

Aus dem
Comprehensive Cancer Center Mainfranken
Direktor: Professor Dr. med. Ralf C. Bargou

**Etablierung eines isogenen Zelllinienmodells zur Untersuchung
der Bedeutung mono- und biallelischer *TP53*-Inaktivierungen
beim Multiplen Myelom**

**Establishment of an isogenic cell line model for the
investigation of the impact of mono- and biallelic *TP53*-
inactivation on multiple myeloma**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Markus Roth
aus
Würzburg

Würzburg, Juni 2019

Referent: Prof. Dr. med. Ralf C. Bargou
Korreferent: Prof. Dr. med. Justus Müller
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2020

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	i
Tabellenverzeichnis.....	ii
Abkürzungsverzeichnis	iii
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Multiple Myelom	1
1.2 Das Stufenmodell der MM-Entwicklung.....	2
1.3 Das Tumorsuppressorprotein p53	7
1.4 Bedeutung von <i>TP53</i> -Alterationen für Staging, Prognose und Therapie des Multiplen Myeloms.....	10
1.5 Genome Editing mittels CRISPR/Cas9	15
1.6 Zielsetzung.....	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Zellkultur.....	19
2.2 Bestimmung der Zellzahl.....	19
2.3 Kryokonservierung von Zellen	20
2.4 Elektroporation	20
2.5 OptiPrep	21
2.6 Zytotoxizitäts-Assays.....	22
2.6.1 Annexin-V-PI-Messung.....	23
2.6.2 alamarBlue-Assay.....	24
2.7 Durchflusszytometrie.....	25
2.7.1 Probenvorbereitung	25
2.7.2 Annexin-V-PI-Messung.....	26
2.7.3 EGFP-PI-Messung.....	26
2.7.4 Messvorgang und Auswertung	27
2.8 Selektionierung von Einzelzell-Klonen	27
2.9 Western Blot.....	29
2.9.1 Herstellung der Gele.....	29
2.9.2 Probengewinnung.....	31
2.9.3 Ultraschalllyse.....	31
2.9.4 SDS-PAGE	31
2.9.5 Blotting.....	33
2.9.6 Ponceaus-S-Rot und Blocking	34
2.9.7 Antikörperfärbung	34
2.10 Herstellung des CRISPR/Cas9-Plasmids.....	36

2.10.1	Auswahl geeigneter Protospacer für die guideRNA.....	36
2.10.2	Design der einzelsträngigen Oligonukleotide.....	38
2.10.3	Herstellung der doppelsträngigen Oligonukleotide und Ligation mit dem GeneArt® CRISPR Nuclease Vector.....	38
2.10.4	Amplifikation der Plasmide	40
2.11	Präparation genomischer DNA.....	40
2.12	PCR.....	41
2.13	Konzentrationsmessung von DNA.....	43
2.14	DNA-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion.....	44
2.15	TA-Klonierung	44
2.15.1	Gewinnung von PCR-Produkten genomischer DNA.....	45
2.15.2	Ligation der PCR-Produkte in den pGEM®-T Easy Vector.....	45
2.15.3	Transformation.....	46
2.15.4	Kolonie-PCR.....	46
2.16	Sequenzierung	47
2.17	Materiallisten	48
3	Ergebnisse.....	57
3.1	Expression von p53 in verschiedenen MM-Zelllinien.....	57
3.2	Elektroporation von AMO-1, NCI-H929, MM.1S und MOLP-8 Zellen	57
3.3	Klonwachstum und Benennung der Klone	61
3.4	Western-Blot-Screening	63
3.5	Genomische Analyse der Klone	65
3.6	Strukturelle Auswirkungen der <i>TP53</i> -Läsionen in isolierten Klonen	70
3.7	Expression und Induzierbarkeit von p53, p21 und Mdm2 bei ausgewählten AMO-1-Klonen	73
3.8	Pharmakologische Charakterisierung.....	75
3.8.1	Nutlin-3A.....	76
3.8.2	Melphalan	80
3.8.3	Etoposid.....	82
3.8.4	Bortezomib	85
3.8.5	Carfilzomib.....	87
4	Diskussion	90
5	Zusammenfassung / Summary	102
6	Literaturverzeichnis.....	105

Danksagung

Lebenslauf

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	γ-Peak	2
Abb. 2	Progression einer monoklonalen Gammopathie	5
Abb. 3	Der p53-Signalweg	8
Abb. 4	TP53 (Schematische Darstellung des genomischen Bereichs der DNA-Binde-Domäne)	9
Abb. 5	R-ISS	12
Abb. 6	CRISPR/Cas9-System	17
Abb. 7	Zytotoxizitäts-Assay	23
Abb. 8	Mund-Saug-Pipette	28
Abb. 9	SDS-PAGE	33
Abb. 10	Protospacer-Auswahl	37
Abb. 11	Herstellung der zielspezifischen CRISPR-Vektoren	39
Abb. 12	PCR-Primer für die TP53-Amplifikation	42
Abb. 13	Nutlin-3A abhängige Induktion von p53 in verschiedenen Zelllinien	57
Abb. 14	Spannungsreihe von AMO-1	59
Abb. 15	Einzelzellklone der Zelllinie AMO-1	62
Abb. 16	p53-Titrationsreihe für AMO-1 Zellen	64
Abb. 17	Screening-Western-Blot	64
Abb. 18	Genomische TP53-Analyse von AMO-1-Klonen	67
Abb. 19	Allel-spezifische Sequenzierung	69
Abb. 20	Leserasteranalyse CRISPR/Cas9-mutierter TP53-Allele in AMO-1-Klonen	72
Abb. 21	Western-Analyse ausgewählter AMO-1-Klone	74
Abb. 22	Korrelation des Zellüberlebens mit der Induzierbarkeit von p53-Zielgenen	78
Abb. 23	Einfluss von Nutlin-3A auf das Zellüberleben	80
Abb. 24	Einfluss von Melphalan auf die Zellviabilität	82
Abb. 25	Einfluss des TP53-Status auf die Etoposid-Sensibilität	83
Abb. 26	Einfluss von Etoposid auf die Zellviabilität	84
Abb. 27	Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität	86
Abb. 28	Einfluss von Carfilzomib auf die Zellviabilität	88

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	MM-Zelllinien	19
Tab. 2	Zur Elektroporation verwendete Plasmide	21
Tab. 3	Zusammensetzung der Arbeitslösung für die Annexin-V-PI-Messung	26
Tab. 4	Zusammensetzung der Arbeitslösung für die EGFP-PI-Messung	27
Tab. 5	Sammel- und Trenngel	30
Tab. 6	Primärantikörper	34
Tab. 7	Sekundärantikörper	35
Tab. 8	PCR-Reagenzien	43
Tab. 9	Ligationsansätze für TA-Klonierung	45
Tab. 10	Reaktionsansätze für Kolonie-PCR	46
Tab. 11	Sequenzierungsansätze	47
Tab. 12	Chemikalien	48
Tab. 13	Wirkstoffe	50
Tab. 14	Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen (hauseigene Herstellung)	51
Tab. 15	Puffer kommerzieller Anbieter (nicht Teil eines Kits)	53
Tab. 16	Software	54
Tab. 17	Zellkulturmedien und Zusätze	54
Tab. 18	DNA-Präparations-Kits	55
Tab. 19	Geräte	55
Tab. 20	Längenstandards	56
Tab. 21	Plasmide	56
Tab. 22	Enzyme	56
Tab. 23	Primer für Kolonie-PCR	56
Tab. 24	Optimale Elektroporations-Spannung für die getesteten MM-Zelllinien	61
Tab. 25	Elektroporations- und Selektionsrunden mit der Zelllinie AMO-1	63
Tab. 26	Übersicht über Hemmkonzentrationen für ausgewählte AMO-1-Klone	76

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
ASCT	autologous stem-cell transplantation
ARF	alternate reading frame
<i>Bax</i>	Bcl2 associated X
bp	base pairs (Basenpaare)
BMPCs	bone marrow plasma cells
Cas9	CRISPR-associated9 (Endonuklease)
<i>CDKN1A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
crRNA	CRISPR RNA
del(17p)	Deletion von 17p
DNA	deoxyribonucleic acid
ds	doppelsträngig
DSB	Doppelstrangbruch
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EMD	extramedullary disease
FACS	fluorescence activated cell sorter
FLC	free light chain
HDR	homology directed repair
HDT	Hochdosis-Chemotherapie
IMWG	International Myeloma Working Group
kDa	kiloDalton
Mdm2	murine double minute 2
MDE	Myelom-definierendes-Ereignis
MGUS	monoclonal gammopathy of undetermined significance
MM	Multiples Myelom
mRNA	messenger RNA
NHEJ	non-homologous end joining
OS	overall survival
PAM	protospacer-adjacent motif
PCR	polymerase chain reaction
PFS	progression-free survival
<i>PUMA</i>	p53 upregulated modulator of apoptosis
R-ISS	revised international staging system
RNA	ribonucleic acid
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMM	smouldering multiple myeloma
tracrRNA	transactivating CRISPR RNA
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
wt	wildtype

1 Einleitung

1.1 Das Multiple Myelom

Das Multiple Myelom (MM) ist ein Non-Hodgkin-Lymphom, das auf der ungehemmten Proliferation entarteter Plasmazellen beruht und damit zu der Gruppe der B-Zell-proliferativen Erkrankungen zählt. Es betrifft vornehmlich ältere Personen (medianes Erkrankungsalter von 72 Jahren) und tritt in Europa mit einer Inzidenz von ca. 5/100000/Jahr auf¹. Ca. 10% der hämatologischen Neoplasien und ~1% aller Malignome entfallen auf das MM¹. Die Myelom-Zellen breiten sich im Knochenmark aus, treten in Wechselwirkung mit dem dort ansässigen physiologischen Mikromilieu und verdrängen dabei das reguläre blutbildende System². Die Konsequenz dieser destruktiven Ausbreitung sind osteolytische Knochenläsionen, Hyperkalzämie, Anämie und Immundefizienz³⁻⁵. In den meisten Fällen (ca. 97%) wird von den malignen Plasmazellen ein monoklonales Immunglobulin (M-Protein) sezerniert⁶. Die Erkrankung wird dann als sekretorisches MM, im Gegensatz zum nicht-sekretorischen MM, bezeichnet. Das monoklonale Immunglobulin hat keine immunologische Funktion, kann aber als typischer „M-spike“ oder „γ-Peak“ in der Serumelektrophorese nachgewiesen werden (siehe Abb. 1) und zu einer Nierenschädigung führen⁶.

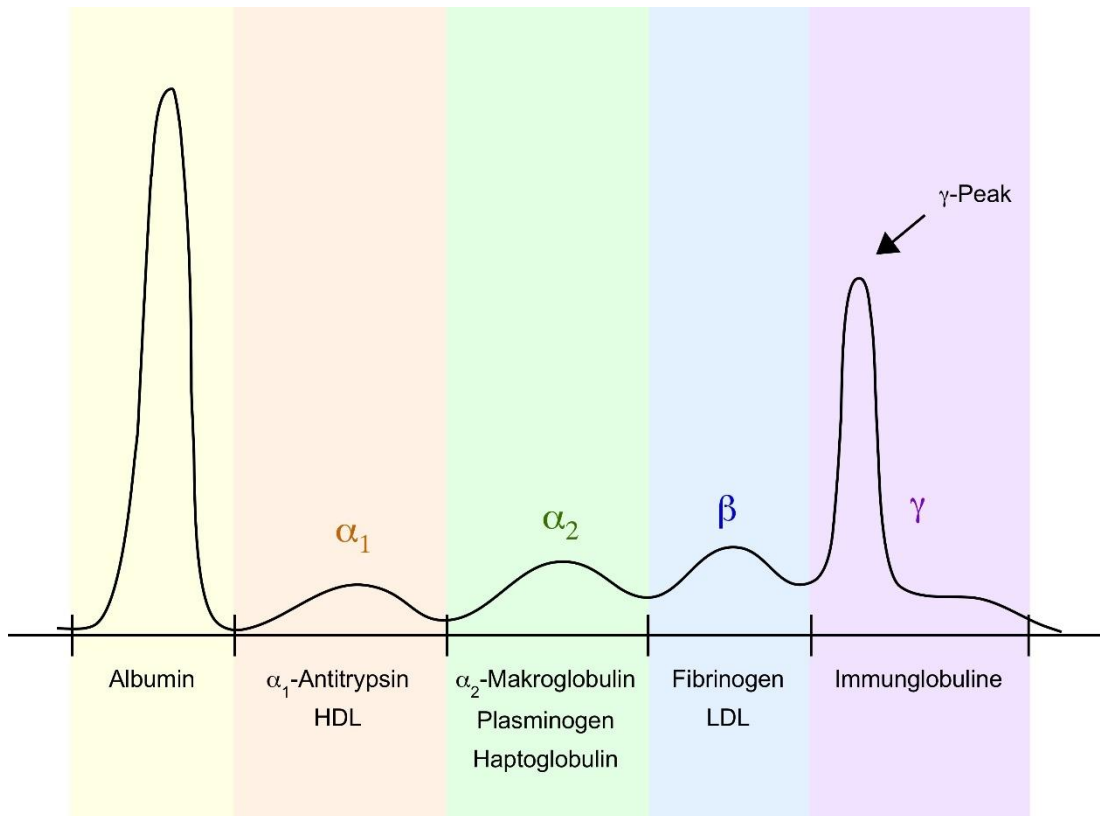


Abb. 1 **γ-Peak**

Bei der Serumelektrophorese werden die Serum-Proteine ihrer Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Es werden die Albumin-Fraktion sowie die α₁-, α₂-, β- und γ-Fraktion unterschieden⁷ (gelegentlich wird die β-Fraktion noch in β₁ und β₂ unterteilt). Bei MM-Patienten können die, von den entarteten Plasmazellen gebildeten, monoklonalen Immunglobuline oftmals in Form eines „γ-Peak“ oder „M-Spike“ in der Serumelektrophorese nachgewiesen werden.

1.2 Das Stufenmodell der MM-Entwicklung

Die Entstehung eines Multiplen Myeloms erfolgt in der Regel aus dem Anfangsstadium der monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance) und über das Zwischenstadium des SMM (smouldering multiple myeloma) (siehe Abb. 2)^{4,8-10}. Die Prävalenz der MGUS steigt mit zunehmendem Alter und tritt mit einer Häufigkeit von ca. 3-4% in der Allgemeinbevölkerung über 50 Jahren auf^{4,8}. Es werden IgM-, non-IgM- und Leichtketten-MGUS unterschieden, aus denen sich jeweils verschiedene Formen der monoklonalen Gammopathie entwickeln können. So stellt die non-IgM-MGUS das erste Stadium in der Evolution des Multiplen Myeloms dar, die Leichtketten-MGUS eine Vorstufe des Leichtketten-MM (einer Subform des MM) und die IgM-MGUS das Ausgangsstadium der

Waldenström Makroglobulinämie (selten IgM-MM)^{11,12}. Das Progressions-Risiko einer MGUS wird mit ca. 1%/Jahr beziffert, ist aber im Detail abhängig von weiteren Faktoren, z.B. von der Konzentration des M-Proteins oder dem Verhältnis der freien Leichtketten im Serum zueinander^{4,8,10,12}. Das Folgestadium der non-IgM- oder Leichtketten-MGUS in der Entwicklung hin zum MM ist das SMM. Dieses ist, genauso wie die MGUS, durch die Abwesenheit von Endorganschäden bzw. deren Manifestation in Form positiver CRAB-Kriterien charakterisiert. CRAB ist ein Akronym der MM-Folgeschäden hypercalcaemia (Überschreitung des Normwertes um $>0,25\text{mmol/l}$, oder Absolutwert $>2,75\text{mmol/l}$), renal insufficiency (Kreatinin Clearance $<40\text{ml/min}$, oder Kreatinin $>2\text{mg/dl}$), anaemia (Hb $<10\text{g/dl}$, oder $<2\text{g/dl}$ unter dem alters- und geschlechtsbezogenen Normwert) und bone lesions (osteolytische Knochenläsionen; nachweisbar in Röntgen, CT oder PET-CT)⁸. Unterscheidungskriterien zwischen MGUS und SMM sind die Zunahme von klonalen Plasmazellen im Knochenmark (BMPCs, bone marrow plasma cells) von Werten $<10\%$ auf Werte $\geq 10\%$ oder eine Konzentration des M-Proteins im Serum von $\geq 30\text{g/l}$ ^{4,13}. Das SMM zeichnet sich auch als Folgestadium der MGUS auf dem Weg steigender Malignität bereits durch ein höheres Progressions-Risiko von 10%/Jahr innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnose aus, welches in der Folgezeit auf 3%/Jahr sinkt⁴. Patienten mit bestimmten genetischen Alterationen der klonalen Plasmazellen wie del(17p), t(4;14) oder 1q-Amplifikation sind einem erhöhten Progressions-Risiko ausgesetzt¹³. Bei Vorliegen von $\geq 10\%$ BMPCs (oder dem Biopsie-gestützten Nachweis eines Plasmozytoms) und der gleichzeitigen Manifestation von, auf die klonale B-Zellerkrankung zurückführbaren, Endorganschäden (siehe CRAB-Kriterien) muss die Diagnose eines Multiplen Myeloms gestellt werden. Diese Diagnose-Kriterien wurden 2014 von der International Myeloma Working Group (IMWG) insofern erweitert, dass auch Erkrankungen bestimmter Patienten, die zuvor als SMM klassifiziert worden waren, aber einem besonders hohen Risiko der Progression in ein MM unterlagen, seitdem als MM eingestuft werden. Als Grenzwert für ein solches außergewöhnlich hohes Risiko wurden eine Wahrscheinlichkeit von $\geq 80\%$ des Auftretens positiver CRAB-Kriterien innerhalb der nächsten beiden Jahre

festgelegt und drei zusätzliche Risiko-Merkmale identifiziert. Diese sind (i) die Infiltration des Knochenmarks mit $\geq 60\%$ BMPCs, (ii) ein FLC(free light chain)-Verhältnis ≥ 100 und (iii) >1 im MRT nachweisbare Knochenläsionen, welche mit den CRAB Kriterien unter dem Terminus „SLiM-CRAB“-Kriterien zusammengefasst und in Kombination mit einer Infiltration des Knochenmarks mit $\geq 10\%$ BMPCs oder einem Biopsie-gestützten Nachweis eines Plasmozytoms als Myelom-definierendes-Ereignis (MDE) betrachtet werden⁸. Das FLC-Verhältnis gibt das Verhältnis der freien (also nicht an schwere Immunglobulin-Ketten gebundenen) κ - zu λ -Ig-Leichtketten im Serum an und liegt normalerweise zwischen Werten von 0,26-1,65⁸. Bei proliferativen B-Zell-Erkrankungen gerät dieses Gleichgewicht durch die vermehrte Produktion nur eines der beiden Leichtketten-Typen (κ oder λ , dann als „betroffene“ Leichtkette bezeichnet) von den klonalen Plasmazellen häufig aus der Waage. Es konnte eine Korrelation zwischen der Prävalenz eines veränderten FLC-Verhältnisses und eines höheren Stadiums der monoklonalen Gammopathie sowie ein Zusammenhang zwischen dem Progressionsrisiko und der Höhe des FLC-Verhältnisses festgestellt werden⁸. So wird seit der Überarbeitung der Diagnosekriterien durch die IMWG im Jahr 2014 ein FLC-Verhältnis ≥ 100 bei gleichzeitiger Konzentration der betroffenen Leichtkette im Serum von $\geq 100\text{mg/l}$ als MDE betrachtet⁸.

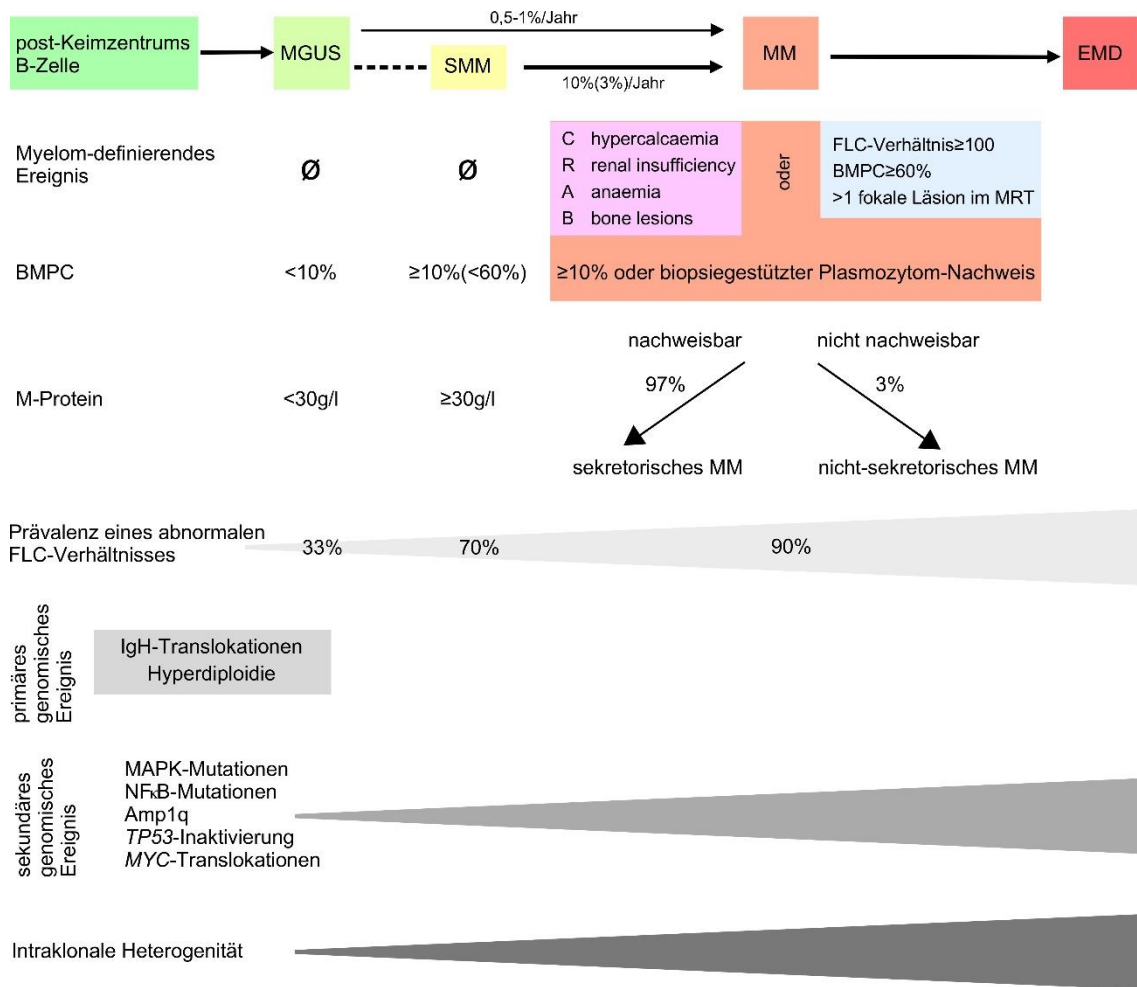


Abb. 2 **Progression einer monoklonalen Gammopathie**

Primäre genomische Ereignisse wie IgH-Translokationen oder Hyperdiploidie initiieren die cancerogene Entartung einer post-Keimzentrums-B-Zelle^{2,10,14-16}. Über die Vorstadien MGUS und SMM kann sich die Anhäufung weiterer sekundärer genetischer Alterationen in einer fortschreitenden Virulenz der klonalen Plasmazellen äußern und zu einer Manifestation der monoklonalen Gammopathie als MM führen^{2,4,15,17}. Die Wahrscheinlichkeit der Progression in ein MM beträgt dabei für eine MGUS ca. 1%/Jahr^{4,8,10,12}, für ein SMM in den ersten 5 Jahren 10%/Jahr und anschließend 3%/Jahr⁴. Die Einteilung einer monoklonalen Gammopathie in MGUS, SMM und MM richtet sich nach der An- bzw. Abwesenheit eines Myelom-definierenden-Ereignisses (MDE), der Infiltration des Knochenmarks mit klonalen Plasmazellen (BMPCs) und der M-Protein-Konzentration im Serum⁸. Beim MM wird je nach Nachweisbarkeit eines M-Proteins zwischen sekretorischem (97% der Fälle) und nicht-sekretorischem (3% der Fälle) MM unterschieden⁶. Oft werden von den monoklonalen Plasmazellen entweder κ- oder λ-Ig-Leichtketten gebildet. Dies führt zu einem abnormalen Verhältnis der, im Serum nachweisbaren, freien Ig-Leichtketten (FLC-Verhältnis)⁸. Die Prävalenz eines solchen abnormalen FLC-Verhältnisses nimmt mit Progression der monoklonalen Gammopathie zu⁸. Über alle Stadien einer monoklonalen Gammopathie hinweg, von der MGUS als Primärstadium bis hin zur Plasmazell-Leukämie als extramedulläre Manifestationsform und finales Stadium des MM, kann eine Zunahme der intraklonalen Heterogenität beobachtet werden^{2,10,16,18}. EMD extramedullary disease. Abb. modifiziert mit Erlaubnis von Macmillan Publishers Ltd: [Nature Reviews Cancer] The genetic architecture of multiple myeloma. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. 2012.

Die Zunahme der BMPCs und des M-Proteins bzw. die Entwicklung von Folgeschäden während des Evolutionsprozesses einer monoklonalen Gammopathie gehen einher mit einer wachsenden Malignität der klonalen Plasmazellen aufgrund zunehmender Komplexität deren genomischer

Veränderungen, die wiederum in primär und sekundär untergliedert werden. Als primäre genomische Ereignisse der MM-Entstehung werden einerseits die Hyperdiploidie mit multiplen chromosomalen Trisomien und andererseits Translokationen rund um den Immunglobulin-Schwerketten-Locus (IgH) auf Chromosom 14 betrachtet^{2,10,14-16}. Diese finden sich häufig bereits im Stadium der MGUS¹⁷. Während der Weiterentwicklung der MGUS hin zu einem intramedullären MM und letztendlich einem extramedullären MM oder einer Plasmazelleukämie als finalem Stadium auf dem Weg zunehmender Malignität, erleiden die klonalen Plasmazellen weitere sekundäre genomische Alterationen^{15,17}. Diese haben zumeist entweder eine proliferationsfördernde Wirkung (z.B. aktivierende Mutationen im MAPK- und NFκB- Signalweg oder MYC-Translokationen) oder eine Apoptose-Resistenz zur Folge (durch Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie *TP53*)^{2,4}. Die Mechanismen der sekundären Gen-Aktivierung bzw. -Inaktivierung sind dabei vielfältig und beinhalten sowohl Punktmutationen in einzelnen Genen, als auch Translokationen, Amplifikationen oder Deletionen ganzer Chromosomenabschnitte, sowie epigenetische Veränderungen der Genexpression durch ein aberrantes DNA-Methylierungsmuster oder eine irreguläre Chromatin Struktur durch Histon-Modifizierungen². Auch die Dysregulation von miRNAs kann eine aberrante Genexpression bewirken¹⁹. Das MM zeichnet sich durch eine ausgeprägte intraindividuelle Heterogenität mit verschiedenen Subklonen aus^{2,10,16-18}. Diese sind oft schon im Stadium der MGUS nachweisbar und befinden sich untereinander in einem evolutionären Konkurrenzkampf, in dem einzelne Klone durch Proliferations-fördernde bzw. Apoptose-inhibierende genomische Ereignisse einen Selektionsvorteil gegenüber anderen erfahren und schlussendlich im Stadium der extramedullären Erkrankung auch die Fähigkeit erlangen können, außerhalb ihrer Knochenmark-Nische zu überleben und zu proliferieren¹⁰. Bolli et al. (2014) konnten neben einer Stabilität des relativen Verhältnisses der einzelnen Klone zueinander, sowie deren jeweiligen genetischen Profilen, drei verschiedene Formen der klonalen Evolution identifizieren: Erstens eine lineare Zunahme der genetischen Alterationen innerhalb eines dominierenden Klons, zweitens ein verzweigtes

Evolutionsmuster, bei dem verschiedene Subklone verschiedene genomische Ereignisse erlitten und drittens ein unterschiedliches klonales Ansprechen auf eine eingeleitete Therapie¹⁷. Insbesondere die letzten beiden Evolutionsformen liefern die Grundlage für die alternierende Dominanz einzelner Subklone im Krankheitsverlauf und für die Selektion besonders maligner und therapieresistenter Klone in fortgeschrittenen Krankheitsstadien¹⁸.

1.3 Das Tumorsuppressorprotein p53

p53 ist Produkt des Tumorsuppressorgens *TP53*, das auf dem Chromosomenabschnitt 17p13 lokalisiert ist^{20,21} und spielt als „Wächter des Genoms“ eine entscheidende Rolle bei der Zellzyklus- und Proliferationskontrolle, der DNA-Reparatur und der Apoptose-Induktion²¹⁻²⁴. Um diese Aufgaben zu erfüllen bilden nach der Translation der p53-mRNA vier einzelne p53-Monomere ein Homotetramer^{23,25,26}, das als Transkriptionsfaktor für eine Reihe nachgeschalteter Gene fungiert. Zu diesen Zielgenen zählen unter anderem *CDKN1A*, welches für p21^{CIP1} (im Folgenden p21 genannt) kodiert und darüber einen Zellzyklusarrest bewirkt, sowie *PUMA*, *Bax*, *Noxa* (Apoptose) und *Mdm2* (Abbau und somit Autoregulation von p53)²⁷⁻³⁰. Darüber hinaus vermag p53 auch über eine mitochondriale Interaktion, und somit unabhängig von seiner Wirkung als Transkriptionsfaktor, die Apoptose einzuleiten^{27,30-32}. Im Ruhezustand einer normalen Zelle wird p53 nur gering exprimiert^{20,23,33}. Grund dafür ist die autoregulatorische Feedback-Schleife über *Mdm2* (siehe Abb. 3). *Mdm2*, selbst ein Zielgen von p53^{20,25}, kodiert für das gleichnamige Protein Mdm2, welches als E3-Ubiquitin-Ligase p53 für den proteasomalen Abbau markiert³⁰. Außerdem hemmt es selbst direkt die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor, in dem es dessen Transaktivierungs-Domäne blockiert^{23,25} und zu einer Translokation von p53 vom Zellkern ins Cytoplasma führt^{30,34}. Aufgrund des Mdm2-vermittelten Abbaus von p53 ist dessen intrazelluläre Halbwertszeit gering und die Kontrolle des p53-Spiegels vollzieht sich vor allem durch Regulierung des Abbau-Vorganges³⁰. So geschieht auch die Stabilisierung von p53 nach Zellstress in erster Linie auf posttranslationalem Wege durch Beeinträchtigung der p53-Mdm2-Interaktion. Diese Interaktions-Hemmung wird,

je nach Stimulus, vornehmlich durch zwei verschiedene Mechanismen erzielt.
 (i) Nach DNA-Schädigung wird p53 an der Mdm2-Bindungs-Domäne phosphoryliert (an den Serin Resten 15, 20 und 37)^{31,35,36} oder acetyliert³¹, dadurch seine Interaktion mit Mdm2 gestört und folglich der p53-Spiegel der Zelle erhöht.

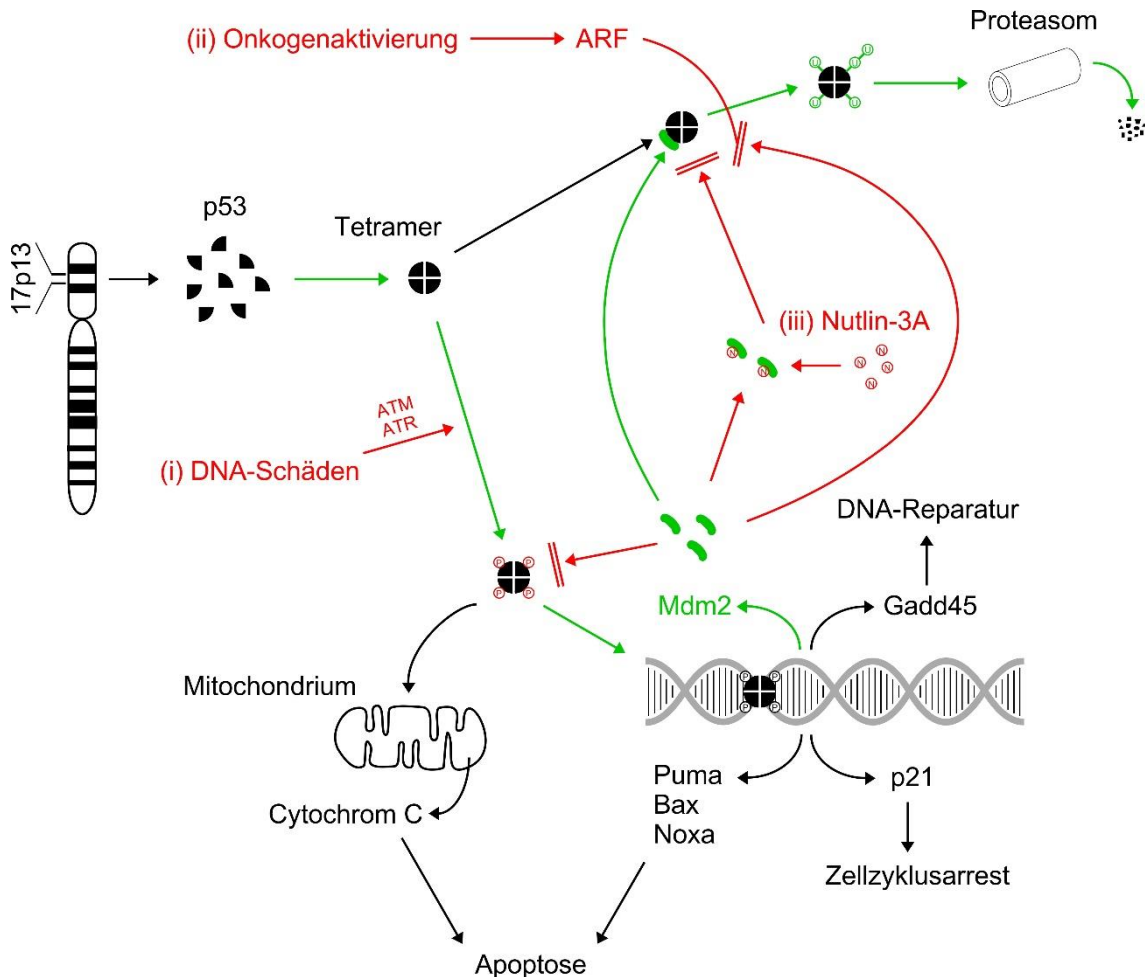


Abb. 3 **Der p53-Signalweg**

Das für p53 kodierende Gen *TP53* befindet sich auf dem Chromosomenabschnitt 17p13²¹. Je vier p53-Monomomere bilden ein Homotetramer^{23,25,26}, das als Transkriptionsfaktor für eine Reihe nachgeschalteter Gene wirkt²⁷⁻³⁰, sowie durch direkte mitochondriale Interaktion zu einer Cytochrom C Freisetzung und konsekutiv zur Apoptose führt^{27,30-32}. Zu den Zielgenen von p53 zählt auch *Mdm2*^{20,25}, dessen Produkt (Mdm2) als Ubiquitin-Ligase den proteasomalen Abbau von p53 bedingt³⁰, und somit wesentlich zur autoregulatorischen Aufrechterhaltung niedriger p53-Spiegel unter Ruhebedingungen beiträgt (grüne Pfeile). Die Erhöhung des intrazellulären p53-Spiegels geschieht durch Hemmung dieser autoregulatorischen Schleife, z.B. in Folge (i) von DNA-Schäden^{31,35,36}, (ii) einer Onkogen-Aktivierung^{23,25} oder (iii) pharmakologisch durch Nutlin-3A^{33,37,38}.

(ii) Ein weiterer Weg der p53-Mdm2-Interaktions-Hemmung wird durch Onkogen-Aktivierung initiiert. Bei dieser Form von Zellstress kommt es zur Translation des Proteins ARF (alternate reading frame)^{23,25}. ARF wirkt über eine Delokalisation von Mdm2 aus dem Nucleoplasma (und somit dem Wirkort von p53) in Richtung

Nucleolus und über eine Behinderung der Translokation des p53-Mdm2-Komplexes ins Zytosol und somit des konsekutiven Abbaus im Proteasom²⁵. Neben diesen beiden physiologischen Induktionsmöglichkeiten von p53 besteht auch die Möglichkeit der pharmakologischen Induktion durch den Mdm2-Inhibitor Nutlin-3A. Nutlin-3A ist das, im Vergleich zu Nutlin-3B, 150mal potentere Enantiomer der Racemats Nutlin-3 und behindert die p53-Mdm2-Interaktion durch Blockade der p53-Bindestelle von Mdm2^{33,37,38}. Für die physiologische Wirksamkeit von Nutlin-3A ist eine wt-Konformation von p53 erforderlich^{37,38}. Die Konsequenz der p53-Mdm2-Interaktionshemmung sowohl aufgrund natürlicher Reize, als auch pharmakologisch bedingt, ist eine Erhöhung des p53-Spiegels und folglich die Transkription der p53-Zielgene, die je nach Art und Ausmaß des Zellstress zu Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur oder zu Apoptose führen können³⁸.

Als „Wächter des Genoms“ hat p53 eine elementare Bedeutung bei der Kontrolle des Zellzyklus und Verhinderung der Krebsentstehung. Die Folge ist, dass bei ~50% der sporadischen menschlichen Tumore Mutationen dieses Tumorsuppressorgens zu beobachten sind und bei vielen weiteren indirekte Mechanismen der p53-Inaktivierung registriert werden können, z.B. Bindung an virale Proteine oder Alterationen von in den p53-Signalweg involvierten Genen²⁴. Treten Mutationen von *TP53* auf, sind diese in 95% der Fälle in den, für die DNA-Binde-Domäne kodierenden, Exons 4 bis 9 lokalisiert^{19,32}. Dies beeinträchtigt folglich die Fähigkeit von p53 als Transkriptionsfaktor zu wirken und seine Aufgaben bei der Kontrolle des Zellzyklus zu erfüllen.

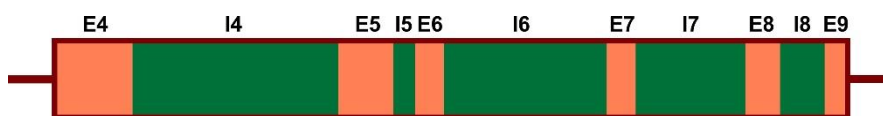


Abb. 4 ***TP53*** (Schematische Darstellung des genomischen Bereichs der DNA-Binde-Domäne)
Die Exons 4 bis 9 kodieren für die DNA-Binde-Domäne von p53¹⁹. E Exon, I Intron

1.4 Bedeutung von *TP53*-Alterationen für Staging, Prognose und Therapie des Multiplen Myeloms

Die Prognose von, an Multiplen Myelom erkrankten, Patienten hat sich seit der Jahrtausendwende stetig verbessert. Durch die kontinuierliche Einführung neuer Medikamente mit geringeren toxischen Nebenwirkungen und effektiverer anti-MM-Wirksamkeit konnte die mittlere Überlebenszeit von MM-Patienten (über alle Risikogruppen hinweg gemittelt) ab dem Zeitpunkt der Diagnose von 2,5 Jahren (2001) auf 6,1 Jahre (2010) gesteigert werden und liegt heutzutage noch deutlich darüber¹³. Nichtsdestotrotz gibt es einen Anteil an Patienten, die aufgrund bestimmter klinischer oder zytogenetischer Merkmale zu den Hochrisiko-Patienten gezählt werden müssen, nicht in demselben Umfang von den Therapie-Fortschritten profitiert haben und deshalb nach wie vor eine schlechte Prognose haben^{39,40}. Zu diesen speziellen zytogenetischen Merkmalen, die die Gruppe der Hochrisiko-Fälle definieren, zählen unter anderem Inaktivierungen des Tumorsuppressorgens *TP53*, die wiederum in mono- und biallelische Ereignisse unterteilt werden können⁴⁰. Zwei gewöhnliche Mechanismen der Inaktivierung eines *TP53*-Allels sind „missense“-Punktmutationen des Gens oder Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 17, del(17p)⁴⁰. Untersuchungen ergaben, dass das auf diesem Chromosomenabschnitt lokalisierte Tumorsuppressorgen *TP53* Teil der „minimal-deleted-region“ von 17p-Deletionen ist²¹. Walker et al. fanden 2018 in einer umfangreichen Studie mit 784 neu diagnostizierten MM-Patienten eine Prävalenz an *TP53*-Inaktivierungen zum Diagnose-Zeitpunkt von 11,3%, darunter 3,7% biallelische Ereignisse⁴⁰. Demzufolge sind Alterationen im p53-System bei Primärdiagnose eines Multiplen Myeloms als eher selten zu betrachten, häufen sich jedoch im Rezidiv^{40,41} und in fortgeschrittenen Krankheitsstadien^{42,43} und werden in Anbetracht dessen als Treiber-Ereignisse für die Progression des MM betrachtet. *TP53*-Läsionen beim Multiplen Myelom, insbesondere biallelische Inaktivierungen, werden mit einer sehr ungünstigen Prognose assoziiert^{17,40,43-45} und als Auslöser für eine Resistenzentwicklung der Myelom Zellen gegen Chemotherapeutika angesehen^{42,46}. Darum haben im Jahr 2015 *TP53*-Alterationen in Form von 17p-Deletionen auch Eingang in das, zur Risikoklassifizierung neu diagnostizierter

MM-Fälle (NDMM, newly diagnosed multiple myeloma) angewandte, überarbeitete internationale Staging-System (R-ISS, revised international staging system) gefunden^{40,45} (siehe Abb. 5). Als weitere Prädiktoren für die Prognose eines NDMM wurden β_2 -Mikroglobulin als Marker für die Tumorlast, die Reduktion des Serum-Albumins als Indikator einer Myelom-bedingten Entzündungsreaktion (durch IL-6 Sekretion), LDH als Äquivalent der Tumorlast und -aggressivität sowie weitere, mit einem schlechten Krankheitsverlauf assoziierte, chromosomale Veränderungen (t(4;14), t(14;16)) angegeben (siehe Abb. 5)⁴⁵. Das R-ISS untergliedert NDMM-Patienten in die drei Risikogruppen Standard-, Intermediär-, und Hoch-Risiko, für die jeweils unterschiedliche Überlebensraten verzeichnet wurden. So betrug die 5-Jahres-Überlebensrate in einer Publikation der IMWG aus dem Jahr 2015 bei Standard-Risiko-Fällen 82%, bei Intermediär-Risiko-Fällen 61% und bei Hoch-Risiko-Fällen 40%⁴⁵. Das R-ISS kann lediglich zur Risikoeinschätzung im Rahmen eines NDMM angewandt werden. Bei bereits vorbehandelten Patienten sind zusätzlich die Tiefe und Dauer des Therapieansprechens von großer Bedeutung^{47,48}. Zudem sind einige Faktoren nicht berücksichtigt, wie beispielsweise das Umfeld des Patienten, sein Alter und Allgemeinzustand, Komorbiditäten und auch bestimmte genetische Veränderungen mit prognostischer Relevanz (z.B. 1q-Amplifikationen) konnten aufgrund mangelnder flächendeckender Erfassung keinen Eingang in dieses Staging-System finden⁴⁵.

R-ISS		
Stadium I Standard-Risiko	Stadium II Intermediär-Risiko	Stadium III Hoch-Risiko
Serum-Albumin $\geq 3,5\text{g/dl}$ + Serum- β_2 -Mikroglobulin $< 3,5\text{mg/l}$ + normale LDH + ø Hochrisiko-CA (del(17p), t(4;14), t(14;16))	weder Stadium I noch III	Serum- β_2 -Mikroglobulin $\geq 5,5\text{mg/l}$ + <i>entweder</i> erhöhte LDH <i>oder</i> Hochrisiko-CA vorhanden (del(17p), t(4;14), t(14;16))

Abb. 5 **R-ISS**

Mit Hilfe des R-ISS können NDMM-Patienten drei verschiedenen Risikogruppen zugeordnet werden: Standard-, Intermediär- und Hoch-Risiko-Gruppe⁴⁵. Die Einteilung richtet sich dabei nach serologischen (Serum-Albumin, Serum- β_2 -Mikroglobulin, LDH) und zytogenetischen (del(17p), t(4;14), t(14;16)) Merkmalen. Das Stadium II umfasst alle Patienten, die weder Stadium I noch Stadium III zugeordnet werden können. Abb. gemäß Palumbo et al.⁴⁵. CA chromosomale Aberration.

Die zytoreduktive Behandlung des Multiplen Myeloms sollte aufgenommen werden, sobald Endorganschäden bzw. ein hohes Risiko deren baldiger Manifestierung gemäß SLiM-CRAB-Kriterien festgestellt werden⁸ und stützt sich auf verschiedene Proteasominhibitor- bzw. IMiD-basierte Chemotherapieprotokolle sowie die Melphalan-Hochdosis-Chemotherapie (HDT) mit autologer Stammzelltransplantation (ASCT)^{13,49}. Das Prinzip der Hochdosis-Chemotherapie besteht in einer möglichst vollständigen Eradikation der malignen Plasmazellen durch Einsatz von hochdosiertem Melphalan, wodurch allerdings auch das physiologische hämatopoetische System beeinträchtigt wird. Um dieses zu rekonstituieren, werden einem Patienten nach der HDT die zuvor mittels Stammzellapherese gesammelten autologen hämatopoetischen Stammzellen reinfundiert. Die myeloablative HDT mit Melphalan gefolgt von der autologen Stammzelltransplantation etablierte sich als wesentlicher Baustein der MM-Therapie und einige klinische Studien (wenngleich vor der Einführung der zahlreichen neuen Substanzen in den letzten 15 Jahren) attestierten ihr einen mittleren Überlebensvorteil von 12 Monaten^{50,51}. Auch vor dem Hintergrund inzwischen verfügbarer, effektiver Behandlungsoptionen mit Medikamenten wie Bortezomib und Lenalidomid bietet die HDT+ASCT nach wie vor Vorteile

mindestens für das progressionsfreie Überleben, manchen Studien zufolge auch für das Gesamtüberleben^{52,53}. Prinzipiell muss bei der Therapie des MM zwischen Patienten unterschieden werden, die sich für eine ASCT eignen und solchen, für die eine Stammzelltransplantation aufgrund von Gebrechlichkeit nicht in Frage kommt. Als grobe Altersgrenze wurde lange Zeit ein Alter von 65 Jahren betrachtet, jedoch hängt die erfolgreiche Durchführbarkeit einer HDT und nachfolgender autologer Stammzelltransplantation in letzter Konsequenz von der körperlichen Fitness und den Begleiterkrankungen eines Patienten ab^{39,53}. Transplantable Patienten erhalten in der Regel eine Induktionschemotherapie über 3-6 Zyklen, gefolgt von HDT+ASCT und einer Erhaltungstherapie^{13,54}. Bei Standard-Risiko-Patienten mit gutem Ansprechen auf die Induktionschemotherapie kann eine längere Fortführung des Chemotherapie-Protokolls und eine „verspätete“ ASCT zum Zeitpunkt des Rezidivs in Erwägung gezogen werden¹³. Gemäß Studien, die für Dreier-Kombinationen im Vergleich zu Zweier-Kombinationen bessere Response-Raten und ein verlängertes progressionsfreies Überleben zeigten, wird die Induktions-Chemotherapie heute wenn möglich mit der Kombination dreier verschiedener Substanzen durchgeführt^{55,56}. Diese beinhalten meist ein Corticosteroid, einen Proteasominhibitor und entweder eine immunmodulatorische Substanz oder Cyclophosphamid¹³. Hochrisiko-Patienten (u.a. solche mit del(17p)) profitieren Studien zufolge in besonderem Maße von der Verwendung eines Proteasominhibitors^{13,54,57-59}. Bei dieser Risikogruppe wird auch die Tandem-ASCT, also die in unmittelbarer Sequenz erfolgende Wiederholung einer HDT+ASCT, als alternatives und möglicherweise vorteilhaftes Therapiekonzept zur Single-ASCT in Erwägung gezogen^{49,53,57}. Nach Hochdosis-Chemotherapie und autologer Stammzelltransplantation kann durch eine Lenalidomid-Erhaltungstherapie ein verlängertes progressionsfreies⁶⁰, evtl. sogar ein verlängertes Gesamt-Überleben⁶¹, erreicht werden. Intermediär- und Hoch-Risiko-Patienten scheinen insbesondere von einer Erhaltungstherapie mit einem Proteasominhibitor zu profitieren⁶². Bei nicht transplantablen Patienten kommen, wenn möglich, die im Rahmen der Induktionschemotherapie eingesetzten Dreier-Kombinationen über einen längeren Zeitraum (meist 12 Zyklen oder mehr), eine

Kombination aus Bortezomib/Melphalan/Prednison (VMP), oder in Abhängigkeit des Fitnesszustands des Patienten reduzierte Therapieprotokolle (z.B. Zweier Kombinationen wie Lenalidomid + low-dose Dexamethason) zur Anwendung^{13,63}. Als effektive Behandlungsoption nicht transplantabler MM-Patienten hat sich auch die Ergänzung des VMP-Protokolls um den monoklonalen Antikörper Daratumumab (DaraVMP) herausgestellt⁶³.

Die Tumorzellen einer MM-Erkrankung unterliegen häufig einer klonalen Evolution mit dem Auftreten zunehmend aggressiver und therapieresistenter Klone^{10,16}, was als Grund für den rezidivierenden Charakter des Multiplen Myeloms angesehen wird^{41,64,65}. Die Anhäufung von Klonen mit *TP53*-Alterationen im Rezidiv^{40,41,66} und die nach jedem weiteren Rezidiv abnehmende progressionsfreie Überlebenszeit⁶⁷ können als ein Grund bzw. eine Folgeerscheinung dieser steigenden klonalen Virulenz betrachtet werden. Die konkrete Wahl der Medikamente in der Rezidiv-Therapie sowie die Frage nach einer erneuten ASCT richten sich nach der Aggressivität des Rezidivs bzw. dem Erfolg und der Verträglichkeit vorangegangener Therapien^{13,53,65}.

Der Nutzen der allogenen Stammzelltransplantation beim Multiplen Myelom ist nach wie vor unklar. Diese ist in der MM-Therapie als experimentelles Therapiekonzept zu werten und sollte ausschließlich im Rahmen von klinischen Studien zur Anwendung kommen⁵⁷. Einer hohen therapieassoziierten Mortalität durch eine Abstoßungsreaktion von bis zu 20% stehen lang andauernde Remissionen bei einem ähnlich großen Teil der Patienten durch den „graft-versus-myeloma“-Effekt gegenüber^{47,49}. Davon könnten insbesondere Hoch-Risiko-Patienten (u.A. solche mit *TP53*-Alterationen) profitieren, bei denen die Erfolgsaussichten der konventionellen Therapie trotz der vielfältigen neuen Substanzen weiterhin limitiert sind^{40,53,57}. Zusätzliche Studien zur genaueren Risiko-Nutzen-Einordnung sind nötig. Weitere neuartige Therapiekonzepte sind den Immuntherapien zuzuordnen. Zu diesen zählen u.a. Checkpoint-Inhibitoren, bispezifische Antikörper und CAR-T-Zellen, mit denen in klinischen Studien zum Teil vielversprechende Ergebnisse erzielt werden konnten^{68,69}.

Grundlage für die in den letzten 10 Jahren verbesserte Prognose von MM-Patienten ist neben der mittlerweile großen Auswahl verschiedener Substanzen zur MM-Therapie v.a. deren individualisierter Einsatz in Abhängigkeit von Fitness, Begleiterkrankungen und exaktem zytogenetischen Risikoprofil der Patienten. So scheinen beispielsweise Patienten mit hyperdiploidem MM besonders von einer Behandlung mit Lenalidomid zu profitieren¹³ während im Fall von t(4;14) ein gutes Ansprechen auf eine Bortezomib-basierte Therapie gezeigt wurde^{13,70}. Darüber hinaus stehen in Europa und den USA je nach Zulassungsstand der verschiedenen Medikamente unterschiedliche Therapiealternativen und -kombinationen zur Verfügung.

1.5 Genome Editing mittels CRISPR/Cas9

Das CRISPR/Cas-System ist Teil des adaptiven Immunsystems von Bakterien und Archaeen^{71,72}. Diesen dient es vor allem zur Abwehr von Phagen und infektiösen Plasmiden^{73,74}. Ziel des Systems ist es, bei einer Reinfektion mit einem infektiösen Agens, dieses dadurch unschädlich zu machen, dass eindringende Fremd-DNA bei einer bestimmten (Wieder-)Erkennungssequenz, dem sogenannten Protospacer, durchschnitten wird^{71,73}. Dazu werden bei Primärinfektion mit einem Erreger Protospacer in palindromische Wiederholungssequenzen des Wirt-Genoms integriert (dann Spacer genannt)⁷¹⁻⁷³. Diese, durch Spacer unterbrochenen, palindromischen Wiederholungssequenzen im Wirt-Genom werden als CRISPR-Sequenzen (clearly regular interspaced short palindromic repeats) bezeichnet⁷³. Die Transkription der CRISPR-Sequenzen führt zur Bildung von CRISPR-RNA (crRNA), welche an eine komplementäre Zielsequenz der Erreger-DNA binden kann⁷⁴. Die Zerstörung der Erreger-DNA wird durch CRISPR-assoziierte (CRISPR-associated, Cas) Endonukleasen bewerkstelligt⁷⁵. Es gibt drei verschiedene Typen von CRISPR/Cas-Systemen. Beim Typ-II-System erfolgt die Rekrutierung der Endonuklease Cas9 und die RNase-III-vermittelte Prozessierung der crRNA unter Mitwirkung einer transactivating crRNA (tracrRNA)^{74,75}. Die Endonuklease-Aktivität von Cas9 zur Spaltung doppelsträngiger DNA ist abhängig von einem, an den Protospacer angrenzenden, PAM (protospacer adjacent motif) bestehend aus einem

beliebigen Nukleotid gefolgt von zwei Guanosin-Nukleotiden (NGG) (siehe Abb. 6, **A** und **C**)⁷⁵. Cas9 verursacht 3 Nukleotide vor dem PAM einen Doppelstrangbruch (DSB) in der Ziel-DNA^{75,76}.

Das CRISPR/Cas9 System kann zum gezielten Abändern von Genen verwendet werden⁷⁵⁻⁷⁷. Nach dem Einführen eines DSBs durch Cas9 erfolgt die Verknüpfung der DNA-Strang-Enden und somit die Reparatur des DSBs entweder durch homology directed repair (HDR) oder durch non-homologous end joining (NHEJ)^{78,79}. Bei der HDR dient eine DNA-Sequenz als Vorlage für die Reparatur des DSBs, so dass bei Verwendung des zweiten, intakten Allels als Vorlage eine *restitutio ad integrum* erfolgen kann⁷⁹. Im Rahmen des Genome Editing bietet die HDR die Möglichkeit durch Bereitstellung von DNA-Matrizen (z.B. durch Co-Transfektion bestimmter Oligonukleotide) gezielte (Punkt-) Mutationen zu erzeugen und damit entweder intakte Gene zu mutieren, oder mutierte Gene zu reparieren^{76,80}. Beim NHEJ erfolgt die Verknüpfung der durch den DSB entstandenen Strang-Enden ohne vorheriges bzw. durch zufälliges Ersetzen der verlorengegangenen Nukleotide⁷⁸. Die Folge sind Deletionen bzw. Insertionen variabler Länge, die u.U. zu einer Leseraster-Verschiebung führen können und meist einen funktionellen Knockout des betroffenen Allels zur Folge haben⁸¹. Zum Zwecke des Genome Editing wurden Plasmide hergestellt, die kodierende Sequenzen für die Bestandteile des CRISPR/Cas9-Systems, also crRNA, tracrRNA und Cas9 enthalten (siehe Abb. 6, **B**). Die Sequenzen für die ursprünglich eigenständige crRNA bzw. tracrRNA sind dabei zur einfacheren Handhabung fusioniert worden ("guideRNA" (gRNA))⁷⁶. Untersuchungen zeigten, dass durch Verknüpfung des 3'-Endes der crRNA mit dem 5'-Ende der tracrRNA bei gleichzeitiger Nachahmung der Sekundärstruktur des ursprünglichen crRNA:tracrRNA-Komplexes, die zielgenaue Endonuklease-Aktivität des CRISPR/Cas9-Systems unbeeinträchtigt bleibt⁷⁵. Zur bedarfsgerechten Anwendung kann vom Anwender in die, von kommerziellen Anbietern erhältlichen, Plasmide noch die entsprechende Spacer-Sequenz kloniert werden.

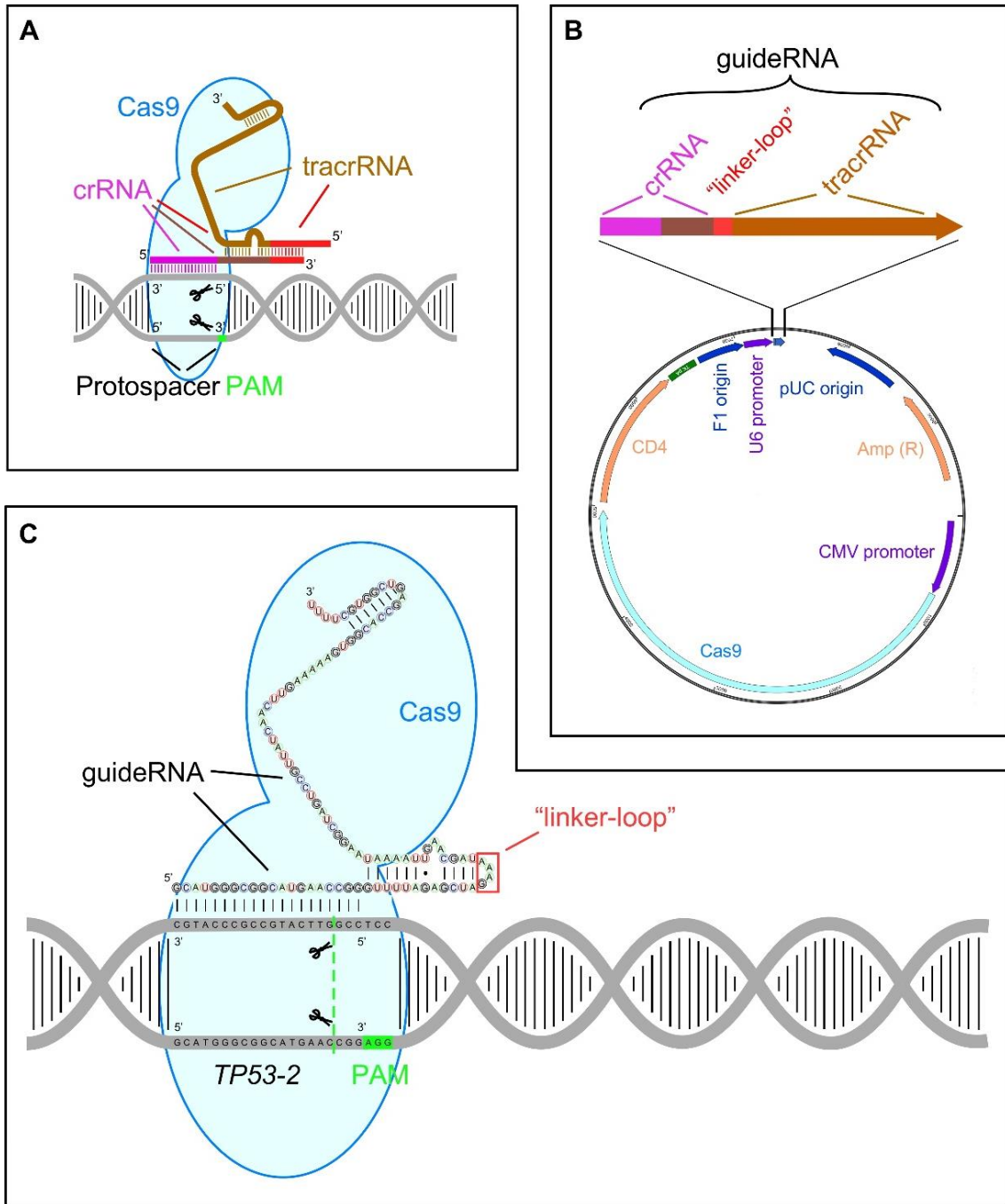


Abb. 6 **CRISPR/Cas9-System**

(A) Ursprünglich besteht das CRISPR/Cas9-System aus den beiden einzelnen RNA-Molekülen crRNA und tracrRNA, sowie der Endonuklease Cas9⁷¹⁻⁷⁴. Die crRNA enthält die zielspezifische Sequenz mit einer Länge von 20 Nukleotiden (lila)⁷⁶. (B) Zum Zwecke des Genome Editing wurden Plasmide konstruiert, die für die Komponenten des CRISPR/Cas9-Systems kodieren⁷⁶. crRNA und tracrRNA wurden dabei durch einen „linker-loop“ (Verbindungsschleife) zu einer guideRNA fusioniert⁷⁵. Vektorkarte (reduziert) des in der vorliegenden Arbeit verwendeten GeneArt® CRISPR Nuclease Vectors (vollständige Vektorkarte siehe Website des Herstellers). (C) In der vorliegenden Arbeit verwendete guideRNA. Diese entstand durch Verbindung der vormals eigenständigen crRNA und tracrRNA durch den „linker-loop“, bestehend aus den 4 Nukleotiden GAAA^{75,76}. Beispielhaft ist die TP53-Zielsequenz TP53-2 dargestellt, an deren 3'-Ende angrenzend sich das PAM AGG befindet. Der DSB wird durch Cas9 drei Nukleotide (in Richtung 5'-Ende) vor dem PAM verursacht⁷⁵.

1.6 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es mittels CRISPR/Cas9-System ein Zelllinienmodell zur Untersuchung der Bedeutung mono- und biallelischer *TP53*-Inaktivierungen für die Funktionalität des p53-Systems beim Multiplen Myelom zu etablieren. Mit diesem sollte insbesondere die Resistenzentwicklung gegen verschiedene, z.T. in der Therapie des MM angewandte, Medikamente untersucht werden. Zu testende Substanzen waren der unmittelbar über eine p53-Induktion wirkende Mdm2-Inhibitor Nutlin-3A³⁸, das in der MM-Therapie flächendeckender Nutzung unterliegende Alkylans Melphalan^{13,49-51}, der ebenfalls über DNA-Schädigung und das p53-System wirkende Topoisomerase-II-Inhibitor Etoposid⁸², sowie Bortezomib und Carfilzomib, welche zur Medikamentengruppe der Proteasominhibitoren zählen. Diese Substanzklasse hat einen maßgeblichen Anteil an der, in den letzten beiden Jahrzehnten, stetig verbesserten Prognose von MM-Patienten¹³ und zeigt auch bei der Behandlung von Hochrisiko-MM-Patienten ein günstiges Wirkungsprofil⁸³.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Zelllinien des multiplen Myeloms wurden von kommerziellen Anbietern bezogen (siehe Tab. 1). Die Zellen wuchsen in einer Suspensions-Kultur, zwei der Zelllinien (MM1.S und MOLP-8) mit semiadhärentem Wachstumsverhalten.

Tab. 1 **MM-Zelllinien**

In vorliegender Arbeit verwendete Zelllinien mit Angabe der Bezugsquelle, des Zelltyps und des Wachstumsverhaltens.

Zelllinie	Bezugsquelle und Nummer	Zelltyp	Wachstumsverhalten
AMO-1	DSMZ ACC 538	Plasmozytom	in Suspension
MM.1S	ATCC® CRL-2974™	M. Myelom	semiadhärent
NCI-H929	DSMZ ACC 163	M. Myelom	in Suspension
MOLP-8	DSMZ ACC 569	M. Myelom	semiadhärent

Genannte Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ in dem Medium RPMI 1640 kultiviert. Diesem zugesetzt waren FBS (fötales Kälberserum) bis zu einer finalen Konzentration von 10%, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 2mM L-Glutamin, 1mM Natriumpyruvat und bei der Zelllinie NCI-H929 zusätzlich 50µM β-Mercaptoethanol. RPMI-1640 Medium mit den genannten Zusätzen wird im Folgenden als Vollmedium bezeichnet. Die einzelnen Zellkulturen wurden im Durchschnitt alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:4 bis 1:8 gesplittet, spätestens jedoch bei Farbumschlag des Mediums von Rot zu Gelb. Dazu wurden die Zellkulturen gründlich durchmischt und bei den Zelllinien MM.1S und MOLP-8 der adhärenente Anteil mittels Zellschaber gelöst und anschließend resuspendiert. Der überschüssige Anteil der Zellsuspension wurde entsorgt und der Rest mit Vollmedium aufgefüllt.

2.2 Bestimmung der Zellzahl

Diese wurde mittels Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu wurden 20µl der zu untersuchenden Zellsuspension mit einer

identischen Menge Trypanblau versetzt. Trypanblau vermag die intakte Zellmembran lebendiger Zellen nicht zu überwinden, bindet jedoch bei toten Zellen ohne intakte Zellmembran an intrazelluläre Proteine und färbt diese folglich blau an. Dadurch können vitale von toten Zellen unterschieden werden und die Konzentration vitaler Zellen in einer Zellsuspension bestimmt werden.

2.3 Kryokonservierung von Zellen

Einige Klone der Zelllinien AMO-1 und MM.1S, sowie ein MOLP-8-Klon wurden zur längerfristigen Aufbewahrung tiefgefroren. Von den einzufrierenden Klonen wurde zunächst die Zellkonzentration bestimmt und anschließend ein $5 \cdot 10^6$ Zellen entsprechendes Volumen der Zellsuspension bei $293 \times g$ pelletiert. Der Medium-Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1ml Einfriermedium (bestehend aus 90% FBS und 10% DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt, sowie anschließend bei -80°C tiefgefroren. Die langfristige Lagerung erfolgte in Flüssigstickstoff.

2.4 Elektroporation

Mit Hilfe der Elektroporation ist es möglich DNA in eine eukaryotische Zelle einzuschleusen. Durch den kurzzeitigen Aufbau eines elektrischen Feldes wird die, physiologischerweise für DNA undurchlässige, Zellmembran kurzzeitig für diese permeabel. Da diese Permeabilitätssteigerung die Zellen jedoch einem osmotischen Stress aussetzt und es den Zellen erschwert ihr physiologisches Zellmilieu aufrecht zu erhalten, ist die Methode mit einem Verlust an vitalen Zellen verbunden.

Zunächst wurde die Zellkonzentration in den Zellkulturflaschen bestimmt. Das der benötigten Zellzahl entsprechende Volumen wurde entnommen. Die benötigte Zellzahl hing vorrangig von der verwendeten Zelllinie und deren Transfektionsrate ab. So waren für eine ausreichende Anzahl erfolgreich transfizierter Zellen ca. $5 \cdot 10^6$ AMO-1 und $40 \cdot 10^6$ MM.1S, NCI-H929 und MOLP-8 Zellen erforderlich. Es folgte die 5-minütige Zentrifugation bei $293 \times g$ in einem

50ml Falcon-Tube. Überstieg die benötigte Menge Zellsuspension die Kapazität eines 50ml Falcon-Tubes, wurden beide Zellpellets beim folgenden PBS-Waschschritt zusammengeführt. Dieser wurde mit 10ml PBS durchgeführt, in denen das Zellpellet sorgfältig resuspendiert wurde. Hierauf schloss sich eine weitere 5-minütige Zentrifugation bei 293xg und die anschließende Entfernung des PBS-Überstands an. Die Zellpellets wurden nun in RPMI-1640 Medium (ohne Zusätze) resuspendiert, welches zuvor mit den zu transfizierenden Plasmiden versetzt worden war. Die verwendeten Plasmide mit ihrer jeweiligen Gebrauchskonzentration sind in Tab. 2 gelistet.

Tab. 2 **Zur Elektroporation verwendete Plasmide**

Die genannten Plasmide wurden in der jeweils angegebenen Konzentration zur Elektroporation eingesetzt. Elektroporationen erfolgten entweder unter alleiniger Verwendung des EGFP-Expressions-Plasmids (für Spannungsreihen, siehe 3.2) oder mittels Kombination von EGFP-Expressions-Plasmid und einem (Einzelanwendung) oder beiden (Doppelanwendung) GeneArt® CRISPR Nuclease Vektoren (für die Generierung *TP53*-inaktivierter Klone).

verwendetes Plasmid	Zur Elektroporation eingesetzte Konzentration
EGFP-Expressions-Plasmid pEGFP-N3	5µg/ml
GeneArt® CRISPR Nuclease Vector (Einzelanwendung)	25µg/ml
GeneArt® CRISPR Nuclease Vector (Doppelanwendung)	je 20µg/ml

Die Elektroporation erfolgte zu je 500µl in 4mm-Küvetten mittels Gene Pulser XCell™. Die optimale Elektroporations-Spannung wurde für jede einzelne Zelllinie anhand einer Spannungsreihe ermittelt (siehe 3.2). Anschließend wurden die elektroporierten Zellen mit vorgewärmtem Vollmedium in Kultur genommen.

2.5 OptiPrep

Mittels OptiPrep können vitale von toten Zellen getrennt werden. Dabei macht man sich die Dichte-Unterschiede lebendiger und toter Zellen zu Nutze. Bei eintretendem Zelltod verlieren die betroffenen Zellen die Kompetenz den osmotischen Gradienten zwischen Zytosol und Extrazellulärraum aufrecht zu

erhalten. Durch die Zugabe von OptiPrep-Reagenz (Iodixanol) wird die Dichte des Mediums über die der lebendigen Zellen angehoben, so dass intakte Zellen bei Zentrifugation flottieren, zerstörte dagegen sedimentieren. Eine Überschichtung der Zellsuspension mit reinem PBS bewirkt die Ansammlung der flottierenden lebenden Fraktion an der Phasengrenze, von wo sie sauber abgenommen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die OptiPrep-Dichtegradientenzentrifugation zur Anreicherung vitaler Zellen nach Elektroporation eingesetzt. Dazu wurde am Folgetag der Elektroporation die Kultur der elektroporierten Zellen für 5 Minuten bei $293\times g$ zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1ml RPMI-1640-Medium (ohne Zusätze) resuspendiert, in ein 5ml-FACS-Röhrchen überführt und mit 300 μ l OptiPrep-Reagenz versetzt. Es folgte die vorsichtige Überschichtung mit 200 μ l PBS und eine erneute 7-minütige Zentrifugation bei $2500\times g$. Anschließend wurden die vitalen Zellen an der Phasengrenze entnommen, mit Vollmedium gewaschen und wieder in Kultur genommen.

2.6 Zytotoxizitäts-Assays

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Zytotoxizitäts-Assays verwendet. Die Annexin-V-PI-Messung und der alamarBlue-Assay. Sie dienen der Untersuchung des Ansprechens der verschiedenen Klone auf die Medikamente Melphalan (Alkylans), Etoposid (Topoisomerase-II-Hemmstoff), Bortezomib (Proteasominhibitor) und Carfilzomib (Proteasominhibitor), sowie der Reaktion auf Nutlin-3A (Mdm2-Inhibitor).

Beiden Messmethoden war eine 3- bzw. 4-tägige Behandlung (siehe Abb.7) mit einem der Wirkstoffe in verschiedenen Konzentrationen vorgeschaltet. Die Spanne der getesteten Konzentrationen erstreckte sich von 0,625 μ M-20 μ M (Nutlin-3A), 1,25 μ M-20 μ M (Melphalan), 0,03125 μ M-8 μ M (Etoposid) und 0,5nM-5nM (Bortezomib und Carfilzomib). Außerdem wurde eine Lösungsmittelkontrolle der jeweiligen Substanz mitgeführt. Diese entsprach der Menge des Lösungsmittels in dem Well mit der höchsten Wirkstoffkonzentration. Sowohl die

medikamentöse Behandlung, als auch die Lösungsmittelkontrolle, erfolgte stets in zweifacher Ausführung um Doppelwerte zu erhalten und einen Mittelwert bilden zu können. Die Versuche wurden in einer 96-Well-Platte mit je 20000 Zellen/Well durchgeführt.

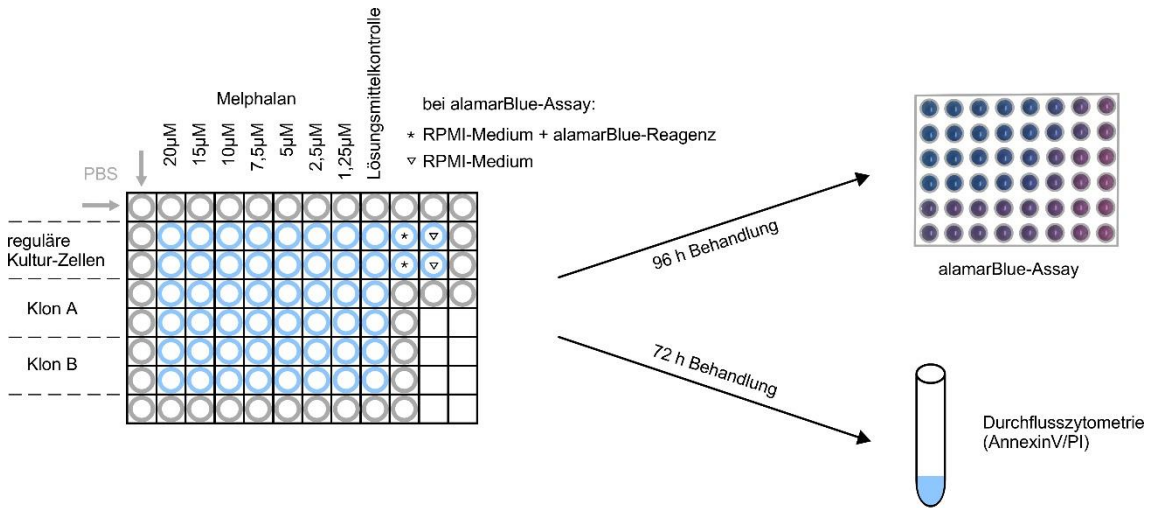


Abb. 7 **Zytotoxizitäts-Assay**

Die Abbildung zeigt exemplarisch den Aufbau eines Zytotoxizitäts-Assays mit Melphalan. In doppelter Ausführung wurden die Zellen der regulären Kultur bzw. der Klone einer Behandlung mit Melphalan in den Konzentrationen 20µM, 15µM, 10µM, 7,5µM, 5µM, 2,5µM und 1,25µM ausgesetzt. Um einen Einfluss des Lösungsmittels auf die Zellviabilität auszuschließen, wurde außerdem eine Lösungsmittelkontrolle mit Ethanol mitgeführt. Beim alamarBlue-Assay dienen zwei mit Medium gefüllte Wells als Korrekturhilfen, sowie zwei mit Medium und alamarBlue-Reagenz gefüllte Wells als Referenzwert für nicht reduziertes alamarBlue-Reagenz in Medium (die alamarBlue-Reagenz-Zugabe erfolgte 6-7 Stunden vor der Messung). Nach 3-tägiger Behandlung erfolgte die durchflusszytometrische Annexin-V-PI-Messung (Nutlin-3A) bzw. nach 4-tägiger Behandlung der alamarBlue-Assay (Melphalan, Etoposid, Bortezomib und Carfilzomib).

2.6.1 Annexin-V-PI-Messung

Die Annexin-V-PI-Messung macht sich den Umstand zu Nutze, dass bei einer Zelle im physiologischen Zustand Phosphatidylserin nur auf zytoplasmatischer Seite der Zellmembran nachgewiesen werden kann, wohingegen dieses im Frühstadium der Apoptose auch auf der Außenseite erscheint. Das Protein Annexin-V bindet an Phosphatidylserin und kann, durch Kopplung an den Fluoreszenz-Farbstoff FITC, zum durchflusszytometrischen Nachweis einer einsetzenden Apoptose genutzt werden. Da bei fortschreitendem Zelltod die Zellmembran zunehmend permeabel wird und Annexin-V auch an das Phosphatidylserin auf zytoplasmatischer Seite binden kann, wird zur Diskrimination einer frühapoptotischen von einer spätapoptotischen/nekrotischen

Zelle Propidiumjodid (PI) verwendet. Der Fluoreszenz-Farbstoff PI ist ein DNA-Interkalator, der die intakte Plasmamembran nicht zu überwinden vermag und daher erst bei fortgeschrittenem Zelluntergang Kontakt zur DNA erlangen kann. Aufgrund des Unterschieds der Fluoreszenzemissionsmaxima von FITC (519nm) und PI (617nm) können somit auf einfache Weise frühapoptotische von spätapoptotischen/nekrotischen Zellen unterschieden werden.

Mittels Annexin-V-PI-Messung wurde der Anteil lebendiger und apoptotischer/nekrotischer Zellen an der Zellpopulation nach 3-tägiger Nutlin-3A-Exposition erfasst und durch das in-Relation-Setzen mit der Lösungsmittelkontrolle das relative Überleben bestimmt (Methode der Durchflusszytometrie und praktische Durchführung der Annexin-V-PI-Messung siehe 2.7).

2.6.2 alamarBlue-Assay

Je aktiver eine Zelle ihren Stoffwechsel betreibt, desto größer ist ihr Vermögen den blau fluoreszierenden Farbstoff Resazurin zum violett fluoreszierenden Resorufin zu reduzieren. Aufgrund der unterschiedlichen Absorptionswerte von Resazurin und Resorufin ist es möglich photometrisch die Umwandlung von Resazurin zu Resorufin zu quantifizieren und dadurch Rückschlüsse auf die Zellviabilität zu ziehen. Diese stellt einen Summenwert für die metabolische Aktivität dar, in den neben der Stoffwechselaktivität auch Proliferation und Zelltod mit eingehen.

Nach 4-tägiger Behandlung der, wie oben beschrieben vorbereiteten, Platten mit dem jeweiligen Medikament, erfolgte die Zugabe von alamarBlue-Reagenz (Resazurin) gemäß Protokoll des Herstellers. Pro Well der 96-Well-Platte wurden 10% der bereits vorhandenen Flüssigkeitsmenge an alamarBlue-Reagenz hinzugefügt. Um bei der großen Anzahl anfallender Pipettiervorgänge Zeit zu sparen und um die Applikation einer identischen Menge alamarBlue-Reagenz in jedes Well zu gewährleisten, wurde dafür eine Multipette verwendet. Nach dem einmaligen Auffüllen des Pipettenaufsatzes mit alamarBlue-Reagenz, wurden je 20µl Reagenzlösung in jedes Well, bis auf die zwei mit reinem Medium gefüllten

Wells, gegeben. Dabei wurde die Pipettenspitze während des Pipettiervorganges stets auf den Flüssigkeitsspiegel des Wells aufgesetzt, um die Oberflächenspannung zu reduzieren und eine gleichmäßige Abgabe der Resazurinlösung zu erreichen. Das Auslesen der Platten erfolgte nach ca. 6-7-stündiger Inkubation im Zellkulturbrutschrank. Gemessen wurde die Absorption von monochromatischem Licht der Wellenlängen 570nm und 600nm mittels einem Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad). Anhand der Absorptionswerte konnte nach Korrelation mit den Kontrollwerten die relative prozentuale Reduktion des alamarBlue-Reagenzes als Maß für die Zellviabilität berechnet werden. Aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen wurden Mittelwerte und Fehlerbalken errechnet (siehe 3.8).

2.7 Durchflusszytometrie

Durch den Einsatz der Durchflusszytometrie können Zellen genauer auf verschiedene Merkmale hin untersucht werden. Dazu werden die gewonnenen Proben mit einem FACS (fluorescence activated cell sorter) analysiert. Dieses führt die Zellsuspension der Messküvette als laminaren Flüssigkeitsstrom an einem Laser vorbei. Der laminare Flüssigkeitsstrom gewährleistet die Registrierung einzelner Zellen. Durch die Detektion des Ausmaßes der Streuung des Lasers können Rückschlüsse auf einige Eigenschaften der Zellen gezogen werden. Das Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter, FSC) korreliert mit der Größe der Zelle, das Seitwärtsstreulicht (Sidescatter, SSC) mit der Granularität. Darüber hinaus können mit dem SSC auch Fluoreszenzfarbstoffe erfasst werden, mit denen, beispielsweise an Antikörper gekoppelt, gezielt Proteine markiert werden können.

2.7.1 Probenvorbereitung

Proben wurden in ein 5ml-FACS-Röhrchen überführt. Es folgte die Zugabe von 4ml PBS und eine 5-minütige Zentrifugation bei 293xg (PBS-Waschschritt). Bei Proben mit einem Volumen >200µl war dem PBS-Waschschritt eine Pelletierung der Zellen (5 Minuten, 293xg) und Entfernung des Mediums vorgeschaltet. Die

grobe Entfernung des Flüssigkeitsüberstandes nach PBS-Waschschritt wurde durch Entleeren der FACS-Röhrchen in einen Abfallbehälter erreicht. Die feine Entfernung der übriggebliebenen Flüssigkeit geschah durch vorsichtiges Ausklopfen der FACS-Röhrchen auf Papier. Anschließend erfolgte die Zugabe der Fluorochrome. Dabei wurde je nach Versuchsaufbau zwischen zwei verschiedenen Konstellationen gewählt.

2.7.2 Annexin-V-PI-Messung

Die Annexin-V-PI-Messung wurde beim Zytotoxizitäts-Assay mit Nutlin-3A angewandt, um das Zellüberleben der Klone nach Nutlin-3A-Behandlung zu untersuchen. Zunächst wurde eine Arbeitslösung hergestellt deren Zusammensetzung folgende Tabelle zeigt.

Tab. 3 Zusammensetzung der Arbeitslösung für die Annexin-V-PI-Messung

Annexin-V/FITC-Bindepuffer	PI-Stammlösung	Annexin-V/FITC-Stammlösung
Menge pro Messansatz [μ l]		
200	4	1

Für einen Versuch mit z.B. 300 Proben bestand die Arbeitslösung aus $300 \cdot 200 \mu$ l = 60ml Annexin-V/FITC-Binde-Puffer, $300 \cdot 4 \mu$ l = 1,2ml PI-Stammlösung und 300μ l Annexin-V/FITC-Stammlösung. In jedes FACS-Röhrchen wurden 200μ l der Arbeitslösung appliziert und das Zellpellet gründlich (durch auf- und abpipettieren) resuspendiert. Dadurch ergab sich ein Überschuss von 2,5% an Arbeitslösung ($\frac{200 \mu\text{l} + 4 \mu\text{l} + 1 \mu\text{l}}{200 \mu\text{l}} = 102,5\%$) um einem etwaigen Mangel durch Pipettierungenauigkeit vorzubeugen.

2.7.3 EGFP-PI-Messung

EGFP, ein gentechnisch modifiziertes, grün fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein), kann mittels FACS-Analyse detektiert werden. Wurde zuvor der Versuch unternommen, Zellen mit einem EGFP-Expressions-Plasmid

zu transfizieren, so stellt der Anteil EGFP-positiver Zellen in der FACS-Analyse ein Maß für die Effektivität der Elektroporation dar. Durch die gleichzeitige Erfassung PI-positiver Zellen wird der Verlust an vitalen Zellen abgebildet. Die EGFP-PI-Messung wurde in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der zelllinienspezifischen, optimalen Elektroporations-Spannung durch eine Spannungsreihe (siehe 3.2) oder zur Überprüfung der Effektivität eines OptiPreps (siehe 2.5) eingesetzt.

Auch bei der EGFP-PI-Messung wurde zunächst eine Arbeitslösung hergestellt.

Tab. 4 Zusammensetzung der Arbeitslösung für die EGFP-PI-Messung

PBS	PI-Stammlösung
Menge pro Messansatz [μ l]	
200	4

Jedem FACS-Röhrchen wurden 200 μ l der Arbeitslösung zugeführt und das Zellpellet sorgfältig resuspendiert. Auch hier diente der Überschuss von 2% an Arbeitslösung ($\frac{200\mu\text{l}+4\mu\text{l}}{200\mu\text{l}} = 102\%$) dem Ausgleich einer Ungenauigkeit der Pipette.

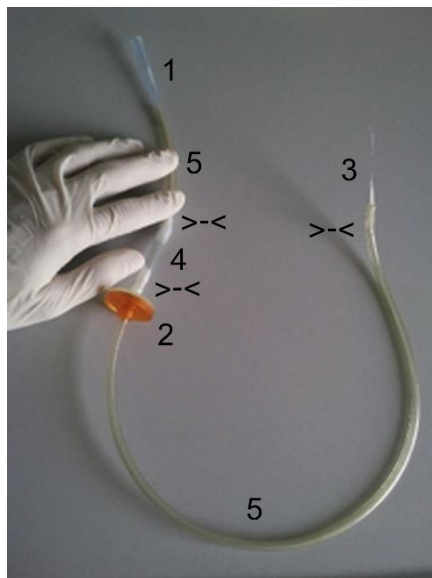
2.7.4 Messvorgang und Auswertung

Sowohl Annexin-V-PI-Messung, als auch EGFP-PI-Messung wurden mit einem FACSCalibur und der Software CellQuest durchgeführt und anschließend mit dem Programm FlowJo ausgewertet.

2.8 Selektionierung von Einzelzell-Klonen

In der vorliegenden Arbeit sollten mittels CRISPR/Cas9-System mono- bzw. biallelisch *TP53*-inaktivierte Klone generiert werden und mit diesen die Bedeutung einer solchen *TP53*-Inaktivierung bei verschiedenen MM-Zelllinien untersucht werden. Dazu war es notwendig nach Transfektion des GeneArt® CRISPR Nuclease Vectors einzelne Zellen zu selektionieren um die Entstehung

von Populationen isogener Zellen (Klone) zu gewährleisten. Diese Einzelzell-Selektionierung erfolgte per Hand mittels selbstkonstruierter Mund-Saug-Pipette (siehe Abb. 8, Anleitung von Dr. Thorsten Stühmer). Die Transfektion von MM-Zellen mit dem GeneArt® CRISPR Nuclease Vector erfolgte stets unter Ko-Transfektion des EGFP-Expressions-Plasmids. Da stark EGFP-positive Zellen analog auch stark mit dem GeneArt® CRISPR Nuclease Vector transfiziert worden sind, erfolgte unter Zuhilfenahme eines Fluoreszenzmikroskops die gezielte Selektionierung und Vereinzelung von optisch einwandfreien Zellen.



- 1 1ml-Pipettenspitze
- 2 0,45µm-Filter
- 3 Pasteurpipette
- 4 starrer Schlauch
- 5 flexibler Schlauch
- >-< Konnektionsstellen, mit Parafilm abgedichtet

Abb. 8 **Mund-Saug-Pipette**
Zur Selektionierung von Einzelzell-Klonen verwendete Pipette.

Die Konnektionsstellen wurden mit Parafilm luftdicht abgedichtet. Die Glaspipettenspitzen wurden über einer Bunsenbrenner-Flamme erhitzt, und sobald das Glas flüssig geworden war, ruckartig (aber trotzdem vorsichtig) auseinandergezogen und gebogen (Zielwinkel 30-60°), um eine möglichst dünne, abgewinkelte Kapillare zu erhalten. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden durch vorsichtigen Aufbau eines Unterdrucks am Mundstück einzelne grün-fluoreszierende Zellen eingesaugt und in Wells einer 96-Well-Platte überführt. Anschließend wurde sorgfältig kontrolliert, dass sich in jedem Well höchstens eine Zelle befand.

2.9 Western Blot

Der Western Blot dient der Antikörper-vermittelten Detektion bestimmter Proteine aus einem Zelllysat. Die Auftrennung der Proteine geschieht mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). SDS dient als anionisches Detergens der Denaturierung und Linearisierung von Proteinen. Dabei lagert sich dieses in einem konstanten Verhältnis zum Molekulargewicht an die Proteine an und bewirkt eine negative Ladung dieser, wodurch die Auftrennung des Proteingemisches nach Größe in einem elektrischen Feld ermöglicht wird. In einem dreidimensionalen Netz, gebildet aus durch N,N'-Methylenbisacrylamid quervernetzten Acrylamidmonomeren, wandern kleinere Proteine schneller zur Anode als größere. Im Anschluss an die Gelelektrophorese werden die nach Größe aufgetrennten Proteine während des „Blottings“ auf eine Membran übertragen. Dort können die Proteine mittels spezifischer Antikörper (in der vorliegenden Arbeit gerichtet gegen p53, β -Aktin, p21 und Mdm2) detektiert werden.

2.9.1 Herstellung der Gele

Ein Gel für die SDS-PAGE setzt sich aus zwei Arten von Gelen zusammen: Dem Sammel- und Trenngel. Das Sammelgel hat aufgrund der geringeren Acrylamid-Konzentration (6%) eine größere Porenweite und dient der Fokussierung der in den Geltaschen befindlichen Proteine, so dass ein gleichzeitiger Eintritt in das Trenngel gewährleistet ist. Dort bewirkt die kleinere Porenweite, verursacht durch die höhere Acrylamid-Konzentration (12%), eine langsamere Laufgeschwindigkeit der größeren Proteine im elektrischen Feld und somit eine Auftrennung des Proteingemisches.

Das Gießen der Gele geschah in folgenden Schritten. Zunächst wurden die Kammern zusammengebaut und mit Wasser deren Dichtigkeit überprüft. Nach dem vollständigen Entfernen des Wassers (unter Zuhilfenahme eines Papiertuchs) wurden die Komponenten von Sammel- und Trenngel (siehe Tab. 5) in einem Falcon-Tube (15ml bzw. 50ml) vermengt. Da die Zugabe von

APS die Polymerisation des Gels startet, erfolgte diese erst unmittelbar vor Befüllen der Kammern. Als Erstes wurden die Kammern mit dem Trenngel bis ca. 1,5cm unterhalb des Kammes befüllt. Dabei mussten Luftblasen in der Kammer vermieden werden. Um eine gerade und glatte Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel zu erhalten, folgte die Überschichtung des noch flüssigen Trenngels mit Isopropanol. Nach der Aushärtung des Trenngels (Kontrolle anhand der Reste im Falcon-Tube) und der vollständigen Entfernung des Isopropanols wurde die Kammer mit dem Sammelgel (nach Zugabe des APS) bis knapp unter den Rand gefüllt. Für die Bildung der Geltaschen wurde ein Kamm eingesetzt. Nach abgeschlossener Polymerisation des Gels wurde dieses bis zur Verwendung für eine SDS-PAGE in ein feuchtes Papiertuch und Frischhaltefolie eingewickelt und bei 4°C aufbewahrt.

Tab. 5 **Sammel- und Trenngel**

Untenstehende Tabelle zeigt die Zusammensetzung eines 12%-Acrylamid-Trenngels und eines 6%-Acrylamid-Sammelgels für die SDS-PAGE. Rotiphorese30 ist eine 30-prozentige Lösung von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid. APS und TEMED bewirken die Quervernetzung von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid und führen damit zur Ausbildung des dreidimensionalen Netzes des Trenngels. Volumenangaben ausreichend für 4 Gele.

*für 500ml Trenngelpuffer **für 500ml Sammelgelpuffer

Reagenz	Trenngel 12%	Sammelgel 6%
Rotiphorese 30%	9,3ml	2,1ml
Trenngelpuffer 4x	5,7ml	
TRIS-Base 1,5M (90,755g*)		
SDS 0,015M (2,162g*)		
pH-Wert-Einstellung auf 8,8		
Sammelgelpuffer 4x		2,6ml
TRIS-Base 0,5M (30,252g**)		
SDS 0,015M (2,162g**)		
pH-Wert-Einstellung auf 6,8		
VE-Wasser	8,1ml	2,9ml
APS 10%	390µl	63µl
TEMED	32,3µl	5,25µl

2.9.2 Probengewinnung

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Western Blot stets die Nutlin-3A-abhängige Induktion von p53, p21 oder Mdm2 untersucht. Die Zellkonzentration der regulären Kulturzellen bzw. Klone wurde vor der Wirkstoff-Zugabe mittels Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt (siehe 2.2). Zu untersuchende Zellen wurden einer 15-stündigen Behandlung mit Nutlin-3A in einer Konzentration von 10 μ M, sowie einer Lösungsmittelkontrolle mit DMSO unterzogen. Anschließend wurden die Zellen in ein 1,5ml Eppendorf-Tube überführt (bei den semiadhärenten Zelllinien MM.1S und MOLP-8 unter Zuhilfenahme eines Zellschabers) und 5 Minuten bei 293 \times g pelletiert. Das Medium wurde abpipettiert und das Zellpellet entweder direkt für die Ultraschalllyse weiterverwendet oder für die längerfristige Aufbewahrung bei -80°C tiefgefroren.

2.9.3 Ultraschalllyse

Zellysate wurden in der vorliegenden Arbeit durch Ultraschalllyse gewonnen. Zunächst wurden die auf Eis gelagerten 1,5ml-Eppendorf-Tubes mit Laemmli-Puffer versehen. Standardmäßig wurden 20 μ l verwendet, mindestens jedoch 10 μ l/100000Zellen. Es folgte die Ultraschalllyse für 7 Sekunden mittels UP50H-Homogenisator. Anschließend wurden die Tubes 3 Minuten lang bei 98°C im Heizblock inkubiert. Vor der Verwendung der Lysate für die SDS-PAGE wurden feste Bestandteile mit der Bench-Top-Zentrifuge unter maximaler Drehzahl pelletiert um eine Korpuskel freie Lösung zu erhalten. Die Aufbewahrung der Lysate erfolgte bei -20°C.

2.9.4 SDS-PAGE

Es wurden durchgehend Gele mit 15 Taschen verwendet (siehe Abb. 9). Vor Beladung des Gels wurden alle Taschen mit einer Pipette sorgfältig durchgespült. Anschließend wurde ein Leerlauf bei 150 V für 7 Minuten durchgeführt. Beim Beladen des Gels wurde die Pipette nach jedem Kontakt mit einer Probe mit

1xTGS-Laufpuffer gründlich gespült um einer Übertragung von Probenmaterial in die anderen Geltaschen vorzubeugen. Die beiden randständigen Taschen wurden, wenn es der Versuchsaufbau zuließ, mit 10µl Laemmli-Puffer gefüllt, um einen gleichmäßigeren Lauf der Proteine im Gel zu gewährleisten (Bei Versuchen mit 14 Proben wurde ausnahmsweise auf den „Laemmli-Rand“ verzichtet). Die zweite Tasche (in Ausnahmefällen die erste) wurde mit 5µl PageRuler™ Unstained Protein Ladder der Firma Thermo Scientific gefüllt, um nach der Filmentwicklung die Banden ihrem Molekulargewicht zuordnen zu können. Die weiteren Geltaschen wurden mit den Lysaten der Nutlin-3A behandelten Klone oder regulären Kulturzellen bzw. deren DMSO-Kontrollen gefüllt, alle ungenutzten Geltaschen wurden mit 10µl Laemmli-Puffer befüllt. Anschließend wurde die Elektrophorese gestartet. Für den Durchlauf des Sammelgels wurde eine Spannung von 80V gewählt. Sobald die Protein-Front das Trenngel erreicht hatte (meist nach 17-20 Minuten) wurde die angelegte Spannung auf 110V erhöht. Diese Spannung wurde für ca. 55-60 Minuten beibehalten und vor Auslaufen der Protein-Front aus dem Gel (nach optischer Kontrolle) die Elektrophorese gestoppt.

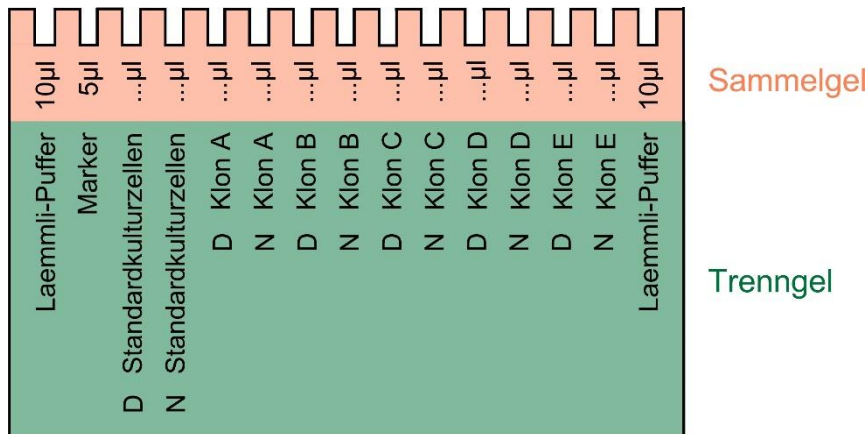


Abb. 9 **SDS-PAGE**

Aufbau und Beladung eines Gels mit 15 Taschen für die SDS-PAGE. Die Geltaschen des Sammelgels wurden wie angegeben beladen. Marker: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific). D: DMSO-Kontrolle. N: Nutlin-3A-behandelte Zellen. Standardkulturzellen: Je nach Zelllinienart der Klone (entweder AMO-1, MM.1S oder MOLP-8). Klon A-E: nach Elektroporation mit einem (oder zwei) CRISPR/Cas9-Plasmid(en) herangewachsene Klone. In der Regel wurde für einen Western Blot das Heranwachsen von 5 Klonen bis zu einer ausreichenden Zellzahl (siehe 3.4) abgewartet. War dies nicht möglich wurden ungenutzte Taschen mit 10µl Laemmli-Puffer beladen. ...µl: Volumen abhängig von der Zellkonzentration des Lysats des jeweiligen Klons. Die Gesamt-Proteinmenge sollte zwischen den Taschen eines Gels möglichst geringe Abweichungen aufweisen (Kontrolle durch β-Aktin).

2.9.5 Blotting

Das Blotting stellt den elektrophoretischen Proteintransfer vom SDS-Gel auf eine Protein-bindende Membran dar. In der vorliegenden Arbeit wurden für das Blotting Nitrocellulosemembranen verwendet. Während der Gelelektrophorese wurde die Blotting-Kassette vorbereitet, Filterpapier und Nitrocellulosemembran wurden auf Trenngelgröße zurechtgeschnitten. In einer Schale mit Blottingpuffer wurde auf eine Rahmenseite der Blotting-Kassette ein Fiberpad platziert, gefolgt von einem Filterpapier und der Nitrocellulosemembran. Nach abgeschlossener SDS-PAGE wurden die Gelkammern, bestehend aus zwei Glasplatten, mit einem Spatel geöffnet und das Sammelgel abgetrennt. In der mit Transferpuffer gefüllten Schale wurde das Trenngel von der Glasplatte abgelöst und formschließend auf der Nitrocellulosemembran platziert. Nun wurden mit einem Glasspatel die ggf. vorhandenen Luftblasen zwischen Membran und Gel verstrichen und das Gel anschließend mit einem weiteren Filterpapier und Fiberpad bedeckt. Die Kassette wurde nun geschlossen und in die Blotting-Station eingesetzt. Auf die richtige Orientierung der Kassette, Membran zur Anode – Gel zur Kathode, wurde geachtet. Es wurden zwei Kühlpacks

(Plastikformen mit Eis aus dem Gefrierschrank) zu beiden Seiten der Blotting-Station platziert. Nun wurde die Form der Blotting-Station mit Blottingpuffer gefüllt. Der Blotting-Vorgang erfolgte für 50 Minuten bei 100V.

2.9.6 Ponceaus-S-Rot und Blocking

Um einen ersten Eindruck über eine erfolgreiche SDS-PAGE und den Blotting-Vorgang zu erhalten, wurde mit einer Proteindetektion mittels Ponceaus-S-Rot-Färbung fortgefahren. Im Anschluss daran erfolgte das als Blocking bezeichnete Absättigen der unspezifischen Proteinbindestellen der Nitrocellulosemembran mit, für den Antikörpernachweis unbedeutenden, Proteinen, um eine zielunspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern und folglich die Hintergrundfärbung zu reduzieren und somit die Sensitivität des Western Blots zu erhöhen. Für das Blocking wurden 15ml 3%-Blockingpuffer bestehend aus 1xTBS-Waschpuffer (Verdünnung des 10xTBS-Waschpuffers mit VE-Wasser), 0,1% Tween® 20 und 3% Magermilchpulver verwendet.

2.9.7 Antikörperfärbung

In der vorliegenden Arbeit wurden die, in Tab. 6 dargestellten, Primärantikörper zur Proteindetektion verwendet.

Tab. 6 **Primärantikörper**

Auflistung der in der vorliegenden Arbeit im Rahmen des Western Blots verwendeten Primärantikörper. Verdünnung: Zur Proteindetektion verwendete Verdünnung des gelieferten Antikörpers.

Antikörper	Lot-Nr.	Spezies	Verdünnung	Hersteller
β-Aktin (A5316)	128K4805	Maus	1:10000	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mdm2 (SMP14) (sc-965)	D2214	Maus	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
p21 (C-19) (sc-397)	H276	Kaninchen	1:3000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

p53 (DO-1) (sc-126)	J2313	Maus	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
------------------------	-------	------	--------	--

Die Antikörper wurden im angegebenen Verhältnis mit 14ml 3%-Blockingpuffer (Zusammensetzung siehe oben) verdünnt. Der Lösung wurden 14µl Natriumazid-Stammlösung zur Hemmung von Keimwachstum zugesetzt. Die Primärantikörperlösung wurde mehrfach verwendet. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

Nach dem Blocking (siehe 2.9.6) wurde die Membran in Primärantikörperlösung über Nacht bei 4°C oder für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es schlossen sich drei 10-minütige Waschschrte der Membran mit 1xTBS+0,1%Tween20® an. Darauf folgte die einstündige Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper (siehe Tab. 7), gekoppelt an Meerrettichperoxidase.

Tab. 7 **Sekundärantikörper**

Auflistung der, in der vorliegenden Arbeit im Rahmen des Western Blots, verwendeten Sekundärantikörper.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Maus, HRP-konjugiert (#115-063-003)	Ziege	1:20000	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien
Kaninchen, HRP-konjugiert (#111-036-045)	Ziege	1:20000	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien

Die Sekundärantikörper wurden im Verhältnis 1:20000 mit 3%-Blockingpuffer verdünnt. Nach dem Abwaschen nicht gebundenen Sekundärantikörpers mit 1xTBS+0,1%Tween20® (3-10 Minuten), wurde für 1 Minute eine ECL-Reaktionslösung mit dem Substrat der Meerrettichperoxidase, Luminol, zugefügt. Unmittelbar im Anschluss erfolgte die Filmexposition und -entwicklung in der Dunkelkammer.

2.10 Herstellung des CRISPR/Cas9-Plasmids

Das CRISPR/Cas9-Plasmid wurde in Form des GeneArt® CRISPR Nuclease Vectors von der Firma ThermoFisher SCIENTIFIC bezogen. Dieses Plasmid beinhaltet die wesentlichen Bestandteile des CRISPR/Cas9-Systems: guideRNA und Cas9. Lediglich die zielspezifische Spacer-Sequenz muss vor Anwendung in den GeneArt® CRISPR Nuclease Vector kloniert werden und dieser mittels Transformation in kompetente Bakterien amplifiziert werden.

2.10.1 Auswahl geeigneter Protospacer für die guideRNA

Zunächst erfolgte die Suche nach geeigneten Protospacern. Die guideRNA des GeneArt® CRISPR Nuclease Vectors benötigt einen Protospacer mit einer Länge von 19-20 Nukleotiden als Zielsequenz. Um sicher zu gehen, dass die später herbeigeführten Mutationen oder Deletionen sich auch nach dem Splice-Vorgang in der fertigen mRNA befanden und somit einen direkten Einfluss auf die Aminosäure-Sequenz des entstehenden Proteins haben würden, wurde die Suche auf den exonischen Bereich von *TP53* beschränkt. Da die Exons 4 bis 9 für die DNA-Binde-Domäne von p53 kodieren¹⁹, wurde die größte Beeinträchtigung der Funktionstüchtigkeit von p53 für Läsionen in diesem Abschnitt erwartet. Für die detaillierte Protospacer-Suche wurden die Exons 4 und 7 ausgewählt (siehe Abb.10). Die Sequenzen dieser (plus angrenzender Introns) entstammten der NCBI Genbank. Auf das Vorhandensein geeigneter PAMs (NGG) am 3'-Ende des Protospacers wurde geachtet. Da Cas9 einen DSB verursacht, waren Protospacer auf dem Matrizenstrang oder auf dem kodierenden Strang gleichermaßen geeignet.

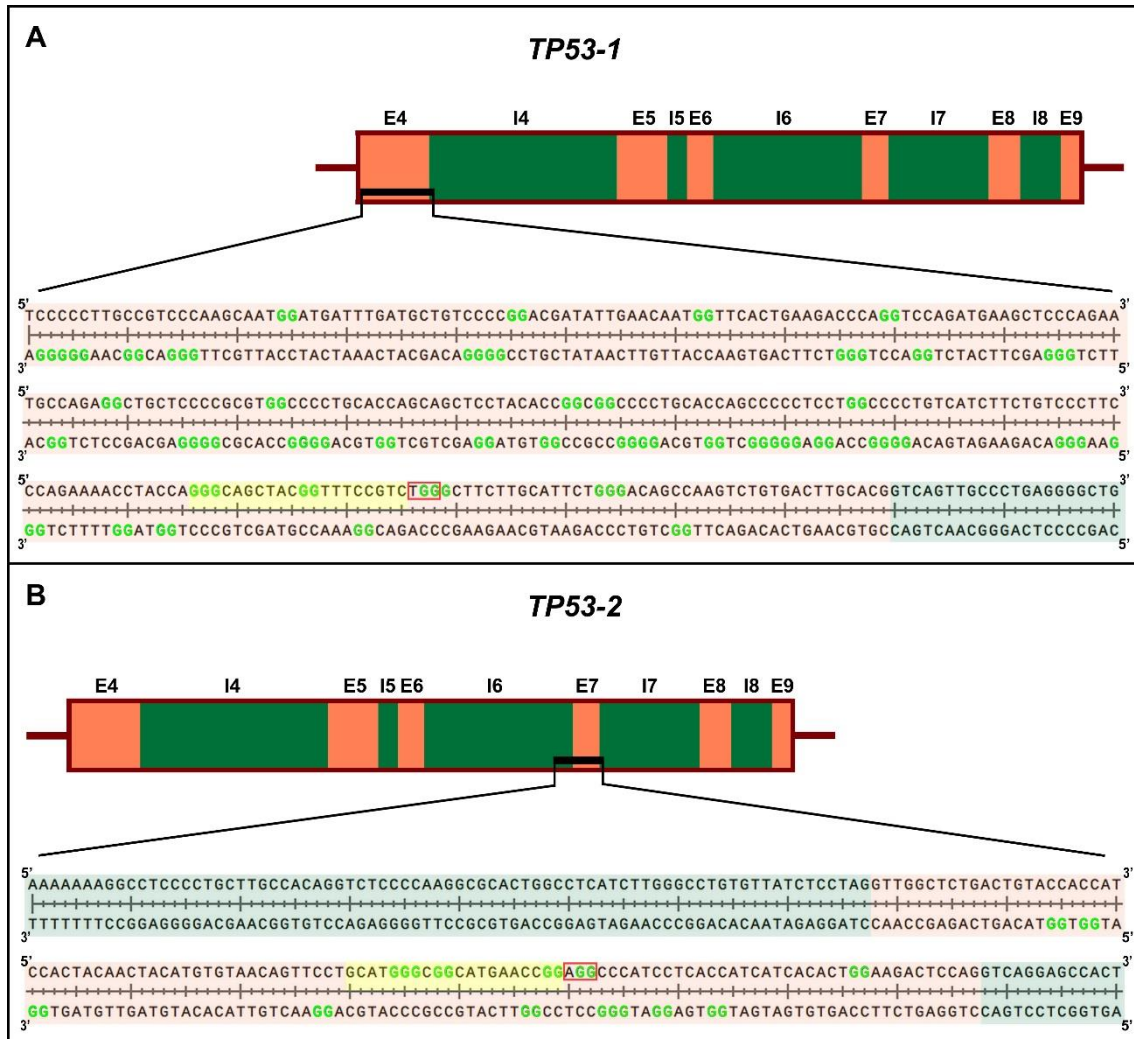


Abb. 10 Protospacer-Auswahl

(A) Detaillierte Darstellung von Exon 4 (orange hinterlegt) und angrenzendem Intron 4 (grün hinterlegt). Abfolgen von ≥ 2 Guanodinukleotiden sind farblich hervorgehoben und stellen geeignete PAMs dar. Der letztendlich ausgewählte Protospacer *TP53-1* ist gelb hinterlegt, das am 3'-Ende angrenzende PAM rot umrahmt. (B) Zu (A) analoge Abbildung von *TP53-2* in Exon 7.

Als geeignete Protospacer wurden *TP53-1* (GGGCAGCTACGGTTTCCGTC) in Exon 4 (Base 216 bis 235) und *TP53-2* (GCATGGGCGGCATGAACCGG) in Exon 7 (Base 53 bis 72) identifiziert (siehe Abb. 10).

Abschließend wurde ein Homologie-Abgleich der ermittelten Protospacer, mit dem gesamten menschlichen Genom durchgeführt, um mögliche homologe Sequenzen als alternativen Angriffspunkt auszuschließen. Da der guideRNA des GeneArt® CRISPR Nuclease Vectors bei der Bindung an ihre Zielsequenz eine Fehlertoleranz von 1-3 Basen zu eigen ist, durften keine weiteren Sequenzen im menschlichen Genom vorhanden sein, die zu den ausgewählten Protospacern

mit einem Unterschied von 3 oder weniger Basen identisch waren. Diese Bedingung wurde von *TP53-1* und *TP53-2* erfüllt.

2.10.2 Design der einzelsträngigen Oligonukleotide

Den beiden Protospacern *TP53-1* und *-2*, sowie deren komplementären Strängen entsprechend, wurden Oligonukleotide bei Sigma-Aldrich bestellt. Diese wurden am 3'-Ende um 5 Nukleotide (GTTTT für Protospacer-Sequenz, CGGTG für Komplementär-Strang) verlängert, um mit den Nukleotid-Überhängen des linearized GeneArt® CRISPR Nuclease Vectors (AAAAC bzw. CACCG, siehe Abb. 11) kompatibel zu sein und später als doppelsträngiges Oligonukleotid in diesen kloniert werden zu können. Für *TP53-1* als Zielsequenz wurden das Oligonukleotid TP53-1-F (GGGCAGCTACGGTTTCCGTCGTTTT) sowie dessen reverses Komplement TP53-1-R (GACGGAAACCGTAGCTGCCCCGGTG) und für *TP53-2* das Oligonukleotid TP53-2-F (GCATGGGCGGCATGAACCGGGTTTT) sowie dessen reverses Komplement TP53-2-R (CCGGTTCATGCCGCCCATGCCGGTG) synthetisiert (siehe Abb. 11 A).

2.10.3 Herstellung der doppelsträngigen Oligonukleotide und Ligation mit dem GeneArt® CRISPR Nuclease Vector

Herstellung der doppelsträngigen Oligonukleotide (siehe Abb. 11 B) und deren Ligation mit dem GeneArt® CRISPR Nuclease Vector (siehe Abb. 11 C) erfolgten nach Hersteller-Angaben. Für die Ligation wurden aus Gründen der Ressourcenschonung nur die halbe Menge aller Reagenzien verwendet.

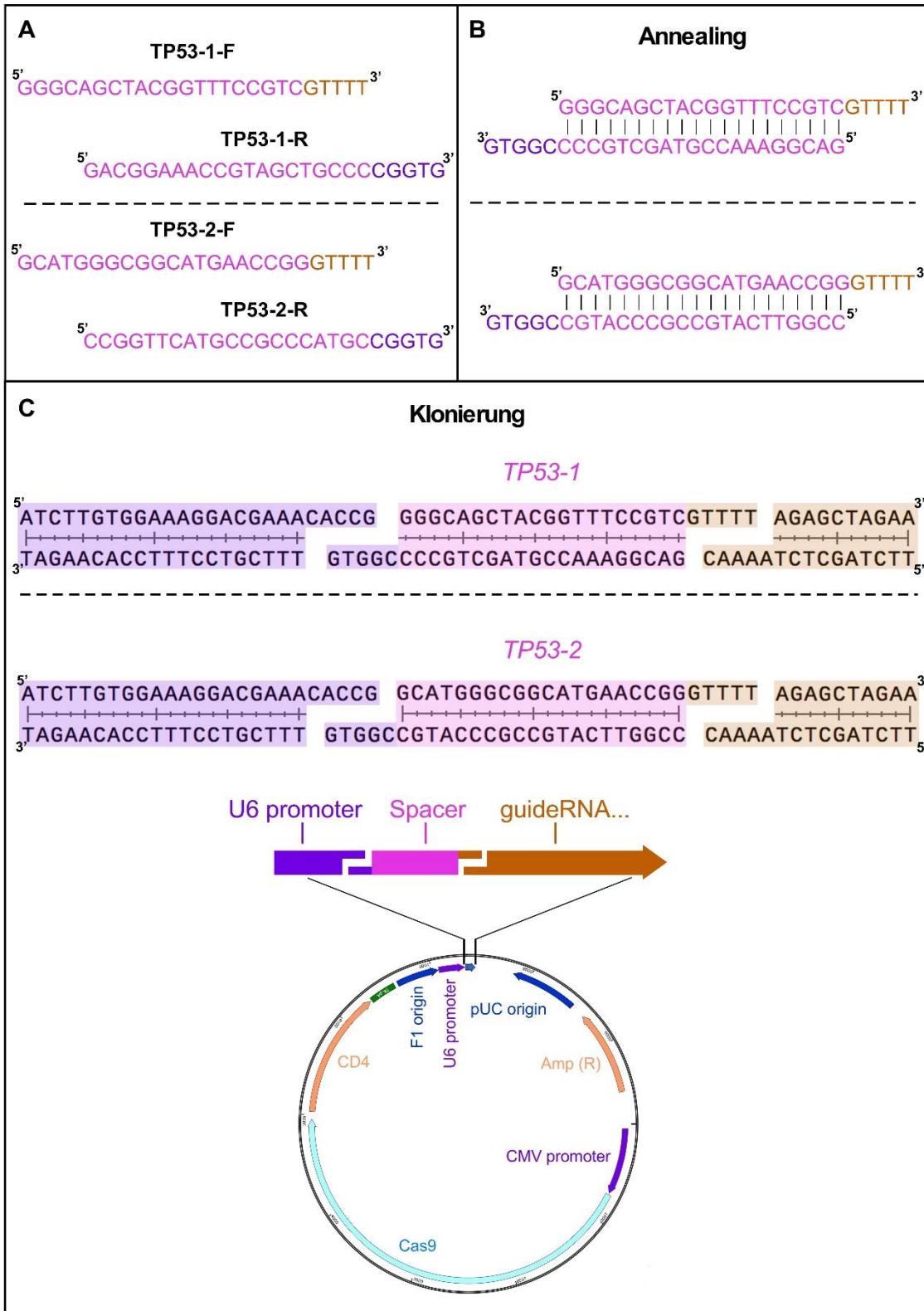


Abb. 11 Herstellung der zielspezifischen CRISPR-Vektoren

(A) Die 25 Basen langen Oligonukleotide TP53-1-F bzw. -R und TP53-2-F bzw. -R entsprechen den, um die 5 Basen GTTTT bzw. CCGTG am 3'-Ende erweiterten, Protospacer-Sequenzen (-F) bzw. deren komplementären Sequenzen (-R). (B) Herstellung der doppelsträngigen Oligonukleotide mit passenden Überhängen. (C) Ligation mit dem Linearized GeneArt® CRISPR Nuclease Vector (reduzierte Vektorkarte, vollständige Vektorkarte siehe Website des Herstellers).

2.10.4 Amplifikation der Plasmide

Die Amplifizierung des GeneArt® CRISPR Nuclease Vectors erfolgte nach Hersteller-Angaben durch Transformation in hauseigene kompetente Bakterien (*E. coli*). Die Präparation der Plasmide erfolgte mit dem Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit der Firma Zymo Research und dem QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (25) der Firma QIAGEN nach Hersteller-Angaben.

2.11 Präparation genomischer DNA

Um *TP53* der verschiedenen Klone im Bereich der CRISPR-Zielsequenzen sequenzieren zu können, war es nötig von diesen genomische DNA zu isolieren. Gewöhnlich wurde die genomische DNA von $4 \cdot 10^5$ Zellen (Spanne: $2 \cdot 10^5$ - $8 \cdot 10^5$) gewonnen. Nach sorgfältiger Resuspendierung wurde ein der genannten Zellzahl entsprechendes Volumen der Zellsuspension entnommen, in ein 1,5ml-Eppendorf-Tube überführt und 5 Minuten bei $800 \times g$ pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe von 250 μ l Lysepuffer. Die Reaktionsansätze wurden 5 Minuten lang bei 60°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden 2,5 μ l RNase A und 2,5 μ l Proteinase K hinzupipettiert und durch Rühren mit einer Pipettenspitze vorsichtig vermengt. Daran schloss sich eine erneute Inkubation bei 60°C für 1 Stunde an. Nun folgte die Zugabe von 125 μ l 5mM NaCl-Lösung und die Lagerung auf Eis um eine Präzipitation der Zellproteine zu bewirken. Durch eine 15-minütige Zentrifugation in der Bench-Top-Zentrifuge bei maximaler Drehzahl wurden die Proteine sedimentiert. Der proteinfreie Überstand wurde in ein neues 1,5ml-Eppendorf-Tube überführt. Die Zugabe von 380 μ l Isopropanol, sowie die darauffolgende einstündige Inkubation bei -20°C führten zur Ausfällung der DNA. Diese wurde 10 Minuten in der Bench-Top-Zentrifuge bei maximaler Drehzahl pelletiert und anschließend mit 1ml 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde an der Raumluft getrocknet (bis das ursprünglich weiße Pellet eine durchsichtige Farbe angenommen hatte) und anschließend je nach Pelletgröße in 30-100 μ l VE-Wasser gelöst. Die DNA-Konzentration der Lösung wurde mit einem NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer bestimmt (siehe 2.13).

2.12 PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) dient zur Amplifikation einer DNA-Matrize. Sie setzt sich aus drei aufeinanderfolgenden Schritten zusammen, der Denaturierung, der Primer-Hybridisierung und der Elongation. Die drei Schritte zusammen werden als Zyklus bezeichnet. Durch die Aneinanderreihung vieler Zyklen kann der, zwischen den beiden Primern gelegene, Abschnitt der DNA-Matrize amplifiziert werden. Bei der Denaturierung bewirkt die hohe Temperatur eine Trennung der beiden komplementären DNA-Stränge. Dies ist Voraussetzung dafür, dass sich nach hinreichender Abkühlung die Primer an ihren jeweils komplementären DNA-Strang anlagern können. In der Elongation werden dann durch eine DNA-Polymerase die Primer gemäß der Matrize verlängert. Auf diese Weise bewirkt jeder Zyklus einer PCR eine Verdoppelung der Matrizen-Sequenz.

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels PCR die DNA-Abschnitte im Bereich der CRISPR-Zielsequenzen bis zu einer für die Sequenzierungsreaktion ausreichenden Menge amplifiziert. Für die PCR-Amplifikation der Protospacer und deren angrenzender Bereiche wurden die PCR-Primer 53-1AN5a (TGAAGACCCAGGTCCAGATG) und 53-1AN3a (CACTGACAGGAAGCCTAAGG) zur Analyse von *TP53-1* (siehe Abb. 12 **A**), sowie 53-2AN5a (TTGCCACAGGTCTCCCAAG) und 53-2AN3a (TGAGTGGGAGCAGTAAGGAG) zur Analyse von *TP53-2* (siehe Abb. 12 **B**) gewählt. Diese wurden bei Sigma-Aldrich bestellt.

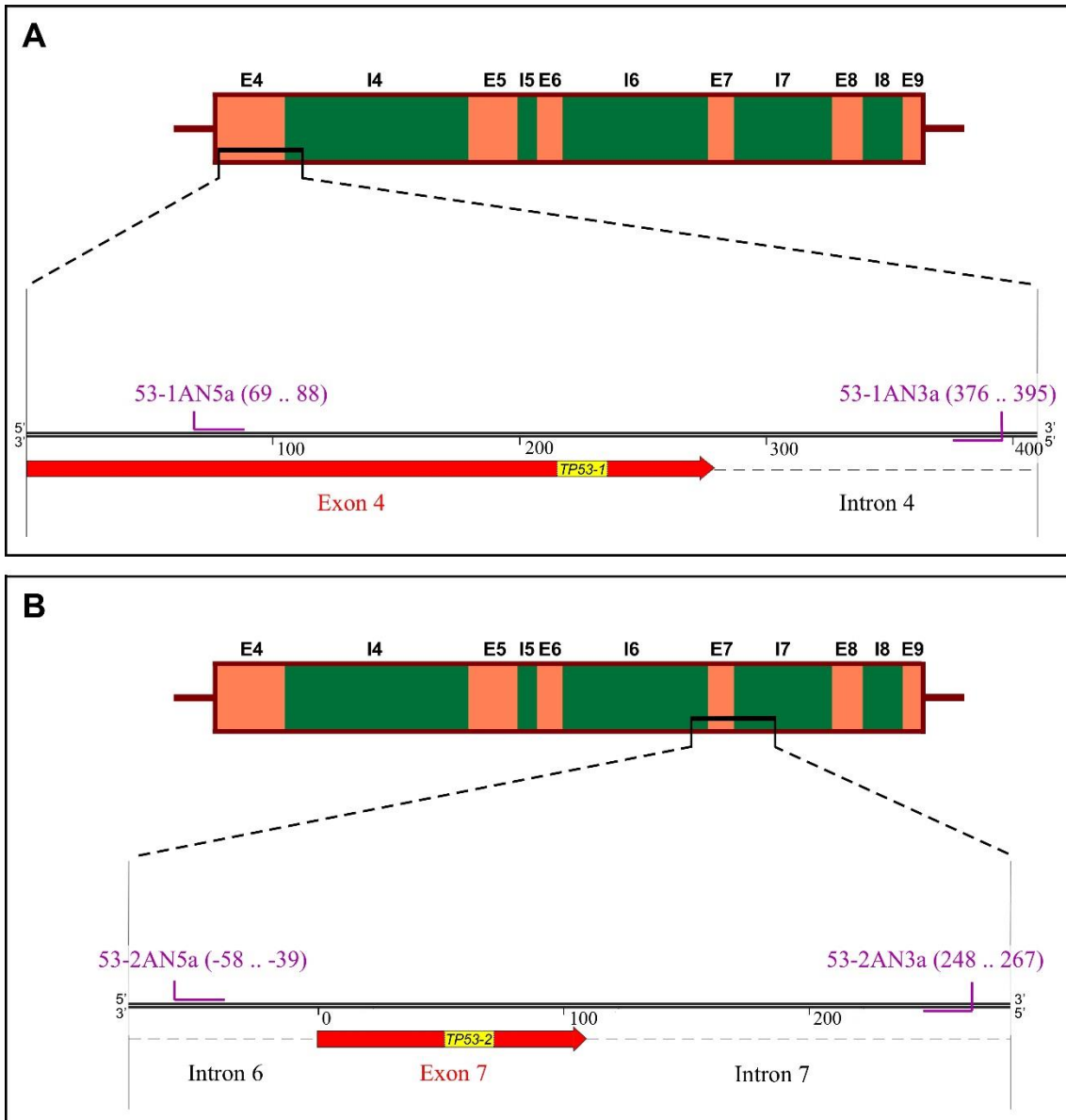


Abb. 12 **PCR-Primer für die TP53-Amplifikation**

Zur Amplifikation des genomischen Bereichs um die CRISPR-Zielsequenzen *TP53-1* und *-2* verwendete PCR-Primer. **(A)** Lokalisation der PCR-Primer 53-1AN5a und -3a in der Umgebung von *TP53-1*. **(B)** Lokalisation der PCR-Primer 53-2AN5a und -3a in der Umgebung von *TP53-2*.


Die PCR-Ansätze setzten sich aus folgenden Reagenzien zusammen (siehe Tab. 8).

Tab. 8 **PCR-Reagenzien**

Als 5'-Primer dienten 53-1AN5a bzw. 53-2AN5a und als 3'-Primer 53-1AN3a bzw. 53-2AN3a. Als DNA-Matrize wurde für die Analyse der Klone deren genomische DNA und für die Positivkontrolle die genomische DNA von regulären AMO-1-Kulturzellen verwendet. Als Negativkontrolle diente ein PCR-Ansatz ohne DNA-Matrize.

	Negativkontrolle	Klon A	Positivkontrolle
10x DreamTaq Buffer [μ l]	2,5	2,5	2,5
dNTPs [μ l]	2,5	2,5	2,5
5'-Primer (100 μ M) [μ l]	1	1	1
3'-Primer (100 μ M) [μ l]	1	1	1
DreamTaq DNA Polymerase [μ l]	0,2	0,2	0,2
VE-Wasser (autoklaviert) [μ l]	18	17	17
DNA-Matrize (genomische DNA) [μ l]	---	1	1
	25 μ l	25 μ l	25 μ l

Für die PCR wurde ein Primus 25 advanced® Thermocycler der Firma PEQLAB verwendet. Die PCR wurde für 40 Zyklen zu untenstehenden Bedingungen durchgeführt. Vor Beginn der 40 Zyklen erfolgte eine 5-minütige initiale Denaturierung bei 94°C aufgrund der Länge der DNA-Matrize (genomische DNA!).

	Temperatur	Dauer
40x 	Initiale Denaturierung	94°C 5'
	Denaturierung	94°C 1'
	Primer-Hybridisierung	55°C 1'
	Elongation	72°C 1'30"

2.13 Konzentrationsmessung von DNA

Die DNA-Konzentrationen von Mini- bzw. Maxipräparationen, sowie von gewonnener genomischer DNA und PCR-Produkten wurden mittels NanoDrop™

2000 Spektralphotometer bestimmt. Dazu wurde ein kleiner Tropfen der verdünnten DNA-Lösung (<1µl) auf den Messdorn pipettiert. Dieser wurde nach jeder Messung mit Papiertüchern gereinigt.

2.14 DNA-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion

Für die DNA-Gelelektrophorese wurden 1%-Agarosegele verwendet. Zur Herstellung wurden 0,5g Agarose in 50ml 1xTAE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle zum Kochen gebracht bis die Lösung klar war. Nach leichter Abkühlung des Kolbens folgte die Zugabe von 3µl HDGreen™ DNA-Dye. Anschließend wurde ein MultiCast™ Gießstand mit dem flüssigen Gel befüllt und ein Kamm (für 6, 10 oder 12 Taschen) eingesetzt. Das Elektrophorese-Becken PerfectBlue™ Gelsystem Mini S wurde mit 1xTAE-Puffer gefüllt, sowie eine Geltasche mit 5µl GeneRuler™ 1kB DNA Ladder als Längenstandard und die übrigen Taschen mit den einzelnen Proben (im Verhältnis 5:1 mit 6x DNA Loading Dye gemischt) beladen. Anschließend wurde die Elektrophorese mit 100-120V für eine Dauer von 20-40 Minuten durchgeführt. Die Visualisierung der DNA-Banden geschah durch Beleuchtung mit UV-Licht. DNA-Banden wurden ausgeschnitten und die DNA mittels des QIAquick Gel Extraction Kits extrahiert.

2.15 TA-Klonierung

Mittels TA-Klonierung konnten die exakten Sequenzen beider *TP53*-Allele der MM-Zelllinien-Klone bestimmt werden. Klone mit Insertionen/Deletionen auf einem bzw. beiden *TP53*-Allelen werden im Folgenden als „mono-“ bzw. „biallelisch *TP53*-inaktiviert“ bezeichnet.

Nach Amplifikation der genomischen DNA mittels PCR beinhalteten die einzelnen Reaktionsansätze multiple Kopien beider Allele. Zeigten die beiden *TP53*-Allele eines Klons unterschiedliche Sequenzen (bei *TP53*^{wt/-} und *TP53*^{-/-} Klonen der Fall), konnte eine Überlagerung des Bandenmusters beginnend bei der Läsions-Stelle registriert werden (siehe 3.5, Abb. 18). Die Separation dieser

beiden, sich überlappenden Sequenzen und somit die Identifizierung der exakten Sequenz beider Allele erfolgte mittels TA-Klonierung.

Die bei der PCR verwendete DreamTaq Polymerase hängt nach Abschluss der Elongation an den soeben synthetisierten DNA-Strang am 3'-Ende ein einzelnes, zusätzliches Desoxyadenosin an. Folglich entstehen doppelsträngige Sequenzen mit einem A-Überhang am 3'-Ende beider DNA-Stränge. Der 3'-A-Überhang der PCR-Produkte ist mit dem 5'-T-Überhang des offenen pGEM®-T Easy Vectors kompatibel.

Durch Transformation des Plasmids in hauseigene kompetente Bakterien (*E. coli*), Picken einzelner Kolonien, Kolonie-PCR, Kultivierung von Bakterien mit passendem Insert im pGEM®-T Easy Vector und Präparation der DNA mittels Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit konnte eine separate Analyse beider Allele bewerkstelligt werden.

2.15.1 Gewinnung von PCR-Produkten genomischer DNA

Siehe 2.11-2.14.

2.15.2 Ligation der PCR-Produkte in den pGEM®-T Easy Vector

Es wurde folgende Ligationsreaktion angesetzt.

Tab. 9 Ligationsansätze für TA-Klonierung

Reagenz	Volumen
10x T4 Ligation Buffer	1µl
pGEM®-T Easy Vector	0,5µl
PCR-Produkt	1-2µl (50ng)
T4 DNA Ligase	1µl
VE-Wasser	Auffüllen auf 10µl

Ligationsansätze wurden durch Pipettieren vermischt und 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.15.3 Transformation

Anschließend erfolgte die Transformation von Bakterien (*E. coli*) mit den nach Ligation geschlossenen Plasmiden. 50µl kompetente Zellen (bei -80°C gelagert) wurden für ca. 3-5 Minuten auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1,5µl Ligations-Gemisch wurden die Bakterien auf einer vorgewärmten LB-Agar-Platte + Ampicillin (100µg/ml) ausgestrichen. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 37°C.

2.15.4 Kolonie-PCR

Mittels Kolonie-PCR konnte überprüft werden, ob die Insertion eines PCR-Produkts zum Ringschluss des pGEM®-T Easy Vectors geführt hatte (Insert-positiv), oder ob dieser Ringschluss ohne Insertion erfolgt war (Insert-negativ). Dies ermöglichte die Selektion geeigneter, Insert-positiver Kolonien für die Plasmid Minipräparation und anschließende Sequenzierung. Für die Kolonie-PCR wurden ausgewählte Kolonien mit einem Zahnstocher gepickt und in PCR-Reaktionsansätze überführt. Diese setzten sich wie folgt zusammen:

Tab. 10 Reaktionsansätze für Kolonie-PCR

Reagenz	Volumen
10x DreamTaq Puffer	2,5µl
dNTP-Mix (2,5mM jedes dNTP)	0,5µl
T7-(5')-Primer (10µM)	1µl
SP6-(3')-Primer (10µM)	1µl
DreamTaq (5U/µl)	0,1µl
VE-Wasser (autoklaviert)	20µl

Die Kolonie-PCR erfolgte zu folgenden Bedingungen:

		Temperatur	Dauer
30x	Denaturierung	94°C	30''
	Primer-Hybridisierung	55°C	30''
	Elongation	72°C	30''

Anschließend wurde eine DNA-Gelelektrophorese mit den PCR-Produkten durchgeführt. Die beiden Primer T7 (am 5'-Ende) und SP6 (am 3'-Ende) umfassten das Insert sowie daran angrenzende Bereiche des pGEM®-T Easy Vectors in einer Länge von 58bp (am 5'-Ende) + 82bp (am 3'-Ende) = 140bp. Bei einer Länge der (*TP53*-wt-)PCR-Produkte von 327bp (Bereich um *TP53-1*) bzw. 325bp (Bereich um *TP53-2*), sowie zusätzlichen 20bp des T7- bzw. 18bp des SP6-Primers deutete eine DNA-Bande von ca. 500bp Länge bei einer Kolonie-PCR auf Insert-Positivität hin, während eine Bande bei ca. 180bp Zeichen eines Ringschlusses des Plasmids anderer Genese war. Insert-positive Kolonien wurden erneut mittels Zahnstocher gepickt und über Nacht in 3ml LB-Medium + Ampicillin (100µg/ml) kultiviert. DNA wurde am Folgetag mittels des Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit präpariert und zum Sequenzieren versandt.

2.16 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch LGC Genomics. Die Proben wurden in 1,5ml-Eppendorf-Tubes versandt. Die Reaktionsgefäße beinhalteten je nach DNA-Typ (Plasmid oder PCR-Produkt) folgende Reagenzien:

Tab. 11 **Sequenzierungsansätze**

Jeder Sequenzierungsansatz wurde mit VE-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 14µl aufgefüllt.

		Menge	Primer
Plasmid	GeneArt® CRISPR Nuclease Vector	1500-2000ng	1,5µl U6-Forward (0,1µg/µl)
	pGEM®-T Easy Vector	ca. 1000ng	2µl SP6 (10µM)
PCR-Produkt	von genomischer DNA	100-150ng	1µl 53-1AN5a/53- 2AN5a (20µM)

2.17 Materiallisten

Tab. 12 **Chemikalien**

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
alamarBlue	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Ampicillin (100mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Annexin-V/FITC	Bender MedSystems, Wien, Österreich
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bacto Agar	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
6x DNA Loading Dye	ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, USA
dNTP-Mix	Fermentas, Waltham, USA
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 96% (mit VE-Wasser auf 70% verdünnt zum Waschen genomischer DNA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

D-Glucose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HDGreen™ DNA-Dye	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	VWR International, Radnor, USA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver	real.-
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
OptiPrep™	Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norwegen
p-Coumarsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Ponceau S	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl) 37%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIS-Base	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 13 Wirkstoffe

Substanz	Konzentration der Stocklösung	Bezugsquelle
Bortezomib	10mM	LC Laboratories, Woburn, USA
Carfilzomib	20mM	Selleckchem, München, Deutschland
Etoposid	20mM	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Melphalan	20mM	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Nutlin-3A	10mM	Selleckchem, München, Deutschland

Tab. 14 **Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen (hauseigene Herstellung)**

Agarplatten (1l, 30ml/Platte)	LB-Medium	500ml
	VE-Wasser (autoklaviert)	500ml
	Bacto Agar	15g
	Ampicillin	100µg/ml (Endkonzentration)
Annexin-V/FITC- Bindepuffer	HEPES	10mM
	NaCl	140mM
	CaCl ₂	2,5mM
	VE-Wasser	
	pH-Wert einstellen auf 7,4	
Blottingpuffer (2l)	Methanol	400ml
	Glycin	28,8g
	TRIS-Base	6g
	VE-Wasser	
ECL- Reaktionslösung	TRIS-Base	100mM
	Luminol	2,5mM
	p-Coumarsäure	0,2mM
	H ₂ O ₂	3mM
	VE-Wasser	
	pH-Wert einstellen auf 8,8	
Laemmli-Puffer (50ml)	Glycerin	5ml
	20% SDS	5ml
	TRIS-Base	3ml
	β-Mercaptoethanol	5ml
	Bromphenolblau	1 Spatelspitze
	VE-Wasser	
	pH-Wert einstellen auf 6,8	

LB-Medium (+Ampicillin)	Hefeextrakt	5g/l
	Trypton	10g/l
	NaCl	10g/l
	Ampicillin	100µg/ml
	VE-Wasser	

Lysepuffer (für Präparation genomischer DNA)	TRIS-Base	10mM
	EDTA	5mM
	NaCl	200mM
	SDS	0,2%
	VE-Wasser	
	pH-Wert einstellen auf 8,5	

PBS (1l)	NaCl	8g
	KCl	0,2g
	Dinatriumhydrogenphosphat- Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O)	1,75g
	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	0,27g
	VE-Wasser (autoklaviert)	
	pH-Wert einstellen auf 7,4	

Ponceau-S-Rot	Ponceau S	0,1%
	Essigsäure	5%
	VE-Wasser	

4xSammelgel-Puffer	TRIS-Base	0,5M
	SDS	0,015M
	VE-Wasser	
	pH-Wert einstellen auf 6,8	

SOC-Medium	Trypton	20g/l
	Hefeextrakt	5g/l
	Glucose	4g/l

	NaCl	10mM
	KCl	2,5mM
	MgCl ₂	5mM
	MgSO ₄	5mM
	VE-Wasser (autoklaviert)	
50xTAE-Puffer (1l)	TRIS-Base	2M
	EDTA	10mM
	Essigsäure	57,1ml
	VE-Wasser	
	pH-Wert einstellen auf 8,5	
10xTBS-Waschpuffer (1l)	TRIS-Base	20mM
	NaCl	136mM
	VE-Wasser	
	pH-Wert einstellen auf 7,6	
10xTGS-Laufpuffer (2l)	TRIS-Base	60g
	Glycin	284g
	SDS	20g
	VE-Wasser	
4xTrenngel-Puffer	TRIS-Base	1,5M
	SDS	0,015M
	VE-Wasser	
	pH-Wert einstellen auf 8,8	

Tab. 15 **Puffer kommerzieller Anbieter (nicht Teil eines Kits)**

Puffer	Hersteller
10x T4 DNA Ligase Buffer	Fermentas, Waltham, USA
10x DreamTaq Buffer	ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, USA

Tab. 16 **Software**

Software, Version	Hersteller
Canvas™ Draw 3	Canvas GFX, Plantation (Florida), USA
CellQuest 5.1	BD Biosciences, Largo (Florida), USA
Endnote X8	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
FlowJo 8.8.6	Tree Star Inc., Ashland, USA
GraphPad PRISM® 7.0d	Graphpad Software, La Jolla, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft, Seattle, USA
SnapGene® 2.6.2	GSL Biotech, Chicago, USA

Tab. 17 **Zellkulturmedien und Zusätze**

Produkt	finale Konzentration	Hersteller
RPMI-1640		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fötales Rinderserum (FBS)	10%	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	2mM	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	1mM	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Penicillin	100U/ml	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Streptomycin	100µg/ml	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
β-Mercaptoethanol	50µM	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 18 DNA-Präparations-Kits

Kit	Hersteller
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research, Freiburg, Deutschland
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (25)	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland

Tab. 19 Geräte

Gerät	Hersteller
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Gene Pulser XCell™	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Model 680 Microplate Reader	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
MultiCast™ Gießstand für Mini S	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer	ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, USA
PerfectBlue™ Gelsystem Mini S	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Pharmacia LKB GPS 200/400 (Power Supply für Agarosegelelektrophorese)	Pharmacia, Uppsala, Schweden
PowerPac Basic™ Power Supply (Western Blot)	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Primus 25 advanced® Thermocycler	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
UP50H-Homogenisator	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Deutschland
Western Blot Apparatur Mini-PROTEAN® 3-Cell	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

Tab. 20 **Längenstandards**

Produkt	Hersteller
GeneRuler™ 1kB DNA Ladder	Fermentas, Waltham, USA
Page Ruler™ Unstained Protein Ladder	ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, USA

Tab. 21 **Plasmide**

Plasmid	Hersteller
GeneArt® CRISPR Nuclease Vector (A21175)	ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, USA
pGEM®-T Easy Vector	Promega Corporation, Fitchburg, USA
pEGFP-N3	Takara Bio Inc., Mountain View, USA

Tab. 22 **Enzyme**

Enzym	Konzentration	Hersteller
DreamTaq DNA Polymerase	5U/μl	ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, USA
T4-DNA Ligase	5U/μl	Fermentas, Waltham, USA
Proteinase K	>600U/ml	ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, USA
RNase A	10mg/ml	ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, USA

Tab. 23 **Primer für Kolonie-PCR**

Primer	Hersteller
T7 TAATACGACTCACTATAGGG	Sigma-Aldrich
SP6 ATTTAGGTGACACTATAG	Sigma-Aldrich

3 Ergebnisse

3.1 Expression von p53 in verschiedenen MM-Zelllinien

Da es Ziel der vorliegenden Arbeit war, Klone mit verändertem p53-Status einer zuvor p53-wt-Zelllinie zu generieren, wurden zunächst geeignete Zelllinien bestimmt, indem die Expression von p53 und dessen Induzierbarkeit durch Nutlin-3A untersucht wurden (siehe Abb. 13).

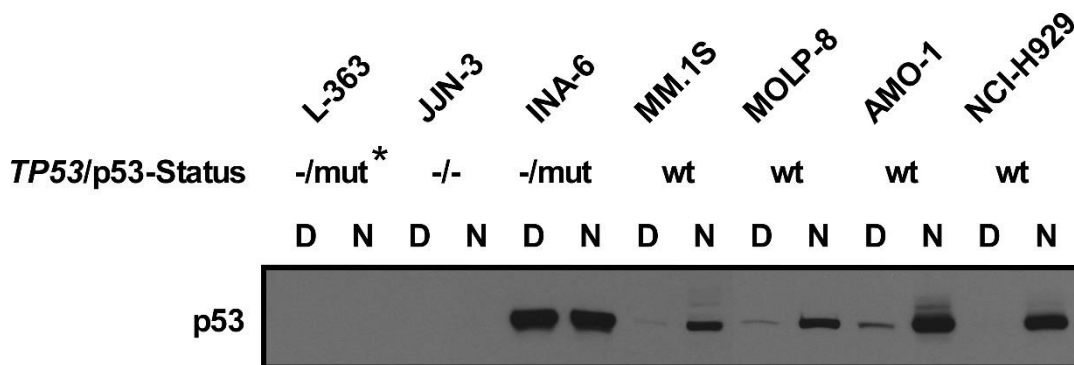


Abb. 13 **Nutlin-3A abhängige Induktion von p53 in verschiedenen Zelllinien**

Zellen der dargestellten Zelllinien wurden jeweils 16 Stunden mit 10µM Nutlin-3A (N) oder mit DMSO (D; als Lösungsmittelkontrolle) behandelt. Anschließend wurde mit den Lysaten von 50000 Zellen (Zellzahlbestimmung mittels Trypanblaufärbung, siehe 2.2) pro Zelllinie und Behandlungsansatz eine SDS-PAGE durchgeführt und p53 mit Hilfe eines anti-p53-Antikörpers (DO-1) detektiert. Quellen für TP53-Status: MM.1S, AMO-1, NCI-H929, JLN3, INA-6 → Keats Laboratory⁸⁴; L363 → Keats Laboratory⁸⁴ + Surget et al.⁸⁵; MOLP-8 → mündliche Mitteilung von Dr. Thorsten Stühmer. *splice-site mutation

Der Western Blot zeigt nur in den TP53^{wt/wt} Zelllinien AMO-1, MM.1S, MOLP-8 und NCI-H929 eine Nutlin-3A-abhängige Induzierbarkeit von p53. Diese ist bei den beiden Zelllinien MM.1S und NCI-H929 bereits von Stühmer et al. dokumentiert³⁷. Aufgrund ihres TP53^{wt/wt} Status und der Nutlin-3A-abhängigen Induzierbarkeit von p53 wurden die Zelllinien AMO-1, MM.1S, MOLP-8 und NCI-H929 als prinzipiell geeignet für weitere Versuche zur Etablierung eines p53-Funktions-Modells angesehen.

3.2 Elektroporation von AMO-1, NCI-H929, MM.1S und MOLP-8 Zellen

Da TP53-Läsionen durch Transfektion des GeneArt® CRISPR Nuclease Vectors verursacht werden sollten, wurde die für eine möglichst effiziente Transfektion

der jeweiligen Zelllinie günstigste Elektroporations-Spannung mit einer Spannungsreihe bei ansonsten gleichbleibenden Parametern (Volumen, Elektrodenabstand) ermittelt. Beispielhaft sei hier die Vorgehensweise bei der Spannungsreihe für die Zelllinie AMO-1 erläutert. Es wurden jeweils $3 \cdot 10^6$ Zellen mit dem EGFP-Expressionsplasmid in einer Konzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ unter Anwendung einer Elektroporations-Spannung von 250V, 280V, 310V, 340V, 370V und 400V transfiziert. Anschließend wurde mittels durchflusszytometrischer EGFP/PI-Messung (siehe 2.7.3) der Einfluss der verschiedenen Spannungshöhen auf das Zellüberleben sowie die Transfektionsrate untersucht (siehe Abb. 14).

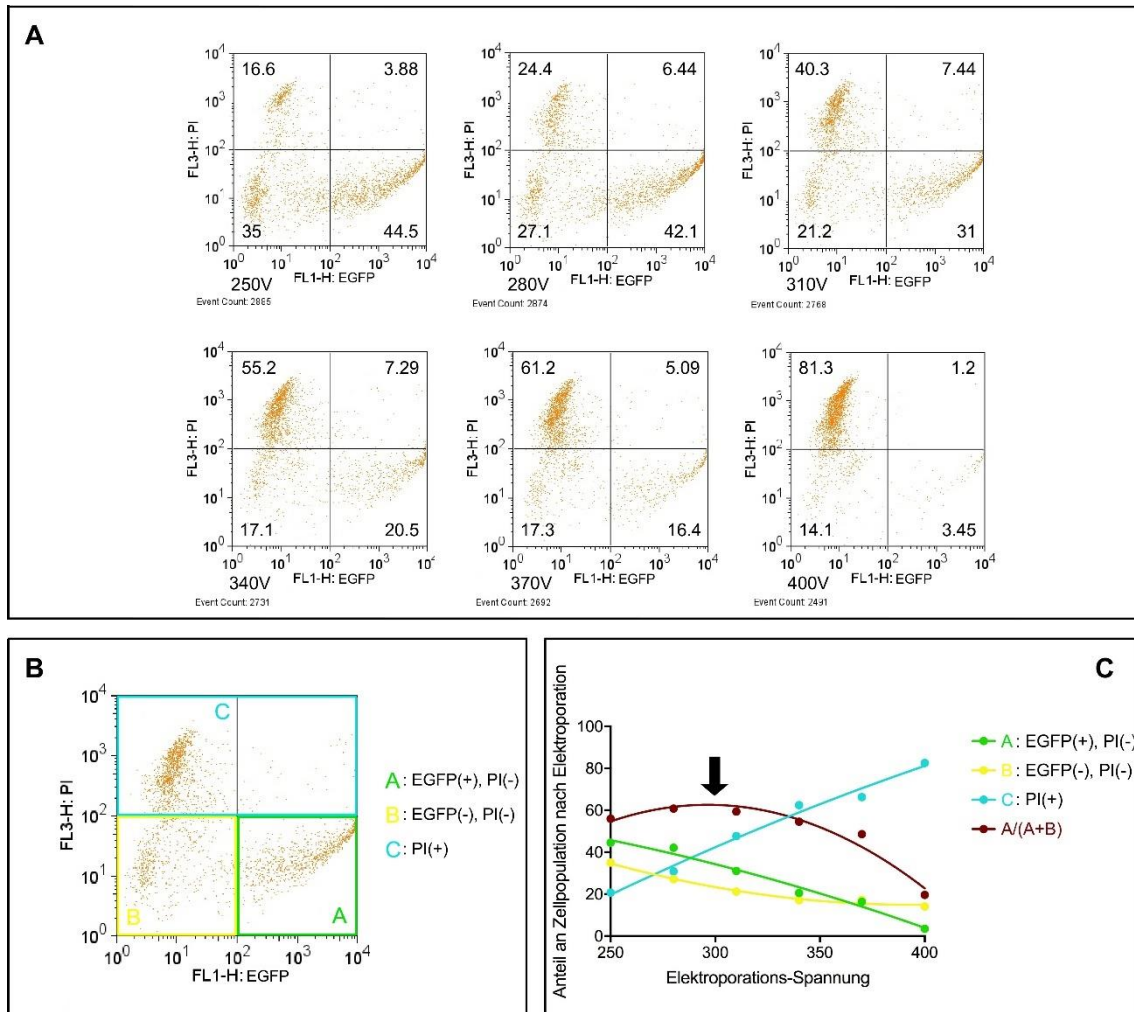


Abb. 14 **Spannungsreihe von AMO-1**

(A) Dot Plots der EGFP-PI-Messung nach Transfektion von AMO-1 mit dem EGFP-Expressions-Plasmid mit der unter dem zugehörigen Blot angegebenen Elektroporations-Spannung. (B) Subpopulationen der Zellen nach Elektroporation. Der Dot-Plot der Elektroporation von AMO-1-Zellen mit dem EGFP-Expressions-Plasmid mit 310V Elektroporations-Spannung wurde zur Veranschaulichung in die, für die Interpretation der Spannungsreihe, wesentlichen Bereiche unterteilt. (C) Einfluss der Spannung auf den relativen Anteil der verschiedenen Fraktionen von AMO-1 nach Elektroporation. Nicht berücksichtigt ist, dass bei sehr hohen Spannungen viele Zellen so zerstört werden, dass sie in der FACS Messung nicht mehr nachweisbar sind.

Die Dot-Plots wurden in drei Bereiche untergliedert (siehe Abb. 14 B). Im rechten, unteren Quadranten (Bereich A) wurden die EGFP-positiven und PI-negativen, d.h. die erfolgreich transfizierten und vitalen, Zellen abgebildet. In dem linken unteren Quadranten (Bereich B) sammelten sich die EGFP- und PI-negativen Zellen, also die Zellen, die nicht mit dem Plasmid transfiziert werden konnten, aber nach wie vor lebendig waren. Die obere Hälfte (Bereich C) zeigte die PI-positiven Zellen, den Zellen entsprechend, welche die Elektroporation nicht überlebt hatten. Abb. 14 C veranschaulicht den Zusammenhang zwischen

Elektroporations-Spannung und dem resultierenden Anteil der, zu den entsprechenden Subpopulationen zugehörigen, Zellen. Mit zunehmender Elektroporations-Spannung stieg die Anzahl der, nach dem Elektroporations-Vorgang, nekrotischen Zellen (blaue Kurve). Gleichzeitig nahm in dem überprüften Spannungsbereich der Anteil sowohl der lebendigen transfizierten (grüne Kurve), als auch der lebendigen nicht-transfizierten (gelbe Kurve) Zellen ab. Da sich mikroskopisch nekrotische Zellen und Zellreste gut von lebendigen Zellen unterscheiden ließen und die Selektionierung von Einzelzell-Klonen unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte (siehe 2.8), war es von Interesse einen möglichst großen Anteil von erfolgreich transfizierten Zellen unter den, nach Elektroporation, vitalen Zellen zu erhalten: $\frac{A}{A+B}$ (braune Kurve, siehe Markierung).

Dem Selektionsvorgang lag außerdem die Annahme zugrunde, dass Zellen, die erfolgreich mit dem EGFP-Expressions-Plasmid transfiziert worden waren, grundsätzlich auch den GeneArt® CRISPR Nuclease Vector aufgenommen hatten. Da der GeneArt® CRISPR Nuclease Vector etwas größer war als das EGFP-Expressions-Plasmid wurde die Effizienz dafür als umso höher erachtet, je größer die Elektroporations-Spannung gewählt wurde. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurde eine Elektroporations-Spannung von 310V für die Transfektion der Zelllinie AMO-1 mit dem GeneArt® CRISPR Nuclease Vector gewählt.

Auf gleiche Art und Weise wurde mit Hilfe einer Spannungsreihe die optimale Elektroporations-Spannung für die Zelllinien MM.1S, MOLP-8 und NCI-H929 bestimmt. Tab. 24 zeigt nachfolgend die ermittelte und später bei der Transfektion des GeneArt® CRISPR Nuclease Vectors angewandte Spannung.

Tab. 24 **Optimale Elektroporations-Spannung für die getesteten MM-Zelllinien**

Die Tabelle zeigt die ermittelte optimale und für die Elektroporation mit dem CRISPR/Cas9-Plasmid angewandte Elektroporations-Spannung.

Zelllinie	Elektroporations-Spannung
AMO-1	310V
MM.1S	310V
MOLP-8	250V
NCI-H929	280V

3.3 Klonwachstum und Benennung der Klone

Am erfolgreichsten gestaltete sich die Generierung von Klonen nach Transfektion mit dem GeneArt® CRISPR Nuclease Vector bei der Zelllinie AMO-1. Insgesamt wurden 348 Einzelzellselektionen vorgenommen (siehe Abb. 15). Bei 108 dieser selektionierten Zellen fand eine Proliferation über das Ein-Zell-Stadium hinaus statt, was zur Ausbildung klonaler Zellpopulationen, im Folgenden Klone genannt, führte. Die überwiegende Anzahl dieser Klone (100/108) konnte bis zu einer für die Western-Analyse ausreichenden Zellzahl von ca. 10000 Zellen (siehe 3.4) kultiviert werden. Von diesen konnte bei 50 Klonen der p53-Status durch *TP53*-Sequenzierung bestätigt werden, fünf Klone lieferten ein uneindeutiges Sequenzierungsergebnis (in Zusammenschau mit der Western-Analyse wurden zwei davon als *TP53*^{-/-} und drei als *TP53*^{wt/-} klassifiziert), und bei 45 Klonen wurde keine Sequenzierung angestrebt. Sämtliche nicht-sequenzierten Klone zeigten in der Western-Analyse eine p53-Induktion nach Nutlin-3A-Behandlung, die überwiegende Mehrzahl eine den *TP53*^{wt/wt} Klonen entsprechende, und wurden demzufolge als *TP53*^{wt/wt} Klone klassifiziert. Bei einigen wenigen „späten“ Klonen mit schwächerer Nutlin-3A abhängiger p53-Induktion, bei denen zeitbedingt auf eine *TP53*-Sequenzierung verzichtet wurde, handelte es sich womöglich um *TP53*^{wt/-} Klone.

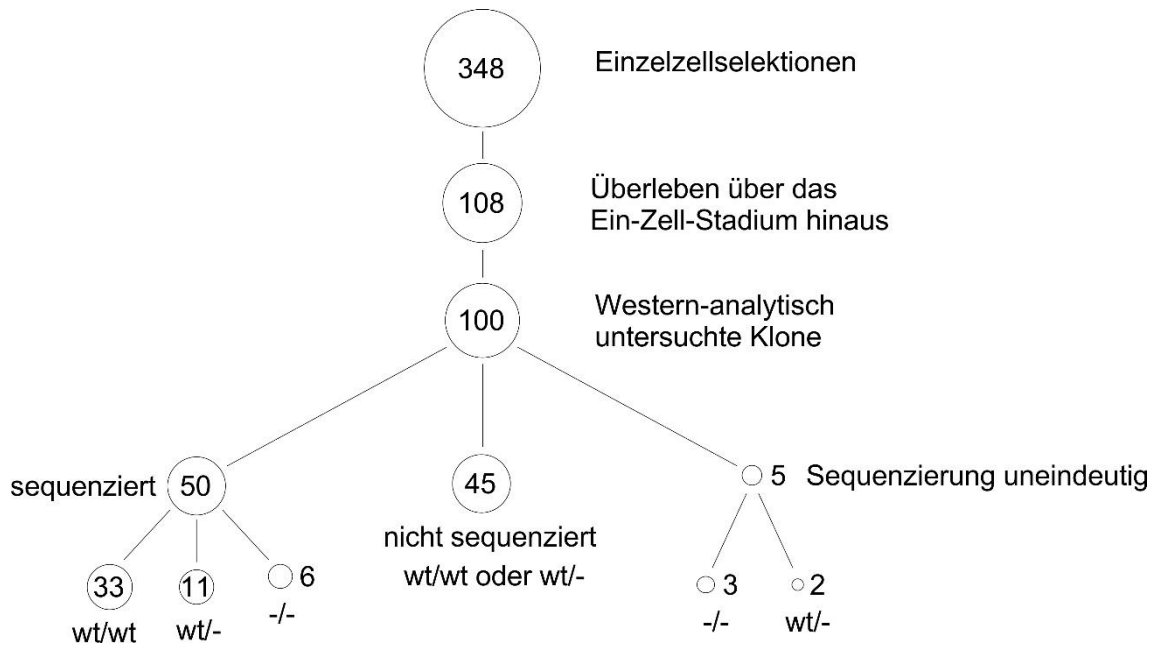


Abb. 15 **Einzelzellklone der Zelllinie AMO-1**

Bei 108 der 348 selektionierten AMO-1-Zellen fand eine Proliferation über das Ein-Zell-Stadium hinaus statt. Von diesen Klonen erreichten wiederum 100 eine für die Western-Analyse ausreichende Zellzahl. Bei 50 Klonen ermöglichte die *TP53*-Sequenzierung eine sichere Bestimmung des *TP53*-Status, fünf Klone lieferten ein uneindeutiges Sequenzierungsergebnis (Klassifizierung in Zusammenschau mit der Western-Analyse) und bei 45 Klonen wurde aufgrund der Western-Analyse (deutliche p53-Induktion nach Nutlin-3A-Behandlung) oder zeitbedingt (Ende des Laborteils der vorliegenden Arbeit) auf eine *TP53*-Sequenzierung verzichtet.

Mit der Zelllinie AMO-1 wurden mehrere „Elektroporationsrunden“ durchgeführt. Die Aufzucht erfolgte zunächst in einer 96-Well-Platte. Alle randständigen Wells wurden mit 200µl PBS gefüllt um eine möglichst geringe Verdunstung des Mediums in den zentral gelegenen Wells zu gewährleisten. Abzüglich des „PBS-Randes“ blieben also 60 Wells pro Platte für die Aufzucht von AMO-1-Klonen. Die Anordnung der Klone in der 96-Well-Platte war Grundlage für die Namensgebung. In allen weiteren Versuchen wurde der Klon in Zeile D und Spalte 5 der 96-Well-Platte mit der Abkürzung D5 bezeichnet. Dem Code wurde zusätzlich eine römische Zahl vorangestellt. Diese kennzeichnete in welcher Elektroporationsrunde der Klon generiert worden war (siehe Tab 25).

Tab. 25 **Elektroporations- und Selektionsrunden mit der Zelllinie AMO-1**

Überblick über die, in den einzelnen Elektroporationsrunden mit der Zelllinie AMO-1, eingesetzten CRISPR/Cas9 Plasmide und deren verwendete Konzentration im Elektroporationsmix (je zusätzlich zu 5µg/ml EGFP-Plasmid). Die Entstehung eines Klons in einer bestimmten Elektroporationsrunde war ausschlaggebend für dessen Benennung.

Elektroporationsrunde	CRISPR/Cas9-Plasmid	Konzentration
I, III, V	2	[25µg/ml]
II, VI	1	[25µg/ml]
IV	1+2	je [20µg/ml]

Die Aufzucht von Klonen der Zelllinien MM.1S, NCI-H929 und MOLP-8 gestaltete sich schwierig. Die beiden Zelllinien NCI-H929 und MOLP-8 zeichneten sich durch eine schlechte Transfektabilität aus und eine Generierung von Einzelzell-Klonen war nicht möglich. Mit NCI-H929 gelang keine Aufzucht von Klonen bei 60 selektionierten Einzelzellen (0/60). Für MOLP-8 gelang lediglich die Aufzucht eines einzigen Klons (1/60). Darum wurde der Versuch der Generierung von Klonen mit mono- bzw. biallelischer *TP53*-Inaktivierung dieser beiden *TP53^{wt/wt}* Zelllinien in diesem Stadium vorzeitig beendet. Mit der Zelllinie MM.1S gelang die Aufzucht von 7 Klonen bei 60 selektionierten Zellen. Aufgrund der im Vergleich zu AMO-1 deutlich geringeren Proliferationsrate von MM.1S Zellen waren bis zur Beendigung des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit nicht alle Experimente mit den Klonen dieser Zelllinie abgeschlossen, weshalb sich die vorliegende Arbeit im Folgenden auf die Ergebnisse aus der Analyse von AMO-1-Klonen beschränkt.

3.4 Western-Blot-Screening

Die Western-Analyse wurde als initiale Screening-Methode zur Detektion von AMO-1-Klonen mit verändertem p53-Status eingesetzt. Zunächst wurde an AMO-1-Standardkultur-Zellen untersucht, von welcher Anzahl an Zellen Lysate benötigt wurden, um eine Detektion von p53 per Western-Analyse zu gewährleisten (siehe Abb. 16). Die Bestimmung der für einen Western Blot benötigten Zellzahl war von entscheidender Bedeutung, um einschätzen zu können, bis zu welcher Populationsgröße ein Klon wachsen musste, um eine erste Untersuchung seines p53-Status zu ermöglichen. Insbesondere sollte

damit auch geklärt werden, ob diese Bestimmung bereits aus der 96-Well-Platte heraus, also mit deutlich weniger als 50.000 Zellen, vorgenommen werden konnte.

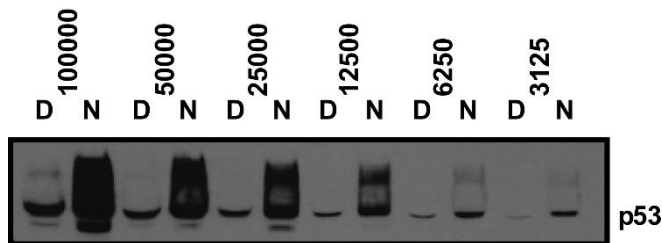


Abb. 16 **p53-Titrationsreihe für AMO-1 Zellen**

AMO-1-Zellen wurden mit 10µM Nutlin-3A (N) oder mit DMSO (D, als Lösungsmittelkontrolle) behandelt. Anschließend wurden Lysate von jeweils 600000 Zellen gewonnen und so verdünnt, dass die genannten „Zelläquivalente“ in der SDS-PAGE eingesetzt werden konnten.

Anhand der p53-Titration wurde eine Zellzahl von ca. 10000-20000 Zellen als ideal für eine Western-Analyse des p53-Status von AMO-1 erachtet. Die Verdoppelungszeit der einzelnen Klone war sehr unterschiedlich, im Schnitt benötigten AMO-1-Klone ca. 3 Wochen bis zum Erreichen der erforderlichen Zellzahl.

Die p53-Induktion bei AMO-1-Standardkultur-Zellen diene stets als Referenz um Veränderungen der p53-Expression der verschiedenen Klone erkennen zu können. Abb. 17 zeigt einen Screening-Western-Blot.

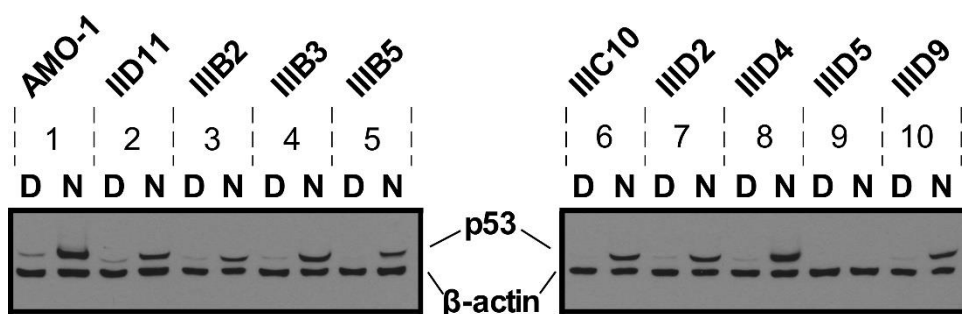


Abb. 17 **Screening-Western-Blot**

Zum Screening auf AMO-1-Klone mit TP53-Läsionen verwendeter Western Blot. Nach 16-stündiger Behandlung der jeweiligen AMO-1-Klone mit DMSO (D; Lösungsmittelkontrolle) und 10µM Nutlin-3A (N) wurde eine Western-Analyse der Zelllysate durchgeführt (β-Aktin zur Ladekontrolle).

In dem dargestellten Screening-Western-Blot war bei den regulären AMO-1-Kulturzellen und allen untersuchten Klone außer bei IIID5 eine p53-Induktion

nach Nutlin-3A-Behandlung feststellbar (siehe Bahnen 1-8 und 10). Die gleich stark ausgeprägten β -Aktin-Banden belegten die gleichmäßige Beladung der Geltaschen mit äquivalenten Proteinmengen und schlossen eine Überbeladung der Bahnen 1-8 N sowie 10 N bzw. eine Unterbeladung von Spalte 9 N aus. In der Konsequenz wurde von einem p53-Knockout bei Klon IIID5 ausgegangen, der später mittels *TP53*-Sequenzierung bestätigt werden konnte (siehe Abb. 19). Auch AMO-1-Klone mit Läsionen in lediglich einem der beiden *TP53*-Allele zeigten Auffälligkeiten in der Western-Analyse. Bei diesen war durchwegs eine gegenüber den *TP53*^{wt/wt} Klonen deutlich beeinträchtigte Nutlin-3A-abhängige p53-Induktion zu beobachten. Einen Überblick bietet Abb. 21.

3.5 Genomische Analyse der Klone

Von allen Klonen wurde genomische DNA gewonnen und bei -80°C aufbewahrt. Die genomische DNA einiger, v.a. der in der Western-Analyse auffälligen, Klone wurde analysiert. Dazu wurde zunächst der, je nach transfiziertem CRISPR/Cas9-Plasmid, relevante *TP53*-Bereich der Klone (siehe Tab. 25) unter Verwendung der Primer 53-1AN5a und -3a (CRISPR-Zielsequenz *TP53-1* in Exon 4) bzw. 53-2AN5a und -3a (CRISPR-Zielsequenz *TP53-2* in Exon 7) mittels PCR amplifiziert. Nach der Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR-Produkte wurden Banden mit einer Länge von ca. 300-350 Nukleotiden ausgeschnitten, die DNA mittels des QIAquick Gel Extraction Kits extrahiert und anschließend sequenziert.

Die sequenzierte DNA beinhaltete die Sequenzen beider *TP53*-Allele. In Anbetracht dessen wurden Klone, die ein eindeutiges p53-wt-Bandenmuster zeigten, als *TP53*^{wt/wt} Klone klassifiziert (siehe Abb.18, IIF10), auch wenn damit nicht vollkommen ausgeschlossen werden konnte, dass nur ein Allel eine wt-Sequenz aufwies, das andere jedoch eine so weitreichende Deletion erfahren hatte, dass auch ein Primer Bindungsbereich verloren gegangen wäre. Solche Klone wären also fälschlicherweise als *TP53*^{wt/wt} eingestuft worden, obwohl sie monoallelisch *TP53*-inaktiviert gewesen wären. Da die Primer für die *TP53*-Sequenzierung so gewählt wurden, dass deren Bindestellen mehr als 100bp von

der entsprechenden Zielsequenz *TP53-1(-2)* entfernt (siehe Abb. 12) waren, wurde die Wahrscheinlichkeit einer solchen inkorrekten Klassifizierung als gering betrachtet, zumal eine Klassifizierung stets in Kombination mit der Western-Analyse erfolgte.

Bei Klonen mit *TP53*-Läsionen überlagerten sich ab einem gewissen Punkt im Bereich der CRISPR-Zielsequenzen zwei verschiedene Sequenzen. Die Folge war ein unklares Bandenmuster (siehe Abb. 18, IVC9). Der exakte *TP53*-Status bzw. die Frage, ob dem uneindeutigen Bandenmuster die Überlagerung zweier mutierter Sequenzen (-/-) oder die Überlagerung einer mutierten und einer wt-Sequenz (wt/-) zugrunde lag, musste in der Folge meistens mittels biallelischer *TP53*-Sequenzierung geklärt werden.

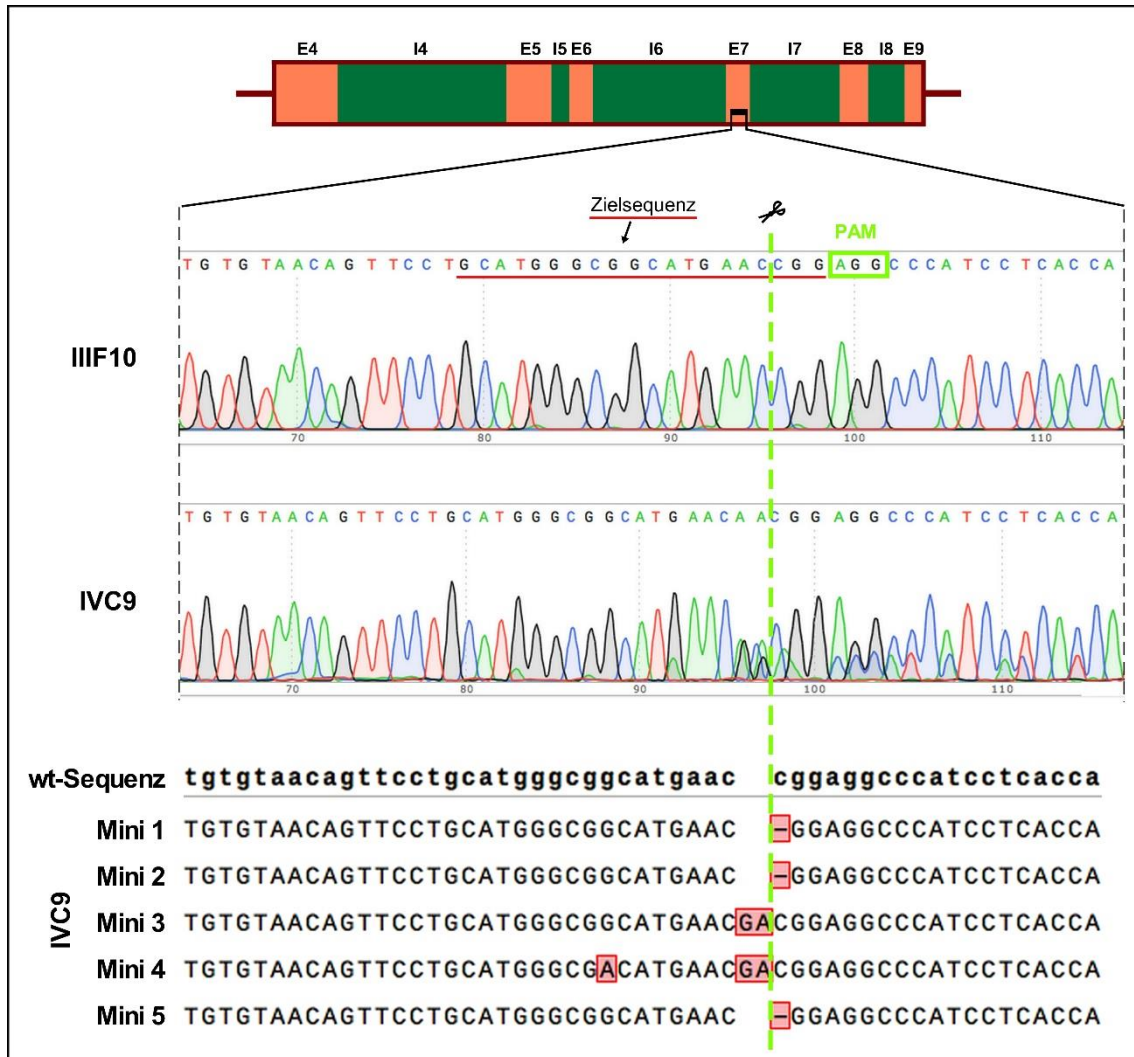


Abb. 18 **Genomische TP53-Analyse von AMO-1-Klonen**

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Sequenzierungsreaktion für TP53-PCR-Produkte von der genomischen DNA der AMO-1-Klone III F10 ($TP53^{wt/wt}$) und IVC9 ($TP53^{-/-}$). Diese beinhaltet die Sequenz beider TP53-Allele, so dass bei Klon III F10 ob des durchgehend saubereren Bandenmusters von zwei identischen Sequenzen (in diesem Fall TP53-wt-Sequenzen) ausgegangen werden kann. Klon IVC9 lässt ein sauberes Bandenmuster nur bis etwa zur Hälfte der abgebildeten Sequenz erkennen. Das letzte eindeutig bestimmbare Nukleotid ist ein Cytidin-Nukleotid. Danach überlagern sich offensichtlich zwei verschiedene Sequenzen. Diese Aufteilung findet in unmittelbarer Umgebung der Schnittstelle der Endonuklease Cas9 statt (grün gestrichelte Linie), die drei Nukleotide in 5'-Richtung vor dem PAM (grün umrahmt) lokalisiert ist. Darunter sind die Sequenzen für verschiedene Minipräparationen nach Klonierung der TP53-PCR-Produkte der genomischen DNA von Klon IVC9 in den pGEM®-T Easy Vector dargestellt. Minis 1, 2 und 5 zeigen eine einzelne Cytidin-Nukleotid-Deletion, wohingegen Mini 3 und 4 eine Guanodin- und Adenosin-Nukleotid-Insertion aufweisen. Diese zwei unterschiedlichen Sequenzen bilden also zwei separate CRISPR/Cas9 Ereignisse ab, die entsprechend beide TP53-Allele betroffen haben müssen. Sowohl die C-Deletion, als auch die GA-Insertion stehen in direktem Kontakt zur Cas9-Schnittstelle und scheinen in Folge des NHEJ nach zuvor erfolgtem DSB entstanden zu sein. Beide Mutationen führen in diesem Fall zu einer Verschiebung des Leserasters und sind somit hoch destruktiv. Die G→A Mutation in Mini 4 ist als PCR-Fehler der Taq-Polymerase zu werten.

Durch separate Sequenzierung beider TP53-Allele wurden 4 $TP53^{wt/-}$ Klone (ID4, IID5, IID10 und IIID3) und 3 $TP53^{-/-}$ Klone (IC5, IIID5 und IVC9) identifiziert bzw. bestätigt. Die TP53-Sequenzierung eines vierten offensichtlichen $TP53^{-/-}$ Klons

(IVD4) war aus ungeklärten Gründen trotz mehrerer Versuche nicht erfolgreich (siehe Diskussion).

Die beiden Klone IID5 und IID10 (siehe Abb. 19 **A**) waren mit dem CRISPR/Cas9-Plasmid mit der CRISPR-Zielsequenz *TP53-1* in Exon 4 transfiziert worden. Für Klon IID5 konnten durch TA-Klonierung nur wt-Sequenzen registriert werden, trotz zweier sich überlagernder Sequenzen bei der Sequenzierung der genomischen DNA. Da eine dieser beiden sich überlagernden Sequenzen als wt-Sequenz identifiziert werden konnte und in der anderen eine 4-Basen-Deletion (CGTC) entschlüsselt werden konnte, wurde dieser Klon als monoallelisch *TP53*-inaktiviert eingestuft. Der *TP53*^{+/-} Status von Klon IID10 konnte durch TA-Klonierung eindeutig bestätigt werden. Neben einer wt-Sequenz konnte eine 12-Basen-Deletion festgestellt werden. Auch die monoallelische *TP53*-Inaktivierung der Klone ID4 und IID3 konnte mittels separater Sequenzierung beider Allele bestätigt werden. So zeigten beide Klone im Bereich der CRISPR-Zielsequenz *TP53-2* in Exon 7 je eine wt-Sequenz und eine 16- (ID4) bzw. 41-Basen-Deletion (IID3).

Der *TP53*^{+/-} Status der Klone IC5, IID5 und IVC9 konnte durch Sequenzierung beider *TP53*-Allele nachgewiesen werden. Bei allen drei Klonen konnten im Bereich der CRISPR-Zielsequenz *TP53-2* je zwei unterschiedlich veränderte Sequenzen festgestellt werden (siehe Abb. 19 **B**).

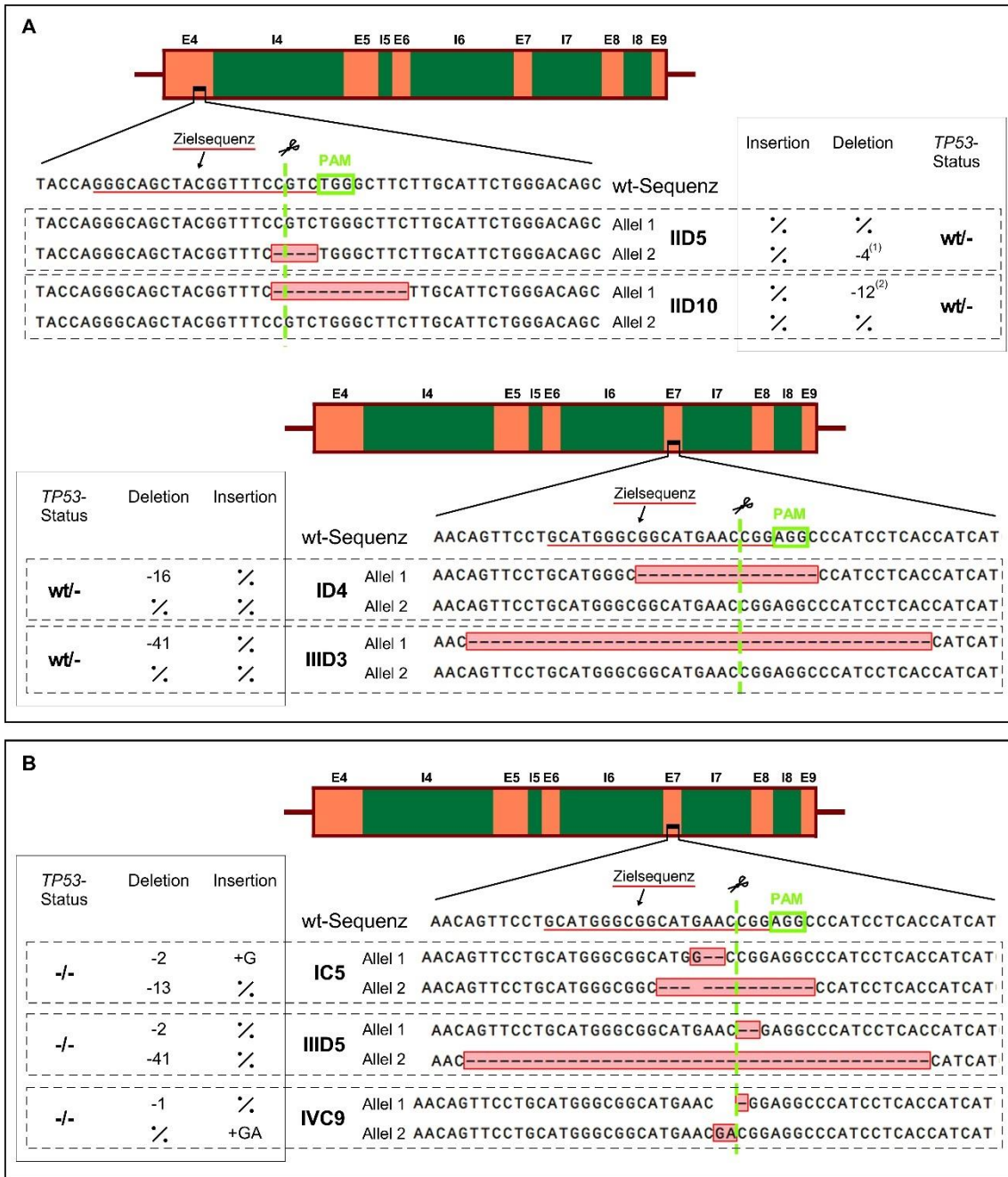


Abb. 19 Allel-spezifische Sequenzierung

Dargestellt sind die Allel-spezifischen Sequenzierungsergebnisse einiger mono- (A) bzw. biallelisch (B) TP53-inaktivierter und für die pharmakologische Untersuchung verwendeter AMO-1-Klone. Die Sequenzen der einzelnen Allele wurden durch Klonierung der PCR-Produkte in den pGEM®-T Easy Vector erhalten (siehe 2.15). Analog zu den in Abb. 18 gezeigten Sequenzen der Mini-Präparationen von klonierten IVC9-TP53-PCR-Amplifikationsprodukten lieferten auch die Sequenzierungsergebnisse für andere AMO-1-Klone zwei unterschiedliche Sequenzen, die entsprechend von beiden TP53-Allelen abstammten. Aus Platzgründen wurde jede dieser Sequenzen repräsentativ nur einmal abgebildet. Über den Allel-Sequenzen ist zur Veranschaulichung die wt-Sequenz des jeweiligen Abschnittes dargestellt. In dieser sind die CRISPR-Zielsequenz (rot unterstrichen) und das PAM (grün umrahmt) hervorgehoben. Drei Nukleotide vor dem PAM (in Richtung 5' Ende) bewirkt Cas9 einen DSB der DNA-Stränge (grün-gestrichelte Linie). Zu jedem einzelnen Allel der Klon ist die Größe vorhandener Deletionen oder Insertionen in Basenpaaren angegeben, sowie in Zusammenschau beider Allele der resultierende TP53-Status des jeweiligen Klons. (1) 4-Basendeletion aus Sequenzierung der Gesamt-TP53-PCR abgeleitet (2) In-frame-Deletion

3.6 Strukturelle Auswirkungen der *TP53*-Läsionen in isolierten Klonen

Die zuvor beschriebenen *TP53*-Läsionen konnten je nach Auswirkung auf das Leseraster des Gens in Frameshift-Mutationen und in In-frame-Mutationen unterteilt werden. Darüber hinaus waren bei Klon IVD4 Veränderungen von *TP53* aufgetreten, die eine Sequenzierung mittels der verwendeten PCR-Primer unmöglich machten.

Eine In-frame-Deletion konnte bei den vier Klonen IID10 (siehe Abb. 19), IIC5, IVG5 und VID9 registriert werden (bei den drei letztgenannten aus der *TP53*-Gesamt-PCR abgelesen). Bei insgesamt 6 *TP53*^{-/-} Klonen und 11 *TP53*^{wt/-} Klonen mit ermittelbaren Allel-Sequenzen, und somit $2 \cdot 6 + 11 = 23$ mutierten Allelen, entsprach dies einer relativen Häufigkeit von 17% (4/23). Die Mehrheit der gefundenen *TP53*-Alterationen stellten Frameshift-Mutationen dar. Das Leseraster (reading-frame) legt fest, welche Basentriplets einer mRNA für das, während der Translation gebildete, Protein kodieren. Folglich gibt es für eine Abfolge von Basen drei verschiedene Möglichkeiten diese in Triplets zu unterteilen – die drei sog. Leseraster. Folge einer Leserasterverschiebung (Frameshift) ist einerseits eine veränderte Größe des Proteins, bedingt durch einen vorzeitigen oder verspäteten Synthese-Stopp bei Entstehung oder Verlust eines Stopcodons (UGA, UAG oder UAA) und andererseits eine mutierte Aminosäuresequenz. p53 unterliegt zahlreichen posttranslationalen Modifikationen, so dass neben der Länge auch insbesondere die Art der Aminosäuresequenz, und somit das Fehlen oder Vorhandensein von Modifizierungsstellen, das Molekulargewicht beeinflusst.

Beginnend mit dem Start-Codon AUG, entsprechend ATG in Exon 2 von *TP53*, wird eine Kette von Aminosäuren gebildet, die das Grundgerüst des Proteins darstellt. Das Start-Codon AUG kodiert für die Aminosäure Methionin (Met). Die Verlängerung der Aminosäurekette des wt-Proteins endet schließlich nach Aspartat 393 (Asp) an dem Stopcodon UGA, entsprechend TGA in Exon 11 von *TP53* (siehe Abb. 20 **A, C**). Leserasterverschiebungen von *TP53* im Bereich der

CRISPR-Zielsequenz *TP53-2* (im Bereich der Aminosäurepositionen 242-248 von wt-p53) resultierten entweder in einem Stopcodon nach Serin 343 (-1 Base), oder nach Tryptophan 261 (-2 Basen) (siehe Abb. 20 **A**). Da sich das Epitop des verwendeten anti-p53-Aks von Aminosäure 11-25 am N-terminalen Ende von p53 erstreckte, war eine Detektion solcher Leserastermutanten in der SDS-PAGE möglich, sofern diese als Protein hinreichend stabil waren.

Bei den drei *TP53*^{-/-} Klonen IC5, IID5 und IVC9 waren beide Allele von Frameshift-Mutationen betroffen (siehe Abb. 19). Bei zwei davon (IC5 und IVC9) wurde mindestens von einem Allel ein stabiles Proteinprodukt abgelesen, erkennbar an den in der Westen-Analyse detektierbaren p53-Banden. Dieses lief, den Erwartungen an ein verkürztes p53-Derivat entsprechend, in der SDS-PAGE bei einem niedrigeren Molekulargewicht als das wt-p53 (siehe Abb.20 **B**).

Im Gegensatz dazu konnte bei Klon IID5 in Folge der Frameshift-Mutation beider Allele kein p53-Derivat in der Western-Analyse detektiert werden (siehe Abb. 20 **B**). Gleiches galt erwartungsgemäß für Klon IVD4, bei dem keine *TP53*-Sequenzbestimmung möglich war.

Klon IID10 besaß von *TP53* ein wt-Allel und eines mit einer 12-Basen-Deletion im Abschnitt *TP53-1*. Bei dieser Deletion handelte es sich um eine In-frame-Deletion, so dass folglich ein wt-p53-Monomer mit 393 Aminosäuren (abgelesen von dem wt-Allel) gebildet wurde und ein, um die 4 Aminosäuren Glycin, Phenylalanin, Arginin und Leucin, verkürztes p53-Monomer (abgelesen von dem Allel mit der 12-Basen-Deletion) (siehe Abb. 20 **C**). Dadurch war die Funktionsfähigkeit des p53-Systems so vollkommen gestört, dass keine Induktion von p53 durch Nutlin-3A beobachtet werden konnte (siehe Abb. 20 **B**). Das von diesem Klon gebildete, verkürzte p53 war offensichtlich stabil und konnte aufgrund seiner, beinahe der wt-p53 entsprechenden Länge in der Western-Analyse bei 53kDa detektiert werden (siehe Abb. 20 **B**).

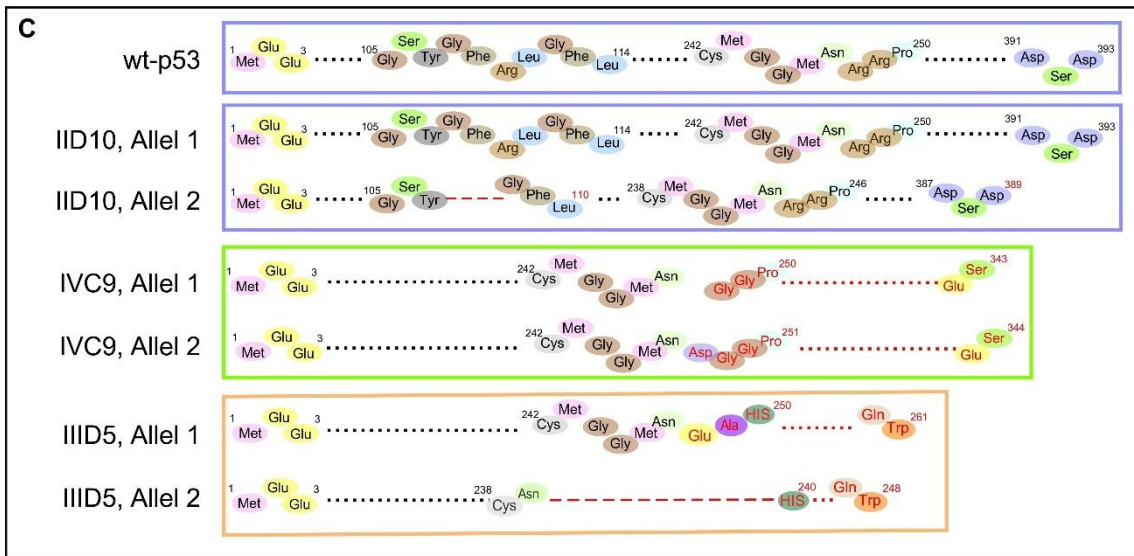
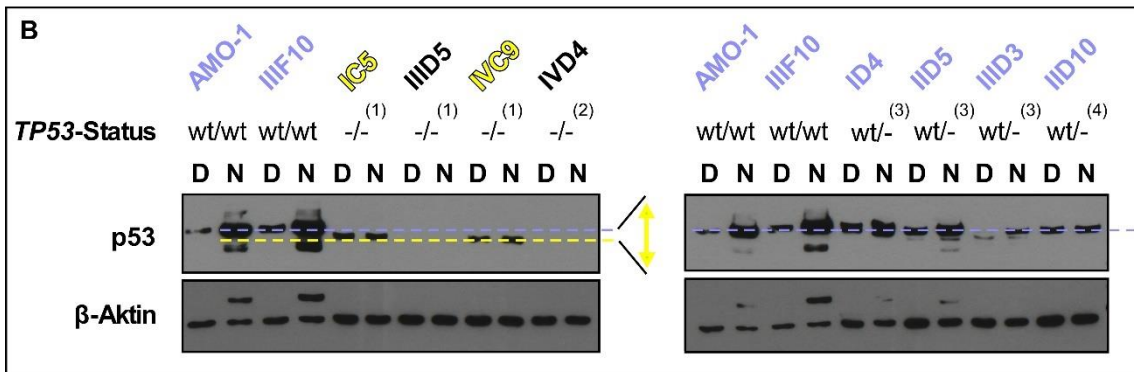
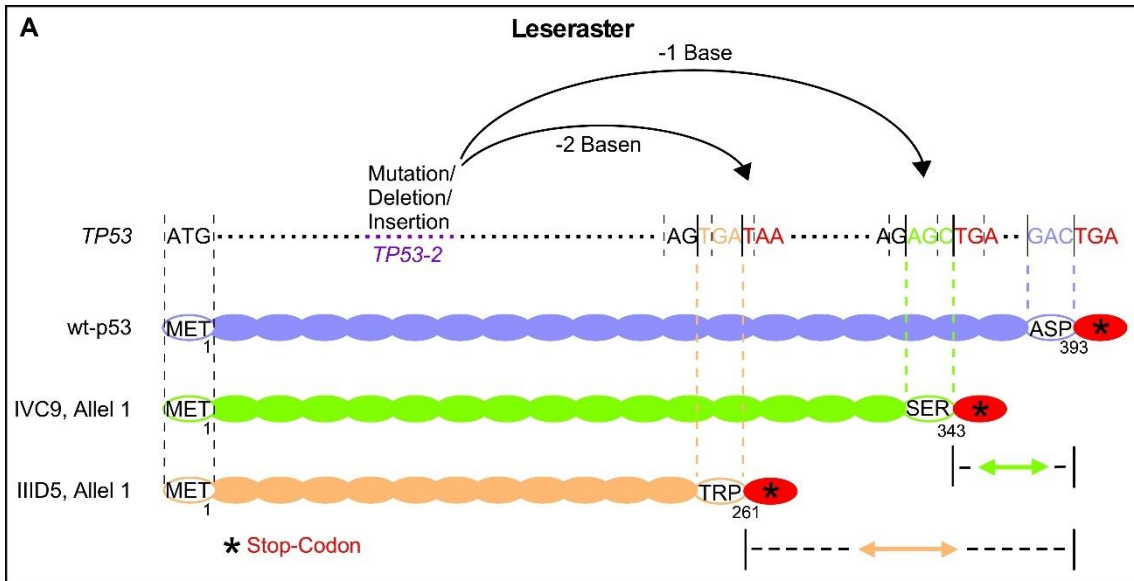


Abb. 20 Leserasteranalyse CRISPR/Cas9-mutierter *TP53*-Allele in AMO-1-Klonen

(A) Für die Aminosäuresequenz des, während der Translation gebildeten, Proteins ist das Leseraster der p53-mRNA von entscheidender Bedeutung. Die p53-mRNA entsteht durch Transkription von *TP53*. Durch Mutationen, Deletionen oder Insertionen während der Reparatur des durch Cas9 in der CRISPR-Zielsequenz verursachten DSBs, kann das Leseraster verschoben werden. Je nachdem, ob das Leseraster um eine oder zwei Basen in Richtung 3'-Ende verschoben wird, kodieren verschiedene Basen-Triplets für die Aminosäure-Sequenz des mutierten Proteins. Es gibt insgesamt drei mögliche Leseraster (da je drei Basen für eine Aminosäure kodieren). Durch Verschiebung des Leserasters ändert sich auch der Abstand bis zum nächsten Stopcodon (rot), bei dem die Translation endet. Durch das Vorhandensein oder Fehlen von Mutationen, Deletionen oder Insertionen im Bereich der CRISPR-Zielsequenz *TP53-2* kann während der Translation früher oder später ein Stopcodon ins Leseraster rücken und die Verlängerung der Aminosäurekette beenden. Die Aminosäurekette endet je nach Leseraster bei Aspartat 393 (wt), Serin 343 (Deletion einer Base) oder Tryptophan 261 (Deletion zweier Basen). (B) Die beiden *TP53*^{-/-} Klone IC5 und IVC9 bildeten in Folge der Leserastermutationen ein stabiles, C-terminal korruptiertes p53-Neoprotein. Dieses konnte in der Western-Analyse, den Erwartungen an ein verkürztes p53-Derivat entsprechend, bei einem geringeren Molekulargewicht als dem von wt-p53 detektiert werden. Bei dem *TP53*^{wt/-} Klon IID10 legt die fehlende Induktion von p53 nach Nutlin-3A-Behandlung eine Expression und dominant negativen Effekt des um 4 Aminosäuren verkürzten p53mut nahe (siehe Diskussion). (C) Allelspezifische Aminosäuresequenzen einiger in A und B gezeigten Klone.

3.7 Expression und Induzierbarkeit von p53, p21 und Mdm2 bei ausgewählten AMO-1-Klonen

Der *TP53*-Status der AMO-1-Klone hatte Einfluss auf die Expression und Nutlin-3A-abhängige Induzierbarkeit von p53 und dessen Transaktivierungspotential für die Zielgene *CDKN1A* und *Mdm2*. Dies äußerte sich in der Western-Analyse anhand der Nutlin-3A-abhängigen Induzierbarkeit der Proteine p53, p21 und Mdm2 (siehe Abb. 21).

Das identische Expressionsmuster der untersuchten Proteine der regulären AMO-1-Kulturzellen (p53-Wildtyp) und des wt-Klons IIF10 zeigte, dass der Klon-Generierungsvorgang keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Proteine hatte. Die 16-stündige Behandlung mit 10µM Nutlin-3A bewirkte bei den *TP53*^{wt/wt} Zellen eine starke Induktion von p53, Mdm2 und p21, zu sehen an den deutlich kräftiger ausgeprägten Banden in den Bahnen 1,2,7 und 8 der Nutlin-3A-behandelten Zellen (N) verglichen zu deren jeweiligen DMSO-Kontrollen (D). Bei den dargestellten biallelisch *TP53*-inaktivierten Klone war keinerlei Induzierbarkeit der oben genannten Proteine durch Nutlin-3A festzustellen. Bei den beiden Klone IID5 (Bahn 4) und IVD4 (Bahn 6) hatte die biallelische *TP53*-Inaktivierung zu einem kompletten Ausfall der Proteinexpression von p53, Mdm2 und p21 geführt.

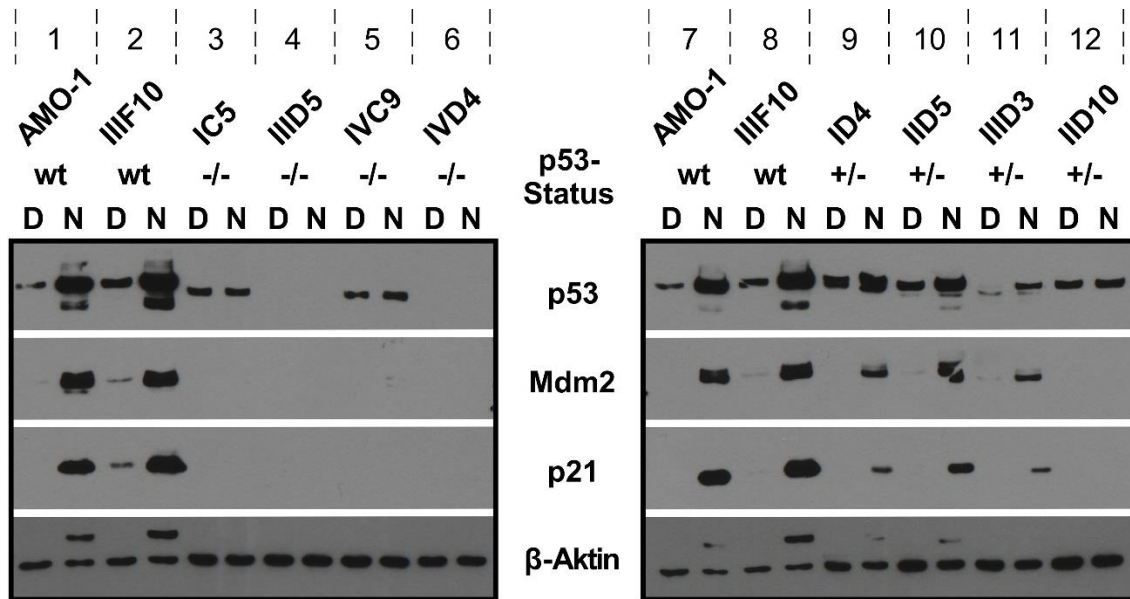


Abb. 21 **Western-Analyse ausgewählter AMO-1-Klone**

Western-Analyse von 4 biallelisch (links) und 4 monoallelisch *TP53*/p53-inaktivierten Klonen (rechts), jeweils im Vergleich zu regulären AMO-1-Kulturzellen und dem *TP53*^{wt/wt} Klon IIIIF10. Untersucht wurde die Expression der Proteine p53, Mdm2 und p21 nach 16-stündiger Induktion durch 10 μ M Nutlin-3A (N) in Relation zur DMSO-Kontrolle (D). β -Aktin diente zur Ladekontrolle. Die beiden Membranen (links \leftrightarrow rechts) wurden auf identische Weise gefärbt und belichtet.

Bei den beiden Klonen IC5 (Bahn 3) und IVC9 (Bahn 5), die ebenfalls Alterationen beider *TP53*-Allele aufwiesen (siehe 3.5), ließen sich hingegen noch p53-Banden im Western Blot nachweisen. Allerdings war auch bei ihnen die Nutlin-3A-abhängige Induzierbarkeit von p53, die bei den *TP53*^{wt/wt} Zellen beobachtet werden konnte, komplett ausgefallen. Zusätzlich liefen die p53-Banden ein Stück tiefer als die der *TP53*^{wt/wt} Zellen, verursacht durch das Entstehen verkürzter Proteine aufgrund der Verschiebung des *TP53*-Leserasters (siehe 3.6). Der dysfunktionale Zustand des entstandenen (und von dem anti-p53-Ak detektierten) Proteins war auch daran zu erkennen, dass es seine Funktion als Transkriptionsfaktor komplett eingebüßt hatte und deshalb bei den Klonen IC5 und IVC9 (genauso wie bei den beiden anderen dargestellten biallelisch *TP53*-inaktivierten Klonen IIID5 und IVD4) nach Nutlin-3A-Behandlung eine Mdm2- und p21-Induktion ausblieb.

Die monoallelisch p53-inaktivierten AMO-1-Klone ID4, IID5 und IIID3 (Bahn 9-11) ließen zum Teil eine deutlich abgeschwächte Induzierbarkeit von p53 verglichen mit *TP53*^{wt/wt} Zellen erkennen. Dies war an der weniger ausgeprägten Zunahme

der p53-Bandenstärke der Nutlin-3A behandelten Zellen gegenüber der jeweiligen DMSO-Kontrolle zu sehen. Der Umstand, dass unter Nutlin-3A-Behandlung allerdings noch eine, wenn auch eingeschränkte, p53-Induktion beobachtet werden konnte, war Ausdruck des einen verbliebenen intakten *TP53*-Allels. Die reduzierte Nutlin-3A-bedingte Induzierbarkeit von p53 manifestierte sich in einem eingeschränkten Transaktivierungspotential von p53. Dies zeigte die zwar nachweisbare aber deutlich verminderte p53-Zielgenexpression in Form schwächerer p21- und Mdm2-Banden bei den *TP53*^{wt/-} Klonen. Der monoallelisch *TP53*-inaktivierte AMO-1-Klon IID10 (Bahn 12) zeigte ein Proteinexpressionsmuster, das sich von dem der anderen *TP53*^{wt/-} Klone unterschied. Eine Induktion von p53 durch vorangehende Nutlin-3A-Behandlung fand nicht statt. Ferner zeigte sich auch genauso wie bei den *TP53*^{-/-} Klonen keine Nutlin-3A-abhängige Induzierbarkeit der p53-Zielgene *Mdm2* und *CDKN1A*.

3.8 Pharmakologische Charakterisierung

Im Folgenden wurde die Resistenzentwicklung gegen verschiedene Wirkstoffe bzw. Therapeutika nach mono- bzw. biallelischer *TP53*-Inaktivierung untersucht. Dazu wurden die klassifizierten und Western-analytisch untersuchten AMO-1-Klone einer Behandlung mit den Substanzen Nutlin-3A, Melphalan, Etoposid, Bortezomib und Carfilzomib unterzogen. Mittels durchflusszytometrischer Annexin-V-PI-Messung (Nutlin-3A) und alamarBlue-Assay (restliche Substanzen) wurde die „Effektive Konzentration“ (EC) bestimmt, mit der eine bestimmte Reduktion des Zellüberlebens (für Nutlin-3A) bzw. der Zellviabilität (für restliche Substanzen) nach 3- (Nutlin-3A) bzw. 4-tägiger (restliche Substanzen) Behandlung erreicht wurde (siehe Tab. 26). Der Vergleich zwischen regulärer Zellkultur und dem Wildtyp-Klon IIF10 diente als Kontrolle dafür, dass eine Einzelzellselektion per se keinen Einfluss auf die Medikamenten-Sensibilität ausübte.

Tab. 26 **Übersicht über Hemmkonzentrationen für ausgewählte AMO-1-Klone**

Der EC-Wert entspricht derjenigen Konzentration von Nutlin-3A (Melphalan/Etoposid/Bortezomib/Carfilzomib), die für eine bestimmte Reduktion (z.B. um 50% → EC50) des Zellüberlebens (der Zellviabilität) nach 3- (4-) tägiger Behandlung benötigt wurde. Bestimmung durchflusszytometrisch mittels Annexin-V-PI-Messung (Zellüberleben), oder durch alamarBlue-Assay (Zellviabilität). Die Werte wurden aus den Abbildungen 23, 24 und 26-28 abgelesen und sind relativ zur Lösungsmittelkontrolle normiert. n.e.: im untersuchten Konzentrationsbereich nicht erreicht

p53-Status Klon		wt		+/-				-/-			
		AMO-1	IIIF10	IID5	IIID3	ID4	IID10	IC5	IIID5	IVC9	IVD4
Nutlin-3A	EC10 [µM]	2	2	2	4	8	n.e.	n.e.			
	EC50 [µM]	4,2	4,5	4,9	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.			
	EC90 [µM]	6	7	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.			
Melphalan	EC50 [µM]	2,8	3,6	9,5	6	n.e.	n.e.	n.e.			
	EC90 [µM]	12	20	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.			
Etoposid	EC50 [µM]	1	0,8	2,5	2	1,5	4	6	5		
	EC75 [µM]	1,5	1,3	n.e.	8	n.e.	8	n.e.	n.e.		
Bortezomib	EC50 [µM]	2,7	2,3	2,7	2,3	2,1	3,9	2,5	3,1		
	EC90 [µM]	3,3	2,7	2,6	2,7	3,2	4,3	3,2	4		
Carfilzomib	EC50 [µM]	4	2,6	3,5	2,4	3,6	4,3	2,9	2,4		
	EC90 [µM]	n.e.	4,5	5	4,5	n.e.	n.e.	5	4		

Es folgt eine detaillierte Beschreibung des Ansprechens der unterschiedlichen Klone auf die getesteten Medikamente.

3.8.1 Nutlin-3A

Der Effekt von Nutlin-3A auf die regulären Kulturzellen und die verschiedenen Klone wurde nach 3-tägiger Behandlung durchflusszytometrisch mittels Annexin-V-PI-Messung untersucht (siehe 2.6 und 2.7). Zur Veranschaulichung der

Unterschiede wurden aus den Daten mit Hilfe des Programms GraphPad PRISM® Überlebenskurven der Klone in Abhängigkeit von der Nutlin-3A-Konzentration erstellt (siehe Abb. 23). Die Überlebenskurven der regulären AMO-1-Kultur-Zellen und des Wildtyp-Klons IIF10 wiesen einen ähnlichen Verlauf auf (Abb. 23 **A**). Eine Reduktion des Überlebens um 10% (EC10) wurde bei ca. 2µM Nutlin-3A erreicht und bei Konzentrationen oberhalb 10µM überlebte nahezu keine Zelle eine 3-tägige Behandlung. Der quasi identische Verlauf der beiden Überlebenskurven zeigte, dass auch nach Einzelzellselektion prinzipiell das Ansprechen der Wildtyp-Zellen auf Nutlin-3A korrekt wiedergegeben wird. Dahingegen bewirkte eine biallelische *TP53*-Inaktivierung eine vollständige Resistenz gegen Nutlin-3A (Abb. 23 **B**). Selbst nach 3-tägiger Behandlung mit der höchsteingesetzten Konzentration von 20µM wurde nicht einmal eine Verringerung des Überlebens um 10% erreicht. Somit entsprach das Verhalten der *TP53*^{-/-} AMO-1-Klone auf Nutlin-3A weitgehend dem von MM-Zelllinien mit biallelischer *TP53*-Inaktivierung³⁷.

Bereits eine monoallelische *TP53*-Inaktivierung bewirkte einen deutlichen Sensibilitäts-Rückgang auf eine Nutlin-3A-Behandlung. So konnten bei den beiden *TP53*^{wt/-} Klonen ID4 und IID3 EC10-Werte erst bei deutlich höheren Konzentrationen erreicht werden (ID4 bei ca. 8µM, IID3 bei ca. 4µM) als bei den *TP53*^{wt/wt} Zellen (2µM) und selbst eine Behandlung in Maximalkonzentration bewirkte keine Halbierung des Zellüberlebens (siehe Tab. 26 und Abb. 23 **C**). Klon IID10 zeigte trotz des einen intakten *TP53*-Allels eine, zu den *TP53*^{-/-} Klonen äquivalente, Resistenz gegen Nutlin-3A. Eine solche Resistenz nach monoallelischer *TP53*-Inaktivierung war lediglich bei Klon IID5 schwach ausgeprägt, doch wurde auch bei diesem Klon die EC90 im Gegensatz zu *TP53*^{wt/wt} Zellen im getesteten Konzentrationsbereich nicht erreicht (siehe Tab. 26 und Abb. 23 **C**).

Die Überlebensraten nach 3-tägiger Nutlin-3A-Behandlung der Klone korrelierten mit der Nutlin-3A-abhängigen Induzierbarkeit des p53-Zielgens *CDKN1A* (siehe Abb. 22). Dies zeigte, dass bei den Klonen mit *TP53* Alterationen, im Rahmen einer umfangreichen Beeinträchtigung der Zellzykluskontrolle, parallel zu

Funktionseinbußen beim Zellzyklusarrest (über p21) auch die Fähigkeit zur Apoptose-Einleitung beeinträchtigt war. Damit in Einklang stehende Beobachtungen hatten bereits Stühmer et al. gemacht, die bei verschiedenen MM-Zelllinien und Primärmaterial von MM-Patienten einen direkten Zusammenhang zwischen der Nutlin-3A-abhängigen Induzierbarkeit von p53 sowie der Induzierbarkeit der p53-Zielgenexpression und dem Zellüberleben nach Nutlin-3A-Behandlung feststellen konnten³⁷.

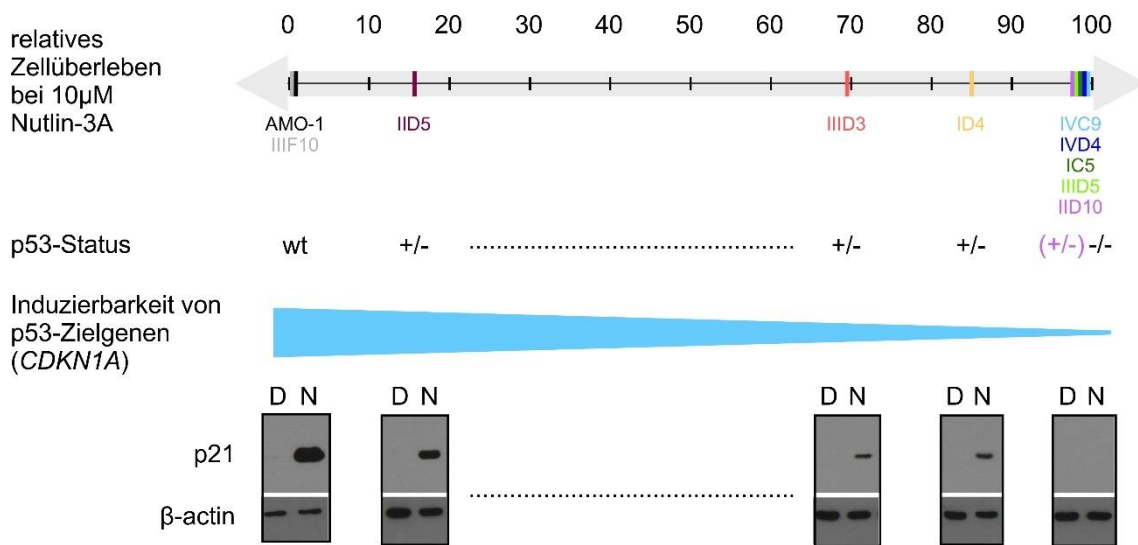


Abb. 22 Korrelation des Zellüberlebens mit der Induzierbarkeit von p53-Zielgenen
 Die Überlebensraten der AMO-1-Klone und -Kulturzellen nach 3-tägiger Behandlung mit 10µM Nutlin-3A, ermittelt mittels Annexin-V-PI-Messung (siehe Abb.23), korrelierten mit dem p53-Status und der p21-Induktion nach 16-stündiger Behandlung mit 10µM Nutlin-3A (N). Lösungsmittelkontrolle mit DMSO (D). Die p21-Induktion wurde als stellvertretend für das allgemeine Transaktivierungspotential von p53 der verschiedenen Klone betrachtet. Zur Herkunft der Western Blot Bildfragmente siehe Abb. 21.

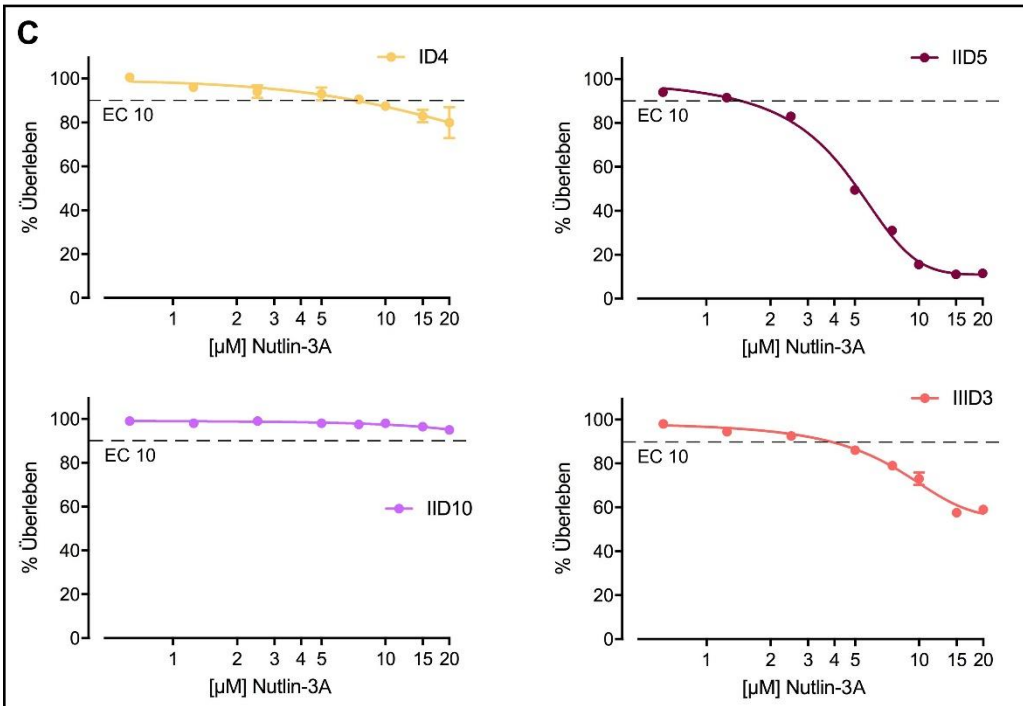
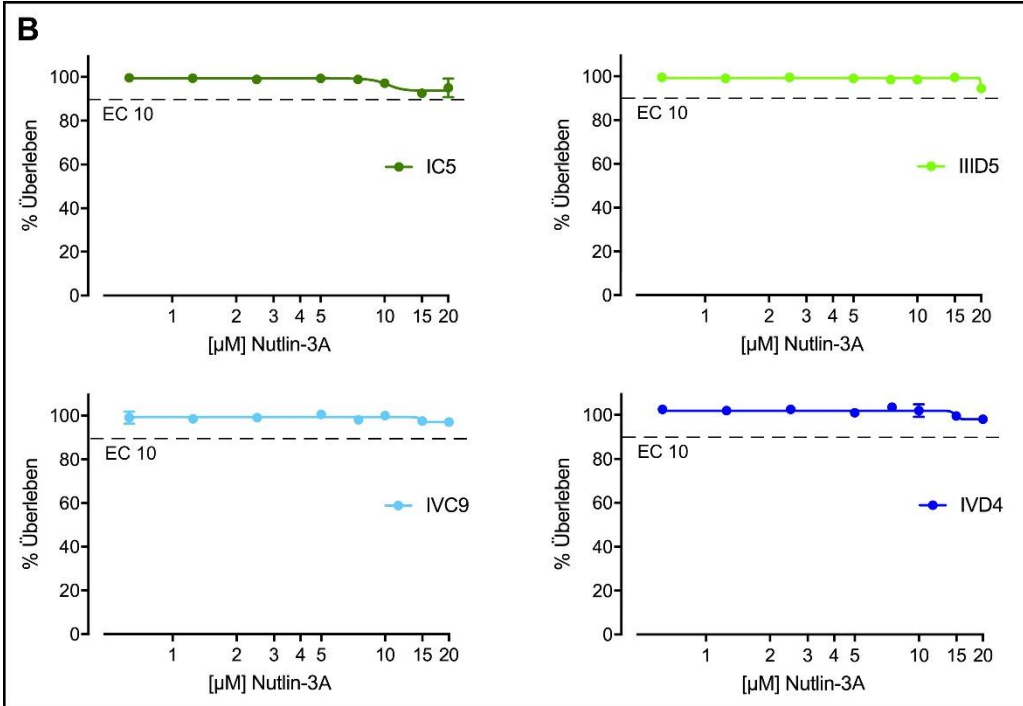
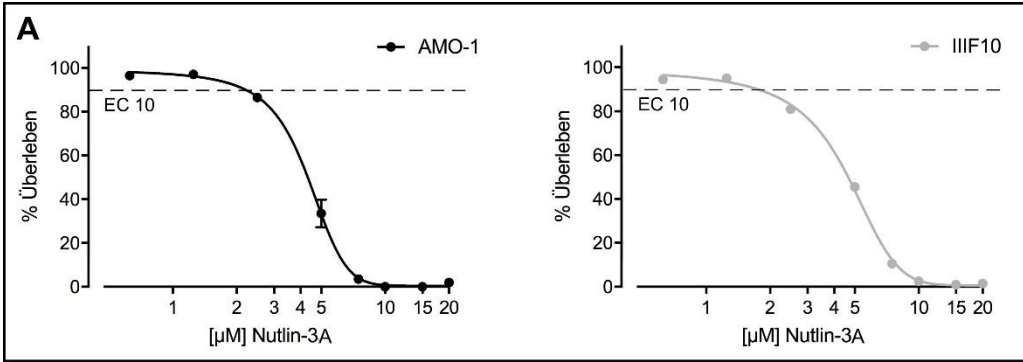


Abb. 23 Einfluss von Nutlin-3A auf das Zellüberleben

Dargestellt wird die Abhängigkeit des Anteils überlebender Zellen (y-Achse) der regulären AMO-1-Kulturzellen und eines $TP53^{wt/wt}$ Klons (**A**), sowie bi- (**B**) bzw. monoallelisch (**C**) $TP53$ -inaktivierter Klone von der Konzentration einer 3-tägigen Nutlin-3A-Behandlung (x-Achse). Die, den Graphen zugrunde liegenden, Daten wurden mittels durchflusszytometrischer Annexin-V-PI-Messung (siehe 2.6.1) erhoben. Das Überleben ist in % relativ zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO) angegeben. Die EC10-Linie entspricht einer Überlebensrate von 90%. Den einzelnen Werten liegen ≥ 2 unabhängige Messungen zugrunde, die Streuung dieser Messwerte wird durch Fehlerbalken dargestellt.

3.8.2 Melphalan

Die Viabilitätskurven der AMO-1-Klone und regulären AMO-1-Kulturzellen wurden anhand der alamarBlue-Daten nach 4-tägiger Behandlung mit Melphalan erstellt (siehe Abb. 24). Der ähnliche Rückgang der Viabilität nach Melphalan-Behandlung der regulären AMO-1-Kulturzellen und des $TP53^{wt/wt}$ Klons IIIIF10 (siehe Abb. 24 **A**) ließ wiederum erwarten, dass der Selektionierungs- und Wachstumsprozess der Klone keinen prinzipiellen Einfluss auf ihre Melphalan-Sensibilität hatte. Im Gegensatz dazu verliefen die Viabilitätskurven der Klone mit biallelischem $TP53$ -Verlust stets über der EC50-Linie (Klon IIID5 und IVC9 sogar deutlich darüber) (siehe Tab. 26 und Abb. 24 **B**). Auch die Viabilität der Klone mit monoallelischer $TP53$ -Inaktivierung lag bei der maximal verwendeten Melphalan-Konzentration ($20\mu\text{M}$) noch deutlich höher als bei $TP53^{wt/wt}$ Vergleichskulturen (Ausnahme: Rückgang der Viabilität von Klon IID5 auf ca. 30%) (siehe Tab. 26 und Abb. 24 **C**). Insgesamt lag die Viabilität der biallelisch $TP53$ -inaktivierten Klone bei der maximalen Dosierung von Melphalan ($20\mu\text{M}$) tendenziell noch etwas höher, als die der monoallelisch $TP53$ -inaktivierten Klone, jedoch bewirkte bereits der Verlust eines $TP53$ -Allels eine deutliche Abflachung/Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven für Melphalan.

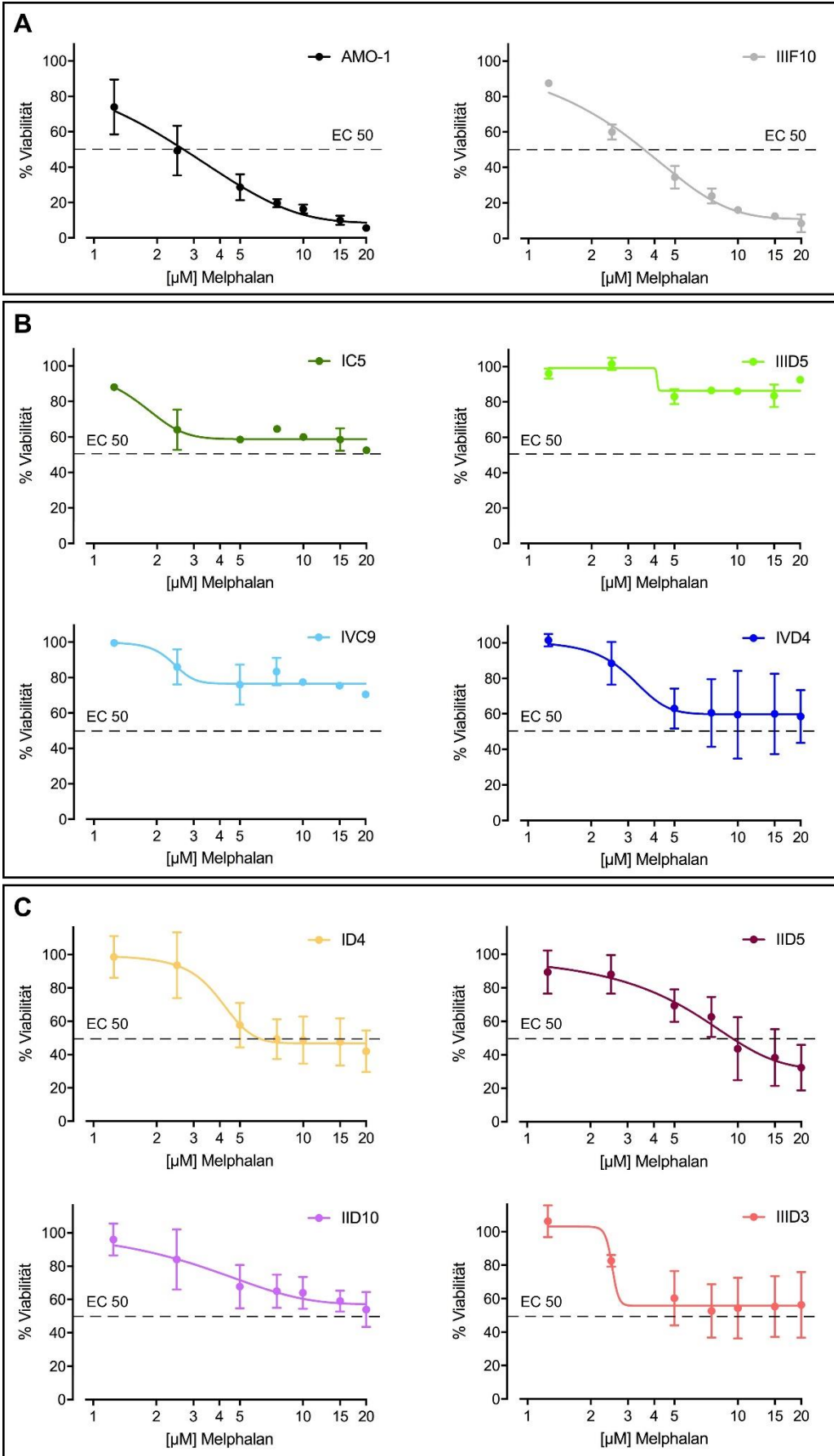


Abb. 24 Einfluss von Melphalan auf die Zellviabilität

Dargestellt wird die Abhängigkeit der Viabilität (y-Achse) der regulären AMO-1-Kulturzellen und eines $TP53^{wt/wt}$ Klons (A), sowie bi- (B) bzw. monoallelisch (C) $TP53$ -inaktivierter Klone von der Melphalankonzentration (x-Achse) einer 4-tägigen Behandlung. Die, den Graphen zugrunde liegenden, Daten wurden mittels alamarBlue-Assay (siehe 2.6.2) erhoben. Den einzelnen Werten liegen ≥ 2 unabhängige Messungen zugrunde. Streuungen dieser Messwerte werden durch Fehlerbalken dargestellt. Viabilität ist ein Maß des Reduktionspotentials der Zellen und damit Ausdruck der Summe ihrer Stoffwechselaktivität. Sie ist in % relativ zur Lösungsmittelkontrolle (Ethanol) angegeben. Der Schnittpunkt der EC50-Linie mit der Viabilitätskurve eines Klons markiert die Melphalankonzentration, die eine Einschränkung von dessen Viabilität um 50% bewirkte.

3.8.3 Etoposid

Die regulären AMO-1-Kulturzellen und AMO-1-Klone wurden einer 4-tägigen Behandlung mit Etoposid ausgesetzt. Anschließend wurde mittels alamarBlue-Assay die Viabilität der Zellen relativ zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO) gemessen und Viabilitätskurven der jeweiligen Klone unter Etoposid-Einfluss erstellt (siehe Abb. 26). Abermals unterstrich der ähnliche Verlauf der Viabilitätskurven der regulären AMO-1-Kulturzellen und des $TP53^{wt/wt}$ Klons IIF10 dass der Selektionierungsvorgang keinen Einfluss auf die Medikamenten-Empfindlichkeit hatte (siehe Abb. 26 A). Eine zunehmende Insuffizienz des p53-Systems durch mono- bzw. biallelische $TP53$ -Inaktivierung äußerte sich in einer Verschiebung der Viabilitätskurven mit Erreichen des EC50-Werts erst bei höheren Konzentrationen (Schnittpunkt der Viabilitätskurven mit der EC50-Linie). So bewirkte bei den $TP53^{wt/wt}$ Zellen eine Behandlung mit ca. $1\mu\text{M}$ Etoposid eine Halbierung der Viabilität, wohingegen für denselben Effekt bei monoallelisch $TP53$ -inaktivierten Klonen im Mittel $2\mu\text{M}$ Etoposid (größere Abweichungen zwischen den $TP53^{wt/-}$ Klonen) und bei biallelisch $TP53$ -inaktivierten Klonen eine Konzentration von $4\mu\text{M}$ benötigt wurde (siehe Abb. 25 und 26 B, C).

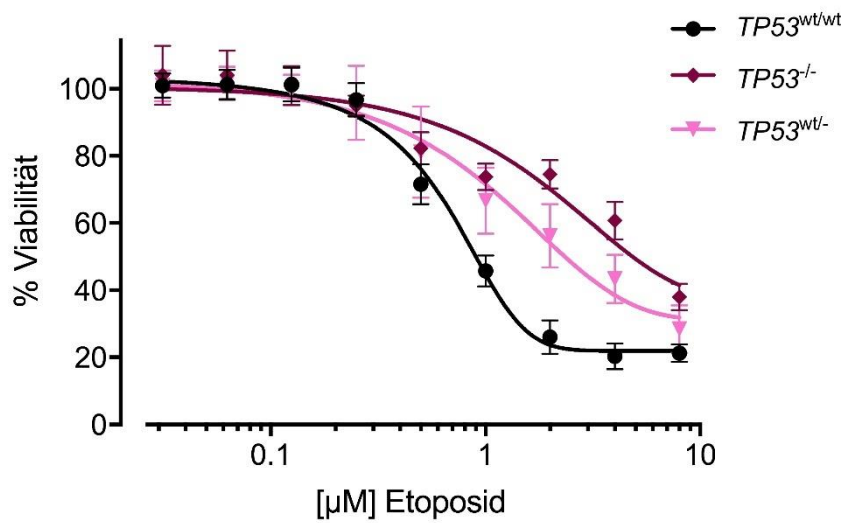


Abb. 25 **Einfluss des *TP53*-Status auf die Etoposid-Sensibilität**

Die Viabilität wurde mittels alamarBlue-Assay nach 4 tägiger Behandlung der Klone mit Etoposid erfasst und in % relativ zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO) angegeben. Den Kurven zugrunde liegen die Messwerte aller einzelnen AMO-1-Klone (siehe Abb. 26), entsprechend deren *TP53*-Status gruppiert. Die Viabilitätskurven der *TP53*^{wt/wt} und *TP53*^{-/-} Klone stützen sich auf je zwei unabhängige Messungen zweier verschiedener Klone (bzw. AMO-1-Kulturzellen), die Viabilitätskurven der *TP53*^{wt/-} Klone auf zwei unabhängige Messungen von vier Klonen. Fehlerbalken symbolisieren die Streuung der einzelnen Messwerte.

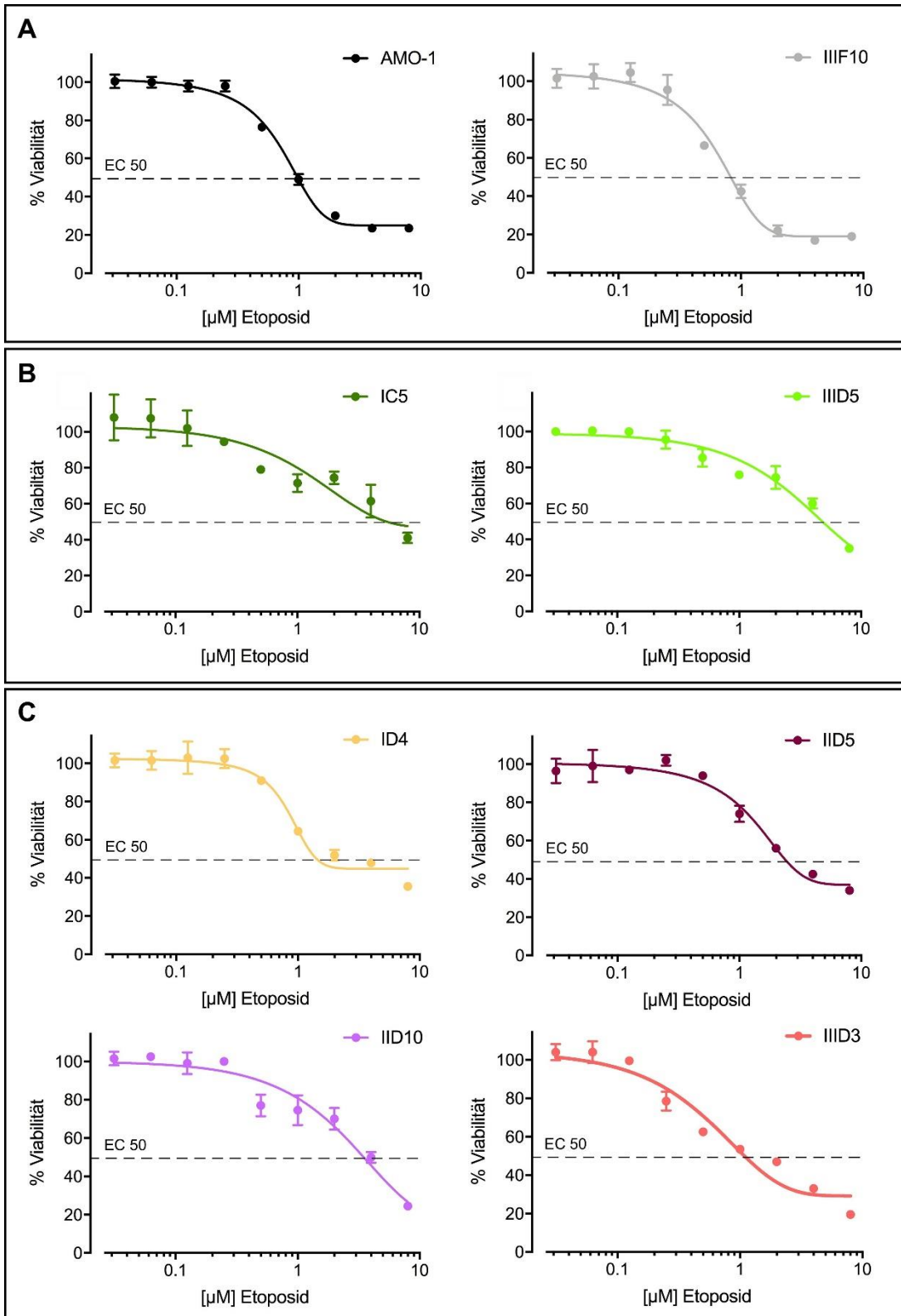


Abb. 26 Einfluss von Etoposid auf die Zellviabilität

Dargestellt wird die Abhängigkeit der Viabilität (y-Achse) der regulären AMO-1-Kulturzellen und eines *TP53^{wt/wt}* Klons (A), sowie bi- (B) bzw. monoallelisch (C) *TP53*-inaktivierter Klone von der Etoposidkonzentration (x-Achse) einer 4-tägigen Behandlung. Die, den Viabilitätskurven zugrunde liegenden, Daten wurden mittels alamarBlue-Assay (siehe 2.6.2) erhoben und entstammen 2 unabhängigen Versuchen. Fehlerbalken stellen die Streuung der einzelnen Messwerte dar. Viabilität ist ein Maß des Reduktionspotentials der Zellen und damit Ausdruck der Summe ihrer Stoffwechselaktivität. Sie ist in % relativ zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO) angegeben. Die EC50-Linie markiert die Etoposidkonzentration, die eine Einschränkung der Viabilität um 50% bewirkte.

3.8.4 Bortezomib

Die Viabilität der regulären AMO-1-Kulturzellen und AMO-1-Klone unter Bortezomib-Einfluss wurde nach 4-tägiger Behandlung mit Bortezomib mittels alamarBlue-Assay erfasst. Wie bei der Verwendung der zuvor dargestellten Substanzen, schien aufgrund des ähnlichen Viabilitätskurvenverlaufs der regulären AMO-1-Kulturzellen und des *TP53^{wt/wt}* Klons IIF10 der Selektionierungs- und Wachstumsprozess der Klone keinen Einfluss auf die Bortezomib-Empfindlichkeit gehabt zu haben (siehe Abb. 27). Ein Einfluss des *TP53*-Status auf die Bortezomib-Sensibilität der Klone konnte nicht festgestellt werden. Die Schnittpunkte der Viabilitätskurven des *TP53^{wt/wt}* Klons und der mono- bzw. biallelisch *TP53*-inaktivierten Klone mit der EC50-Linie erstreckten sich auf den Konzentrationsbereich zwischen 2nM und 4nM und die EC90 wurde bei 2,5-4,5nM Bortezomib erreicht (siehe Tab. 26 und Abb. 27).

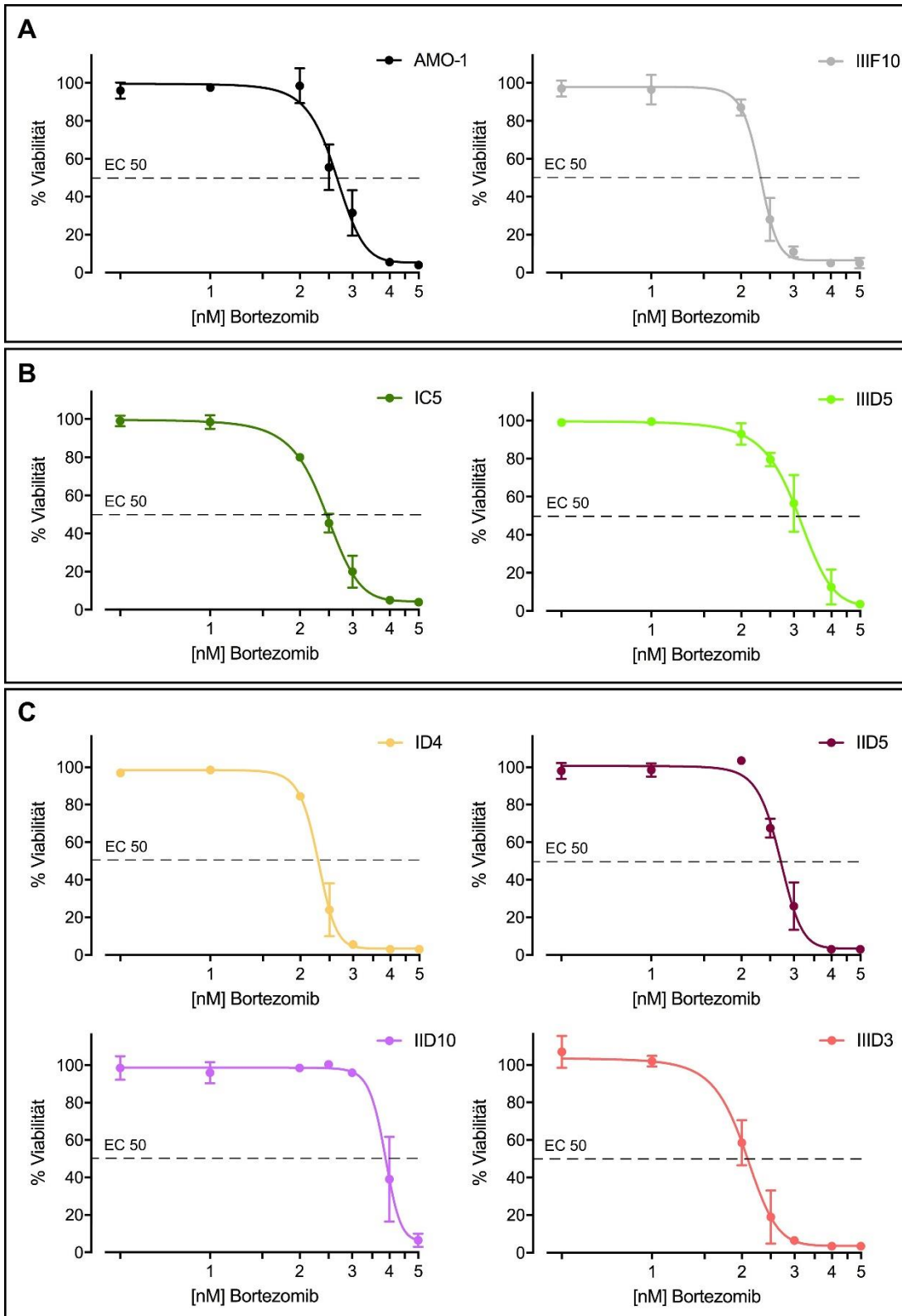


Abb. 27 Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität

Dargestellt wird die Abhängigkeit der Viabilität (y-Achse) der regulären AMO-1-Kulturzellen und eines *TP53^{w^t/w^t}* Klon (A), sowie bi- (B) bzw. monoallelisch (C) *TP53*-inaktivierter Klone von der Bortezomibkonzentration (x-Achse) einer 4-tägigen Behandlung. Die, den Viabilitätskurven zugrunde liegenden, Daten wurden mittels alamarBlue-Assay (siehe 2.6.2) erhoben und stützen sich auf ≥ 2 unabhängige Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die Streuung der einzelnen Messwerte in verschiedenen Messungen an. Viabilität ist ein Maß des Reduktionspotentials der Zellen und damit Ausdruck der Summe ihrer Stoffwechselaktivität. Sie ist in % relativ zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO) angegeben. Die EC50-Linie markiert die Bortezomibkonzentration, die eine Einschränkung der Viabilität um 50% bewirkte.

3.8.5 Carfilzomib

Die Viabilität der regulären AMO-1-Kulturzellen und der AMO-1-Klone unter Carfilzomib-Exposition wurde nach 4-tägiger Behandlung mittels alamarBlue-Assay gemessen (siehe Abb. 28). Auch für den zweiten getesteten Proteasominhibitor, Carfilzomib, schien der *TP53*-Status ohne Bedeutung für die Sensibilität der Klone zu sein. Die EC50 wurde zwischen 2,5nM und 4,5nM erreicht (siehe Tab.26 und Abb. 28). Die Kurven der einzelnen Klone unterschieden sich leicht, ein Zusammenhang mit dem *TP53*-Status konnte jedoch nicht festgestellt werden.

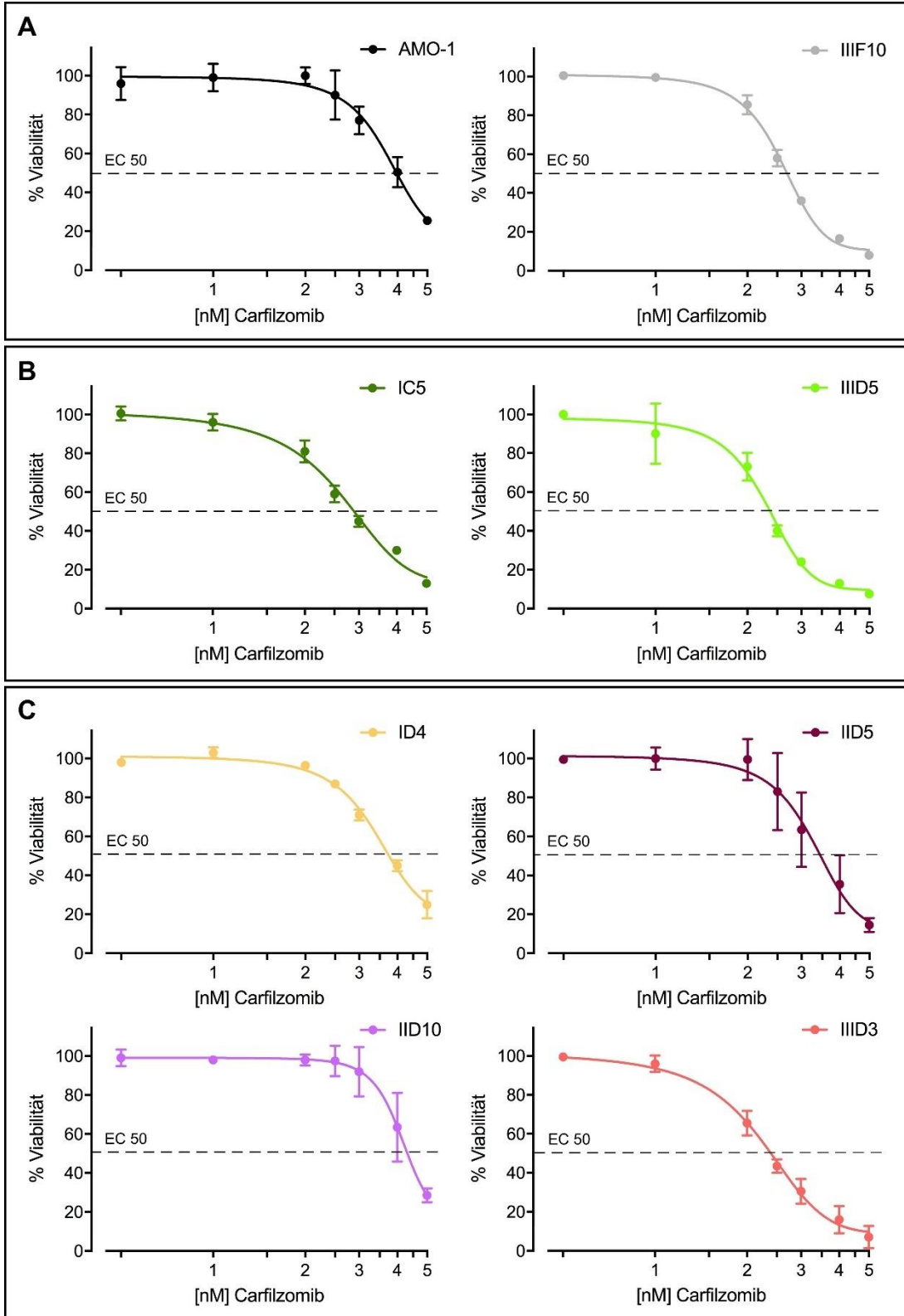


Abb. 28 Einfluss von Carfilzomib auf die Zellviabilität

Dargestellt wird die Abhängigkeit der Viabilität (y-Achse) der regulären AMO-1-Kulturzellen und eines *TP53^{wt/wt}* Klons (**A**), sowie bi- (**B**) bzw. monoallelisch (**C**) *TP53*-inaktivierter Klone von der Carfilzomibkonzentration (x-Achse) einer 4-tägigen Behandlung. Die, den Viabilitätskurven zugrunde liegenden, Daten wurden mittels alamarBlue-Assay (siehe 2.6.2) erhoben und stützen sich auf ≥ 2 unabhängige Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die Streuung der einzelnen Messwerte in verschiedenen Messungen an. Viabilität ist ein Maß des Reduktionspotentials der Zellen und damit Ausdruck der Summe ihrer Stoffwechselaktivität. Sie ist in % relativ zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO) angegeben. Die EC50-Linie markiert die Carfilzomibkonzentration, die eine Einschränkung der Viabilität um 50% bewirkte.

4 Diskussion

Der von vielen Autoren beobachtete Einfluss von *TP53*-Alterationen auf die Prognose hiervon betroffener MM-Patienten^{40,45,59,86,87}, war Anlass für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, inwiefern das p53-System beim MM durch mono- bzw. biallelische *TP53*-Inaktivierung beeinträchtigt wird. Damit zusammenhängend sollte untersucht werden, wie insbesondere monoallelische Läsionen in ihrer potenziellen Resistenzwirkung gegenüber klinisch relevanten Therapeutika zu beurteilen sind, da derartige Daten innerhalb eines isogenen Zellmodellsystems für das Multiple Myelom nicht bekannt sind. Die Arbeiten bildeten darüber hinaus eine Grundlage für spätere Versuche (Promotionsprojekt von Umair Munawar), in denen der Einfluss monoallelischer Punktmutationen in *TP53* untersucht und zu den hier erwirtschafteten Daten in Bezug gestellt wurde^{88,89}.

Die Korrelation klinischer Prognose-Daten mit der Funktionalität des p53-Systems der Myelom-Zellen von Hochrisiko-Patienten mit *TP53*-Alterationen, wird *in vivo* durch folgende Störfaktoren erschwert: (i) Beim Multiplen Myelom sind neben Punktmutationen einzelner Gene und Deletionen ganzer Chromosomenabschnitte (von beiden Inaktivierungsmechanismen ist *TP53* auf Chromosom 17p betroffen) eine Vielzahl genetischer Veränderungen bekannt. Dazu zählen u.a. Chromosomentranslokationen unter Einbeziehung des IgH-Locus auf Chromosom 14, Hypo- und Hyperdiploidie, Genamplifikationen (z.B. von *CKS1B*) und viele weitere^{17,40,90,91}. Diese treten oft in Kombination auf, so dass häufig deutliche Unterschiede in der Genarchitektur der entarteten Plasmazellen zwischen den einzelnen Patienten existieren. (ii) Darüber hinaus findet sich auch intraindividuell eine ausgeprägte Diversität in der Subklon-Zusammensetzung der MM-Fälle². In der Regel können schon in den Vorstadien des Multiplen Myeloms, MGUS oder SMM, viele Subklone mit unterschiedlichem genetischem Profil nachgewiesen werden¹⁰. Deren anteilmäßige Zusammensetzung und sogar örtliche Verteilung auf fokale Tumorerläsionen⁹² ändert sich im Krankheitsverlauf, wenn manche Klone durch eine bestimmte Therapieform zurückgedrängt und andere dadurch oder durch weitere genetische

Veränderungen einen Selektionsvorteil erfahren^{10,18,64}. (iii) Weiterhin treten die Myelom-Zellen an ihrem natürlichen Lokalisationsort, dem Knochenmark, in Wechselwirkung mit dem dort ansässigen physiologischen Mikromilieu, repräsentiert u.a. durch Knochenmark-Stroma-Zellen, Osteoblasten und Osteoklasten^{2,5,37,92,93}. Diese nehmen Einfluss auf die Medikamentenempfindlichkeit der Myelom-Zellen^{37,94} und können bei der Beurteilung der Funktionalität des p53-Systems *in vivo* als potentielle Confounder betrachtet werden. Aus diesen Gründen stellt das MM eine inter- und intraindividuell äußerst heterogene Erkrankung dar. Diese Heterogenität und der Einfluss oben genannter Störfaktoren lässt sich am besten *in vitro* unter standardisierten Laborbedingungen in einem Zelllinienmodell mit spezifischen *TP53*-Läsionen umgehen. In diesem Kontext können Unterschiede zwischen den, bis auf *TP53* isogenen, Klonen am sichersten auf ihren *TP53*-Status zurückgeführt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es ein solches Zelllinien-Modell zu generieren und an diesem die Funktionalitäts-Einbußen des p53-Systems einer MM-Zelllinie nach mono- bzw. biallelischer *TP53*-Inaktivierung, sowie die damit potenziell verbundene Resistenzbildung gegenüber gängigen anti-MM-Medikamenten, zu untersuchen.

Die Zelllinie AMO-1 stellte sich als geeignet für die p53-Knockout-Versuche heraus, da sie die notwendigen Bedingungen eines 2n-Status für wt-*TP53*⁸⁵ und eines funktionsfähigen, durch Nutlin-3A induzierbaren, p53-Systems besaß. Weitere vorteilhafte Eigenschaften dieser Zelllinie waren eine gute Transfektabilität und eine hohe Zellteilungsrate. Die Einteilung der Klone hinsichtlich ihres *TP53*/p53-Status erfolgte mittels Western-Analyse und allelspezifischer *TP53*-Sequenzierung. Durch die Bestimmung der *TP53*-Sequenzen beider Allele konnte oftmals der anhand des Western-Blot-Screenings vermutete p53-Status eines Klons verifiziert werden. Als Auslöser für die Inaktivierung eines *TP53*-Allels konnten Leserasterverschiebungen des Gens infolge des NHEJ-Reparaturvorganges nach Cas9-verursachtem DSB identifiziert werden. In einigen Fällen führte eine Frameshift-Mutation zur Expression eines stabilen, C-terminal korrumpierten p53-Derivats, das potenziell

einen Einfluss auf zelluläre Signalwege ausüben könnte. Sowohl das Proteinexpressions- als auch Resistenzmuster der AMO-1-Klone, bei denen ein solches p53-Neo-Protein in der Western-Analyse detektiert werden konnte, entsprach jedoch dem der AMO-1-Klone ohne nachweisbarem p53-Neo-Protein. Folglich wurden die verschiedenen Frameshift-Mutationen als funktionell äquivalent mit resultierender Inaktivierung des betroffenen *TP53*-Allels betrachtet. Damit erfolgte die *TP53*-Inaktivierung in dem hier vorgestellten AMO-1-Zelllinienmodell durch einen anderen Mechanismus als *in vivo*, wo diese sich meist in Form einer Deletion des Chromosomenabschnitts 17p oder einer „missense“-Punktmutation vollzieht^{18,40}. Auch wenn sich die „minimal deleted region“ (die kleinste gemeinsam deletierte Region) bei del(17p)-Fällen auf über 600kbp erstreckt und weitere Gene umfasst, wurde *TP53* bereits von Teoh et al. als das relevante, von dieser Deletion betroffene Gen identifiziert²¹. Deshalb wurden *TP53*-Leserasterverschiebungen in dem AMO-1-Zelllinienmodell der vorliegenden Arbeit als funktionelle Annäherung an eine 17p-Deletion betrachtet, obwohl sich die CRISPR/Cas9-vermittelten *TP53*-Läsionen nur auf einen, vergleichsweise minimalen, Bereich des Genoms beschränkten.

Der *TP53*-Status der Klone spiegelte sich in der Induktion von p53 sowie dessen Zielgenen *CDKN1A* und *Mdm2* nach Nutlin-3A-Behandlung in der Western-Analyse wider. Während bei *TP53*^{wt/wt}-Zellen eine starke Induktion des p53-Signalweges registriert werden konnte, war diese Induktion nach monoallelischer *TP53*-Inaktivierung deutlich abgeschwächt und kam nach Knockout beider *TP53*-Allele komplett zum Erliegen. Dies steht im Einklang mit einigen Studien die einen Zusammenhang zwischen dem *TP53*-Status und der Induktion von p53 und dessen Zielgenen nach Behandlung mit Nutlin-3A feststellen konnten^{21,30,37}. Im Gegensatz zu diesen Studien stützen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht auf verschiedene MM-Zelllinien, sondern auf Versuche mit isogenen Klonen einer Zelllinie mit lediglich differierendem *TP53*-Status. Dies ermöglicht den Ausschluss eines Einflusses koexistierender genetischer- und epigenetischer Veränderungen. Bereits der monoallelische *TP53*-Verlust ging mit einer deutlichen Reduktion des p53-Spiegels bei AMO-1-Zellen nach Zellstress

einher und resultierte in einem verringerten Transaktivierungspotential von p53. Dies steht in Einklang mit einer Arbeit von Lynch und Milner die eine Haploinsuffizienz von *TP53* bei isogenen Klonen der Colon-Carcinom-Zelllinie HCT116 feststellen konnten²⁹. Ein außergewöhnliches Proteinexpressionsmuster präsentierte Klon IID10. Trotz eines in der Sequenz-Analyse nachweislich intakten *TP53*-Allels hatte dieser *TP53*^{wt/-} Klon eine zu den *TP53*^{-/-} Klonen äquivalente Ausschaltung des p53-Systems erfahren. Die Läsion des zweiten Allels stellte sich bei genauerer Betrachtung als Deletion von 12 Basenpaaren und somit als In-frame-Deletion heraus. Folglich können die Zellen dieses Klons sowohl wt-p53, als auch ein um 4 Aminosäuren verkürztes und damit dem wt-p53 relativ ähnliches (im Vergleich zu den p53-Derivaten nach Verschiebung des Leserasters) Protein bilden, welches vermutlich weitgehend stabil ist (analog zu dem p53mut Punkt-mutierter *TP53*-Allele³⁷). Wie oben bereits erwähnt, ist neben der 17p-Deletion die „missense“-Punktmutation eine weitere bekannte Art der *TP53*-Alteration^{19,27,32,40,43}. Als Konsequenz einer solchen Punktmutation werden zusätzlich zu einer bloßen Inaktivierung des betroffenen Allels auch ein „gain-of-function“-Mechanismus (GOF) oder die Entwicklung eines dominant negativen Effekts durch das mutierte p53 auf das p53 des verbliebenen wt-Allels in Erwägung gezogen³². Unter GOF kann ein onkogener Funktionsgewinn des mutierten p53 durch Bindung an diverse Onko- oder Tumorsuppressorproteine verstanden werden, der zu einem abnormalen Einfluss von p53mut auf weitere zelluläre Signalwege führt^{27,95}. Ein dominant negativer Effekt einer *TP53*-Mutation beschreibt einen inhibierenden Einfluss des resultierenden p53mut auf den tetramerischen Transkriptionsfaktor, der sein volles Transaktivierungspotential nur ausschöpfen kann, wenn er aus p53-wt-Monomeren gebildet wird. Die Ausübung eines solchen dominant negativen Effekts durch p53mut wurde von einigen Autoren als alternativer Grund für die Beobachtung angenommen, dass die Mutation eines Allels trotz eines verbliebenen wt-Allels entsprechend negative Auswirkungen auf die Funktionalität des p53-Systems hatte⁹⁶ und könnte in der vorliegenden Arbeit den vollständigen Ausfall des p53-Systems von Klon IID10 trotz eines intakten *TP53*-Allels und trotz des Western-analytisch nachweisbaren p53 (allerdings ohne Nutlin-3A-Induktion) erklären.

Die kombinierte Betrachtung der Western-Analyse und allelspezifischen *TP53*-Sequenzbestimmung ermöglichte eine sichere Einordnung der Klone in die Gruppen der *TP53*^{wt/wt}-Klone, der monoallelisch- und der biallelisch *TP53*-inaktivierten Klone. Klon IVD4, bei dem trotz mehrerer Versuche keine erfolgreiche Sequenzierung von *TP53* gelang, wurde aufgrund des vollständigen Fehlens von p53-Banden in der Western-Analyse und der komplett ausgefallenen p53-Zielgen-Expression, als biallelisch *TP53*-inaktiviert eingestuft. Als ein möglicher Erklärungsansatz für das Scheitern der *TP53*-Sequenzierung wurde das Vorliegen größerer Deletionen betrachtet, die eine Hybridisierung der in der PCR verwendeten Primer mit dem Genom, und damit die Amplifizierung des entsprechenden *TP53*-Abschnittes, unmöglich machten. Auch der komplette Verlust von wenigstens einem Chromosom 17 wäre nicht auszuschließen, ist aber nicht näher untersucht worden. Lediglich der *TP53*-Status von Klon IID5 war mit einer geringen Unsicherheit behaftet. Aufgrund der, im Vergleich zu den *TP53*^{wt/wt} Zellen, reduzierten Nutlin-3A-abhängigen Induzierbarkeit von p53 und vor allem p21 und Mdm2 wurde dieser Klon anfänglich als monoallelisch *TP53*-inaktiviert eingestuft, wenngleich die Beeinträchtigung des p53-Systems in der Western-Analyse nicht ganz so ausgeprägt ausfiel, wie die der anderen *TP53*^{wt/-}-Klone. Die Sequenzbestimmung von 5 PCR-Produkten (mittels Klonierung in den pGEM®-T Easy Vector und bakterieller Vermehrung) lieferte ausschließlich *TP53*-wt-Sequenzen. Dies könnte einerseits durch Zufall bedingt sein (zufälliges Picken von 5 Bakterienkolonien mit *TP53*-wt-Vektor trotz vorhandener mutierter Sequenz) oder andererseits auf den tatsächlichen *TP53*^{wt/wt} Status von Klon IID5 zurückzuführen sein, weshalb es unklar blieb, ob es sich bei diesem Klon um einen *TP53*^{wt/-}-Klon mit relativ starker Proteinexpression handelte, oder um einen *TP53*^{wt/wt} Klon mit relativ schwacher. Einen Grund zur Annahme erstgenannter Hypothese lieferte die, in der Sequenzierung der genomischen DNA neben einer deutlichen *TP53*-wt-Sequenz erkennbare, schwache Hintergrundsequenz mit einer 4-bp-Deletion.

Nach der Überprüfung der Auswirkungen des Verlusts eines oder beider *TP53*-Allele von AMO-1-Zellen auf die Expression von p53 und dessen

Transaktivierungspotential, wurden die Konsequenzen dieser unterschiedlich stark ausgeprägten Beeinträchtigung des p53-Systems für die Sensibilität der Klone auf verschiedene Medikamente untersucht. Die Inaktivierung beider *TP53*-Allele bewirkte nicht nur eine, auf die Aufrechterhaltung physiologischer Proteinspiegel und deren Elevation nach Zellstress (Nutlin-3A-Behandlung) bezogene, Insuffizienz des p53-Systems, sondern manifestierte sich darüber hinaus in einer Insensibilität dieser Klone für eine Nutlin-3A-Exposition selbst im höchsten getesteten Konzentrationsbereich, was in Einklang mit der Nutlin-3A-Resistenz anderer MM-Zelllinien mit biallelischer *TP53*-Inaktivierung wie U266 und KSM11²¹ oder INA-6 und OPM-2³⁷ steht. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass das Defizit der Transaktivierungsfähigkeit von p53 bei diesen Klonen nicht nur *CDKN1A* und *Mdm2* betraf, sondern weitere Gene umfasste. Potenzielle Kandidaten wären die proapoptotisch wirkenden p53-Zielgene *PUMA*, *Bax* oder *Noxa*^{27,28}. Eine Resistenzentwicklung gegenüber Nutlin-3A konnte bei den AMO-1-Klonen auch schon nach monoallelischer *TP53*-Inaktivierung festgestellt werden. Bei diesen Klonen fiel eine deutliche Abflachung der, nach 3-tägiger Nutlin-3A-Behandlung mittels Annexin-V-PI-Messung erstellten, Überlebenskurven auf, die (bis auf Klon IID5) nicht die EC50 erreichten. Dies war ein Zeichen dafür, dass das verbliebene *TP53*-wt-Allel den Verlust des zweiten Allels nur unzureichend kompensieren konnte. Ein ähnliches Bild ergab auch die Resistenztestung auf die beiden genotoxisch wirkenden Zytostatika Melphalan und Etoposid. Ersteres entfaltet seine DNA-schädigende Wirkung über eine Alkylierung von Guanin-Resten und daraus folgender Quervernetzung der DNA-Stränge⁹⁷, letzteres über eine Hemmung der Topoisomerase II⁸². Die gemeinsame Endstrecke der zytostatischen Wirkung dieser Substanzen ist die Aktivierung des p53-Systems und Apoptose-Induktion aufgrund der verursachten DNA-Schäden³⁷. Klone mit *TP53*-Alterationen zeigten eine geringere Sensibilität für diese beiden genotoxischen Medikamente. Für beide Substanzen war der Effekt einer biallelischen *TP53*-Inaktivierung am stärksten, aber bereits die Inaktivierung eines Allels löste in allen betroffenen Klonen eine deutlich nachweisbare Resistenz aus. Insgesamt war die Resistenzentwicklung nach *TP53*-Inaktivierung gegen Melphalan stärker ausgeprägt als gegen Etoposid. So

wurde für Melphalan im getesteten Konzentrationsbereich nicht die EC50 der biallelisch *TP53*-deletierten Klone und nicht die EC90 der monoallelisch *TP53*-deletierten Klone erreicht, während für Etoposid eher eine Verschiebung der EC50 hin zu höheren Konzentrationen auffiel (siehe Tab. 26 und Abb. 25). Im Gegensatz zu der Sensibilität für die genotoxischen Medikamente Melphalan und Etoposid war die *TP53*-Inaktivierung ohne Bedeutung für ein Ansprechen auf die Proteasominhibitoren Bortezomib und Carfilzomib. Für beide Substanzen konnte keine Verschiebung der EC50 und EC90 infolge eines veränderten *TP53*-Status festgestellt werden (siehe Tab. 26). Dies steht in Einklang mit einigen Studien, die vom p53-System unabhängige Mechanismen als Ursache für eine Proteasominhibitor-Resistenz vorschlagen, u.a. Mutationen oder eine Überexpression der $\beta 5$ -Untereinheit (PSMB5) des Proteasoms^{98,99}, bzw. eine Down-Regulation der unfolded protein response oder eine vermehrte Expression von MDR-Efflux-Pumpen¹⁰⁰.

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit gelang es mittels Genome Editing durch CRISPR/Cas9 ein isogenes Zelllinien-Modell der MM-Zelllinie AMO-1 zur Untersuchung der Bedeutung zweier intakter *TP53*-Allele für die Funktionalität des p53-Systems zu etablieren. Dabei repräsentierten verschiedene Klone die unterschiedlichen Funktionszustände des p53-Systems nach mono- bzw. biallelischer *TP53*-Inaktivierung oder im wt-Zustand. Sowohl die Analyse des Proteinexpressionsmusters einiger dem p53-System zugehöriger Proteine (p53, p21 und Mdm2), als auch die Empfindlichkeitstestung der Klone auf die Substanzen Nutlin-3A, Melphalan und Etoposid lieferten mit den spezifischen *TP53*-Läsionen kohärente Ergebnisse. Je nach Art der *TP53*-Inaktivierung (mono- oder biallelisch) zeigten die AMO-1-Klone eine gruppencharakteristische Beeinträchtigung der Funktionalität des p53-Systems, was die Potenz des generierten Modells zur Untersuchung der Auswirkungen der Inaktivierung eines oder beider *TP53*-Allele unterstrich. Eine Limitation der Übertragbarkeit der Ergebnisse dieses Modells auf das Multiple Myelom im Allgemeinen besteht in dem Umstand, dass alle beschriebenen Beobachtungen lediglich an einer einzigen MM-Zelllinie, AMO-1, gemacht werden konnten. Das Scheitern der

Etablierung eines entsprechenden Modells mit den beiden Zelllinien NCI-H929 und MOLP-8 war auf bestimmte Eigenschaften dieser Zelllinien zurückzuführen. So sind NCI-H929 und MOLP-8 durch eine schlechte Transfektibilität gekennzeichnet. Zudem war nach Einzelzellselektion die Zellteilungsrate auf ein Minimum reduziert, so dass das Ein-Zell-Stadium nicht überwunden und keine Klone generiert werden konnten. Auch wenn möglicherweise unter anderen Transfektionsbedingungen oder bei einer späteren Selektion von Zellen, die nach der Elektroporation "aus dem Größten 'raus" sind, bessere Aufwuchsraten zu erreichen gewesen wären, wurde angesichts der guten Ergebnisse mit der Zelllinie AMO-1 eine Etablierung von *TP53*-Defektklonen für MOLP-8 und NCI-H929 nicht weiter verfolgt. Letzteres gelang zwar für die Zelllinie MM.1S, jedoch ist diese Zelllinie durch eine generell niedrige Proliferationsrate charakterisiert, weshalb erst nach einer längeren Zeit eine, für die Folgeversuche ausreichende, Zellzahl der Klone erreicht wurde. Aus diesem Grund war nur ein Teil der geplanten Versuche mit MM.1S bis zur Beendigung des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit abgeschlossen. Die im Vergleich zu AMO-1 deutlich geringere Zellteilungsrate von MM.1S wurde auch als eine mögliche Erklärung für die nicht feststellbare Resistenzentwicklung gegen genotoxische Zytostatika von MM.1S nach mono- oder biallelischer *TP53*-Inaktivierung in Betracht gezogen. Dies erschien angesichts der Tatsache plausibel, dass schnell proliferierende Zellen in der Regel stärker von einer Behandlung mit genotoxischen Zytostatika betroffen sind als langsam proliferierende und von den dadurch verursachten DNA-Schäden in die Apoptose getrieben werden. Im Gegensatz zu der Zelllinie AMO-1, bei der sich eine Dysfunktion des p53-Systems zur Aufrechterhaltung bzw. Induktion physiologischer Proteinspiegel schon nach monoallelischer *TP53*-Inaktivierung in einer ausgeprägten Beeinträchtigung der Viabilität nach genotoxischem Zellstress niederschlug, blieb bei MM.1S selbst die komplette Ausschaltung des p53-Systems in dieser Hinsicht ohne Konsequenz. Daraus konnte abgeleitet werden, dass die MM-Zelllinie AMO-1 für eine adäquate Antwort auf nicht reparierbare DNA-Schäden abhängiger von zwei intakten *TP53*-Allelen war als MM.1S. Solche, zwischen zwei Zelllinien trotz identischer *TP53*-Inaktivierung, feststellbaren Unterschiede

sind womöglich auf den jeweiligen zellulären Hintergrund zurückzuführen vor dem sich diese ereignet². Auch *in vivo* finden sich Indizien dafür, dass die resultierenden Auswirkungen einer *TP53*-Läsion stets im Kontext zu weiteren koexistierenden genetischen Alterationen zu betrachten sind, bzw. zusätzlich von patientenspezifischen Faktoren (wie Interaktion mit dem Immunsystem des Patienten oder dem Mikromilieu des Knochenmarks) beeinflusst werden⁴¹.

Die prognostische Relevanz monoallelischer *TP53*-Alterationen zum Zeitpunkt der Erst-Diagnose einer MM-Erkrankung ist gegenwärtig nicht abschließend geklärt. So wurde stets von vielen Autoren die singuläre Deletion eines 17p-Chromosomenabschnitts als Risikomerkmale eines ungünstigen Krankheitsverlaufes angesehen und findet sich auch in dem R-ISS der IMWG zur Risikoklassifizierung wieder^{45,59,86,87}. Dennoch wird aktuell die Risikobehaftung von del(17p)-Fällen in Folge einer 2018 erschienen Studie von Walker et al. angezweifelt, da dort kein Zusammenhang zwischen der monoallelischen 17p-Deletion und dem progressionsfreien bzw. Gesamt-Überleben hiervon betroffener Patienten festgestellt werden konnte⁴⁰. Als mögliche Begründung für die Divergenz zu früheren Beobachtungen wurde angeführt, dass womöglich in den entsprechenden Studien die Prognose-Daten der del(17p)-Gruppe durch MM-Fälle mit biallelischer *TP53*-Inaktivierung verfälscht wurden, da das Vorhandensein von *TP53*-Mutationen meist nicht untersucht worden war und diese in Kombination mit einer 17p-Deletion des anderen Allels zu einer kompletten Abschaltung des p53-Systems führen können. Unbestritten ist jedoch die generelle Neigung zur Anhäufung von Klonen mit *TP53*-Alterationen im Rezidiv des Multiplen Myeloms und die besonders schlechte Prognose derjenigen Patienten, die einen „double hit“ von *TP53*, also eine biallelische Inaktivierung und damit komplette Abschaltung des p53-Systems, erfahren^{17,40,41,43,44,65}. Diese Patienten versterben an ihrer MM-Erkrankung oftmals innerhalb von 2 Jahren^{40,41}. Das MM stellt eine inter- und intraindividuell sehr heterogene Erkrankung dar. Unterschiede in der Genarchitektur der entarteten Plasmazellen finden sich dabei nicht nur zwischen den verschiedenen Patienten, sondern spiegeln sich auch in der subklonalen Zusammensetzung

jedes einzelnen MM-Falles wieder^{16-18,64,92}. Dabei wird je nach relativer Häufigkeit zwischen Haupt- und Subklonen unterschieden, die im Krankheitsverlauf zum Teil zurückgedrängt werden können, im Gegenzug andere dafür aber ein dominierendes Auftreten erlangen oder durch zusätzliche genetische Veränderungen sogar neu in Erscheinung treten können. Der Progression einer MM-Erkrankung und deren rezidivierendem Charakter scheint ein evolutionärer Konkurrenzkampf zwischen den Subklonen eines einzelnen Patienten zugrunde zu liegen^{10,16,64,66,101}. Manche dieser Subklone können durch bestimmte genetische Alterationen Medikamentenresistenzen erwerben und dadurch einen Selektionsvorteil gegenüber anderen erlangen⁶⁶. Eine experimentelle Grundlage für die registrierte Zunahme von *TP53*-Alterationen im Rezidiv könnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darstellen. Wie die Beobachtungen an der MM-Zelllinie AMO-1 zeigen, kann in einem bestimmten genetischen Kontext bereits die Inaktivierung eines *TP53*-Allels bei MM-Zellen zu einer Beeinträchtigung der physiologischen Zellantwort auf DNA-Schäden führen. Die in der Konsequenz entstehende Melphalan-Resistenz könnte *in vivo* bei Subklonen zu einer erhöhten evolutionären Fitness führen und unter Ausübung von entsprechendem Selektionsdruck Auslöser für eine Akkumulation von Klonen mit *TP53*-Alterationen im Rezidiv sein.

Das Auftreten einer biallelischen *TP53*-Inaktivierung ist als einer der bedeutendsten Prädiktoren für ein verkürztes progressionsfreies und Gesamt-Überleben zu werten^{40,41}. Bei wohlgermerkt inzwischen fraglichem Zusammenhang zwischen monoallelischer 17p-Deletion und nachteiligem Krankheitsverlauf beim NDMM, wurden in der Vergangenheit Überlegungen angestellt, ob die monoallelische *TP53*-Inaktivierung als Zwischenschritt auf dem Weg zur kompletten Ausschaltung des p53-Systems zu betrachten sei und dies die schlechtere Prognose der del(17p)-Fälle begründe^{18,41}. Dass das Vorhandensein einer 17p-Deletion die Entstehung eines biallelisch *TP53*-deletierten Klons auch *in vivo* unter Umständen beschleunigen könnte, ist angesichts der Haploinsuffizienz von *TP53* bei der MM-Zelllinie AMO-1 durchaus vorstellbar und wird durch die höhere Prävalenz von *TP53*-Mutationen bei del(17p)-Fällen

unterstützt^{42,43}. *In vivo* wäre ein Subklon nach monoallelischer *TP53*-Inaktivierung nicht nur durch die Ausschaltung des ersten Allels der biallelischen *TP53*-Inaktivierung einen Schritt näher, sondern er wäre durch das bereits insuffiziente p53-System zusätzlich auch für die Anhäufung weiterer DNA-Schäden (und dadurch Inaktivierung des zweiten Allels) empfänglich. Diese Hypothese wird durch Studien von Teoh et al. und Keats et al. unterstützt, die eine erhöhte genomische Instabilität bei insuffizientem p53-System²¹ bzw. bei del(17p)-Fällen¹⁸ feststellen konnten.

Melphalan ist gegenwärtig in der Therapie des Multiplen Myeloms weit verbreitet. So findet es Anwendung im Rahmen der myeloablativen Hochdosis-Chemotherapie vor autologer Stammzelltransplantation, die die Standard-Therapie aller transplantablen Patienten darstellt^{53,57}. Darüber hinaus kommt es auch bei Patienten, für die aufgrund ihres Alters oder Komorbiditäten eine ASCT nicht in Frage kommt, in vielfältigen Kombinationen (beispielsweise MP, MPT, VMP, DaraVMP) zum Einsatz^{1,63}. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass unter bestimmten Begleitumständen bereits die Inaktivierung eines, und erst recht beider, *TP53*-Allele beim MM zu einer fortschreitenden Resistenz gegen genotoxische Zytostatika (v.a. Melphalan) führen kann, gleichzeitig aber die Sensibilität dieser Myelom-Zellen für andere Substanzen, wie beispielsweise für Proteasom-Inhibitoren, nicht beeinflusst. Dies erscheint angesichts deren p53-unabhängiger Apoptose-Induktion über die Proteine Bcl-XL¹⁰² und NOXA¹⁰³ naheliegend und deckt sich mit der klinisch beobachteten Wirksamkeit von Proteasominhibitoren in der Behandlung von Hochrisiko-MM-Patienten mit *TP53*-Alterationen^{59,83}. Aus der, anscheinend auf bestimmte Medikamentengruppen beschränkten, Resistenzentwicklung nach *TP53*-Alterationen leitet sich die Frage ab, ob durch eine Behandlung mit Melphalan die Selektion und Akkumulation p53-insuffizienter Klone begünstigt wird und ob bestimmte Kombinationstherapien (z.B. solche mit Einsatz von Bortezomib oder Carfilzomib) durch frühzeitige und weitreichende Eradikation entsprechender Subklone in dieser Hinsicht protektiv wirken. Solche intensiveren und mit stärkeren Nebenwirkungen behafteten Kombi-Therapien wären bei jungen, fitten und insbesondere

Hochrisiko-Patienten in Erwägung zu ziehen, bei denen im Sinne der „Total Therapy“ eine möglichst vollständige Eradikation aller Subklone, bei gleichzeitiger Akzeptanz stärkerer therapieassoziierter Nebenwirkungen, erstrebenswert ist^{104,105}. Ein Ansatz um Antworten auf diese Frage zu erhalten, wäre zukünftig die subklonale Architektur mit Fokus auf den *TP53*-Status möglichst vieler MM-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose, vor jeder neu durchgeführten Therapie und im Rezidiv zu erfassen. Anhand solcher Daten wäre es dann retrospektiv möglich die Verteilung von MM-Fällen mit *TP53*-Alterationen auf Melphalan-naive Patienten und solche mit Melphalan-Exposition zu untersuchen und einen etwaigen Einfluss der Ko-Medikation festzustellen.

5 Zusammenfassung / Summery

Trotz der Fortschritte in der Therapie des Multiplen Myeloms und des stetig wachsenden Arsenal effektiver anti-MM-Medikamente muss ein Teil der Patienten mit bestimmten zytogenetischen Veränderungen der Tumorzellen nach wie vor der Hochrisiko-Gruppe zugeordnet werden und hat eine Lebenserwartung von nur wenigen Jahren. Einer der ungünstigsten prognostischen Marker ist die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *TP53* durch Mutationen des Gens oder Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 17, del(17p). Diese wird häufig mit einer Chemoresistenz der entarteten Plasmazellen in Verbindung gebracht.

In der vorliegenden Arbeit gelang es mittels des CRISPR/Cas9-Systems *TP53*-Läsionen zu erzeugen und isogene Klone der *TP53*^{wt/wt} Zelllinie AMO-1 zu generieren. Diese wurden anhand der Sequenzanalysen von beiden *TP53*-Allelen den Gruppen der biallelisch *TP53*-inaktivierten, der monoallelisch *TP53*-inaktivierten und der *TP53*^{wt/wt} Klone zugeordnet. Das gruppenspezifische Verhalten der Klone aller drei Gruppen hinsichtlich deren Expression von p53, p21 und Mdm2 unterstrich die Validität des etablierten Zelllinienmodells zur Untersuchung der Bedeutung von *TP53*-Läsionen beim Multiplen Myelom. Neben einer kompletten Ausschaltung durch biallelische *TP53*-Inaktivierung zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch eine Haploinsuffizienz des p53-Systems. Diese äußerte sich in einer Abschwächung der Nutlin-3A-abhängigen p53-, p21- und Mdm2-Induktion bereits nach Inaktivierung eines *TP53*-Allels durch Frameshift-Mutation. Korrelierend zu dem Proteinexpressionsmuster konnte eine zunehmende Resistenzentwicklung der Klone je nach Grad der *TP53*-Inaktivierung (mono- bzw. biallelisch) gegen Nutlin-3A sowie genotoxische Substanzen nachgewiesen werden, während die Sensibilität der MM-Zellen gegen Proteasominhibitoren unbeeinträchtigt blieb. Einschränkungen hinsichtlich der Übertragbarkeit der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf das Multiple Myelom im Allgemeinen bestehen in dem Umstand, dass die beschriebenen Beobachtungen lediglich an einer einzigen MM-Zelllinie gemacht werden konnten. Dies ist durch die geringe Auswahl an *TP53*^{wt/wt} MM-Zelllinien,

die zudem noch oft eine schlechte Transfektabilität und niedrige Zellteilungsrate nach Einzelzellselektion aufweisen, bedingt.

Die an der Zelllinie AMO-1 gemachten Beobachtungen stehen in Einklang mit der in klinischen Studien festgestellten Verkürzung des progressionsfreien- (PFS) und Gesamt-Überlebens (OS) bei MM-Patienten mit *TP53*-Alterationen. Die zunehmende Chemoresistenz der malignen Plasmazellen nach mono- bzw. biallelischer *TP53*-Inaktivierung kann als Grund für die Akkumulation entsprechender Klone im Rezidiv und in fortgeschrittenen Krankheitsstadien des MM angesehen werden. Mittels möglichst umfassender Erfassung des genauen *TP53*-Läsions-Status in zukünftigen klinischen Studien zu multiplen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs könnte der Einfluss verschiedener, in der Therapie des MM zum Einsatz kommender Substanzen auf die Selektion bzw. die Unterdrückung besonders virulenter Subklone mit *TP53*-Läsionen untersucht werden.

Despite the current huge improvements in the therapy of multiple myeloma, patients with *TP53*-inactivation have a poor PFS and OS.

In the present work, it succeeded to establish isogenic clones of the *TP53*^{wt/wt}-cell-line AMO-1 via CRISPR-Cas9-engineering. These clones could successfully be grouped in *TP53*^{wt/wt}, *TP53*^{wt/-} and *TP53*^{-/-} clones by detection of p53 expression after overnight treatment with the mdm2-inhibitor nutlin-3a and by *TP53*-sequencing. All clones showed a group-specific induction of p53, p21 and mdm2, being less for the wt/- in comparison to the wt/wt-clones and not detectable for the -/- clones. Subsequently these clones showed a resistance for the treatment with the genotoxic drugs melphalan and etoposide, in contrast to their response on the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib where no differences could be observed.

These observations agree well with the clinically observed dramatic impact of *TP53*-inactivation on PFS and OS. The development of chemoresistance by *TP53*-inactivation could be the reason for the accumulation of such clones during relapse after therapy and in advanced stages of the disease. To explore the impact of different therapy-modalities on the development of *TP53*-inactivated clones might be the aim of future clinical studies.

6 Literaturverzeichnis

1. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2017;28:iv52-iv61.
2. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* 2012;12:335-48.
3. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet* 2009;374:324-39.
4. Chesi M, Bergsagel PL. Advances in the pathogenesis and diagnosis of multiple myeloma. *Int J Lab Hematol* 2015;37 Suppl 1:108-14.
5. Anderson KC. Multiple myeloma: a clinical overview. *Oncology (Williston Park)* 2011;25 Suppl 2:3-9.
6. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003;121:749-57.
7. Gekle M, Wischmeyer E, Gründer S, et al. Taschenlehrbuch Physiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2010:241.
8. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15:e538-48.
9. van de Donk NW, Mutis T, Poddighe PJ, Lokhorst HM, Zweegman S. Diagnosis, risk stratification and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Int J Lab Hematol* 2016;38 Suppl 1:110-22.
10. Walker BA, Wardell CP, Melchor L, et al. Intraclonal heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms. *Leukemia* 2014;28:384-90.
11. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. Long-term follow-up of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Semin Oncol* 2003;30:169-71.
12. Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, et al. Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* 2018;378:241-9.
13. Rajkumar SV. Myeloma today: Disease definitions and treatment advances. *Am J Hematol* 2016;91:90-100.
14. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009;23:2210-21.
15. Rasche L, Weinhold N. [Pathogenesis of multiple myeloma]. *Internist (Berl)* 2019;60:3-9.
16. Melchor L, Brioli A, Wardell CP, et al. Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia* 2014;28:1705-15.

17. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nature communications* 2014;5:2997.
18. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood* 2012;120:1067-76.
19. Herrero AB, Rojas EA, Misiewicz-Krzeminska I, Krzeminski P, Gutierrez NC. Molecular Mechanisms of p53 Deregulation in Cancer: An Overview in Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci* 2016;17.
20. Teoh PJ, Chng WJ. p53 abnormalities and potential therapeutic targeting in multiple myeloma. *BioMed research international* 2014;2014:717919.
21. Teoh PJ, Chung TH, Sebastian S, et al. p53 haploinsufficiency and functional abnormalities in multiple myeloma. *Leukemia* 2014;28:2066-74.
22. Meng X, Dong Y, Sun Z. Mechanism of p53 downstream effectors p21 and Gadd45 in DNA damage surveillance. *Sci China C Life Sci* 1999;42:427-34.
23. Soussi T, Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2001;1:233-40.
24. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307-10.
25. Sherr CJ, Weber JD. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:94-9.
26. Stommel JM, Wahl GM. Accelerated MDM2 auto-degradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation. *EMBO J* 2004;23:1547-56.
27. Tanaka T, Watanabe M, Yamashita K. Potential therapeutic targets of TP53 gene in the context of its classically canonical functions and its latest non-canonical functions in human cancer. *Oncotarget* 2018;9:16234-47.
28. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002;2:594-604.
29. Lynch CJ, Milner J. Loss of one p53 allele results in four-fold reduction of p53 mRNA and protein: a basis for p53 haplo-insufficiency. *Oncogene* 2006;25:3463-70.
30. Saha MN, Jiang H, Chang H. Molecular mechanisms of nutlin-induced apoptosis in multiple myeloma: evidence for p53-transcription-dependent and -independent pathways. *Cancer Biol Ther* 2010;10:567-78.
31. Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2004;4:793-805.
32. Soussi T, Lozano G. p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:834-42.
33. Stühmer T, Bargou RC. Selective pharmacologic activation of the p53-dependent pathway as a therapeutic strategy for hematologic malignancies. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2006;5:39-42.
34. Roth J, Dobbstein M, Freedman DA, Shenk T, Levine AJ. Nucleocytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J* 1998;17:554-64.
35. Bean LJ, Stark GR. Phosphorylation of serines 15 and 37 is necessary for efficient accumulation of p53 following irradiation with UV. *Oncogene* 2001;20:1076-84.

36. Bean LJ, Stark GR. Regulation of the accumulation and function of p53 by phosphorylation of two residues within the domain that binds to Mdm2. *J Biol Chem* 2002;277:1864-71.
37. Stühmer T, Chatterjee M, Hildebrandt M, et al. Nongenotoxic activation of the p53 pathway as a therapeutic strategy for multiple myeloma. *Blood* 2005;106:3609-17.
38. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004;303:844-8.
39. Avet-Loiseau H, Facon T. Front-line therapies for elderly patients with transplant-ineligible multiple myeloma and high-risk cytogenetics in the era of novel agents. *Leukemia* 2018;32:1267-76.
40. Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, et al. A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis. *Leukemia* 2018.
41. Weinhold N, Ashby C, Rasche L, et al. Clonal selection and double-hit events involving tumor suppressor genes underlie relapse in myeloma. *Blood* 2016;128:1735-44.
42. Chng WJ, Price-Troska T, Gonzalez-Paz N, et al. Clinical significance of TP53 mutation in myeloma. *Leukemia* 2007;21:582-4.
43. Lode L, Eveillard M, Trichet V, et al. Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica* 2010;95:1973-6.
44. Kortüm KM, Langer C, Monge J, et al. Targeted sequencing using a 47 gene multiple myeloma mutation panel (M(3) P) in -17p high risk disease. *Br J Haematol* 2015;168:507-10.
45. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* 2015;33:2863-9.
46. Elnenaei MO, Gruszka-Westwood AM, A'Hernt R, et al. Gene abnormalities in multiple myeloma; the relevance of TP53, MDM2, and CDKN2A. *Haematologica* 2003;88:529-37.
47. Laubach J, Garderet L, Mahindra A, et al. Management of relapsed multiple myeloma: recommendations of the International Myeloma Working Group. *Leukemia* 2016;30:1005-17.
48. Perrot A, Lauwers-Cances V, Corre J, et al. Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2018;132:2456-64.
49. Breitkreutz I, Raab M, Goldschmidt H. [First-line treatment of multiple myeloma]. *Internist (Berl)* 2019;60:23-33.
50. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003;348:1875-83.
51. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myelome. *N Engl J Med* 1996;335:91-7.
52. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, et al. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *N Engl J Med* 2017;376:1311-20.

53. Mina R, Lonial S. Is there still a role for stem cell transplantation in multiple myeloma? *Cancer* 2019.
54. Willenbacher E, Balog A, Willenbacher W. Short overview on the current standard of treatment in newly diagnosed multiple myeloma. *Memo* 2018;11:59-64.
55. Moreau P, Avet-Loiseau H, Facon T, et al. Bortezomib plus dexamethasone versus reduced-dose bortezomib, thalidomide plus dexamethasone as induction treatment before autologous stem cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2011;118:5752-8; quiz 982.
56. Cavo M, Tacchetti P, Patriarca F, et al. Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: a randomised phase 3 study. *Lancet* 2010;376:2075-85.
57. Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood* 2016;127:2955-62.
58. Chan HSH, Chen CI, Reece DE. Current Review on High-Risk Multiple Myeloma. *Curr Hematol Malig Rep* 2017;12:96-108.
59. 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;121:884-92.
60. Jackson GH, Davies FE, Pawlyn C, et al. Lenalidomide maintenance versus observation for patients with newly diagnosed multiple myeloma (Myeloma XI): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2019;20:57-73.
61. McCarthy PL, Holstein SA, Petrucci MT, et al. Lenalidomide Maintenance After Autologous Stem-Cell Transplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Meta-Analysis. *J Clin Oncol* 2017;35:3279-89.
62. Sonneveld P, Schmidt-Wolf IG, van der Holt B, et al. Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON-65/ GMMG-HD4 trial. *J Clin Oncol* 2012;30:2946-55.
63. Blommestein HM, van Beurden-Tan CHY, Franken MG, Uyl-de Groot CA, Sonneveld P, Zweegman S. Efficacy of first-line treatments for multiple myeloma patients not eligible for stem cell transplantation - A Network Meta-analysis. *Haematologica* 2019.
64. Magrangeas F, Avet-Loiseau H, Gouraud W, et al. Minor clone provides a reservoir for relapse in multiple myeloma. *Leukemia* 2013;27:473-81.
65. Kortüm KM, Einsele H. [Diagnostic and therapeutic considerations on recurrence of multiple myeloma : A current overview]. *Internist (Berl)* 2018.
66. Corre J, Cleyne A, Robiou du Pont S, et al. Multiple myeloma clonal evolution in homogeneously treated patients. *Leukemia* 2018;32:2636-47.
67. Kumar SK, Therneau TM, Gertz MA, et al. Clinical course of patients with relapsed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2004;79:867-74.

68. Franssen LE, Mutis T, Lokhorst HM, van de Donk N. Immunotherapy in myeloma: how far have we come? *Therapeutic advances in hematology* 2019;10:2040620718822660.
69. Castella M, Fernandez de Larrea C, Martin-Antonio B. Immunotherapy: A Novel Era of Promising Treatments for Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci* 2018;19.
70. Xiong W, Wu X, Starnes S, et al. An analysis of the clinical and biologic significance of TP53 loss and the identification of potential novel transcriptional targets of TP53 in multiple myeloma. *Blood* 2008;112:4235-46.
71. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet* 2011;45:273-97.
72. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007;315:1709-12.
73. Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 2010;468:67-71.
74. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 2012;482:331-8.
75. 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;337:816-21.
76. Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013;339:823-6.
77. Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013;339:819-23.
78. Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* 2010;79:181-211.
79. Li X, Heyer WD. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 2008;18:99-113.
80. Lin S, Staahl BT, Alla RK, Doudna JA. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *eLife* 2014;3:e04766.
81. Guha TK, Wai A, Hausner G. Programmable Genome Editing Tools and their Regulation for Efficient Genome Engineering. *Computational and structural biotechnology journal* 2017;15:146-60.
82. Szikriszt B, Poti A, Pipek O, et al. A comprehensive survey of the mutagenic impact of common cancer cytotoxics. *Genome Biol* 2016;17:99.
83. Avet-Loiseau H, Fonseca R, Siegel D, et al. Carfilzomib significantly improves the progression-free survival of high-risk patients in multiple myeloma. *Blood* 2016;128:1174-80.
84. Keats Lab - HMCL Characteristics. (Accessed 29.05., 2019, at [https://www.keatslab.org/myeloma-cell-lines/hmcl-characteristics.](https://www.keatslab.org/myeloma-cell-lines/hmcl-characteristics))
85. Surget S, Descamps G, Brosseau C, et al. RITA (Reactivating p53 and Inducing Tumor Apoptosis) is efficient against TP53 abnormal myeloma cells independently of the p53 pathway. *BMC Cancer* 2014;14:437.
86. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood* 2007;109:3489-95.

87. Boyd KD, Ross FM, Tapper WJ, et al. The clinical impact and molecular biology of del(17p) in multiple myeloma treated with conventional or thalidomide-based therapy. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;50:765-74.
88. Munawar U, Barrio S, Roth M, et al. Implications of *TP53* alterations for therapy response in multiple myeloma. *Oncol Res Treat* 2018;41:1-358.
89. Munawar U, Barrio S, Roth M, et al. Implications of *TP53* alterations for Therapy Response in Multiple Myeloma. *Blood* 2018;132:3189.
90. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, et al. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol* 2015;33:3911-20.
91. Weinhold N, Heuck CJ, Rosenthal A, et al. Clinical value of molecular subtyping multiple myeloma using gene expression profiling. *Leukemia* 2016;30:423-30.
92. Rasche L, Chavan SS, Stephens OW, et al. Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. *Nature communications* 2017;8:268.
93. Anderson KC. New insights into therapeutic targets in myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:184-90.
94. Mitsiades CS, Mitsiades NS, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC. The role of the bone microenvironment in the pathophysiology and therapeutic management of multiple myeloma: interplay of growth factors, their receptors and stromal interactions. *Eur J Cancer* 2006;42:1564-73.
95. Yamamoto S, Iwakuma T. Regulators of Oncogenic Mutant TP53 Gain of Function. *Cancers (Basel)* 2018;11.
96. de Vries A, Flores ER, Miranda B, et al. Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:2948-53.
97. Esma F, Salvini M, Troia R, Boccadoro M, Larocca A, Pautasso C. Melphalan hydrochloride for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Pharmacother* 2017;18:1127-36.
98. Brännert D, Kraus M, Stühmer T, et al. Novel cell line models to study mechanisms and overcoming strategies of proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease* 2019;1865:1666-76.
99. Lu S, Wang J. The resistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib. *Biomarker research* 2013;1:13.
100. Soriano GP, Besse L, Li N, et al. Proteasome inhibitor-adapted myeloma cells are largely independent from proteasome activity and show complex proteomic changes, in particular in redox and energy metabolism. *Leukemia* 2016;30:2198-207.
101. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012;481:306-13.
102. Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J, Dou QP. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* 2011;11:239-53.
103. Qin JZ, Ziffra J, Stennett L, et al. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res* 2005;65:6282-93.

104. Barlogie B, Mitchell A, van Rhee F, Epstein J, Morgan GJ, Crowley J. Curing myeloma at last: defining criteria and providing the evidence. *Blood* 2014;124:3043-51.
105. Usmani SZ, Crowley J, Hoering A, et al. Improvement in long-term outcomes with successive Total Therapy trials for multiple myeloma: are patients now being cured? *Leukemia* 2013;27:226-32.

Publikationen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit fanden Eingang in Veröffentlichungen in den beiden Journalen „Blood“ und „Scientific Reports“.

Munawar U, Rasche L, Müller N, Vogt C, Da-Via M, Haertle L, Arampatzi P, Dietrich S, Roth M, Garitano-Trojaola A, Steinhardt MJ, Striffler S, Gallardo M, Martinez-Lopez J, Bargou RC, Heckel T, Einsele H, Stühmer T, Kortüm KM, Barrio S. Hierarchy of mono- and biallelic TP53 alterations in multiple myeloma cell fitness. *Blood*. 2019 Sep 5;134(10):836-840. doi: 10.1182/blood.2019000080.

Munawar U, Roth M, Barrio S, Wajant H, Siegmund D, Bargou RC, Kortüm KM, Stühmer T. Assessment of TP53 lesions for p53 system functionality and drug resistance in multiple myeloma using an isogenic cell line model. *Sci Rep*. 2019 Dec 2;9(1):18062. doi: 10.1038/s41598-019-54407-4.

Teile der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit fanden Eingang in einen, bei der Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie 2018 in Wien (Journal: *Oncology Research and Treatment*) und beim Annual Meeting 2018 der American Society of Hematology (ASH) in San Diego (Journal: *Blood*), veröffentlichten Abstract.

Munawar U, Barrio S, Roth M, Einsele H, Bargou R, Kortüm KM, Stühmer T. Implications of *TP53* alterations for therapy response in multiple myeloma. *Oncol Res Treat*. 2018;41(Suppl 4):1-358.

Munawar U, Barrio S, Roth M, Einsele H, Bargou RC, Stühmer T, Kortüm KM. Implications of *TP53* alterations for Therapy Response in Multiple Myeloma. *Blood*. 2018;132(Suppl 1):3189.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf C. Bargou für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Justus Müller für die Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Thorsten Stühmer für die umfangreiche Betreuung meiner Promotionsarbeit, die ausführliche Beantwortung meiner Fragen und für die, über das Fachliche hinausgehenden, interessanten Gespräche.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeiterinnen des Lehrstuhls für Translationale Onkologie Evelyn Brandt, Stefanie Kirner und Nadine Kremer, sowie bei meinem Bruder Bernhard Roth für zahlreiche Anleitungen und die Einarbeitung in die verschiedenen Labortechniken und den Laboralltag.

Großer Dank auch an Dr. Daniela Brännert und Umair Munawar für die vielen Hilfestellungen und Erklärungen sowohl zu fachlichen Fragen, als auch zum Umgang mit diverser Computersoftware.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Dr. Torsten Steinbrunn für einige Verbesserungsvorschläge zur schriftlichen Ausarbeitung der Dissertation und bei Peter Wermke für die schnelle Hilfe bei Problemen mit Word.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geboren am:

Geburtsort:

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

1996-2000 Volksschule Altenburgblick Stegaurach

2000-2009 Kaiser-Heinrich-Gymnasium Bamberg

Studium

10/2009-3/2010 Universität Karlsruhe (KIT), Studium der Elektrotechnik

4/2010-2/2018 Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Studium der Humanmedizin

10/2012-10/2015 Förderung durch das Deutschlandstipendium

12/2017 Ablegen der ärztlichen Prüfung

Seit 4/2018 Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Strukturiertes Promotionsstudium Humanmedizin

Würzburg, den 6.6.2019

Markus Roth