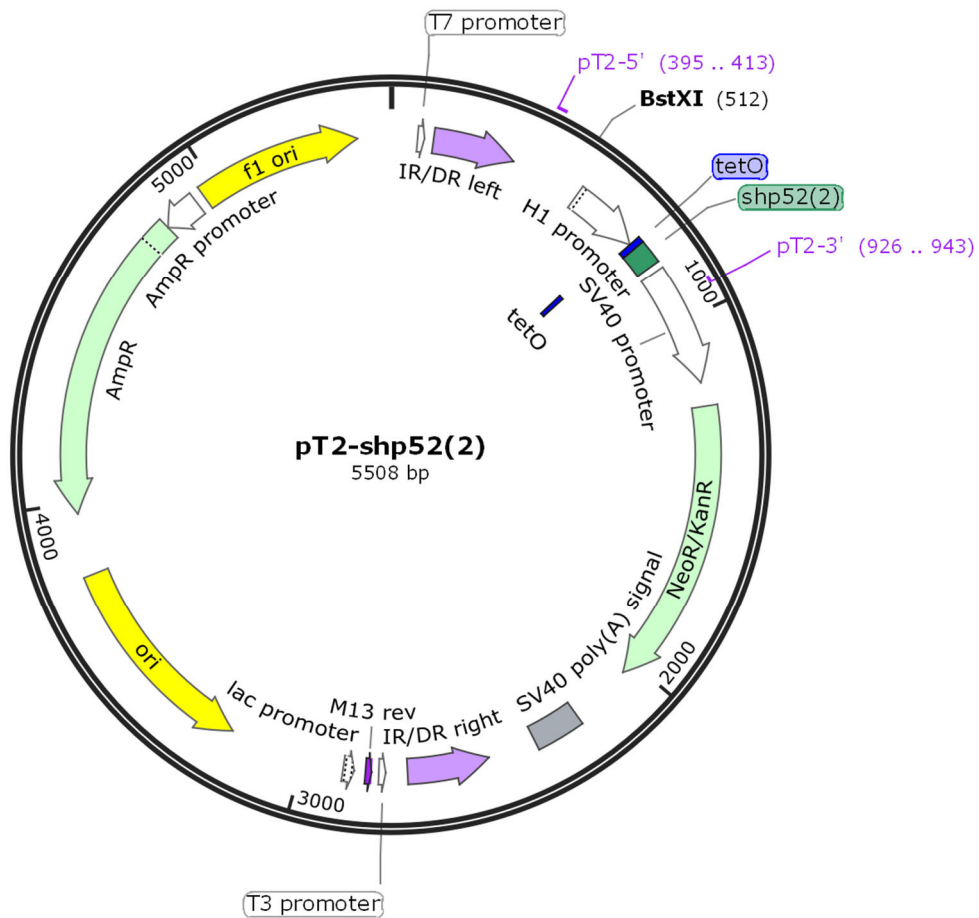


Abbildung 28

Vektorkarte pT2-shp52(2): *Sleeping Beauty* Einzel-shRNA-Expressionsvektor für eine induzierbare shRNA gegen p52 (p52(2)-Sequenz, vgl. 2.4).

Das Plasmid wurde im Rahmen dieser Arbeit neu kloniert.

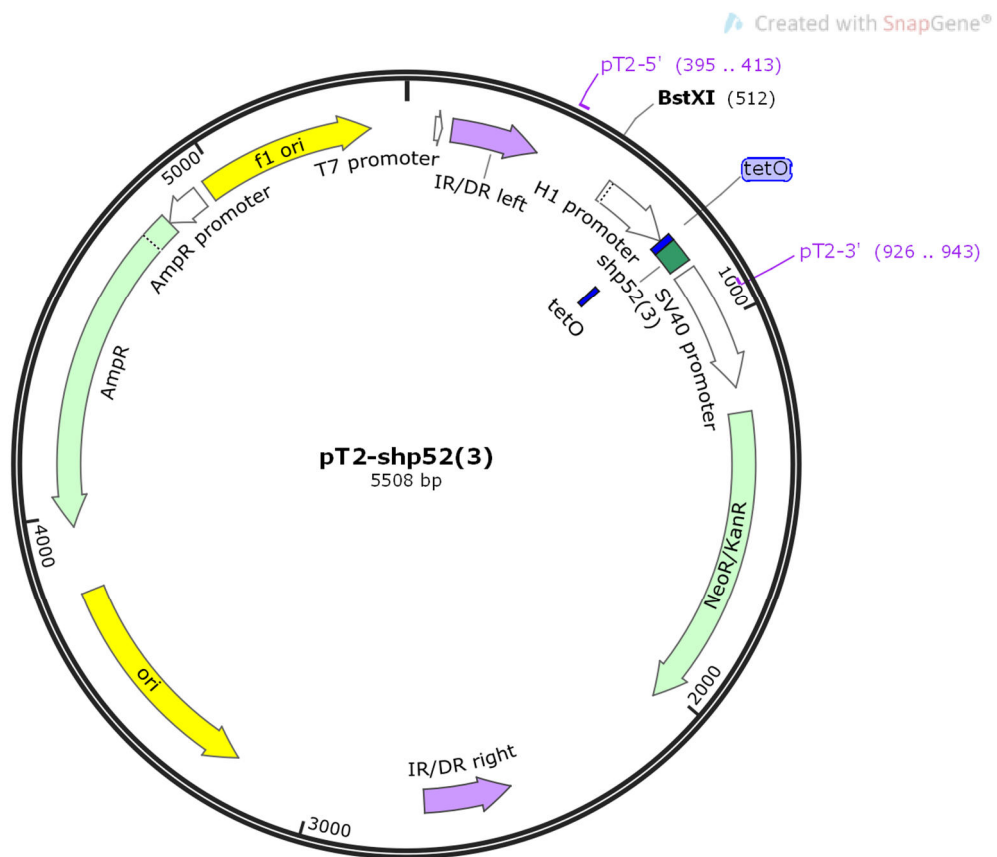


Abbildung 29

Vektorkarte pT2-shp52(3): *Sleeping Beauty* Einzel-shRNA-Expressionsvektor für eine induzierbare shRNA gegen p52 (p52(3)-Sequenz, vgl. 2.4).

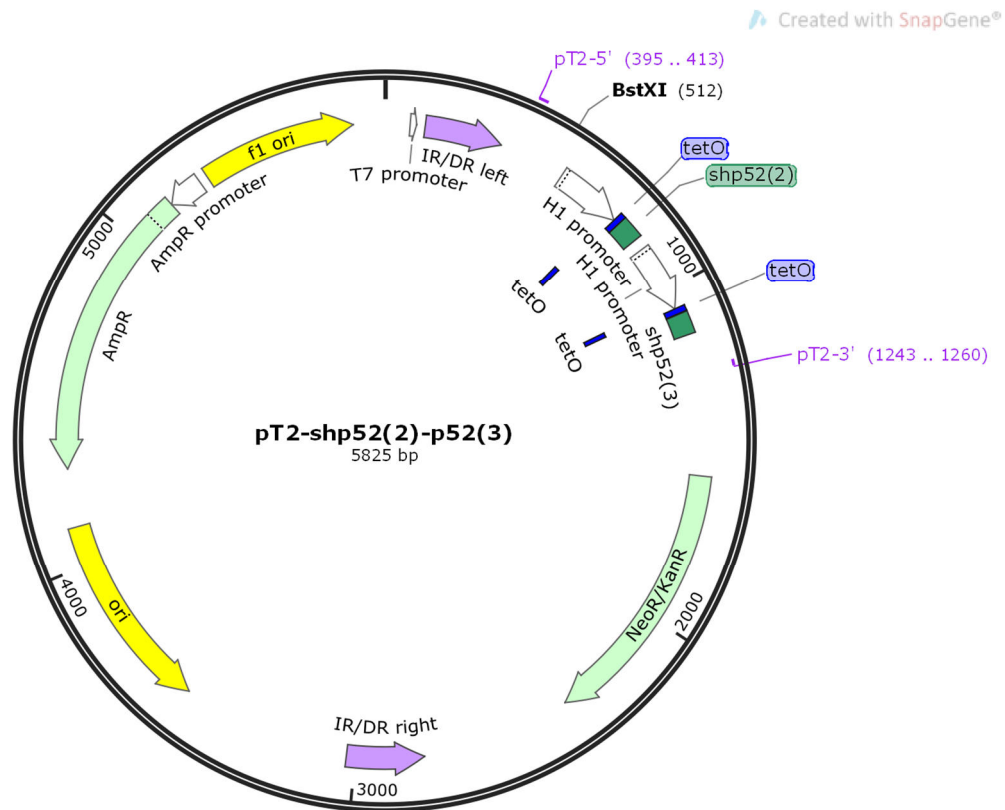


Abbildung 30

Vektorkarte pT2-shp52(2)-shp52(3): *Sleeping Beauty* Doppel-shRNA-Expressionsvektor für zwei verschiedene induzierbare shRNA-Sequenzen gegen p52.

Das Plasmid wurde im Rahmen dieser Arbeit neu kloniert.

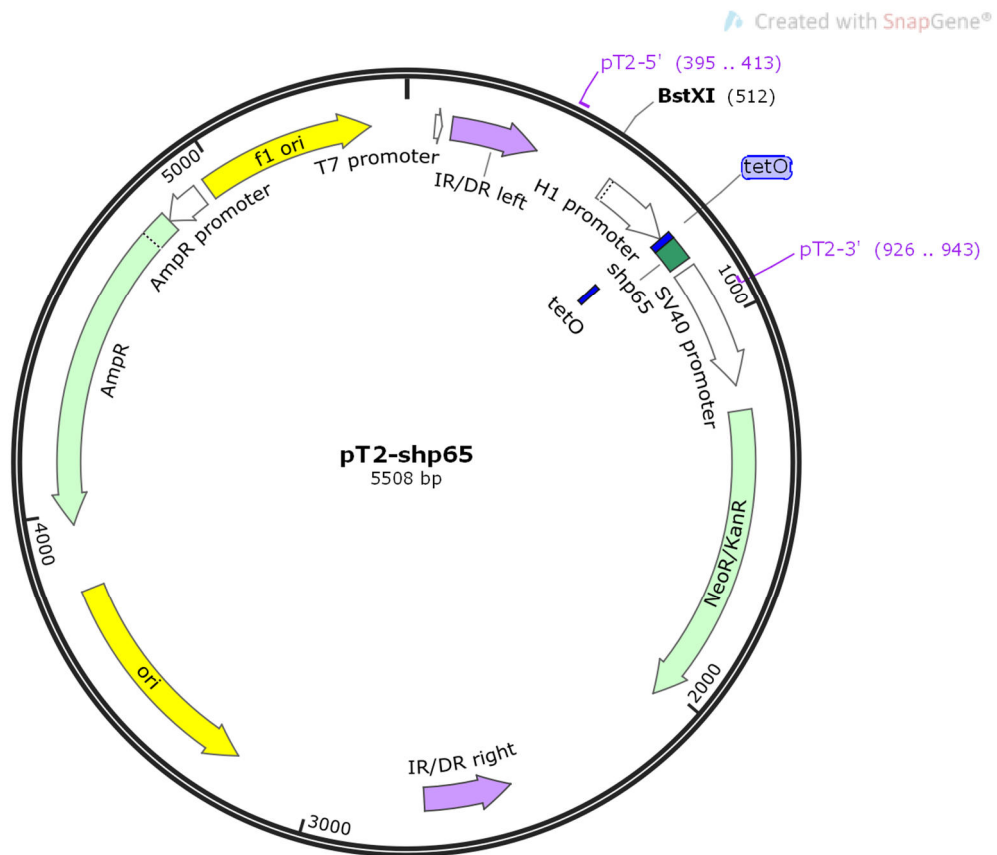


Abbildung 31

Vektorkarte pT2-shp65: *Sleeping Beauty* Einzel-shRNA-Expressionsvektor für eine induzierbare shRNA gegen p65 (RelA).

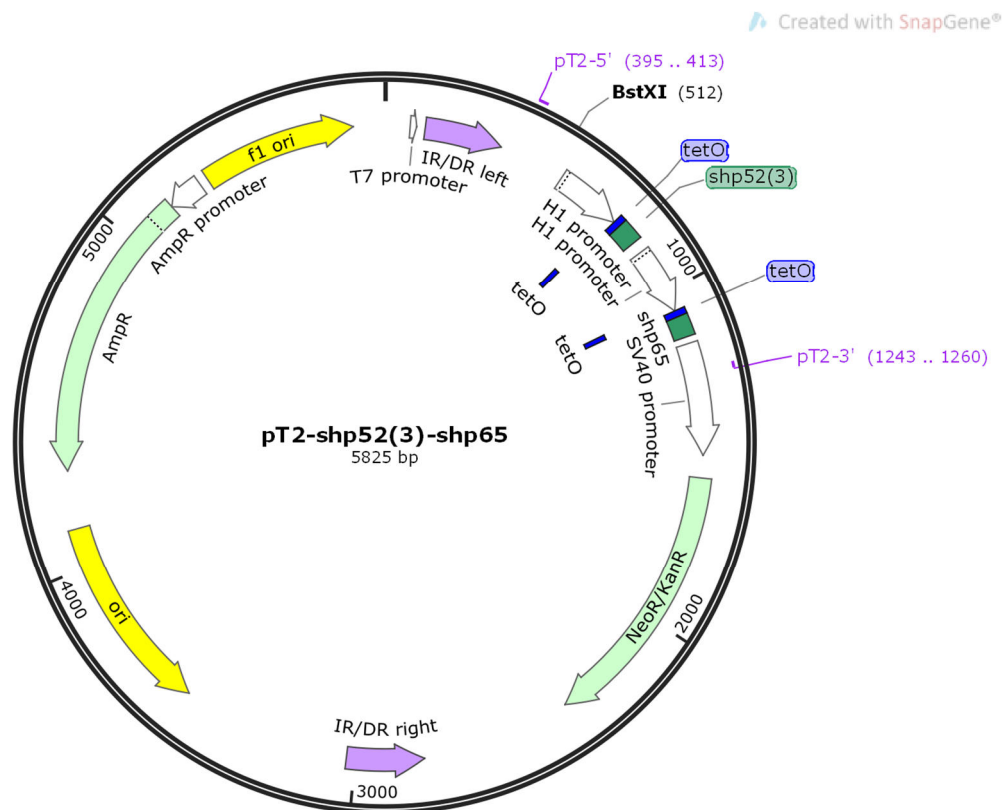


Abbildung 32

Vektorkarte pT2-shp52(3)-shp65: *Sleeping Beauty* Doppel-shRNA-Expressionsvektor für zwei induzierbare shRNA-Expressionskassetten gegen p52 und p65 (RelA).

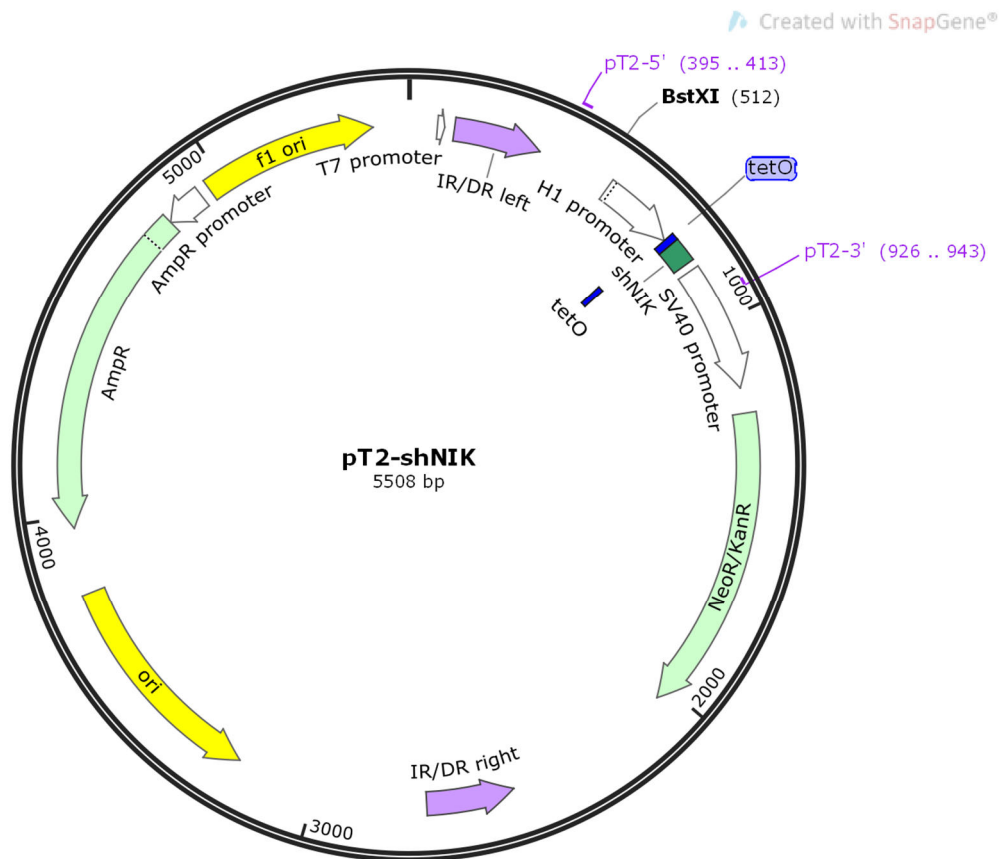


Abbildung 33

Vektorkarte pT2-shNIK: *Sleeping Beauty* Einzel-shRNA-Expressionsvektor für eine induzierbare shRNA gegen NIK.

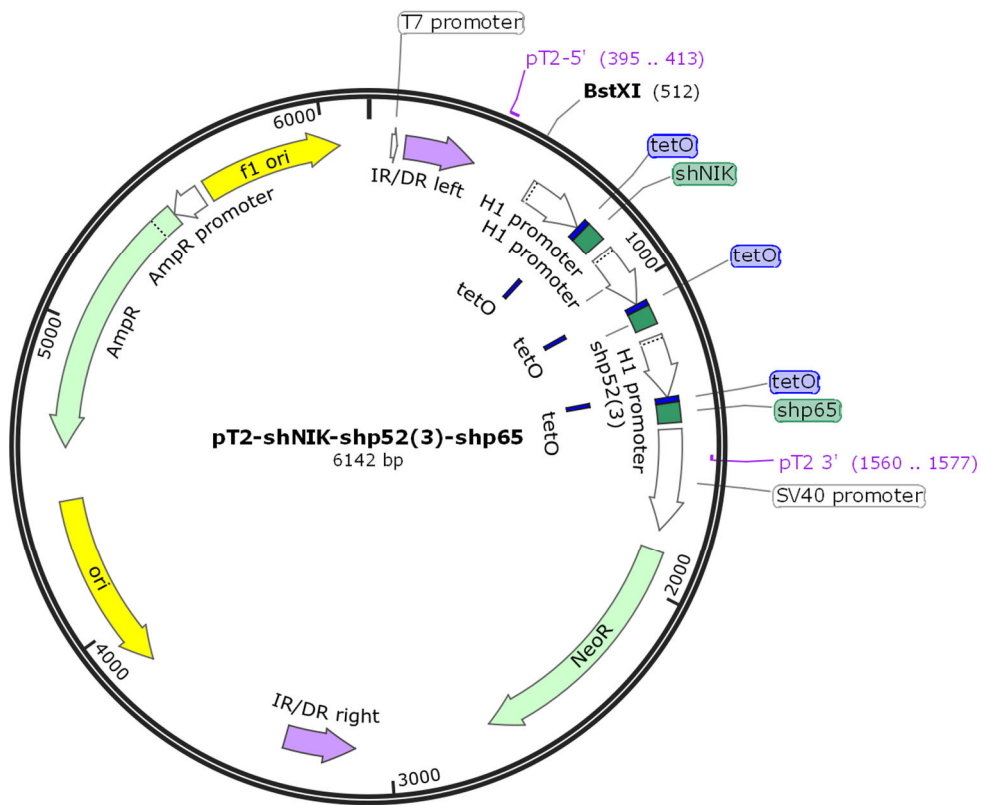


Abbildung 34

Vektorkarte pT2-shNIK-shp52(3)-shp65: Sleeping Beauty Tripel-shRNA-Expressionsvektor für induzierbare shRNAs gegen NIK, p52 und p65 (RelA).

8. LITERATUR

1. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood*. 2008;111(6):2962-72.
2. Berdeja JG, Lin Y, Raje NS, Siegel DSD, Munshi NC, Liedtke M, et al. First-in-human multicenter study of bb2121 anti-BCMA CAR T-cell therapy for relapsed/refractory multiple myeloma: Updated results. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(15_suppl):3010-.
3. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014;15(12):e538-48.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(1):7-30.
5. Landgren O, Katzmann JA, Hsing AW, Pfeiffer RM, Kyle RA, Yeboah ED, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance among men in Ghana. *Mayo Clin Proc*. 2007;82(12):1468-73.
6. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet*. 2009;374(9686):324-39.
7. Palumbo A, Bringhen S, Ludwig H, Dimopoulos MA, Blade J, Mateos MV, et al. Personalized therapy in multiple myeloma according to patient age and vulnerability: a report of the European Myeloma Network (EMN). *Blood*. 2011;118(17):4519-29.
8. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*. 2009;113(22):5412-7.
9. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 2002;346(8):564-9.
10. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 2006;354(13):1362-9.
11. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ, 3rd. Long-term follow-up of 241 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance: the original Mayo Clinic series 25 years later. *Mayo Clin Proc*. 2004;79(7):859-66.
12. Berenson JR, Anderson KC, Audell RA, Boccia RV, Coleman M, Dimopoulos MA, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: a consensus statement. *Br J Haematol*. 2010;150(1):28-38.
13. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Multiple Myeloma. *JAMA Oncol*. 2015;1(2):174-5.
14. Anguille S, Bryant C. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *CMAJ*. 2013;185(15):1345.
15. Rajkumar SV. Preventive strategies in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Am J Hematol*. 2012;87(5):453-4.
16. Rajkumar SV, Merlini G, San Miguel JF. Haematological cancer: Redefining myeloma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(9):494-6.
17. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(5):335-48.
18. Dhodapkar MV. MGUS to myeloma: a mysterious gammopathy of underexplored significance. *Blood*. 2016;128(23):2599-606.
19. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2004;351(18):1860-73.

20. Giuliani N, Rizzoli V, Roodman GD. Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition. *Blood*. 2006;108(13):3992-6.
21. International Myeloma Working G. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*. 2003;121(5):749-57.
22. Larsen JT, Kumar SK, Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Rajkumar SV. Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 2013;27(4):941-6.
23. Rajkumar SV, Larson D, Kyle RA. Diagnosis of smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2011;365(5):474-5.
24. Anderson KC. The 39th David A. Karnofsky Lecture: bench-to-bedside translation of targeted therapies in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2012;30(4):445-52.
25. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005;23(15):3412-20.
26. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2011;364(11):1046-60.
27. Russell SJ, Rajkumar SV. Multiple myeloma and the road to personalised medicine. *Lancet Oncol*. 2011;12(7):617-9.
28. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. 1975;36(3):842-54.
29. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*. 2015;33(26):2863-9.
30. Rajkumar SV, Gahrton G, Bergsagel PL. Approach to the treatment of multiple myeloma: a clash of philosophies. *Blood*. 2011;118(12):3205-11.
31. Usmani SZ, Crowley J, Hoering A, Mitchell A, Waheed S, Nair B, et al. Improvement in long-term outcomes with successive Total Therapy trials for multiple myeloma: are patients now being cured? *Leukemia*. 2013;27(1):226-32.
32. Alexanian R, Haut A, Khan AU, Lane M, McKelvey EM, Migliore PJ, et al. Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *JAMA*. 1969;208(9):1680-5.
33. Munshi NC. Plasma cell disorders: an historical perspective. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:297.
34. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. Myeloma Trialists' Collaborative Group. *J Clin Oncol*. 1998;16(12):3832-42.
35. Barlogie B, Smith L, Alexanian R. Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents. *N Engl J Med*. 1984;310(21):1353-6.
36. Alexanian R, Dimopoulos MA, Delasalle K, Barlogie B. Primary dexamethasone treatment of multiple myeloma. *Blood*. 1992;80(4):887-90.
37. Cornbleet MA, McElwain TJ, Kumar PJ, Filshie J, Selby P, Carter RL, et al. Treatment of advanced malignant melanoma with high-dose melphalan and autologous bone marrow transplantation. *Br J Cancer*. 1983;48(3):329-34.
38. Barlogie B, Alexanian R, Dicke KA, Zagars G, Spitzer G, Jagannath S, et al. High-dose chemoradiotherapy and autologous bone marrow transplantation for resistant multiple myeloma. *Blood*. 1987;70(3):869-72.
39. Lokhorst H, Einsele H, Vesole D, Bruno B, San Miguel J, Perez-Simon JA, et al. International Myeloma Working Group consensus statement regarding the current

- status of allogeneic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2010;28(29):4521-30.
40. Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1999;341(21):1565-71.
 41. Richardson PG, Mitsiades C, Hideshima T, Anderson KC. Lenalidomide in multiple myeloma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006;6(8):1165-73.
 42. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med*. 2003;348(26):2609-17.
 43. Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, Buadi FK, Pandey S, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*. 2014;28(5):1122-8.
 44. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, Mateos MV, Zamagni E, Avet-Loiseau H, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up dagger. *Ann Oncol*. 2017.
 45. Ocio EM, Richardson PG, Rajkumar SV, Palumbo A, Mateos MV, Orłowski R, et al. New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG). *Leukemia*. 2014;28(3):525-42.
 46. Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, Hayashi T, Chauhan D, Richardson P, et al. Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood*. 2003;101(4):1530-4.
 47. Carvalho P, Goder V, Rapoport TA. Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell*. 2006;126(2):361-73.
 48. Jagannath S, Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, et al. Bortezomib appears to overcome the poor prognosis conferred by chromosome 13 deletion in phase 2 and 3 trials. *Leukemia*. 2007;21(1):151-7.
 49. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2008;359(9):906-17.
 50. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng WJ, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2007;12(2):131-44.
 51. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):175-87.
 52. Wagner SD, Neuberger MS. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:441-57.
 53. Liu YJ, Banchereau J. Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells. *Semin Immunol*. 1997;9(4):235-40.
 54. Gonzalez D, van der Burg M, Garcia-Sanz R, Fenton JA, Langerak AW, Gonzalez M, et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*. 2007;110(9):3112-21.
 55. Papavasiliou FN, Schatz DG. Cell-cycle-regulated DNA double-stranded breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Nature*. 2000;408(6809):216-21.
 56. Chesi M, Bergsagel PL. Advances in the pathogenesis and diagnosis of multiple myeloma. *Int J Lab Hematol*. 2015;37 Suppl 1:108-14.
 57. Bergsagel PL, Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*. 2001;20(40):5611-22.

58. Onodera N, McCabe NR, Nachman JB, Johnson FL, Le Beau MM, Rowley JD, et al. Hyperdiploidy arising from near-haploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 1992;4(4):331-6.
59. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J, Jr. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*. 2005;106(1):296-303.
60. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*. 2011;471(7339):467-72.
61. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008;456(7218):66-72.
62. Lee W, Jiang Z, Liu J, Haverty PM, Guan Y, Stinson J, et al. The mutation spectrum revealed by paired genome sequences from a lung cancer patient. *Nature*. 2010;465(7297):473-7.
63. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009;23(12):2210-21.
64. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*. 2012;120(5):1067-76.
65. Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, Dickens NJ, Jenner MW, Boyd KD, et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood*. 2010;116(15):e56-65.
66. Tiedemann RE, Gonzalez-Paz N, Kyle RA, Santana-Davila R, Price-Troska T, Van Wier SA, et al. Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia*. 2008;22(5):1044-52.
67. Lode L, Eveillard M, Trichet V, Soussi T, Wulleme S, Richebourg S, et al. Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica*. 2010;95(11):1973-6.
68. Boyd KD, Ross FM, Walker BA, Wardell CP, Tapper WJ, Chiecchio L, et al. Mapping of chromosome 1p deletions in myeloma identifies FAM46C at 1p12 and CDKN2C at 1p32.3 as being genes in regions associated with adverse survival. *Clin Cancer Res*. 2011;17(24):7776-84.
69. Demchenko YN, Kuehl WM. A critical role for the NFκB pathway in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2010;1(1):59-68.
70. Hausmann S, Brandt E, Kochel C, Einsele H, Bargou RC, Seggewiss-Bernhardt R, et al. Loss of serum and glucocorticoid-regulated kinase 3 (SGK3) does not affect proliferation and survival of multiple myeloma cell lines. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122689.
71. Walker BA, Wardell CP, Chiecchio L, Smith EM, Boyd KD, Neri A, et al. Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood*. 2011;117(2):553-62.
72. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell*. 2014;25(1):91-101.
73. Neri P, Ren L, Azab AK, Brentnall M, Gratton K, Klimowicz AC, et al. Integrin beta7-mediated regulation of multiple myeloma cell adhesion, migration, and invasion. *Blood*. 2011;117(23):6202-13.

74. Annunziata CM, Hernandez L, Davis RE, Zingone A, Lamy L, Lam LT, et al. A mechanistic rationale for MEK inhibitor therapy in myeloma based on blockade of MAF oncogene expression. *Blood*. 2011;117(8):2396-404.
75. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF-kappaB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016;8(3):227-41.
76. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008;132(3):344-62.
77. Demchenko YN, Glebov OK, Zingone A, Keats JJ, Bergsagel PL, Kuehl WM. Classical and/or alternative NF-kappaB pathway activation in multiple myeloma. *Blood*. 2010;115(17):3541-52.
78. Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Redini F, Heymann D. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(18):2334-50.
79. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*. 2006;25(51):6758-80.
80. Perkins ND, Gilmore TD. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ*. 2006;13(5):759-72.
81. Gilmore TD. NF-kappa B, KBF1, dorsal, and related matters. *Cell*. 1990;62(5):841-3.
82. Ghosh G, Wang VY, Huang DB, Fusco A. NF-kappaB regulation: lessons from structures. *Immunol Rev*. 2012;246(1):36-58.
83. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225-60.
84. Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene*. 2006;25(51):6706-16.
85. Natoli G. NF-kappaB and chromatin: ten years on the path from basic mechanisms to candidate drugs. *Immunol Rev*. 2012;246(1):183-92.
86. Smale ST. Dimer-specific regulatory mechanisms within the NF-kappaB family of transcription factors. *Immunol Rev*. 2012;246(1):193-204.
87. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006;25(51):6680-4.
88. Hinz M, Arslan SC, Scheidereit C. It takes two to tango: IkappaBs, the multifunctional partners of NF-kappaB. *Immunol Rev*. 2012;246(1):59-76.
89. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*. 2002;109 Suppl:S81-96.
90. Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol*. 2002;3(10):958-65.
91. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:693-733.
92. Coope HJ, Atkinson PG, Huhse B, Belich M, Janzen J, Holman MJ, et al. CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J*. 2002;21(20):5375-85.
93. Chen ZJ. Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. *Immunol Rev*. 2012;246(1):95-106.
94. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G, et al. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science*. 2001;293(5534):1495-9.
95. Hinz M, Scheidereit C. The IkappaB kinase complex in NF-kappaB regulation and beyond. *EMBO Rep*. 2014;15(1):46-61.

96. Hacker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*. 2006;2006(357):re13.
97. Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC. NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science*. 1993;259(5103):1912-5.
98. McMillin DW, Delmore J, Weisberg E, Negri JM, Geer DC, Klippel S, et al. Tumor cell-specific bioluminescence platform to identify stroma-induced changes to anticancer drug activity. *Nat Med*. 2010;16(4):483-9.
99. Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F, et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2007;12(2):115-30.
100. Hideshima T, Neri P, Tassone P, Yasui H, Ishitsuka K, Raje N, et al. MLN120B, a novel IkappaB kinase beta inhibitor, blocks multiple myeloma cell growth in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 2006;12(19):5887-94.
101. Jourdan M, Moreaux J, Vos JD, Hose D, Mahtouk K, Abouladze M, et al. Targeting NF-kappaB pathway with an IKK2 inhibitor induces inhibition of multiple myeloma cell growth. *Br J Haematol*. 2007;138(2):160-8.
102. Gilmore TD, Herscovitch M. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene*. 2006;25(51):6887-99.
103. Steinbrunn T, Chatterjee M, Bargou RC, Stuhmer T. Efficient transient transfection of human multiple myeloma cells by electroporation--an appraisal. *PLoS One*. 2014;9(6):e97443.
104. Chatterjee M, Stuhmer T, Herrmann P, Bommert K, Dorken B, Bargou RC. Combined disruption of both the MEK/ERK and the IL-6R/STAT3 pathways is required to induce apoptosis of multiple myeloma cells in the presence of bone marrow stromal cells. *Blood*. 2004;104(12):3712-21.
105. Zhang B, Fenton RG. Proliferation of IL-6-independent multiple myeloma does not require the activity of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2). *J Cell Physiol*. 2002;193(1):42-54.
106. Shimizu S, Takiguchi T, Fukutoku M, Yoshioka R, Hirose Y, Fukuhara S, et al. Establishment of a CD4-positive plasmacytoma cell line (AMO1). *Leukemia*. 1993;7(2):274-80.
107. Jackson N, Lowe J, Ball J, Bromidge E, Ling NR, Larkins S, et al. Two new IgA1-kappa plasma cell leukaemia cell lines (JJN-1 & JJN-2) which proliferate in response to B cell stimulatory factor 2. *Clin Exp Immunol*. 1989;75(1):93-9.
108. Diehl V, Schaadt M, Kirchner H, Hellriegel KP, Gudat F, Fonatsch C, et al. Long-term cultivation of plasma cell leukemia cells and autologous lymphoblasts (LCL) in vitro: a comparative study. *Blut*. 1978;36(6):331-8.
109. Drexler HG, Matsuo Y. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Leuk Res*. 2000;24(8):681-703.
110. Drexler HG, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*. 2002;39(2):75-90.
111. alamar blue Protocol.pdf.
112. van de Wetering M, Oving I, Muncan V, Pon Fong MT, Brantjes H, van Leenen D, et al. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep*. 2003;4(6):609-15.

113. Izsvak Z, Chuah MK, Vandendriessche T, Ivics Z. Efficient stable gene transfer into human cells by the Sleeping Beauty transposon vectors. *Methods*. 2009;49(3):287-97.
114. Severin Fink LZ, Bernhard Roth, Evelyn Brandt, Laure Voisin, Zsuzsanna Izsvák, Ralf C. Bargou, Thorsten Stuehmer. Sleeping Beauty vectors for inducible multi-target knockdown approaches in multiple myeloma cells (in Vorbereitung).
115. Sharp PA. RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev*. 1999;13(2):139-41.
116. Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*. 2002;26(2):199-213.
117. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 2002;296(5567):550-3.
118. Tijsterman M, Plasterk RH. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell*. 2004;117(1):1-3.
119. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
120. Bergsagel PL, Mateos MV, Gutierrez NC, Rajkumar SV, San Miguel JF. Improving overall survival and overcoming adverse prognosis in the treatment of cytogenetically high-risk multiple myeloma. *Blood*. 2013;121(6):884-92.
121. Egan JB, Shi CX, Tembe W, Christoforides A, Kurdoglu A, Sinari S, et al. Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood*. 2012;120(5):1060-6.
122. Sanda T, Iida S, Ogura H, Asamitsu K, Murata T, Bacon KB, et al. Growth inhibition of multiple myeloma cells by a novel I κ B kinase inhibitor. *Clin Cancer Res*. 2005;11(5):1974-82.
123. Rauert-Wunderlich H, Siegmund D, Maier E, Giner T, Bargou RC, Wajant H, et al. The IKK inhibitor Bay 11-7082 induces cell death independent from inhibition of activation of NF κ B transcription factors. *PLoS One*. 2013;8(3):e59292.
124. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
125. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001;411(6836):494-8.
126. Boch J. TALEs of genome targeting. *Nat Biotechnol*. 2011;29(2):135-6.
127. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-21.
128. Guha TK, Wai A, Hausner G. Programmable Genome Editing Tools and their Regulation for Efficient Genome Engineering. *Comput Struct Biotechnol J*. 2017;15:146-60.
129. Yin H, Kauffman KJ, Anderson DG. Delivery technologies for genome editing. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(6):387-99.
130. Baum C, von Kalle C, Staal FJ, Li Z, Fehse B, Schmidt M, et al. Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences. *Mol Ther*. 2004;9(1):5-13.
131. Narezkina A, Taganov KD, Litwin S, Stoyanova R, Hayashi J, Seeger C, et al. Genome-wide analyses of avian sarcoma virus integration sites. *J Virol*. 2004;78(21):11656-63.

132. Howarth JL, Lee YB, Uney JB. Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells). *Cell Biol Toxicol*. 2010;26(1):1-20.
133. Ahler E, Sullivan WJ, Cass A, Braas D, York AG, Bensinger SJ, et al. Doxycycline alters metabolism and proliferation of human cell lines. *PLoS One*. 2013;8(5):e64561.
134. Moullan N, Mouchiroud L, Wang X, Ryu D, Williams EG, Mottis A, et al. Tetracyclines Disturb Mitochondrial Function across Eukaryotic Models: A Call for Caution in Biomedical Research. *Cell Rep*. 2015.
135. Chatzispyrou IA, Held NM, Mouchiroud L, Auwerx J, Houtkooper RH. Tetracycline antibiotics impair mitochondrial function and its experimental use confounds research. *Cancer Res*. 2015;75(21):4446-9.
136. Demchenko YN, Brents LA, Li Z, Bergsagel LP, McGee LR, Kuehl MW. Novel inhibitors are cytotoxic for myeloma cells with NF κ B inducing kinase-dependent activation of NF κ B. *Oncotarget*. 2014;5(12):4554-66.
137. Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, Hayashi T, et al. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem*. 2002;277(19):16639-47.
138. Moreau P, Richardson PG, Cavo M, Orłowski RZ, San Miguel JF, Palumbo A, et al. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood*. 2012;120(5):947-59.
139. Watanabe M, Dewan MZ, Okamura T, Sasaki M, Itoh K, Higashihara M, et al. A novel NF-kappaB inhibitor DHMEQ selectively targets constitutive NF-kappaB activity and induces apoptosis of multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 2005;114(1):32-8.
140. Hideshima T, Chauhan D, Kiziltepe T, Ikeda H, Okawa Y, Podar K, et al. Biologic sequelae of I{kappa}B kinase (IKK) inhibition in multiple myeloma: therapeutic implications. *Blood*. 2009;113(21):5228-36.
141. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res*. 2001;61(7):3071-6.
142. Tai YT, Acharya C, An G, Moschetta M, Zhong MY, Feng X, et al. APRIL and BCMA promote human multiple myeloma growth and immunosuppression in the bone marrow microenvironment. *Blood*. 2016;127(25):3225-36.
143. Rossi JF, Moreaux J, Hose D, Requirand G, Rose M, Rouille V, et al. Atacicept in relapsed/refractory multiple myeloma or active Waldenstrom's macroglobulinemia: a phase I study. *Br J Cancer*. 2009;101(7):1051-8.
144. Rossi JF. Phase I study of atacicept in relapsed/refractory multiple myeloma (MM) and Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011;11(1):136-8.
145. Liao G, Zhang M, Harhaj EW, Sun SC. Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem*. 2004;279(25):26243-50.
146. Vallabhapurapu S, Matsuzawa A, Zhang W, Tseng PH, Keats JJ, Wang H, et al. Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol*. 2008;9(12):1364-70.
147. Zarnegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, Dempsey PW, Cheung HH, He J, et al. Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory

- complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol.* 2008;9(12):1371-8.
148. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol.* 2011;12(8):695-708.
149. Unniyampurath U, Pilankatta R, Krishnan MN. RNA Interference in the Age of CRISPR: Will CRISPR Interfere with RNAi? *Int J Mol Sci.* 2016;17(3):291.
150. Boettcher M, McManus MT. Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Molecular Cell.* 2015;58(4):575-85.
151. Barrangou R, Birmingham A, Wiemann S, Beijersbergen RL, Hornung V, Smith A. Advances in CRISPR-Cas9 genome engineering: lessons learned from RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(7):3407-19.

9. ABBILDUNGEN

Abbildung 1.....	4
Abbildung 2.....	8
Abbildung 3.....	17
Abbildung 4.....	21
Abbildung 5.....	26
Abbildung 6.....	30
Abbildung 7.....	35
Abbildung 8.....	40
Abbildung 9.....	41
Abbildung 10.....	44
Abbildung 11.....	67
Abbildung 12.....	69
Abbildung 13.....	71
Abbildung 14.....	73
Abbildung 15.....	74
Abbildung 16.....	77
Abbildung 17.....	79
Abbildung 18.....	84
Abbildung 19.....	87
Abbildung 20.....	90
Abbildung 21.....	91
Abbildung 22.....	92
Abbildung 23.....	113
Abbildung 24.....	114
Abbildung 25.....	115
Abbildung 26.....	116
Abbildung 27.....	117
Abbildung 28.....	118
Abbildung 29.....	119
Abbildung 30.....	120
Abbildung 31.....	121
Abbildung 32.....	122
Abbildung 33.....	123
Abbildung 34.....	124

10. DANKSAGUNG

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Ralf Bargou für die Bereitstellung des Themas und die Übernahme des Erstgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Löffler und Herrn Prof. Andreas Schlosser bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie die Betreuung im Rahmen des Promotionskomitees.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Thorsten Stühmer, der mir sowohl während des experimentellen Teils als auch bei der Überarbeitung der schriftlichen Fassung stets mit wertvollen Ratschlägen zur Seite stand und dessen konstante und angenehme Betreuung wesentlich zur Qualität der Arbeit beigetragen hat.

Der Graduate School of Life Sciences der Universität Würzburg danke ich für die Förderung der Arbeit in finanzieller und wissenschaftlicher Hinsicht.

Weiterhin danke ich Mathias Nehen für gelegentliches Korrekturlesen und zahlreiche hilfreiche Verbesserungsvorschläge.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Jutta und Jan-Peter Zugelder, meiner Familie und Freunden für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

11. LEBENSLAUF

seit 07/2018	Assistenzarzt in der 1. Medizinischen Abteilung für Gastroenterologie, Asklepios Klinik Altona (Prof. Dr. J. Pohl)
seit 2017	Strukturiertes Promotionsstudium Humanmedizin, Universität Würzburg
2016-2017	Praktisches Jahr: Universitätskinderklinik Würzburg, Asklepios Klinik Altona Sanglah Hospital Denpasar, Bali, Indonesien
2010-2017	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
2000 - 2009	Ganerben-Gymnasium, Künzelsau Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1996 - 2000	Grundschule GuWS, Künzelsau

Promotion

Seit 2015 Promotionsarbeit „Etablierung eines stabilen induzierbaren Multikassetten-Systems für shRNA-Knockdown-Konstrukte in Myelom Zelllinien und Anwendung zur Analyse des NFκB-Signalwegs“

Doktorvater Prof. Dr. Ralf C. Bargou
Lehrstuhl für Translationale Onkologie
Medizinische Klinik und Poliklinik II
Universitätsklinikum Würzburg

Freisemester Sommer 2015 für den experimentellen Teil der Promotion

Promotionsstipendium der Graduate School of Life Sciences, Universität Würzburg

12. EIDESSTÄTLICHE ERKLÄRUNG

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Etablierung eines stabilen induzierbaren Multikassetten-Systems für shRNA-Knockdown-Konstrukte in Myelom Zelllinien und Anwendung zur Analyse des NFκB-Signalwegs“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Würzburg,

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Establishment of a stable and inducible Multicassette-shRNA-Knockdown System in Myeloma Cell Lines and Adaption to the Evaluation of the NFκB-Pathway in Multiple Myeloma” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

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

Würzburg,

Place, date

Signature

