



**Entwicklung eines Sleeping Beauty Transposon Systems zum simultanen und induzierbaren
shRNA-Knock-down verschiedener Zielstrukturen in Zelllinien des Multiplen Myeloms**

**Development of a system for multi-targeted inducible shRNA-knock-downs with
the Sleeping Beauty transposon system and establishment in Multiple Myeloma cell lines**

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

vorgelegt von

Severin Lion Julian Fink

aus

Augsburg

Würzburg, Oktober 2020



Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Haaf

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

2. Betreuer: Prof. Dr. Jürgen Löffler

3. Betreuer: Prof. Dr. Martin Eilers

4. Betreuer: Prof. Dr. Dr. Andreas Beilhack

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Multiples Myelom	7
1.1.1	Definition.....	7
1.1.2	Epidemiologie.....	7
1.1.3	Symptomatik.....	8
1.1.4	Diagnostik.....	9
1.1.5	Stadieneinteilung	13
1.1.6	Therapie und Prognose	15
1.1.7	Genetische Heterogenität.....	21
1.2	Aktuelle Knock-down- und Transfektionsmethoden	32
1.2.1	Pharmakologische Substanzen.....	33
1.2.2	RNA-Interferenz (RNAi) vermittelter Knock-down	35
1.2.3	Dauerhafte Transfektion mit dem Sleeping Beauty Transposon System	37
1.2.4	Induzierbarkeit mit Tetrazyklin-kontrollierter Transkriptionsaktivierung (Tet-System)	40
1.3	Zielsetzung und Fragestellung	43
2	Material	45
2.1	Geräte und Software	45
2.2	Reagenzien	46
2.2.1	Chemikalien.....	46
2.2.2	Zellkultur	47
2.2.3	Enzyme	48
2.2.4	Antikörper.....	49
2.3	Pufferlösungen	49
2.4	Molekularbiologische Kits	51
2.5	Plasmide	51
2.5.1	Protein-Expression.....	51
2.5.2	Sleeping Beauty Transposon System.....	52
2.5.3	Klonierung	52
2.5.4	shRNA-Expression	52
2.6	DNA-Oligonukleotidsequenzen	52
2.6.1	Primer	52
2.6.2	Klonierungen	53
2.6.3	Bakterienstamm XL1-Blue	55
2.7	Zelllinien	55
2.7.1	AMO-1.....	56

2.7.2	INA-6.....	56
2.7.3	JJN-3.....	56
2.7.4	L-363.....	57
2.7.5	MM.1S.....	57
3	Methoden.....	58
3.1	Zellbiologische Techniken.....	58
3.1.1	Zellkultivierung.....	58
3.1.2	Passagieren der Zellen.....	58
3.1.3	Zellzählung.....	58
3.1.4	Nachweis von Mykoplasmen durch PCR.....	59
3.1.5	Transfektion durch Elektroporation.....	59
3.1.6	Säulenaufreinigung mit CD4 MicroBeads.....	60
3.1.7	OptiPrep Zellaufreinigung.....	61
3.1.8	Stabile Transfektion mit dem Sleeping Beauty Transposon System.....	62
3.2	Molekularbiologische Techniken.....	63
3.2.1	DNA-Präparation aus <i>E. coli</i>	63
3.2.2	Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese.....	63
3.2.3	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	64
3.2.4	Ethanol-fällung.....	64
3.2.5	Gewinnung von DNA-Fragmenten.....	65
3.2.6	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i>	70
3.2.7	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	70
3.2.8	Selektion der Kolonien.....	71
3.2.9	Sequenzierung.....	73
3.3	Messmethoden.....	73
3.3.1	Fluoreszenz-Durchflusszytometrie.....	73
3.3.2	AlamarBlue Zellviabilitätsassay.....	75
3.3.3	Western Blot.....	75
4	Ergebnisse.....	78
4.1	Konzeption.....	79
4.2	Nutzung des Sleeping Beauty Transposon Systems im Multiplen Myelom.....	81
4.2.1	Stabile Expression von Proteinen in MM Zellen am Beispiel EGFP.....	81
4.2.2	Etablierung eines Sleeping Beauty Donor Vektors mit Puromycin-Resistenz.....	83
4.3	H1-Promotor-Kassetten zur stabilen und induzierbaren shRNA-Expression.....	91
4.3.1	Restriktionsenzym-basiertes shRNA-Kassetten-system.....	91

4.3.2	Äquivalenz des transienten Knock-downs verschiedener Modifikationen des H1-Promotors	96
4.3.3	Stabile Expression von shRNA und Knock-down in MM Zellen am Beispiel von ERK2...	97
4.3.4	Beständigkeit des stabilen Knock-downs verschiedener Modifikationen des H1-Promotors	101
4.3.5	Stabiler und simultaner Knock-down von mehreren Zielproteinen.....	103
4.4	Adäquate und kontinuierliche TetR-Expression.....	107
4.4.1	Transiente Expression von TetR mittels CMV-Promotor	107
4.4.2	Stabile Expression von TetR mittels CMV-Promotor	110
4.4.3	Verstärkung der TetR-Expression	117
4.5	Induzierbare shRNA-Expression.....	128
5	Diskussion	132
5.1	Übersicht	132
5.2	Beurteilung der Unterschiede zwischen transienter und stabiler shRNA-Expression ...	135
5.3	Limitationen	138
5.3.1	Off-Target-Effekte von RNAi	138
5.3.2	Effizienz des Knock-downs abhängig von der Kassettenanzahl	141
5.4	Übertragbarkeit auf andere Systeme	142
5.5	Fazit im Rahmen des Gesamtprojekts	146
6	Zusammenfassung.....	148
7	Summary.....	149
8	Abbildungen	150
9	Tabellen.....	151
10	Klonierungen	152
11	Mutationen.....	154
12	Plasmide	154
13	Anhang	155
14	Literatur.....	167
15	Abkürzungen	201
16	Veröffentlichungen	204
17	Danksagung	204

1 Einleitung

1.1 Multiples Myelom

1.1.1 Definition

Das Multiple Myelom (MM; C90 im ICD-10) ist eine maligne Erkrankung der Plasmazelle und wird gemäß Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) den B-Zell-Lymphomen zugeordnet. Bei dieser Erkrankung kommt es zu einer monoklonalen Plasmazellvermehrung im Knochenmark, die mit einer verstärkten Produktion kompletter oder inkompletter monoklonaler Immunglobuline (Ig) einhergeht. Im Serum oder Urin kann dieses monoklonale Protein (auch „Paraprotein“ oder „M-Protein“ genannt) bei fast allen Formen des MM nachgewiesen werden (Wörmann *et al.*, 2018).

Im klinischen Sprachgebrauch wird die Bezeichnung „Plasmozytom“ häufig als Synonym verwendet. Dies bezeichnet aber eine Sonderform des Multiplen Myeloms. Hier kommt es zu einer lokalisierten Vermehrung von Plasmazellen ohne systemische Beteiligung. Im Verlauf entwickeln bis zu 50 % der Plasmozytom Patienten ein „systemisches“ Multiples Myelom (Dimopoulos *et al.*, 2000; Weber, 2005). Kommt es zum leukämischen Verlauf mit monoklonalen Plasmazellen im peripheren Blut, spricht man von einer Plasmazelleukämie.

1.1.2 Epidemiologie

Die Inzidenz des Multiplen Myeloms liegt bei 4 bis 6 pro 100.000 Einwohner in Deutschland. So wird die Krankheit pro Jahr bei circa 3.600 Männern und 2.900 Frauen neu diagnostiziert. Das Multiple Myelom ist somit die dritthäufigste hämatologische Neoplasie und daher die Ursache für circa 1 % aller Krebserkrankungen in Deutschland. Mit einem mittleren Erkrankungsalter von ungefähr 73 Jahren handelt es sich um eine Erkrankung des „alten Menschen“. Ein erster signifikanter Anstieg an Erkrankungen lässt sich ab dem 50. Lebensjahr verzeichnen. Patienten vor dem 40. Lebensjahr stellen mit unter 2 % der Fälle eine seltene Ausnahme dar (Kyle *et al.*, 2003). Neben der zunehmenden Inzidenz mit steigendem Alter ist auch das männliche Geschlecht und die Zugehörigkeit zu bestimmten Bevölkerungsgruppen ein Risikofaktor. Die Fallzahlen zeigen, dass in den USA die schwarze im Vergleich zur weißen Bevölkerung ein doppelt so hohes Risiko aufweist am Multiplen Myelom zu erkranken. Diesbezüglich sprechen epidemiologische Daten dafür, dass das Erkrankungsrisiko in China weltweit am geringsten ist (Katalinic und Pritzkeleit, 2013; Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., 2017; Kyle und Rajkumar, 2008). Sollte sich die Verschiebung der

Altersstruktur in Deutschland wie prognostiziert in Richtung Überalterung fortsetzen, ist mit einem Anstieg der Neuerkrankungen um circa 30 % zu rechnen (Wörmann *et al.*, 2018).

Die Ätiologie des Multiplen Myeloms ist weitestgehend unklar. Es werden verschiedene Noxen, chronische Infektionen wie etwa Hepatitis C oder das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) sowie Adipositas als mögliche Ursache diskutiert (Wallin und Larsson, 2011). In Bezug auf eine mögliche genetische Disposition konnte bereits nachgewiesen werden, dass Verwandte ersten Grades (Landgren *et al.*, 2006) und durch die Metaanalyse genomweiter Studien auch Personen mit bestimmten genetischen Variationen (Mitchell *et al.*, 2016) ein erhöhtes Risiko aufweisen, am Multiplen Myelom zu erkranken. Als Vorläufer tritt bei fast allen Patienten eine monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) auf (Landgren *et al.*, 2009; Weiss *et al.*, 2009), dessen Prävalenz im Alter zwischen 45 und 75 Jahren bei 3,5 % in Deutschland liegt (Eisele *et al.*, 2012). Es entwickelt sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 % pro Jahr in ein MM oder eine andere lymphoproliferative Erkrankung weiter (Dispenzieri *et al.*, 2010; Zingone und Kuehl, 2011). Bei Patienten über 70 Jahren konnte gezeigt werden, dass die Diagnose eines MGUS mit einer signifikanten Exzessmortalität assoziiert ist (Kristinsson *et al.*, 2009).

1.1.3 Symptomatik

Initiale Symptome sind häufig gar nicht oder nur unspezifisch vorhanden. Bis zu einem Viertel aller Patienten sind bei Diagnosestellung beschwerdefrei. Hauptsächlich werden vorhandene Symptome durch die Zerstörung der Knochen, die Verdrängung der Hämatopoese, hohe monoklonale Immunglobulin-Konzentrationen und den sekundären Immundefekt verursacht.

Als am häufigsten auftretende Symptome sind zum einen Knochenschmerzen (60 %) zu nennen. Diese werden durch Osteolysen verursacht, die aufgrund der Stimulation von Osteoklasten sowie Inhibition von Osteoblasten durch Zellen des Multiplen Myeloms entstehen. Osteolysen sind fast bei allen Patienten zu finden und treten bevorzugt in Knochen des Schädels, des Stammskeletts und der proximalen Extremitäten auf. Die Osteolysen können darüber hinaus zu pathologischen Frakturen und durch das freigesetzte Calcium zu Hypercalcämie bis hin zur hypercalcämischen Krise führen (Galson *et al.*, 2012; Giuliani *et al.*, 2006).

Zum anderen ist ebenfalls mit 40 % häufig eine eher unspezifische Fatigue bei Diagnosestellung zu finden. Diese wird oftmals durch eine Anämie verursacht, die durch eine zunehmende Verdrängung der Hämatopoese im Knochenmark zustande kommt. Der gleiche Mechanismus kann mit geringerer Prävalenz ebenfalls eine Thrombozytopenie oder Leukopenie verursachen und somit zu einer petechialen Blutungsneigung beziehungsweise einem sekundären Antikörpermangel mit einer erhöhten Infektneigung führen. Insgesamt ist zwar die Anzahl an

Immunglobulinen vermehrt, aber die Menge funktionell wirksamer Antikörper durch Verdrängung vermindert. Die vermehrt gebildeten monoklonalen Immunglobuline des Multiplen Myeloms sind nämlich nicht funktionsfähig. Diese können außerdem zu schäumendem Urin und einer Nierenfunktionsverschlechterung im Rahmen einer Bence-Jones-Proteinurie oder Albuminurie führen. Auch eine B-Symptomatik mit Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß kann als klassisches Zeichen einer malignen Erkrankung vorhanden sein. Lymphadenopathien treten nur äußerst selten auf, obwohl man dies durch die zytogenetische Zuordnung zu den malignen Lymphomen zunächst vermuten könnte. Wie nicht entartete Plasmazellen, bevorzugen auch die Multiplen Myelom Zellen das Knochenmarksmilieu (Kyle, 1975; Wörmann *et al.*, 2018). Ein extramedullärer Befall ist bei Diagnosestellung mit 1 – 2 % äußerst selten und entwickelt sich im Verlauf der Erkrankung bei 8 % der Patienten (Short *et al.*, 2011).

1.1.4 Diagnostik

Beim klinischen Verdacht auf ein MM können labordiagnostische und bildgebende Verfahren helfen, diese Vermutung zu erhärten und durch histopathologische Untersuchungen kann die Diagnose abschließend bestätigt werden. Neben Anamnese und körperlicher Untersuchung kann auch eine stark erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) oder eine Erhöhung der Gesamteiweißkonzentration im Serum akzidentiell auffallen und weitere Diagnostik nach sich ziehen. Im Labor sollte zur Abklärung ein Differentialblutbild angefertigt werden und im Serum die Elektrolyte, das Kreatinin, der Harnstoff, die Laktatdehydrogenase (LDH) und die Alanin-Aminotransferase (ALT), das Gesamteiweiß, das Albumin und das β_2 -Mikroglobulin (β_2 M) bestimmt, die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) berechnet und ein 24 Stunden-Sammelurin zur Quantifizierung der Eiweißausscheidung vorgenommen werden (Kyle und Rajkumar, 1999). Bei fortgeschrittenem Verlauf kann sich hier bereits eine Panzytopenie aufgrund der Verdrängung im Knochenmark und eine Hypercalcämie durch den Knochenabbau zeigen. Die Parameter LDH, Albumin und β_2 M haben zudem prognostische Relevanz (siehe auch **1.1.5**).

Mit Hilfe der Serumprotein-Elektrophorese kann der für monoklonale Gammopathien typische M-Gradient nachgewiesen werden. Hier wird eine starke Erhöhung der γ -Fraktion sichtbar, die durch vom MM produzierten IgG oder IgM verursacht wird. Diese Untersuchung kann als Screeningtest fungieren, ist aber bei begründetem Verdacht wegen unzureichender Sensitivität allein nicht ausreichend. Als Bestätigungstest sollte dann eine Immunfixationselektrophorese von Serum und Urin angefertigt werden, diese erlaubt sowohl den Nachweis monoklonaler Immunglobuline als auch monoklonaler freier Leichtketten. Ebenfalls sollte sich daran die quantitative Bestimmung der verschiedenen Immunglobuline (IgG, IgA, IgM) im Serum

anschließen. Multiple Myelome, die inkomplette Immunglobuline oder IgA produzieren sowie der asekretorische Typ, besitzen keinen M-Gradienten. Lange Zeit konnten die freien Leichtketten nur als sogenanntes Bence-Joncs-Protein im Urin nachgewiesen werden. Dieses wurde nach seinem Entdecker Henry Bence Jones benannt, der dieses 1848 im Urin eines Patienten mit Multiplem Myelom nachweisen konnte (Jones, 1851). Seit 2001 können und sollten die freien Kappa- und Lambda-Leichtketten auch im Serum mittels Immunoassay quantitativ nachgewiesen werden (Drayson *et al.*, 2001).

Als bildgebendes Verfahren wurden früher nur konventionelle Röntgenaufnahmen nach dem „Pariser Schema“ des Schädels, der Wirbelsäule, des Thorax, des Beckens und der langen Röhrenknochen durchgeführt. Da hier die Sensitivität der Erkennung von Osteolysen zu gering war, wird heute eine Low-Dose-Ganzkörper-Computertomographie (CT) durchgeführt (Hillengass *et al.*, 2017).

Als nächster Schritt im diagnostischen Ablauf wird eine Knochenmarkspunktion mit Entnahme von Aspirat und Stanzzyylinder vorgenommen. Vom Aspirat wird eine Zytologie und eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) durchgeführt, um verschiedene, teilweise prognostisch aussagekräftige Deletionen (del(x)), Amplifikationen (add(x)) oder Translokationen (t(x;y)) oder auch Hyperdiploidie nachweisen zu können. Das Vorliegen von del(17p), t(4;14) oder t(14;16) geht mit einem erheblichen Risiko für einen schweren Verlauf einher und stellt damit Faktoren zur Einordnung in eine Hochrisikogruppe (siehe auch **1.1.5**) dar (Sonneveld *et al.*, 2012). Alle anderen genetischen Aberrationen haben aktuell keinen Einfluss auf die Therapieentscheidung, können aber prognostische Aussagekraft haben. Die Hyperdiploidie ist zum Beispiel prognostisch günstig, die add(1q21) und die t(14;20) hingegen ungünstig. Vom bioptischen Material wird eine Histologie durchgeführt. Durch diese und durch Durchflusszytometrie kann der prozentuale Anteil an monoklonalen Plasmazellen bestimmt werden.

Bei unklaren Befunden kann vor invasiven Maßnahmen zunächst durch die Magnetresonanztomographie (MRT), das CT, das Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-CT oder eine Osteodensitometrie ein weiterer Informationsgewinn erreicht werden. Im MRT zeigt sich als typischer fokaler osteolytischer Befall eine fleckförmige Signalmindering in der T1-Wichtung der betroffenen Knochen mit mäßiger Kontrastmittel (KM)-Anreicherung. Zudem können hiermit extramedulläre Manifestationen und eine diffuse Knochenmarksinfiltration dargestellt werden. Die Sensitivität einer Ganzkörper-MRT ist höher als die einer Low-Dose-Ganzkörper-CT, wird aber aufgrund der langen Untersuchungszeit seltener angewandt. Die Szintigraphie ist in 48 % der Untersuchungen falsch-negativ und wird deshalb nicht

durchgeführt (Healy *et al.*, 2011). Bei Verdacht auf ein extramedulläres MM oder ein Plasmozytom kann eine Gewebebiopsie die Diagnosestellung erlauben.

Die Diagnosestellung erfolgt dann anhand der aktuellen Diagnosekriterien der International Myeloma Working Group (IMWG) von 2014 (Rajkumar *et al.*, 2014).

MGUS	Smoldering Myelom	Multiples Myelom (MM)								
IgG / IgA / IgM - MGUS										
monoklonales Protein (Serum) IgG oder IgA oder IgM < 3 g/dL und klonale Plasmazellen < 10% im Knochenmark (KM) und keine MM definierenden Ereignisse	monoklonales Protein (Serum) IgG oder IgA ≥ 3 g/dL und monoklonales Protein (Urin) ≥ 500 mg/24 h und / oder klonale Plasmazellen 10% – 60% im KM	klonale Plasmazellen ≥ 10% im KM oder bioptisch gesichertes Knochen- oder extramedulläres Plasmozytom								
oder	und	und								
Leichtketten - MGUS										
abnormales sFLC Verhältnis (< 0,26 oder > 1,65) und erhöhtes Level des betroffenen Leichtkettentyps und kein Schwerkettennachweis in der Immunfixation und klonale Plasmazellen < 10% im KM und monoklonales Protein (Urin) < 500 mg/24 h und keine MM definierenden Ereignisse	keine MM definierenden Ereignisse (CRAB und SLiM negativ) und keine Amyloidose	mindestens ein MM definierendes Ereignis: ≥1 CRAB positiv oder ≥1 SLiM positiv								
		MM definierende Ereignisse: CRAB- und SLiM-Kriterien								
		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="background-color: #004D40; color: white; text-align: center; width: 20px;">C</td> <td>Calcium Erhöhung (> 11 mg/dl oder 1 mg/dl > obere Normgrenze)</td> </tr> <tr> <td style="background-color: #004D40; color: white; text-align: center;">R</td> <td>Renale Insuffizienz (GFR < 40 ml/min oder Kreatinin > 2 mg/dl)</td> </tr> <tr> <td style="background-color: #004D40; color: white; text-align: center;">A</td> <td>Anämie (Hb < 10 g/dl oder 2 g/dl < normal)</td> </tr> <tr> <td style="background-color: #004D40; color: white; text-align: center;">B</td> <td>≥1 lytische Knochenläsion im Röntgen, CT oder PET-CT</td> </tr> </table>	C	Calcium Erhöhung (> 11 mg/dl oder 1 mg/dl > obere Normgrenze)	R	Renale Insuffizienz (GFR < 40 ml/min oder Kreatinin > 2 mg/dl)	A	Anämie (Hb < 10 g/dl oder 2 g/dl < normal)	B	≥1 lytische Knochenläsion im Röntgen, CT oder PET-CT
C	Calcium Erhöhung (> 11 mg/dl oder 1 mg/dl > obere Normgrenze)									
R	Renale Insuffizienz (GFR < 40 ml/min oder Kreatinin > 2 mg/dl)									
A	Anämie (Hb < 10 g/dl oder 2 g/dl < normal)									
B	≥1 lytische Knochenläsion im Röntgen, CT oder PET-CT									
		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="background-color: #004D40; color: white; text-align: center; width: 20px;">S</td> <td>Mindestens sechzig Prozent (≥ 60%) klonale Plasmazellen im KM</td> </tr> <tr> <td style="background-color: #004D40; color: white; text-align: center;">Li</td> <td>Verhältnis betroffener:nicht-betroffener Leichtkettentypen ≥ 100</td> </tr> <tr> <td style="background-color: #004D40; color: white; text-align: center;">M</td> <td>≥1 fokale Läsion (≥ 5 mm) im MRT</td> </tr> </table>	S	Mindestens sechzig Prozent (≥ 60%) klonale Plasmazellen im KM	Li	Verhältnis betroffener:nicht-betroffener Leichtkettentypen ≥ 100	M	≥1 fokale Läsion (≥ 5 mm) im MRT		
S	Mindestens sechzig Prozent (≥ 60%) klonale Plasmazellen im KM									
Li	Verhältnis betroffener:nicht-betroffener Leichtkettentypen ≥ 100									
M	≥1 fokale Läsion (≥ 5 mm) im MRT									

Abbildung 1: Diagnosekriterien verschiedener MM Stadien (Managing Myeloma, 2016; Vincent Rajkumar, 2014) Kriterien der International Myeloma Working Group (IMWG) von 2014 zur Diagnosestellung von MGUS, Smoldering Myelom und Multiplem Myelom. Beim MGUS muss zur Diagnosestellung zwischen Leichtketten und vollständigen Immunglobuline produzierenden Klonen unterschieden werden. Das Smoldering Myelom unterscheidet sich vor allem durch das Vorliegen von Myelom definierenden Ereignissen vom MM. Diese werden über die CRAB-Kriterien als Marker für Endorganschäden und über die SLiM-Kriterien als neue Biomarker zur frühzeitigen Diagnosestellung definiert.

Für die Diagnose eines Multiplen Myeloms muss im Knochenmarksausstrich der Anteil monoklonaler Plasmazellen mindestens 10 % betragen oder alternativ ein durch Biopsie bestätigtes Plasmozytom vorliegen. Zudem sind definitionsgemäß beim Multiplen Myelom bereits Endorganschäden durch die Plasmazellproliferation vorhanden. Dies unterscheidet das Multiple Myelom vom Smoldering (Schwelenden) Myelom (SMM). Das Vorliegen von Endorganschäden wird durch die CRAB-Kriterien definiert und beinhaltet Hypercalcämie, Niereninsuffizienz, Anämie und Knochenläsionen. Sollten die CRAB-Kriterien noch keine Endorganschäden anzeigen, sind zur frühzeitigen Diagnosestellung zudem die SLiM-Kriterien etabliert worden. Diese lassen ohne das Vorliegen der CRAB-Kriterien die Diagnose MM zu. Die drei als neue Biomarker bezeichneten SLiM-Kriterien beinhalten einen monoklonalen Plasmazellanteil im Knochenmark von mindestens 60 %, ein durch Immunnephelometrie gemessenes Verhältnis der beiden Leichtkettentypen im Serum von betroffenem (monoklonal überexprimiertem) Typ zu nicht betroffenem Typ von größer gleich 100 (Normwert: 0,26 bis 1,65) oder den Nachweis mindestens einer fokalen Läsion größer gleich 5 mm im MRT. Es konnte gezeigt werden, dass sich bei Patienten, bei denen einer dieser Biomarker vorlag, abhängig von der Subgruppe, in 55 – 94 % der Fälle innerhalb von 2 Jahren ein MM gemäß alter Definition ohne SLiM-Kriterien entwickelte (Larsen *et al.*, 2013; Palumbo *et al.*, 2015).

Nach der Art der produzierten monoklonalen Immunglobuline kann das Multiple Myelom in verschiedene Typen unterteilt werden: zum einen in die mit 80 % häufigeren Typen mit Produktion kompletter Immunglobuline Typ IgG (50 %), Typ IgA (25 %), Typ IgD (ca. 1 %) und Typ IgM (ca. 0,5 %) sowie in das sogenannte Bence-Jones-Myelom (20 %), welches nur einen der Leichtketten-Typen der Immunglobuline produziert. Sehr selten kommen auch Mischtypen und asekretorische Formen vor. Bei der asekretorischen Form wird das monoklonale Protein zwar produziert, aber von den Zellen nicht ins Blut abgegeben (Kyle *et al.*, 2003).

Da Multiple Myelome vom Typ IgM extrem selten sind, muss beim Nachweis dieses Immunglobulintyps differentialdiagnostisch vor allem an das Vorliegen eines Morbus Waldenström gedacht werden (Ansell *et al.*, 2010). Als weitere wichtige Differentialdiagnosen des Multiplen Myeloms sind zum einen andere monoklonale Gammopathien wie das MGUS, das Smoldering Myelom, das POEMS-Syndrom und die primäre Leichtketten (AL)-Amyloidose sowie zum anderen Tumore mit Osteolysen wie verschiedene Knochentumore oder Metastasen anderer Tumore wie zum Beispiel Mamma-, Prostata-, Lungen- und Nierenkarzinom in Betracht zu ziehen.

1.1.5 Stadieneinteilung

Wie viele andere maligne Erkrankungen entsteht das Multiple Myelom durch einen schrittweisen Transformationsprozess. Als prämaligener Vorläufer findet sich fast immer die MGUS, welche sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 % pro Jahr in das Multiple Myelom transformiert. Als Zwischenschritt erfolgt die Ausbildung eines Smoldering (Schwelenden) Myeloms, das zwar morphologisch gesehen ein MM ist, aber definitionsgemäß noch keine Endorganschäden hervorgerufen hat und damit weitestgehend asymptomatisch ist. Eine Transformation zum (symptomatischen) Multiplen Myelom findet mit einer jährlichen Wahrscheinlichkeit von 10 % statt. Im letzten Schritt verlieren die malignen Zellen die Abhängigkeit vom Knochenmarksmilieu und manifestieren sich als Plasmazellleukämie oder als extramedulläres Myelom (Kyle und Rajkumar, 2002).

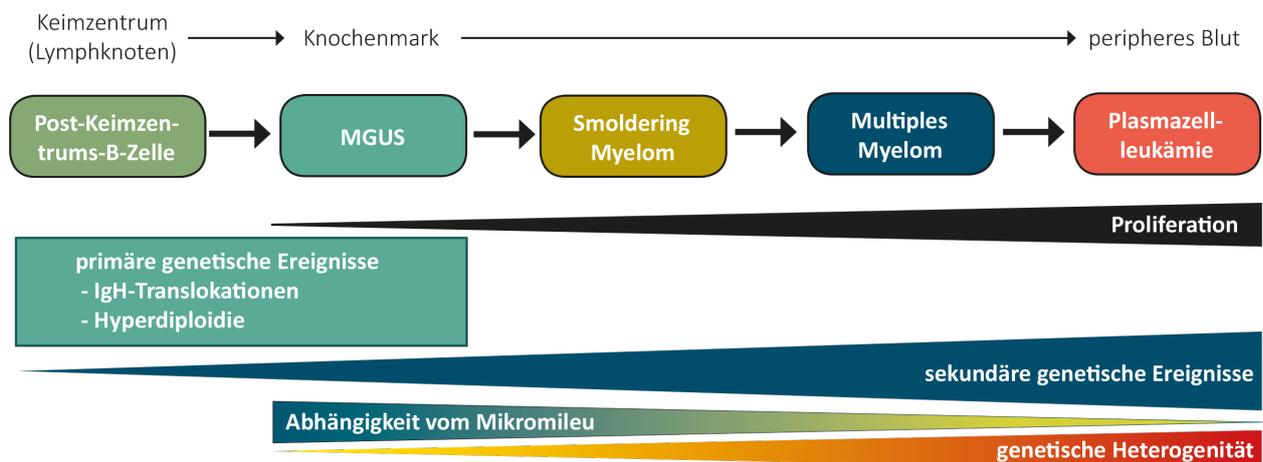


Abbildung 2: Maligner Transformationsprozess (Dhodapkar, 2016; Morgan et al., 2012; Zugelder, 2019)

Der Übergang der klinischen Einteilungen von der gesunden B-Zelle über MGUS, Smoldering Myelom, Multiples Myelom bis hin zur Plasmazellleukämie ist mit Zunahme an genetischen Alterationen verbunden. Zunächst führt ein initiales primäres genetisches Ereignis zur Immortalisierung eines Zellklons und Bildung einer prämaligen Zellpopulation (MGUS). Durch Anhäufung weiterer sekundärer genetischer Veränderungen verlieren die Zellen zunehmend die Abhängigkeit vom Mikromilieu des Knochenmarks und gewinnen zunehmend proliferative Kompetenz. Die veränderten Klone werden hierbei auf eine darwinistische Weise selektiert. Das Smoldering Myelom präsentiert sich klinisch noch ohne Endorganschäden (CRAB und SLiM negativ) und führt dann durch weitere maligne Transformation zum symptomatischen Multiplen Myelom. Schließlich können die Zellen sogar komplett die Abhängigkeit vom Knochenmark verlieren und werden in die Peripherie als Leukämiezellen ausgeschwemmt. Dies bildet das Ende des evolutionären Prozesses mit Ausbildung einer Plasmazellleukämie.

Die erste Stadieneinteilung für das Multiple Myelom wurde von Durie und Salmon (1975) etabliert. Diese wird heutzutage nicht mehr verwendet, da sie zwar mit der Tumormasse korreliert, aber nur sehr eingeschränkt Aussagen über die Prognose treffen kann. Zudem ist sie durch Miteinbeziehung der Osteolysen von der zum Teil untereinander abweichenden Beurteilung durch Radiologen abhängig. 2005 wurde daher von Greipp *et al.* das International Staging System (ISS)

veröffentlicht. Hierbei reichen allein die Konzentrationen des β_2 M und Albumins im Serum aus, um eine prognostische Einteilung in drei Kategorien vornehmen zu können. Diese beiden Parameter wurden durch eine statistische Analyse von mehr als 10.000 Patienten identifiziert und validiert.

	Stadium I (ISS-I)	Stadium II (ISS-II)	Stadium III (ISS-III)
Blutkonzentrationen	β_2 M < 3,5 mg/L und Albumin \geq 3,5 g/dL	β_2 M 3,5 – 5,5 mg/L oder β_2 M < 3,5 mg/L und Albumin < 3,5 g/dL	β_2 M > 5,5 mg/L
Medianes Überleben	> 5 Jahre	3 – 4 Jahre	2 – 3 Jahre

Tabelle 1: Stadieneinteilung gemäß International Staging System (Greipp et al., 2005)

Der genaue Pathomechanismus für die β_2 M -Erhöhung und die Albumin-Erniedrigung durch das Multiple Myelom ist unklar. β_2 M scheint nicht nur mit der Tumormasse und Nierenfunktion zu korrelieren, sondern auch weitere Faktoren wie eventuell die Immunfunktion miteinzuschließen. Albumin wird möglicherweise durch die Wirkung von Interleukin-6 (IL-6), welches im Mikromilieu der Multiplen Myelom-Zellen entsteht, vermindert in der Leber gebildet. Da durch diese Klassifikation nur 5 – 9 % aller Hochrisikopatienten identifiziert werden konnten, wurde eine überarbeitete Version (Revised-ISS, R-ISS) des ISS von Palumbo *et al.* (2015) vorgelegt. Diese erweitert die Klassifikation zum einen um das Vorliegen eines erhöhten LDH-Spiegels im Serum und zum anderen von bestimmten chromosomalen Aberrationen mit hohem Risiko. Diese beiden Parameter weisen beide auf die Entwicklung eines aggressiven Verlaufes hin.

	Stadium I (R-ISS I)	Stadium II (R-ISS II)	Stadium III (R-ISS III)
Kriterien	ISS I und keine Risikoaberration und normales LDH	weder R-ISS I noch R-ISS III	ISS III und Risikoaberration oder hohes LDH
Absolutes 5-Jahres Überleben	82 Monate	62 Monate	40 Monate

Tabelle 2: Stadieneinteilung gemäß Revised International Staging System (Palumbo et al., 2015)

Genetische Aberrationen mit hohem Risiko: *del(17p), t(4;14), t(14;16)*

Hohe Lactatdehydrogenase (LDH): *oberhalb des Normbereichs (circa > 130mg/dl)*

1.1.6 Therapie und Prognose

Unbehandelt führt die Erkrankung innerhalb von 6 Monaten zum Tod. An dieser Stelle ist anzumerken, dass auch mit optimaler Behandlung die relativen 5 (10)-Jahres-Überlebensraten bei nur 48 (31) % für Männer und 45 (30) % für Frauen liegen (Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., 2015).

Eine definitive Behandlungsindikation ist beim Vorliegen der alten Diagnosekriterien nach ISS gegeben. Sollten die CRAB-Kriterien negativ sein und nur die SLiM-Kriterien positiv sein, ist nach der Meinung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO) sowohl ein Abwarten mit engmaschiger Kontrolle als auch eine sofortige Therapieeinleitung möglich (Wörmann *et al.*, 2018). Die IMWG empfiehlt dahingegen das sofortige Einleiten einer Therapie (Rajkumar *et al.*, 2014). Der Nutzen beziehungsweise Nachteil einer frühzeitigeren Therapie ist aktuell noch nicht durch Studien belegt. Um die Vergleichbarkeit von Studien zu gewährleisten, wurden 2006 international gültige Remissionskriterien durch die IMWG vereinbart (Durie *et al.*, 2006) und 10 Jahre später aktualisiert (Kumar *et al.*, 2016). Bei den meisten Patienten ist allerdings auch nach Erreichen der oben genannten Remissionskriterien mit molekulargenetischen Methoden, Durchflusszytometrie, MRT oder PET-CT noch eine minimale residuelle Resterkrankung (MRD) nachweisbar (Davies, 2017). Daher hat der Begriff der MRD, auch wenn er aktuell kein Teil der Remissionskriterien ist, in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Patienten, bei denen keine MRD nachgewiesen werden kann, haben ein besseres Gesamtüberleben (OS) und progressionsfreies Überleben (PFS) (Munshi *et al.*, 2017). Noch hat der Nachweis der MRD keine therapeutische Konsequenz und wird deshalb nur im Rahmen von Studien bestimmt.

Eine Heilung der Krankheit ist durch typische Behandlungsregime, die die Verwendung der autologen Stammzellentransplantationen (autologe HSZT) einbeziehen, nicht möglich (Krishnan *et al.*, 2016). Im letzten Jahrhundert waren die wichtigsten therapeutischen Errungenschaften abgesehen von Urethan, welches nur noch historische Bedeutung hat, zum einen Medikamente, die heute noch Anwendung finden (Kyle und Rajkumar, 2008). Das sind seit 1958 Melphalan (Blokhin *et al.*, 1958), seit 1962 die Corticosteroide wie Prednison oder Dexamethason (Mass, 1962) und seit 1974 Cyclophosphamid (Lee *et al.*, 1974); zum anderen die autologe HSZT, welche erstmals 1983 bei einem Patienten mit Plasmazellleukämie durchgeführt wurde (McElwain und Powles, 1983).

Aber erst seit Beginn des 21. Jahrhunderts konnten durch die Einführung einiger neuer Medikamente weitere signifikante Fortschritte in der Überlebensverlängerung von Patienten

erreicht werden. Palumbo *et al.* (2015) konnten im Zuge der Etablierung des R-ISS nachweisen, dass seit der Einführung neuartiger Medikamente sich die Lebenserwartung in allen prognostischen Stadien signifikant verbessert hat. Durchschnittlich konnte die Lebenserwartung um 5 Jahre gesteigert werden (Anderson, 2012). Dieser Erfolg wird vor allem der Verwendung neuer Medikamente zugerechnet (Kumar *et al.*, 2014).

Jedoch können die neuen in der Erstlinientherapie verwendeten Medikamentenklassen der Proteasom-Inhibitoren (Bortezomib) und der Immunmodulatoren (Lenalidomid), auch in Kombination mit der autologen Stammzelltherapie, in der Regel keine dauerhafte Remission der Erkrankung bewirken (Franssen *et al.*, 2016; Krishnan *et al.*, 2016).

In der Erstlinientherapie werden die Patienten in eine für Hochdosistherapie geeignete und nicht geeignete Gruppe unterteilt. Bei den für die Hochdosistherapie geeigneten Patienten wird nach Induktionstherapie eine autologe Stammzelltransplantation durchgeführt. Patienten mit Risikofaktoren erhalten innerhalb von 6 Monaten eine erneute autologe Stammzelltransplantation. Dies wird dann als Tandemtransplantation bezeichnet. Daraufhin schließt sich eine Erhaltungstherapie mit Bortezomib oder Lenalidomid an (Wörmann *et al.*, 2018).

Aktuell wird das Risiko-Nutzen-Profil einer sofortigen autologen Transplantation in Frage gestellt. Es konnte gezeigt werden, dass es das Gesamtüberleben nicht verändert, wenn die autologe Transplantation erst beim Auftreten eines Rezidivs durchgeführt wurde. Einigen Patienten konnte auf diese Weise eine Transplantation (zunächst) erspart werden (Attal *et al.*, 2017).

Patienten, die für die Hochdosistherapie nicht geeignet sind und einen schlechten Allgemeinzustand aufweisen, können verschiedene, meist aus 3 Medikamenten bestehende Kombinationstherapien angeboten werden. Das von der DGHO in der aktuellen Leitlinie von 2018 empfohlene Induktionsschema ist die Dreierkombination von Bortezomib / Cyclophosphamid / Dexamethason (VCD), Bortezomib / Melphalan / Prednison (VMP) oder Bortezomib / Lenalidomid / Dexamethason (RVD). Sollte es der Allgemeinzustand nicht zulassen, wird eine Zweifachkombination aus Lenalidomid und niedrig dosiertem Dexamethason (Rd) angewandt.

In der Zweit- und Drittlinientherapie ist das Therapieschema gerade aufgrund der großen genetischen Heterogenität der Erkrankung und der hohen Häufigkeit an Rezidiven sehr komplex. Auf einige neue medikamentöse Optionen soll im Folgenden eingegangen werden. Für eine detaillierte Analyse in der Rezidivtherapie sei hier auf die gerade erst im Mai 2018 aktualisierte Leitlinie der DGHO verwiesen (Wörmann *et al.*, 2018).

In den letzten Jahren wurden einerseits die neuen, weiterentwickelten Proteasom-Inhibitoren (Carfilzomib, Ixazomib) und Immunmodulatoren (Pomalidomid) zugelassen und andererseits

zwei monoklonale Antikörper (Daratumumab, Elotuzumab) und der Histon-Deacetylase-Hemmer (HDAC-Hemmer) Panobinostat in der Zweitlinientherapie eingeführt. Daratumumab ist ein Anti-CD38-Antikörper und seit April 2017 in Deutschland zugelassen. Er wird als Kombinationstherapie entweder mit Lenalidomid und Dexamethason (DRd) oder mit Bortezomib und Dexamethason (DVd) oder als Monotherapie verwendet. Die POLLUX-Studie konnte zeigen, dass das DRd-Triple-Schema im Vergleich zu Lenalidomid und Dexamethason (Rd) ohne Daratumumab ein um 63 % geringeres relatives Risiko für Progression oder Tod hat (Dimopoulos *et al.*, 2016). In der CASTOR-Studie war das PFS mit dem DVd-Triple-Schema mehr als doppelt so lang wie dasselbe Schema ohne Daratumumab (Palumbo *et al.*, 2016). Beide Studien konnten auch zeigen, dass mehr Patienten MRD-Negativität erreichen konnten. Ebenfalls konnte die aktuelle ALCYONE-Studie zeigen, dass die Zugabe von Daratumumab auch den Outcome in der Erstlinientherapie verbessert, eine Erweiterung der Zulassung ist deshalb bereits vom Hersteller beantragt worden.

Elotuzumab ist ein Anti-SLAMF7-Antikörper und seit Mai 2016 in Deutschland zugelassen. In der Dreifachkombination mit Lenalidomid und Dexamethason konnte im Vergleich zu Lenalidomid und Dexamethason allein eine Verlängerung des PFS und des OS im Median um 4,2 beziehungsweise 4,1 Monate erreicht werden (Lonial *et al.*, 2015). Der Zusatznutzen von Elotuzumab wird vom G-BA nur als gering eingeschätzt (Gemeinsamer Bundesausschuss, 2016a), im Kontrast dazu wird der Zusatznutzen von Daratumumab als beträchtlich angesehen (Gemeinsamer Bundesausschuss, 2017a).

Als Medikament mit einem weiteren neuen Wirkungsmechanismus wurde der Histon-Deacetylase (HDAC)-Hemmer Panobinostat 2015 in der Europäischen Union zugelassen. In der randomisiert-kontrollierten PANORAMA-Studie konnte gezeigt werden, dass Panobinostat das PFS signifikant um im Median 7,8 Monate verlängert, die Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit war im Unterschied dazu aber nicht signifikant (Miguel *et al.*, 2013; San-Miguel *et al.*, 2016). Aktuell ist für den G-BA der Zusatznutzen im Therapiealgorithmus unklar (Gemeinsamer Bundesausschuss, 2016b).

Einen vielversprechenderen Therapieansatz, der sich seit November 2018 als sogenannte Breakthrough Therapie mit dem Kandidaten bb2121 im beschleunigten Zulassungsverfahren der Food and Drug Administration (FDA) und der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) befindet, ist die chimäre Antigenrezeptor (CAR)-T-Zell-Therapie (Celgene Corporation, 2017). Bei dieser neuartigen Immuntherapie werden T-Zellen des Patienten gewonnen und gentechnisch (meist mit Lentiviren) verändert, sodass diese CAR auf ihrer Oberfläche exprimieren, die gegen

bestimmte Antigene der Krebszellen gerichtet sind. Beim bb2121 ist dies das B-Zell-Reife-Antigen (BCMA), welches als Oberflächenrezeptor hauptsächlich auf Plasmazellen und somit auch auf Multiplen Myelom Zellen zu finden ist. Nach der Rücktransfusion der gentechnisch veränderten T-Zellen lösen diese eine Immunreaktion gegen die Krebszellen mit dem „programmierten“ Antigen aus (Cohen, 2018). 81 % der Patienten in einer Phase I Studie mit bb2121 sprachen auf die Therapie an, im Hochdosisarm waren es sogar 94 % und bei fast der Hälfte aller Patienten konnte sogar eine komplette Remission erreicht werden (Berdeja *et al.*, 2017). Eine erste Auswertung im Beobachtungszeitraum der genannten Studie ergab ein im Median um ein Jahr verlängertes PFS (Raje *et al.*, 2018). Eine schwere Nebenwirkung der CAR-T-Zell-Therapie ist das Zytokin-Freisetzungssyndrom (CRS), welches bei dieser Studie bei 10 % der Patienten in schwerer Ausprägung auftrat. Es wird vermutet, dass das CRS durch Cytokine, die beim Zerfall von Krebszellen freigesetzt werden, entsteht und damit dem Tumorlyse-Syndrom ähnelt. Dies kann zu Fieber, Atemnot und Erythemen bis hin zum Tod führen (Porter *et al.*, 2018). Der durch die CAR-T-Zell-Therapie bedingte Tod eines 20-jährigen Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie wirft neue Fragen zur Sicherheit dieser neuartigen Therapie auf. Hierbei war unbeabsichtigt eine Leukämiezelle gentechnisch verändert worden (Ruella *et al.*, 2018). Neben den geringen Erfahrungswerten und neuen technologischen Herausforderungen kommt erschwerend hinzu, dass die Therapie bedeutend komplizierter durchzuführen und mit viel höheren Kosten (aktuell 320.000 € pro Patient) verbunden ist als bereits andere etablierte Therapieformen (Korzilius, 2019).

Das aktuelle Ziel der Entwicklung und Einführung neuer Medikamente ist es, aus dem Multiplen Myelom entweder eine chronische Erkrankung zu machen oder auf der anderen Seite eine Langzeitremission („Heilung“) zu erreichen (San-Miguel und Mateos, 2011). Als Vorbild für den ersten Punkt dient hier die Einführung der Tyrosinkinaseinhibitoren bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML). Beides kann aktuell auch durch die Einführung der genannten neuen Medikamente (noch) nicht erreicht werden (Nahi *et al.*, 2012; Ravi *et al.*, 2018).

Zusätzlich zum Versuch eine Remission zu erzielen, ist ein weiteres wichtiges Ziel der Therapie die Verhinderung und Behandlung von therapie- und tumorbedingten Komplikationen und somit die Steigerung der Lebensqualität. Bei Patienten mit mindestens einer Osteolyse oder einem Therapieschema mit Glucocorticoiden muss eine osteoprotektive Therapie eingeleitet werden. Dies führt zur Verminderung der skelettbezogenen Ereignisse wie pathologischen Frakturen, Rückenmarkskompression oder Hypercalcämie. Hierfür steht primär als Bisphosphonat die Zoledronsäure oder alternativ als Anti-RANKL-Antikörper Denosumab zur Verfügung. Zur

Verhinderung einer therapieassoziierten Hypocalcämie wird zudem jeweils Calcium und gegebenenfalls Vitamin D3 substituiert. Sollte die osteoprotektive Therapie nicht ausreichen, können schmerzhafte oder instabile Osteolysen zudem durch Radiotherapie oder operativ durch Vertebro-/Kyphoplastie behandelt werden (Terpos *et al.*, 2015; Terpos *et al.*, 2013). Der durch die Knochenmarkinsuffizienz entstehenden Anämie kann durch die Gabe von rekombinantem Erythropoietin (EPO) entgegengewirkt werden. Die häufig im Rahmen der Therapie auftretende Neutropenie kann mit Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) behandelt werden (Moreau *et al.*, 2017). Eine antibiotische Infektionsprophylaxe ist umstritten, kann aber möglicherweise gerade zu Beginn der Therapie mit Lenalidomid oder bei sehr infektgefährdeten Patienten nützlich sein. Auf jeden Fall sollte eine Pneumokokken- und Influenzaimpfung durchgeführt werden. Patienten, die einen Proteasom-Inhibitor erhalten, sollten zudem eine Herpes-Zoster-Prophylaxe mit Aciclovir bekommen (Terpos *et al.*, 2015).

Die einzige Option mit kurativem Potential stellt die allogene Stammzelltransplantation (allogene HSZT) dar, für die aufgrund der Toxizität aber lediglich 5 bis 10 % aller Patienten in Frage kommen. Hierbei kann nach aktueller Studienlage das Ziel der Kuration, das heißt einer dauerhaften Remission, trotz des „Transplant-gegen-Myelom-Effekts“ nur selten erreicht werden. Die drei Registerstudien der European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) zeigten ein PFS von nur 20 % nach 3 Jahren (Crawley *et al.*, 2007; Crawley *et al.*, 2005) beziehungsweise ebenfalls 20 % nach 5 Jahren (Auner *et al.*, 2013) nach allogener HSZT. Im Langzeit-Follow-up von 42 Patienten waren 50 % nach 5 Jahren, 45 % nach 10 Jahren und nur noch 7 % nach 20 Jahren in Remission (Vekemans *et al.*, 2014). Auch in einer anderen Studie mit 60 Patienten trat nach über 10 Jahren nach allogener HSZT noch bei 10 % der Patienten ein Rezidiv auf. Hier zeigte sich ein PFS von 31 % nach 7 Jahren (Sahebi *et al.*, 2013). Die verschiedenen Ergebnisse resultieren aus der unterschiedlichen Vorbehandlung der Patienten und aus der Verwendung neuer medikamentöser Therapien in den Studien mit besseren Ergebnissen. Übereinstimmend zeigt sich aber, dass anscheinend eine Heilung bei einer mehr oder weniger großen Subgruppe möglich ist. Die große Frage ist, ob hierbei die Risiko-Nutzen-Bewertung positiv ist beziehungsweise wie die Patienten identifiziert werden können, die von dieser Behandlung profitieren. Zudem ist die Intensität der Konditionierung Gegenstand der Forschung, um die genaueste Abwägung zwischen möglichst geringen Nebenwirkungen und möglichst kleiner Rezidivwahrscheinlichkeit zu ermöglichen (Lokhorst *et al.*, 1997). Im Vergleich zur autologen HSZT ist die allogene HSZT mit einem signifikant höheren Risiko an therapiebedingter Mortalität (TRM) verbunden. In einer aktuellen deutschen Studie zeigte sich allerdings eine TRM

von nur 6 % nach einem Jahr (Kroger *et al.*, 2013). Andere zum Teil ältere Studien publizierten deutlich höhere TRM von 21,5 % nach einem Jahr (Auner *et al.*, 2013), von 22 % nach zwei Jahren (Patriarca *et al.*, 2012) beziehungsweise von 43 % nach einem Jahr (Mehta *et al.*, 1998). Bei 79 % der Patienten zeigte sich im Verlauf eine ausgeprägte chronische Graft-versus-Host Erkrankung (Bruno, 2016).

In der Erstlinientherapie bewertet der Gemeinsame Bundesausschuss Deutschlands (G-BA) die allogene HSZT als sinnvolle Therapieoption für alle jüngeren Patienten und für Patienten in gutem Allgemeinzustand mit Histokompatibilitätsantigen (HLA)-identischem Familienspender. Der G-BA konnte zwei methodisch gute Studien identifizieren, die eine niedrigere Rezidivrate nach allogener HSZT und auch einen signifikanten Überlebensvorteil sowie besseres PFS nach einem Beobachtungszeitraum von 7 (Giaccone *et al.*, 2011) beziehungsweise 8 Jahren (Bjorkstrand *et al.*, 2011) nachweisen konnten. Der Nutzen überwog hier den Nachteil durch erhöhte TRM (Bruno *et al.*, 2007). 5 andere prospektiv vergleichende Studien konnten dahingegen keinen signifikanten Vorteil für das Gesamtüberleben oder PFS nachweisen. Daraus resultiert die Notwendigkeit noch weitere Studien durchzuführen, um zu einer abschließenden Beurteilung kommen zu können. Entsprechende Studien werden aktuell an verschiedenen Zentren durchgeführt (Gemeinsamer Bundesausschuss, 2017b). Jenseits der Erstlinientherapie ist die Risiko-Nutzen-Bewertung der allogenen HSZT noch sehr unklar, weswegen vom G-BA eine Erprobungsrichtlinie initiiert wurde (Gemeinsamer Bundesausschuss, 2017b). Die allogene HSZT sollte daher nur im Rahmen von Einzelfallentscheidungen und Studien durchgeführt werden (Bruno, 2016; Dhakal *et al.*, 2016; Vekemans *et al.*, 2014).

Die Behandlungsmöglichkeiten für das Multiple Myelom sind daher zum aktuellen Zeitpunkt insbesondere für jüngere Patienten sowie Patienten mit nur kurzem progressionsfreiem Krankheitsverlauf oder Patienten mit einem Rezidiv bei Weitem nicht zufriedenstellend. Bei Aufnahme der Arbeit für diese Promotion traf dies noch umso mehr zu, da neue Therapien wie Daratumumab noch nicht vorhanden und die CAR-T-Zell-Therapie noch nicht in Erprobung war. Es ist weiterhin unbedingt notwendig, neue Ansatzpunkte für die medikamentöse Therapie zu identifizieren (Ocio *et al.*, 2014).

1.1.7 Genetische Heterogenität

Das MM ist genetisch gesehen nicht eine einzelne Krankheitsentität, vielmehr werden verschiedene klinisch ähnliche Erkrankungen unter diesem Überbegriff subsumiert. Sie alle besitzen die Gemeinsamkeit, dass sie mit den zuvor genannten Kriterien einer manifesten klonalen Proliferation von Plasmazellen einhergehen. Ein einheitlicher Therapieansatz ist daher nicht möglich, sondern stark abhängig von dem molekularen Subtyp der Erkrankung (Morgan *et al.*, 2012). Diese intratumorale Heterogenität wird als Hauptursache für die fehlende Heilbarkeit des MM angesehen (Chapman *et al.*, 2011; Morgan *et al.*, 2012). Im Durchschnitt finden sich 35 Mutationen im Genom eines MM (Chapman *et al.*, 2011), womit es, was die Anzahl an Mutationen betrifft, im Mittelfeld verschiedener onkologischer Erkrankungen liegt (McGranahan und Swanton, 2017). Auch in vielen anderen Tumorentitäten ist die intratumorale Heterogenität der entscheidende Faktor, der zu Sterblichkeit, Therapieversagen und Arzneimittelresistenz führt (Greaves, 2015).

1.1.7.1 Primäre onkogenetische Ereignisse

Genetische Analysen von MM Zellen zeigen, dass neben einer großen Anzahl unterschiedlicher Mutationen, einige wenige primäre Chromosomenaberrationen im Sinne von primären onkogenetischen Ereignissen über alle Stufen der Tumorentwicklung vom MGUS bis zur Plasmazellleukämie vorhanden sind. Diese initialen Mutationen führen zur Immortalisierung einer einzelnen Zelle, diese wird Myeloma Propagating Cell (MPC) genannt (Morgan *et al.*, 2012). Die Ursache dafür, dass es nur einige wenige, unterschiedliche primäre Ereignisse gibt, liegt in der physiologischen Plasmazellentwicklung begründet. Es existieren zwei unterschiedliche, ungefähr gleich häufige Gruppen dieser Primärerereignisse, die als gemeinsame Endstrecke zur Cyclin D Dysregulation und somit zur Deregulierung des G1/S-Phase-Checkpoints führen.

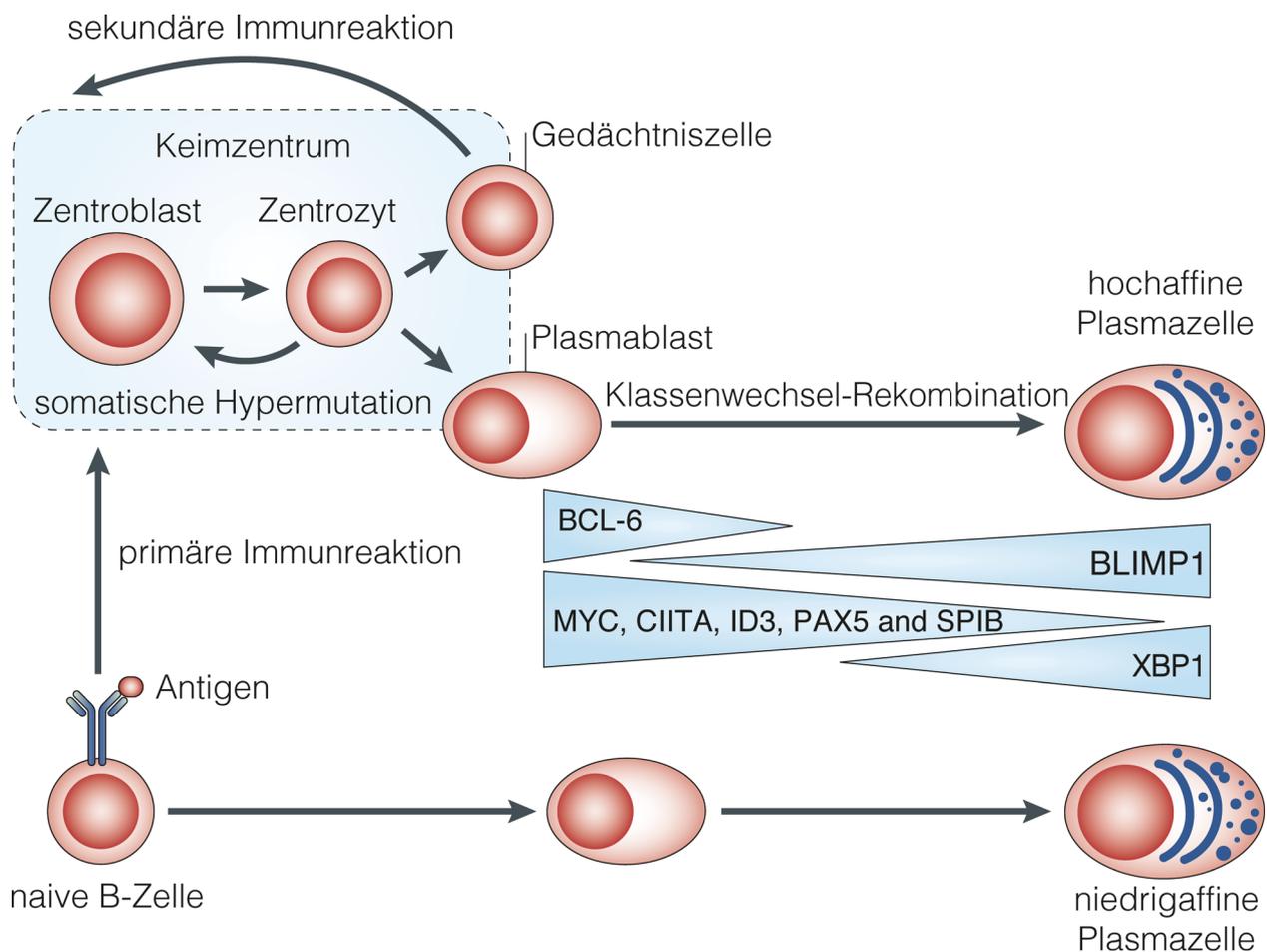


Abbildung 3: Physiologische Plasmazellentwicklung (Morgan et al., 2012)

Antigen-Stimulation führt dazu, dass eine naive B-Zelle entweder zu einer Plasmazelle mit niedriger Affinität differenziert oder nach Wanderung in das Keimzentrum die Affinitätsreifung stattfindet, welche durch somatische Hypermutation und Antigenselektion vermittelt wird. Anschließend findet durch Rekombination der Klassenwechsel der Immunglobuline statt. Die Differenzierung zur Antikörper produzierenden Plasmazelle ist nach der Wanderung ins Knochenmark abgeschlossen. Bei der für diese Schritte notwendigen DNA-Umlagerungen können Fehler auftreten, welche zur Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen können. Zudem müssen zur endgültigen Differenzierung nötige proliferative Eigenschaften der Zelle abgeschaltet werden. Sollte dies nicht ordnungsgemäß stattfinden, können aktive zelluläre Prozesse verbleiben, welche zum Ausbilden eines Multiplen Myeloms beitragen können.

Übersetzte Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Nature Reviews Cancer

1.1.7.1.1 Gruppe mit Immunglobulin Gen Translokationen

Es existieren zum einen MM mit Immunglobulin Gen Translokationen. Hierbei ist entweder der Immunglobulin Schwereketten (IgH) Locus (14q32) oder einer der Immunglobulin Leichtketten (IgL) Loci (λ : 2p12 oder κ : 22q11) betroffen. IgH Translokationen finden sich in fast der Hälfte aller MGUS und SMM, in über 50 % der intramedullären MM und bis hin zu 85 % der Plasmazelleukämien (Chesi et al., 2012). IgL Translokationen kommen in ungefähr 10 % aller MGUS und SMM sowie in ungefähr 15 % aller MM vor und betreffen vor allem den Lambda-Ketten Locus. Der starke Enhancer der Immunglobulin Loci kann durch diese Translokationen

Onkogene unter seine Kontrolle bekommen und zu deren verstärkter Expression führen (Morgan *et al.*, 2012).

Selten entsteht die Translokation bei der V(D)J-Rekombination im Knochenmark, welche einen frühen Schritt der B-Zellreifung darstellt. Hierbei wird in der Pro-B-Zelle durch somatische Rekombination der variable Anteil des Exons der Schwerketten durch je ein variables Variable-, Diversity- und Junction-Segment zusammengefügt. Für das Exon der Leichtketten findet der gleiche Prozess anschließend in der Prä-B-Zelle ohne das Diversity-Segment statt (Tonegawa, 1983). Dieser Vorgang benötigt das Einfügen von Doppelstrangbrüchen (DSB) an bestimmten Rekombinationssignal-Sequenzen der DNA durch Enzyme, die durch Recombination-Activating Gene (RAG) kodiert werden. Diese DSB werden dann durch DNA-Reparaturenzyme repariert. Mit dem Abschluss der Rekombination beider Ketten-Typen ist die Zelle in der Lage IgM zu produzieren.

Im peripheren lymphatischen Gewebe findet in Keimzentren die weitere B-Zelldifferenzierung der unreifen B-Zelle statt, welche zusammen mit der V(D)J-Rekombination die immense Antikörpervielfalt ermöglicht, die für ein intaktes Immunsystem nötig ist (Mostoslavsky *et al.*, 2004). Bei der somatischen Hypermutation (SHM) werden nach Stimulation durch Antigen-Präsentation durch T-Zellen und dendritische Zellen Punktmutationen im Variable-Segment verursacht. Anschließend werden die für dieses Antigen affinsten B-Zellen selektiert, diese differenzieren sich weiter zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen. Die Punktmutationen werden durch das Enzym aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase (AID) durch Austausch von Cytidin durch Uridin in der entspiralisierten DNA verursacht. Da Uridin nicht natürlich in der DNA vorkommt, wird dieser „Fehler“ entweder durch Fehlpaarungsreparatur (DNA-Mismatch-Reparaturproteine MSH2/MSH6) oder durch Basenexzisionsreparatur behoben. Bei der Basenexzisionsreparatur wird Uridin durch die Uracil-DNA-Glykosylase (UNG) zu einem abasischen Rest umgewandelt. Dies führt dann über das DNA-Reparaturenzym REV1 genau wie bei der Fehlpaarungsreparatur zu Punktmutationen. Alternativ kann hier aber auch die apurinische/apyrimidinische Endonuclease 1 (APE1) ansetzen und zu DSB führen (Murphy und Weaver, 2018). Dasselbe gilt auch für die anschließende IgH-Switch-Rekombination, bei der DSBs nötig sind. Der Klassenwechsel (CSR) der Ig wird durch die Deletion von Exons möglich und ermöglicht so die Bildung verschiedener Ig-Klassen (Stavnezer *et al.*, 2008). Die notwendigen DSB werden durch die AID, UNG und APE1 eingebracht und diese durch nicht-homologes Endjoining wieder ohne den herausgeschnittenen Teil zusammengefügt (Lieber *et al.*, 2006).

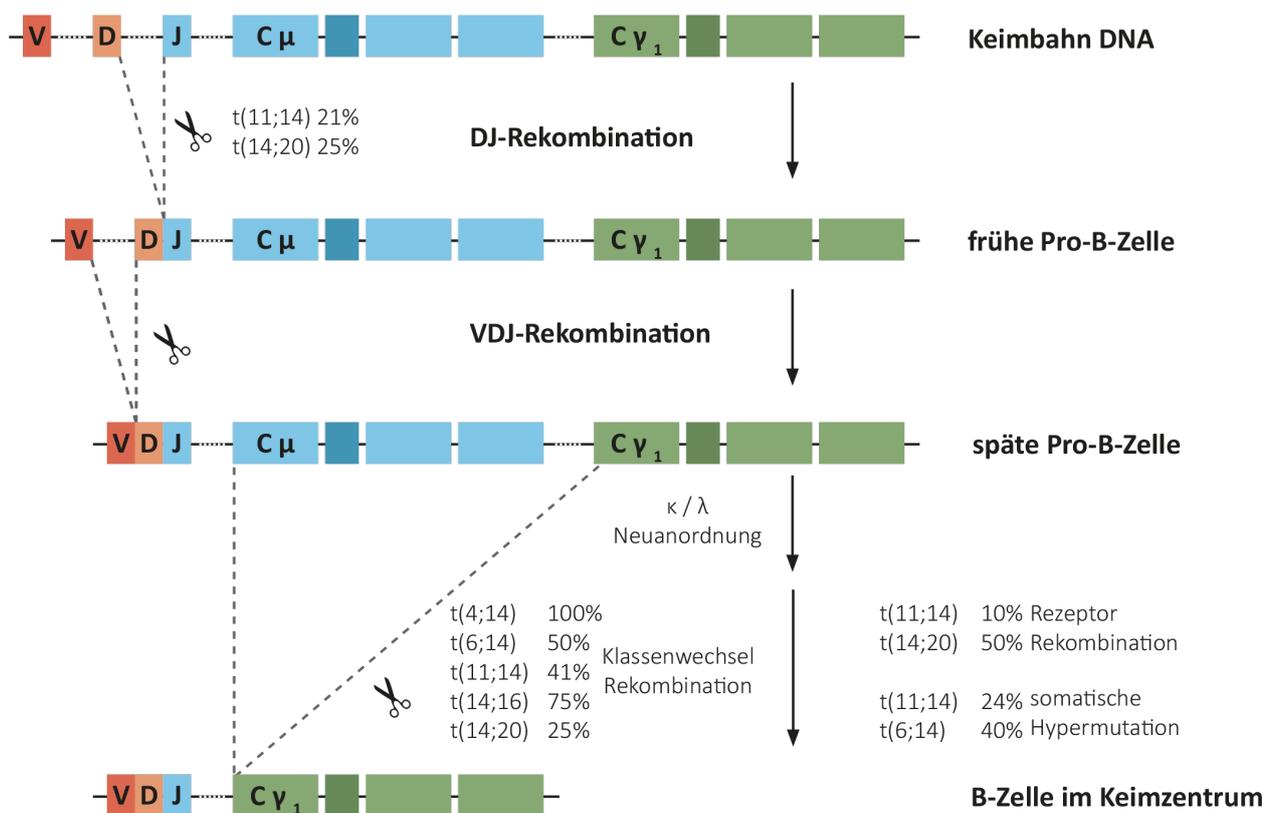


Abbildung 4: VDJ-Rekombination und Translokationen im Multiplen Myelom (Walker et al., 2013)

Translokationen treten zwischen dem IgH-Locus und allen Hauptpartnerchromosomen bei der Klassenwechsel-Rekombination im Keimzentrum auf. Die Untergruppen t(11;14) und t(14;20) entstehen zudem auch durch andere Mechanismen, zum einen durch Rezeptor-Rekombination im Keimzentrum oder durch DH-JH-Rekombination im frühen Pro-B-Zellstadium.

Modifizierte Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Blood Journal

Der Mechanismus, der zur Entstehung von chromosomalen Translokationen führt, setzt das Vorliegen von DSBs der DNA an verschiedenen Stellen voraus. Diese werden dann teilweise aberrant wieder zusammengefügt und führen somit zur Translokation (Richardson und Jasin, 2000). Sowohl bei der V(D)J-Rekombination (Lieber et al., 2006), der CSR (Walker et al., 2013) und der SHM (Wu et al., 2003) kommt es zu diesen prädisponierenden DSBs. Schätzungen gehen davon aus, dass sich täglich abnormale Translokationen in insgesamt bis zu 1.000 Zellen aufgrund von DSBs bilden (Morgan et al., 2012). Die häufigsten Translokationen (immer ausgehend vom Chromosom 14 auf dem die Ig-Loci liegen) sind t(11;14), t(4;14), t(14;16), t(14;20) und t(6;14) mit einem Vorkommen von je 15 %, 12 %, 3 %, 2 % beziehungsweise 1 % der untersuchten Proben (Walker et al., 2018). Als Resultat findet sich eine Überexpression von MMSET sowie FGFR3, CCND3, CCND1, MAF und MAFB, welche offenbar zu einem Überlebensvorteil führen (Morgan et al., 2012).

Walker *et al.* (2013) konnten die weitverbreitete Annahme widerlegen, dass fast alle Translokationen während der CSR entstehen (Morgan *et al.*, 2012). In 61 untersuchten Proben konnte CSR bedingte Translokation nur in 62 % der Fälle nachgewiesen werden (Walker *et al.*, 2013). Weiterhin gültig bleibt die These, dass die Translokation sich vor allem in den Keimzentren der Lymphknoten abspielt. Dies wird dadurch gestützt, dass MM als monoklonales Protein hauptsächlich IgG und IgA produzieren und es somit unwahrscheinlich ist, dass bei diesen MM die Translokation schon vor der Einwanderung in das Keimzentrum entsteht. Die Bruchstellen finden sich meist in der Region der IgH Wechsel-Region (verursacht durch CSR) oder 5' davon (vermutlich durch SMH entstanden) (Walker *et al.*, 2013). Vereinzelt finden sich die Bruchregionen auch im Bereich der VDJ-Sequenzen und in 4 % der MM existiert eine Subpopulation mit einer anderen VDJ-Sequenz, sodass die V(D)J ebenfalls eine eher seltene Ursache für Translokationen darstellt (Corre *et al.*, 2015).

1.1.7.1.2 Gruppe mit hyperdiploidem Genom

Neben den MM mit Immunglobulin Translokation existiert die Gruppe von MM mit einem hyperdiploiden Genom mit insgesamt 48 bis 75 (hauptsächlich 49–56) Chromosomen. Typischerweise treten Trisomien aller oder einiger der numerisch ungeraden Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21 auf. IgH Translokation können vorkommen, sind aber mit ungefähr 10 % recht selten und möglicherweise erst im Verlauf erworben. Das Entstehen dieser Hyperdiploidie ist noch ungeklärt (Chesi und Bergsagel, 2015). Man vermutet, dass, ähnlich wie bei der hyperdiploiden akuten lymphatischen Leukämie, die zusätzlichen Chromosomen auf einmal in einer fehlerhaften Mitose entstehen (Morgan *et al.*, 2012). Patienten in dieser Gruppe haben im Vergleich zur Gruppe mit Ig Translokationen eine bessere Prognose.

1.1.7.1.3 Generelle Cyclin D Dysregulation

Sowohl in der hyperdiploiden als auch der nicht-hyperdiploiden Gruppe findet man bei fast allen MGUS und MM eine erhöhte Expression mindestens eines der drei CCND Gene, welche für Cyclin D kodieren (Bergsagel *et al.*, 2005). Es findet sich oft eine direkte oder indirekte Dysregulation durch Cyclin D oder MAF Translokationen. CCND1 wird von fast 40 % aller MM exprimiert, obwohl dies in normalen B-Zellen nicht vorkommt. CCND2 ist in fast allen anderen MM erhöht. Die wenigen Tumore ohne Cyclin D Überexpression besitzen oft ein inaktiviertes RB1, sodass kein Cyclin D notwendig ist, um zu proliferieren. Diese Erkenntnisse führten zur Schaffung der Translokations- und Cyclin D (TC) Klassifikation. Abhängig von Ig Translokation und transkriptioneller Aktivierung von Cyclin D Genen werden die MM in

8 verschiedene Gruppen eingeteilt (Bergsagel und Kuehl, 2005). Eine Übersicht über die verschiedenen Ursachen, die zur Cyclin D Dysregulation führen, ist in **Abbildung 5** zu finden.

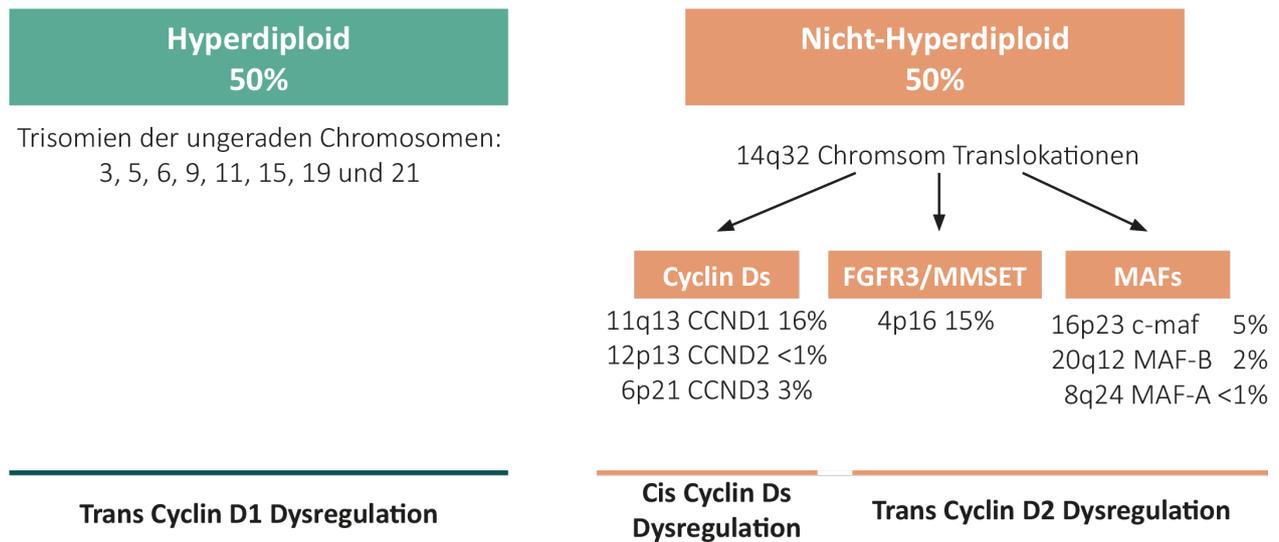


Abbildung 5: Cyclin D Regulation bei Hyperdiploidie und Nicht-Hyperdiploidie (Chesi und Bergsagel, 2015)

Fast alle hyperdiploiden Tumore haben eine biallelische Cyclin-D1 trans-Dysregulation. Nichthyperdiploide Tumore haben oft t(14q32) Translokationen, die die angegebenen Loci beeinflussen. In etwa 25% von ihnen wird eines des D-Typ-Cyclins durch eine 14q32 Translokation cis-dysreguliert, und in den anderen nicht-hyperdiploiden Tumoren wird die Expression von Cyclin D2 trans-dysreguliert.

Modifizierte Abbildung mit freundlicher Genehmigung von International Journal of Laboratory Hematology

1.1.7.2 Sekundäre onkogenetische Ereignisse

Es existiert eine beinahe unüberschaubare Anzahl an sekundären Events. Man vermutete lange, dass die sekundären Ereignisse komplett zufällig im Rahmen weiterer Mutationen auftreten. Walker *et al.* (2018) konnten aber zeigen, dass abhängig von dem primären Ereignis – Ig Translokation oder Hyperdiploidie – bestimmte sekundäre genetische Veränderungen nicht rein zufällig auftreten. Neben der primären Ig Translokation kommen sekundär häufig andere chromosomale Veränderungen vor. Die häufigsten sind hierbei Monosomie 13 (45%) (Avet-Loiseau *et al.*, 2007), Duplikationen des langen Arms des Chromosoms 1 (add(1q); 30% bis 35%) (Hanamura *et al.*, 2006), und verschiedene chromosomale Deletionen wie del(1p), del(6q), del(8p), del(12p), del(14q), del(16q), del(17p) oder del(20p) (Avet-Loiseau *et al.*, 2009). Durch die Nachweisbarkeit dieser chromosomalen Veränderungen im Karyotyp sind sie schon längere Zeit bekannt. Die Bestimmung des Karyotyps hat jedoch nur eine begrenzte Sensitivität, da es notwendig ist, dass die Zellen sich in der Metaphase befinden (Rajan und Rajkumar, 2015). Das MM hat meistens nur eine geringe Proliferationsrate, sodass der Nachweis nur bei 25 – 30% der Patienten mittels Karyotypisierung möglich ist. Mit modernen Technologien wie der Interphase Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (iFISH) können dahingegen 83% und mit der Oligonukleotid-

Array-basierten komparativen genomischen Hybridisierungsanalyse (oaCGH) sogar 99 % aller chromosomalen Veränderungen erkannt werden (Kjeldsen, 2016).

Andere molekulargenetische Alterationen können überhaupt nicht mit der Karyotypisierung nachgewiesen werden. Deren Nachweis ist erst durch die Verwendung neuerer Verfahren wie der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) oder Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP)-Arrays sowie Whole-Exome-Sequenzierung (WES) oder Whole-Genome-Sequenzierung (WGS) in den letzten Jahren möglich geworden (Corre *et al.*, 2015).

1.1.7.3 Genomweite Studien und das onkogene Signalnetzwerk

Mit dem Ziel gerade die Genetik der sekundären Ereignisse des Multiplen Myeloms besser zu verstehen, wurden von verschiedenen Forschergruppen genomweite Sequenzierungen (WGS) durchgeführt. Diese Analysen konnten verschiedene schon bekannte Mutationen bestätigen und neue Mutationen finden. Hierdurch wird es immer mehr möglich, die genetische Vielfalt des MM zu verstehen sowie Subgruppen und betroffene Signalwege zu identifizieren.

Die erste WGS-Studie wurde durch die Finanzierung der Multiple Myeloma Research Foundation (MMRF) 2011 ermöglicht. Es wurde von insgesamt 23 Patienten das gesamte Genom und von weiteren 13 Patienten die Exons der Zellen ihres Multiplen Myeloms sequenziert (Chapman *et al.*, 2011). Diese ersten Sequenzierungsdaten ließen Morgan *et al.* (2012) in einer Übersichtsarbeit über die Genetik des Multiplen Myeloms zu dem Schluss kommen, dass das onkogene Signalnetzwerk des MM noch komplexer ist als gedacht. Eine Übersicht der typischen genetischen Mechanismen, die auf zellulärer Basis zum Ausbilden eines MM führen, ist in **Abbildung 6** zu finden.

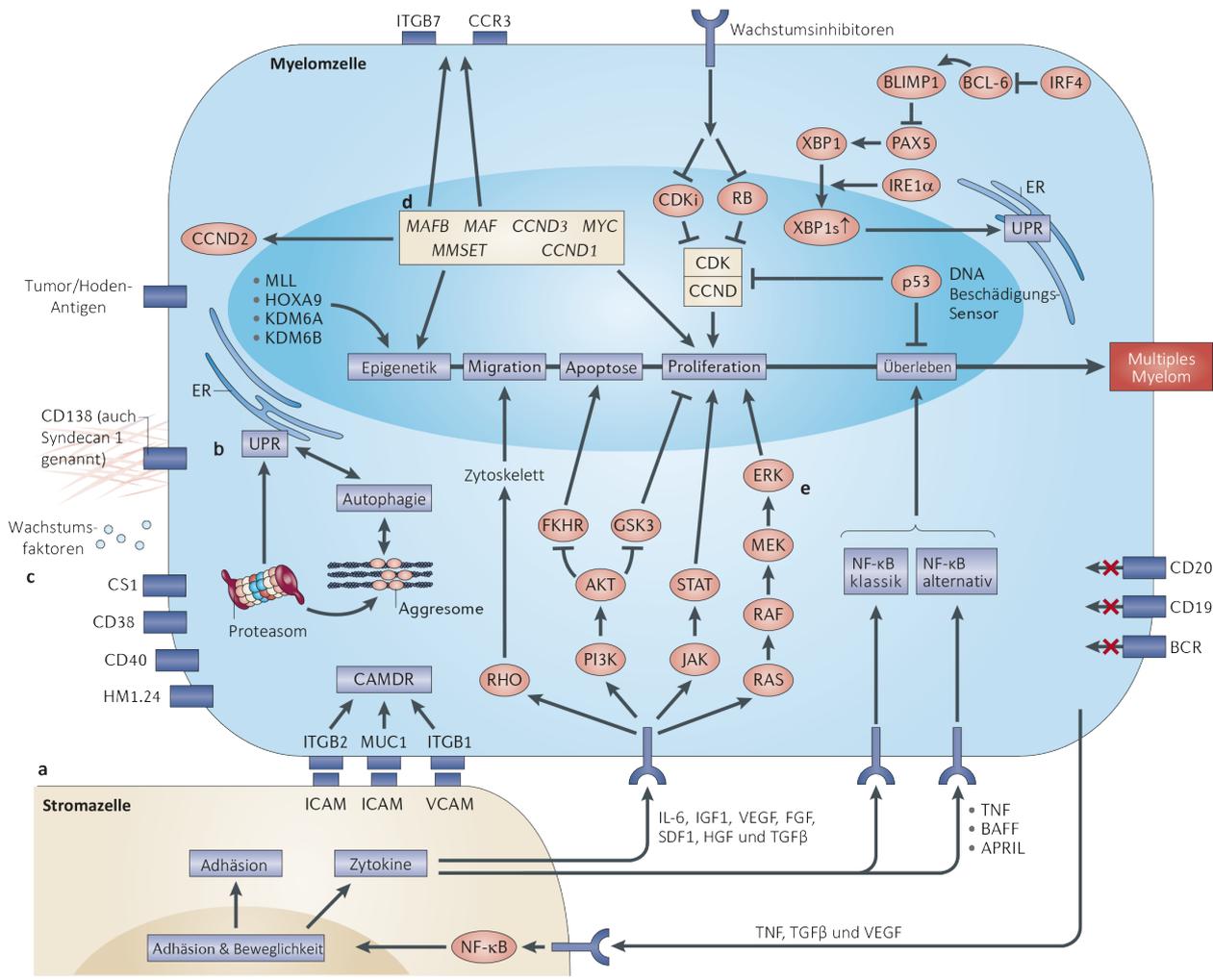


Abbildung 6: Zelluläre Vernetzung einer typischen MM Zelle (Morgan et al., 2012)

a: Zwischen den MM Zellen und Stromazellen bildet sich im Knochenmark eine durch Zytokine und Zelladhäsion vermittelte positive Rückkopplung heraus. Dies führt neben Proliferation der MM Zelle auch zu Arzneimittelresistenz, kann allerdings auch als mögliches therapeutisches Ziel dienen.

b: Aufgrund der massenhaften Produktion von Ig sind MM Zellen stark von Protein prozessierenden Wegen abhängig (unter anderem von der ungefalteten Proteinantwort (UPR), Proteasom, Aggresom und Autophagie)

c: Möglicherweise mittels Antikörper therapeutisch nutzbare Zelloberflächenantigene

d: Translokationen, an denen der Immunglobulin-Schwerketten-Locus beteiligt ist, führen zu einer Überexpression von anderen Genen, welche durch eine Deregulation des Zellzyklus die Zellproliferation beeinflusst.

e: Zahlreiche Signalwege werden in MM Zellen dereguliert, darunter der PI3K-, NF-κB-, RAS-RAF-MAPK- und JAK-STAT-Signalweg. Sehr häufig ist auch eine Überexpression der Transkriptionsfaktoren MAF und MYC vorhanden. Schlussendlich kommt es zur abnormen Plasmazell-differenzierung, Deregulierung des Zellzyklus, verminderter Apoptose und einer gesteigerten Proliferation und verlängertem Überleben von MM Zellen.

Übersetzte Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Nature Reviews Cancer

Auch in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe wurden 2013 in Würzburg genomweite Sequenzierungen von 5 Patienten-Proben und 6 Myelom Zelllinien durchgeführt. Hier konnten noch unbekannte Mutationen in den Genen von Adhäsionsproteinen und Rezeptor-Tyrosinkinasen sowie von nachgeschalteten Signalmolekülen nachgewiesen werden. Die Technologie der WGS hat – seit der ersten vollständigen Sequenzierung eines menschlichen Genoms 2003 im Rahmen des Humangenomprojekts – was Kosten und Effizienz betrifft, einen Quantensprung gemacht. Dieser technologische Fortschritt und intensive Forschungsbemühungen ermöglichten es Walker 2016 – nur 5 Jahre nach der ersten Sequenzierung eines MM – das Multiple Myeloma Genome Project mit einem Datensatz von insgesamt 2161 Patienten zu etablieren. Die Daten stammen aus der Myeloma XI Studie (Walker *et al.*, 2015) des Dana-Faber Cancer Institute/Intergroupe Francophone du Myelome (Bolli *et al.*, 2014) und der Multiple Myeloma Research Foundation CoMMpass Studie (Laganà *et al.*, 2017). Im Detail besteht die Datenbank aus 1436 Whole-Exome-Sequenzierungen (WES), 708 Whole-Genome-Sequenzierungen (WGS), 993 Targeted-Panel-Sequenzierungen und den Expressionsdaten aus 1497 RNA-Seq- und Gen-Expressions-Arrays, welche mit den klinischen Daten der Patienten verknüpft sind (Walker *et al.*, 2016). Das Ziel dieses großen Datensatzes ist einerseits eine klinische Einteilung anhand relevanter molekularer Aberrationen zu ermöglichen, und andererseits neue Treibermutationen und krankheitsrelevante Signalwege zu finden. In einer ersten Analyse des genannten Datensatzes konnten 63 verschiedene Treibermutationen nachgewiesen werden und gezeigt werden, dass sekundäre Mutationen von dem primären Ereignis abhängig sind. Wichtige durch diese Treibermutationen betroffene Signalwege sind folgende: MEK/ERK (50 %), NF-kappaB (NF-κB; 14 %), epigenetische Regulatoren (18 %), die RNA-Prozessierung (18 %) und der G1/S Zellzyklusübergang (5 %) (Walker *et al.*, 2018). Gemäß der TARGET Datenbank des Broad Institutes ist für 27 % (17 von 63) nachgewiesener Treibermutationen ein potentiell wirksames Medikament verfügbar (Broad Institute, 2015). Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass für den größten Teil der Treibermutationen noch kein zielgerichtetes Medikament verfügbar und somit eine vorherige Evaluation im Labor notwendig ist. In einer systematischen Analyse von 33 Veröffentlichungen, welche Sequenzierungsdaten (WGS, WES, NGS) von MM bis einschließlich 2015 enthalten, kommen Weaver und Tariman (2017) ebenfalls zu der Schlussfolgerung, dass noch Hunderte neu identifizierter Gene auf ihre Nützlichkeit in der Behandlung des MM überprüft werden müssen. Zudem erhofft man sich durch die genetische Analyse eine Möglichkeit, prognostische Marker zu finden. Walker *et al.* (2018) konnten in ihrer Auswertung aber nur wenige Zusammenhänge zwischen Mutation und dem OS finden. Als Beispiel für wichtige Läsionen mit prognostischer

Assoziation sei hier das Gen *TP53* genannt. Da die Aussagekraft einzelner Mutationen begrenzt ist, versucht man das MM anhand molekulargenetischer Daten in prognostische und therapeutische Gruppen einzuordnen. Die Klassifikation nach Translokation und Cyclin D (Bergsagel und Kuehl, 2005) und die University of Arkansas for Medical Sciences (UAMS)-Klassifikation (Zhan *et al.*, 2006) sind aktuell die beiden bedeutendsten molekulargenetischen Klassifikationssysteme. Von vielen anderen Forschern wurde ebenfalls versucht auf der Basis von Genexpressionsanalysen Klassifikationen zu erstellen oder die beiden oben genannten zu modifizieren. Es wurde zum Beispiel die EMC-92 Gensignatur, welche ein reduziertes OS vorhersagt (Kuiper *et al.*, 2012), und eine Klassifikation aufgrund der genetischen Ähnlichkeit zu bestimmten Zeitpunkten der B-Zell-Entwicklungen entwickelt (Bødker *et al.*, 2018). Von Broyl *et al.* (2010) konnten zusätzlich zu den Clustern der UAMS Klassifikation 3 weitere Cluster gefunden werden. Auch Walker *et al.* (2018) konnten 9 verschiedene neue Kopienzahlvariation (CNV)–Cluster identifizieren. Bis jetzt konnte sich, abgesehen von Hochrisikoaberrationen wie del(17p), t(4;14) und t(14;16), noch keine dieser Klassifikationen in der Klinik durchsetzen. Vermutlich ist dies nur noch eine Frage der Zeit. Zum Beispiel kann ein erhöhter GEP70-Risiko-Score bereits jetzt zu 67 % prognostizieren, ob in den nächsten 2 Jahren eine Progression von MGUS in ein MM stattfindet (Dhodapkar *et al.*, 2014).

1.1.7.4 Zeitliche und intraindividuelle Heterogenität

Neben dieser genetischen Heterogenität zwischen den MM von verschiedenen Patienten muss bei Forschungsbemühungen zudem in Betracht gezogen werden, dass bei dieser Erkrankung darüber hinaus eine interklonale Heterogenität im MM eines Patienten (intraindividuelle Heterogenität) besteht. Es konnte gezeigt werden, dass in untersuchten Proben mindestens eine weitere Subpopulation neben der dominanten Population besteht (Walker *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 2012). Es besteht außerdem sowohl eine zeitliche als auch räumliche genetische Heterogenität des MM eines Patienten. In mehr als 75 % der Fälle konnte gezeigt werden, dass sich die Biopsate aus verschiedenen Läsionen eines Patienten genetisch unterscheiden. Es wird angenommen, dass es in der Frühphase der Erkrankung zu einer Metastasierung kommt und anschließend zu einer regionalen genetischen Evolution der einzelnen Läsionen im weiteren Verlauf (Rasche *et al.*, 2017). Im zeitlichen Krankheitsverlauf verändert sich das MM dann auf der einen Seite durch weitere spontane Mutationen und Umgebungsfaktoren und auf der anderen Seite durch Selektionsdruck der verwendeten Therapie (Chesi und Bergsagel, 2011; Egan *et al.*, 2012).

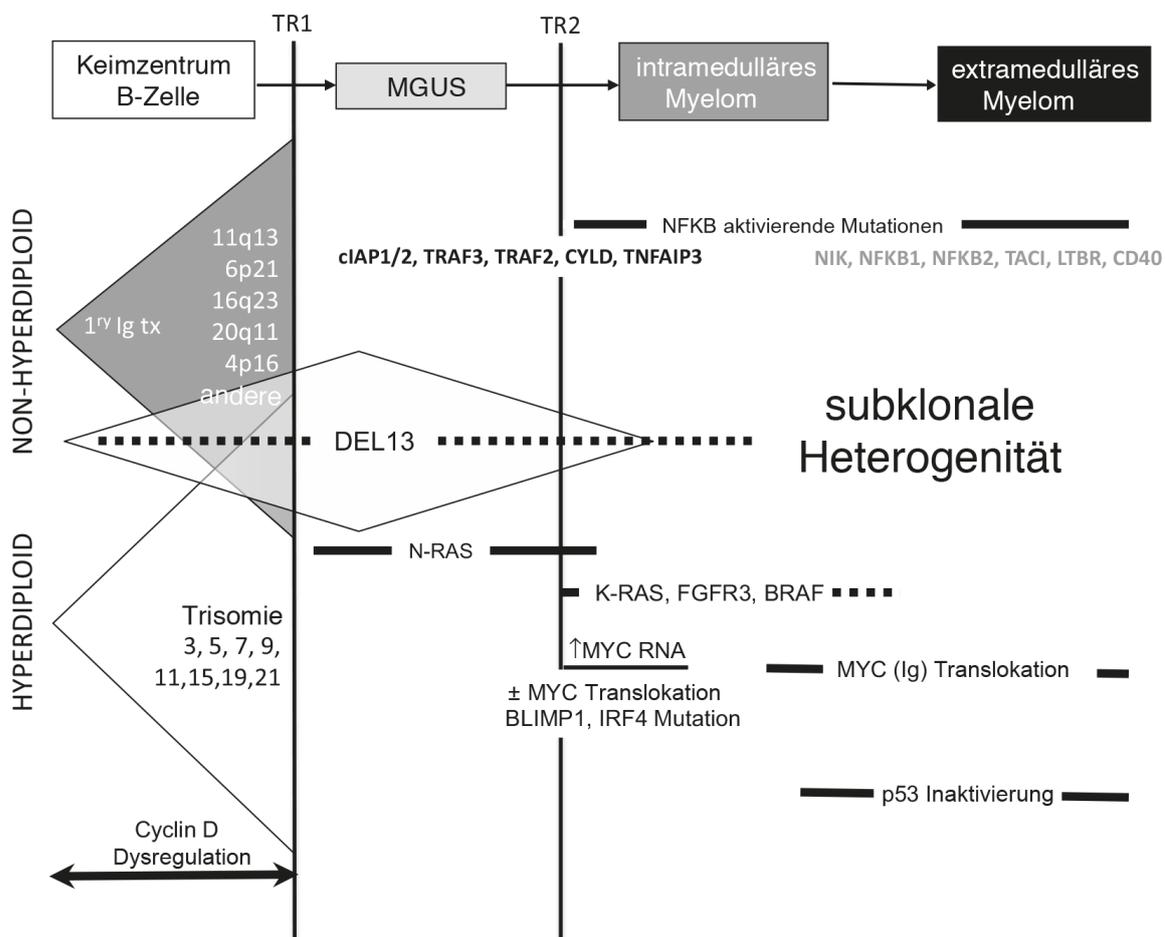


Abbildung 7: Modell für die molekulare Pathogenese von MGUS und MM (Chesi und Bergsagel, 2015)

Der anfängliche Übergang (TR1) zu einer nachweisbaren prämaligen Erkrankung (MGUS) wird durch eine genetische Veränderung aus den zwei Kategorien der primären Ereignisse (IgH Translokationen im Vergleich zu Trisomien) verursacht. Genetisch gesehen findet hier meistens keine Überlappung statt, doch führen beide Kategorien direkt oder indirekt zu einer Cyclin D Dysregulation. Der Übergang (TR2) von MGUS zu MM ist mit einer erhöhten MYC-Expression und manchmal mit aktivierenden Mutationen der K-RAS- oder Chromosom-13-Deletion verbunden. Es werden frühe und späte Progressionsereignisse der molekularen Pathogenese des MM gezeigt. Übersetzte Abbildung mit freundlicher Genehmigung von International Journal of Laboratory Hematology

Das Vorliegen dieser genetisch verschiedenen Subklone kann die schnelle Anpassung auf Medikamente durch Selektionsdruck erklären und sollte deshalb in zukünftigen Therapieregimen beachtet werden. Gerade bei Patienten mit einem diagnostizierten MM in der Hochrisikogruppe konnte gezeigt werden, dass hier auch die subklonale Heterogenität hoch ist (Chapman *et al.*, 2011; Rajkumar *et al.*, 2014; Steinbrunn *et al.*, 2011). Hierdurch würde der Einsatz verschiedener Medikamente nötig werden, um alle Subpopulationen gleichermaßen therapeutisch angreifen zu können. Diese intratumorale und intraindividuelle Heterogenität macht es sehr wahrscheinlich, dass das Multiple Myelom in einem Patienten im zeitlichen Verlauf keiner linearen, sondern vielmehr einer darwinistischen, verzweigten Evolution entspricht. Unter dieser Annahme treten Mutationen im MM mehr oder wenig zufällig auf und durch die darwinistische Selektion der

„fittesten“ Subklone kommt es zur weiteren Krankheitsentwicklung mit Progress, Resistenzen gegen Medikamente und Rezidiven (Anderson *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse sind aus therapeutischer Sicht wichtig, um in der Klinik Risikogruppen zu identifizieren, welche eine aggressive Therapie benötigen, oder aber um Patienten bestimmte Therapien zu ersparen, die für sie nur wenig oder keine Wirkungen haben würden. Für die Forschung nach weiteren medikamentösen Therapien sind diese Erkenntnisse ebenfalls von großer Relevanz, um betroffene Signalwege zu identifizieren und Angriffspunkte auswählen zu können. Die aktuellen verfügbaren Medikamente setzen bisher nur in einem kleinen Teil der bekannten betroffenen Signalwege an oder deren Mechanismus ist noch nicht genau bekannt (Ocio *et al.*, 2014). Diese genomweiten Studien von primärem Material aus Tumoren von Patienten zeigen, dass es sich um eine sehr heterogene genetische Erkrankung handelt und viele neue Angriffspunkte identifiziert werden konnten, welche nun möglichst rasch im Labor auf ihren potentiellen Nutzen überprüft werden müssen.

Diese Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass es sich beim Multiplen Myelom um eine, wie zuvor bereits ausgeführt, genetisch sehr heterogene Erkrankung handelt, bei der oft mehrere Signalwege intra- beziehungsweise interklonal gleichzeitig betroffen sind. Für einzelne Wirkstoffe wie Kinase-, Deacetylase- oder HSP-90-Inhibitoren, die präklinisch vielversprechende Ergebnisse zeigten, konnten in klinischen Studien allerdings leider bisher nur moderate Erfolge erzielt werden (Abramson, 2016; Chesi *et al.*, 2012; Miguel *et al.*, 2013). Nach der Meinung unserer Clinical Research Unit 216 und auch anderer Forschungsgruppen ist es daher nötig, mehrere Signalmoleküle – zumeist in unterschiedlichen Signalwegen – durch eine Kombinationstherapie gleichzeitig auszuschalten (Ocio *et al.*, 2014; Weston-Bell *et al.*, 2012).

Es stellt eine große Hürde dar, wirksame Kombinationen zu identifizieren und daher müssen diese präklinisch effizient und ausgiebig getestet werden. Daraus resultieren spezielle Anforderungen an die im Labor verwendeten molekulargenetischen Methoden.

1.2 Aktuelle Knock-down- und Transfektionsmethoden

Zur In-vitro-Untersuchung von möglichen therapeutischen Ansatzpunkten werden aktuell pharmakologische Substanzen und verschiedene kommerziell erhältliche Systeme zum Gen-Knock-down eingesetzt, welche auch mit verschiedenen Arten des Gen-Knock-downs beziehungsweise Gen-Knock-outs (Heidenreich und Zhang, 2016) und Formen der Transfektion arbeiten (Kim und Eberwine, 2010). Bei der Analyse der gebräuchlichen Systeme zeigte sich, dass diese für die Anwendung in Zellen des Multiplen Myeloms mit dem Ziel, neue Angriffspunkte für die medikamentöse Therapie zu finden, nicht oder nur mit Einschränkungen einsetzbar sind.

1.2.1 Pharmakologische Substanzen

Typischerweise werden pharmakologische Substanzen für die therapeutische Signalwegblockade *in vivo* verwendet. Häufig finden diese auch Anwendung in der Grundlagenforschung bei der Durchführung von *in vitro* Experimenten. Hierbei wird zwischen den beiden Gruppen der Small Molecules und der Biologicals unterschieden.

1.2.1.1 Small Molecules

Die zahlenmäßig größte Gruppe ist die der niedermolekularen Verbindungen (Small Molecules), die durch ihre nur geringe molekulare Größe von kleiner $800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ durch die Zellmembran in Zellen eindringen und dort ihre Wirkung entfalten können. Der klassische Mechanismus ist hier das Andocken an eine hydrophobe Tasche der Zielstruktur und eine hieraus resultierende Blockierung katalytischer Aktivität. Proteine ohne solche Bindungsstelle und ohne enzymatische Aktivität galten lange als pharmakologisch nicht beeinflussbar. Unter dieser Annahme ging man davon aus, dass nur 10–15 % der menschlichen Proteine medikamentös angreifbar sind. Gleichzeitig muss man in Betracht ziehen, dass auch angenommen wird, dass nur 10–15 % aller Proteine krankheitsrelevant sind. Bedauerlicherweise besteht aber keine Korrelation zwischen angreifbaren und krankheitsrelevanten Proteinen. Aktuell gibt es ungefähr für 2 % der menschlichen Proteine zugelassene Medikamente (Lo, 2011). In den letzten Jahren wurden Ansätze entwickelt, die dieses Paradigma auflockern und es ermöglichen, Proteine zu beeinflussen, welche bislang als nicht medikamentös angreifbar galten. Eine Methode nutzt hier die Möglichkeit, Protein zu Protein-Interaktionen zu inhibieren (Arkin und Whitty, 2009). Andere Forschungsgruppen konnten mit allosterischer Inhibition Fortschritte erzielen. Zudem wurden die Techniken verfeinert, mit denen man für katalytische Zentren Inhibitoren entwickeln kann. So wurde es möglich für bestimmte Angriffspunkte Small Molecules zu entwickeln, bei denen die Bemühungen jahrelang vergeblich waren (Lazo und Sharlow, 2016). Sogar für das in 30 % aller menschlichen Tumoren mutierte RAS, das als nicht medikamentös angreifbar gilt, und für das lange Zeit vergeblich versucht wurde wirksame Substanzen zu finden (Cox *et al.*, 2014), konnten mittlerweile erste Fortschritte erzielt werden (Welsch *et al.*, 2017). Diese neuen Erkenntnisse stellen womöglich einen Durchbruch in der Entwicklung neuer Medikamente dar, konnten aber zum jetzigen Stand die absolute Zahl der medikamentös beeinflussbaren Proteine im Menschen nur sehr geringfügig verändern. Da es nun möglich scheint, Medikamente für sogenannte „undruggable“ Proteine zu entwickeln, sollten nun im Labor Knock-down Versuche nicht nur mit dem Ziel der Identifizierung relevanter Signalpfade durchgeführt werden, sondern auch mit Blick auf eine zukünftige Eignung als medikamentöser Angriffspunkt. Aufgrund dieser komplizierten

Ausgangslage und der extrem aufwendigen Entwicklung und Zulassung von Medikamenten liegt für Lazo und Sharlow (2016) eine große Verantwortung in der Entscheidung, für welchen Angriffspunkt als nächstes versucht wird eine pharmakologisch wirksame Substanz zu entwickeln. Dies stützt die These, dass es äußerst sinnvoll ist, potentielle Angriffspunkte für Medikamente vorher auf effiziente Weise zu überprüfen und eine fundierte Vorselektion durchzuführen.

1.2.1.2 Biologicals

Die andere Gruppe der pharmakologischen Substanzen stellen die Biologicals dar, zu denen Peptide, Antikörper, modifizierte Nukleinsäuren und Impfstoffe zählen. Diese können aufgrund ihrer molekularen Größe nicht in die Zelle eintreten und somit nur an extrazelluläre Ziele binden. Im näheren Sinne versteht man unter Biologicals heutzutage rekombinant hergestellte Proteine wie monoklonale Antikörper, Enzym-Modulatoren und Rezeptor-Modulatoren. Seit der ersten Zulassung eines monoklonalen Antikörpers 1986 nimmt die Anzahl neuer rekombinant hergestellter Proteine (NMEs) stetig zu (Rodgers und Chou, 2016). Mit 91 Zulassungen im Vergleich zu 777 niedermolekularen Verbindungen im Zeitraum von 1982 bis 2013 ist der Anteil mit in etwa 8 % an neuen medikamentösen Therapien dennoch recht klein (Kinch, 2015). Ebenso wie die niedermolekularen Verbindungen können die Biologicals als Ergänzung zur Erforschung von Signalnetzwerken herangezogen werden, dies wird aber dadurch limitiert, dass sie nur extrazelluläre Moleküle angreifen können. Da es sich bei der Entwicklung der Biologicals, genau wie für die niedermolekularen Wirkstoffe, um einen sehr komplexen, kosten- und zeitintensiven Vorgang handelt, kann das in dieser Arbeit entwickelte Knock-down-System ebenfalls bei der notwendigen Vorselektion helfen.

Da sowohl Small Molecules als auch Biologicals aufwendig individuell für jede molekulare Zielstruktur entwickelt werden müssen, ist ihre gezielte Anwendung in der Forschung nach neuen medikamentösen Zielen in der Regel auf schon bekannte Substanzen beschränkt. Die pharmakologische Signalwegsblockade dient daher häufig als Kombinationspartner bei der Suche nach neuen Ansatzpunkten. Auf diese Weise können zum Beispiel komplette Signalwege herunterreguliert beziehungsweise ausgeschaltet und der Zusatznutzen eines neuen Knock-downs zu etablierten Substanzen beurteilt werden. Zusätzlich muss beachtet werden, dass zwar die Qualität dieser pharmakologischen Signalwegsblockade häufig sehr gut ist, doch leider kann oft nicht ausgeschlossen werden, dass unerwartete Wechselwirkungen mit anderen Zellstrukturen auftreten (Hellerstein, 2008).

1.2.2 RNA-Interferenz (RNAi) vermittelter Knock-down

Als weitverbreitete Alternative zur pharmakologischen Signalwegblockade in der Grundlagenforschung und zunehmend auch in therapeutischen Anwendung existiert die RNA-Interferenz (RNAi) als vielseitiges und gut etabliertes genetisches Werkzeug zum Knock-down von Genen jeglicher Art in Eukaryoten. Die RNAi durch doppelsträngige RNA (dsRNA) wurde 1998 von Fire und Mello erstmals beschrieben, sie erhielten hierfür 2006 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin. Durch die Entdeckung dieser natürlich vorkommenden Regulationsform durch Interaktion von komplementärer RNA mit der messenger RNA (mRNA) in Eukaryoten, konnten Methoden entwickelt werden, um gezielt eine bestimmte Genexpression temporär oder dauerhaft in eukaryotischen Zellen zu vermindern oder sogar weitestgehend auszuschalten. Die beiden hauptsächlich eingesetzten Formen dsRNA sind hier small interfering RNA (siRNA) und short hairpin RNA (shRNA). Bei siRNA handelt es sich schon um die „aktive“ dsRNA. Dies bedeutet, dass nach Transfektion die Wirkung sofort nach Aufspaltung in Einzelstränge im Zytoplasma beginnt. Mit einer Basenpaarlänge von 20 – 25 ist diese Form sehr klein und kann gut in die Zelle eindringen. Die siRNAs müssen in der Regel als kommerzielles Produkt erworben werden. Im Kontrast dazu kann zur intrazellulären Produktion der shRNA-Form eine DNA-Matrize transient oder stabil in Zielzellen transfiziert werden. Diese kann als Vektor einfach synthetisiert, vervielfältigt und weitergegeben werden, wodurch nur geringe Kosten entstehen (Mocellin und Provenzano, 2004). Die Erstellung eines Vektors ist somit mit etwas mehr Aufwand verbunden als ein Erwerb der sofort nutzbaren kommerziellen siRNA. Die Transfektionseffizienz ist aufgrund des größeren molekularen Umfangs zudem teils deutlich geringer. Nach erfolgreicher Transfektion des Vektors wird die shRNA-Expressionskassette dann im Zellkern durch die Polymerase II oder III transkribiert. Durch weitere Prozessierung durch die Enzyme Drosha und Dicer wird die shRNA in die entsprechende siRNA umgewandelt. Daraufhin folgt die mit dem siRNA-Mechanismus gemeinsame Endstrecke. Die komplementären Basenpaare interferieren mit der mRNA durch Spaltung der mRNA oder Inhibition der Translation. Dadurch wird die Neusynthese des kodierten Proteins durch die Ribosomen mehr oder weniger effizient unterbunden (Novina und Sharp, 2004; Wang *et al.*, 2011). Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass die Verwendung von siRNA nur transient wirkt, da sie nicht selber von der Zelle hergestellt wird, shRNA hingegen kann bei stabiler Integration der kodierenden Matrize ins Genom auch dauerhaft wirken, da die Zelle diese dann konstitutiv synthetisiert. In der Arzneimittelforschung wird Hochdurchsatz-Screening mittels siRNA und shRNA durchgeführt (Gunsalus und Piano, 2005) und es gibt Bemühungen diese auch therapeutisch zu nutzen (Lazo und Sharlow, 2016).

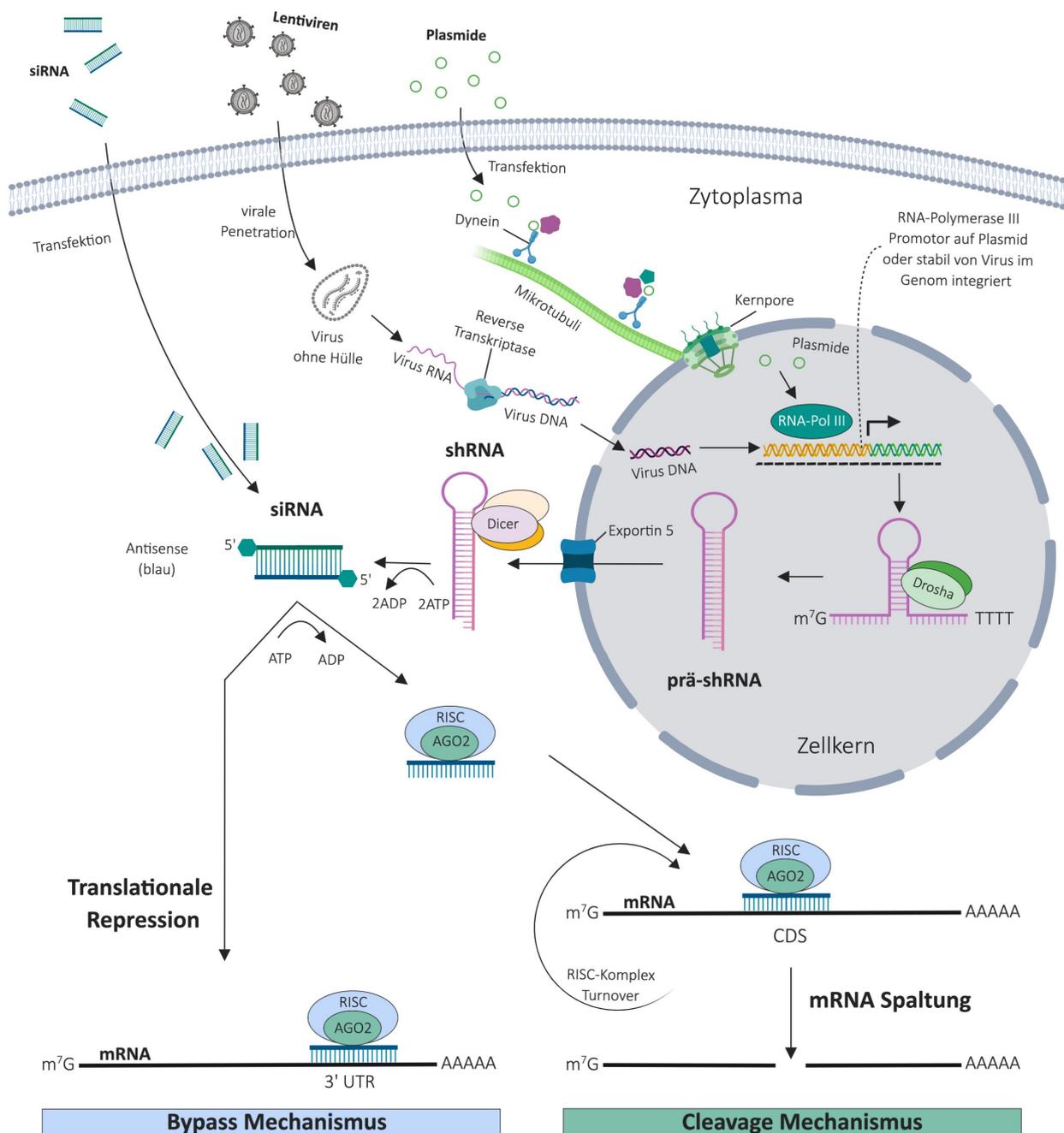


Abbildung 8: Anwendung von RNA-Interferenz (Brummelkamp et al., 2002; Cojocari, 2010)

Nach Einbringen eines Plasmides (transient) oder lentiviralen Vektors (stabil) in den Zellkern wird die shRNA durch die RNA-Polymerase II (oder mit anderen Promotoren auch RNA-Polymerase III) transkribiert. Das RNA-Transkript wird vom Enzym Drosha zu prä-shRNA prozessiert und anschließend in das Zytoplasma exportiert. Die nun fertige shRNA ist eine doppelsträngige RNA, die eine Haarnadelstruktur bildet. Die shRNA wird anschließend vom Enzym Dicer zu siRNA umgebaut. Synthetisierte siRNA kann auch direkt durch Transfektion in die Zelle eingebracht werden. Der Sinnstrang der siRNA wird durch RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) abgebaut. Der Gegensinnstrang bindet zusammen mit dem RISC mit seiner Komplementärsequenz an eine mRNA (Bypass Mechanismus). Bei nur unvollständiger Übereinstimmung der Komplementärsequenzen verhindert der RISC die Translation der mRNA (Bypass Mechanismus). Bei vollständiger Komplementarität schneidet der RISC die mRNA (Cleavage Mechanismus). Beides führt zu einer Verhinderung der Translation des Gens und somit zu einem Knock-down.

Diese Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com

1.2.3 Dauerhafte Transfektion mit dem Sleeping Beauty Transposon System

1.2.3.1 Transposons

Schon in den 1940er Jahren machte die Zytogenetikerin Barbara McClintock die Entdeckung, dass im Maisgenom Gene ihre Position auf den Chromosomen wechseln (McClintock, 1946; McClintock, 1950). Bis sich aber ihre Beobachtung in die allgemeine Lehrmeinung von beweglicher DNA durchsetzte, dauerte es noch bis in die 70er Jahre. Für diese Entdeckung der Transposons wurde sie 1983 mit dem Nobelpreis in Physiologie und Medizin ausgezeichnet. Der evolutionäre Nutzen der Transposons wurde zunächst gering eingeschätzt (Ohno, 1972; Orgel *et al.*, 1980) und erst Ende des 20. Jahrhunderts geriet der Einfluss der Transposition auf die Entwicklung des Genoms des Wirtsorganismus in den Fokus. Durch die Entschlüsselung des menschlichen Genoms durch das Human Genome Project konnte festgestellt werden, dass ungefähr 45 % des humanen Genoms aus Transposons besteht (Lander *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001). Hierbei handelt es sich zu über 90 % um Retrotransposons, welche ähnlich wie Retroviren zuerst in RNA transkribiert werden und dann über Reverse-Transkription wieder als DNA ins Genom integriert werden (Dombroski *et al.*, 1994). Bei den restlichen 10 % handelt es sich um DNA-Transposons, welche keinen Zwischenschritt über RNA benötigen. Eine neue statistische Analyse konnte mit dem Ergebnis, dass sogar ungefähr 70 % des menschlichen Genoms von Transposons abstammen (de Koning *et al.*, 2011), noch einmal die Relevanz von Transposons in der Evolution unterstreichen. Zudem kam die Idee auf, Transposons als molekulargenetisches Werkzeug zu nutzen. Hier unterscheidet man zwei Klassen: die erste mit einem „copy & paste“- Mechanismus, wie man es ähnlich auch in lentiviralen Systemen findet, und die zweite mit einem „cut & paste“- Mechanismus. Radice *et al.* konnten 1994 Transposons erstmals in Vertebraten nachweisen. Doch zunächst konnte kein funktionsfähiges Klasse II Transposon aus Vertebraten isoliert werden, da sie durch Mutationen inaktiviert sind. Im Jahr 1996 gelang es, das aktive Tol2 Transposon aus dem japanischen Reifisch zu isolieren (Koga *et al.*, 1996) und ein Jahr später das aktive Transposon „Sleeping Beauty“ (SB) aus phylogenetischen Daten von Lachsfischen zu rekonstruieren (Ivics *et al.*, 1997). Als weiteres Transposon-System in Vertebraten steht piggyBac (PB) aus dem Nachtfalter *Trichoplusia ni* zur Verfügung (Ding *et al.*, 2005). Seit 2008 wird auch von verschiedenen Forschungsgruppen die Verwendung von Transposons als Gentherapie erprobt (Aronovich *et al.*, 2011; Hackett *et al.*, 2010; Hudecek *et al.*, 2017; Izsvak *et al.*, 2010; Nagy *et al.*, 2015; Tipanee *et al.*, 2017; Vink *et al.*, 2009).

1.2.3.2 Sleeping Beauty Transposon System (SBTS)

Transposasen integrieren natürlicherweise die sie codierende DNA-Sequenz inklusive repetitiver Sequenzen in das Genom. Um sich den „cut & paste“-Mechanismus molekularbiologisch zu Nutze zu machen, ist im Sleeping Beauty Transposon System die Expressionskassette für die Transposase auf einem separaten Vektor und das zu integrierende Template auf einem zweiten (Donor) Vektor untergebracht. Der erste Vektor exprimiert die hyperaktive SB100X Transposase mit einem starken Cytomegalievirus (CMV) - Promotor in eukaryotischen Zellen. Bei der hyperaktiven SB100X Transposase handelt es sich um eine gentechnisch modifizierte Version der Sleeping Beauty Transpose, welche eine circa 100-fach erhöhte Aktivität gegenüber der ursprünglichen SB10 Transposase besitzt (Mates *et al.*, 2009). Im Template/Donor Vektor sind die beiden Seiten der repetitiven Sequenzen (IR/DR), welche die Transposase zum Schneiden erkennt, vorhanden. Hier ist das Gen der Transposase zwischen den IR/DR nicht vorhanden und stattdessen kann hier das gewählte Template inkloniert werden. Sinnvollerweise ist hier meist bereits eine Kassette vorhanden, mit der eine Antibiotikaresistenz vermittelt wird, um erfolgreich transfizierte Zellen selektionieren zu können. Mit dieser Methode können Vektoren mit Inserts von einer Größe bis zu 10kb generiert und transfiziert werden (Izsvak *et al.*, 2000). Beim Sleeping Beauty Transposon System handelt es sich um ein noch relativ neues Verfahren, um dauerhaft DNA in das Erbgut von Zellen zu integrieren. In Vergleich zu anderen erhältlichen Systemen hat es verschiedene Vorteile. Im Gegensatz zur Einzelklonselektion ist die Generierung einer polyklonalen transponierten Zellkultur mit einer Verringerung des Zeitaufwandes von mindestens drei Monaten auf circa zwei Wochen möglich. Zudem wird darüber hinaus eine genetische Heterogenität der Zellkultur auch in weiteren Versuchen erhalten. Sollte dies nicht erwünscht sein, ist natürlich auch die rein klonale Aufzucht aus einer isolierten transponierten Zielzelle möglich. Der Vorteil im Vergleich zu lentiviralen Systemen liegt insbesondere im geringeren Zeitaufwand. Der aufwendige Schritt der Virusproduktion entfällt und wird durch eine einfache Vektorklonierung mit anschließender Vervielfältigung in *Escherichia coli* (*E. coli*) ersetzt. Die Virusproduktion und -verwendung setzt eine höhere biologische Sicherheitsstufe des Labors voraus, was sowohl höhere bau- als auch genehmigungstechnische Hürden bedeutet, als auch einen größeren Aufwand bei der Versuchsdurchführung und der Abfallbeseitigung nach sich zieht. Die Transfektionsraten für Vektorkomponenten wie Sleeping Beauty können bei Myelomzellen nicht diejenigen von lentiviralen Systemen erreichen, sind aber für die Anwendung in der Zellkultur – insbesondere nach Selektion – völlig ausreichend. Bei In-vivo-Experimenten haben lentivirale Systeme den Vorteil einer guten Penetration in die Zelle. Unerwünschterweise integrieren diese

ihre DNA-Nutzlast jedoch bevorzugt in Exons, was die Gefahr von Kollateralschäden erhöht (Nagy *et al.*, 2015). Sleeping Beauty hat in vivo durch seine fast zufällige Integration ins Genom (70 % in Introns) den Vorteil weniger Integrationsereignisse in Exons zu produzieren (Mates *et al.*, 2009), und somit ein niedrigeres Risiko für die Aktivierung von Onkogenen zu besitzen (Hackett *et al.*, 2010). Daher wurden bereits Hybridsysteme entwickelt, welche Lentiviren zum Einbringen in die Zelle nutzen und Sleeping Beauty zur stabilen Integration ins Genom verwenden (Vink *et al.*, 2009). Auch in der Ex-vivo-Anwendung zur Modifikation von T-Zellen ist Sleeping Beauty eine kosteneffektive, zeitsparende und flexible Methode im Vergleich zu Lentiviren (Field *et al.*, 2013). Auf Basis von Sleeping Beauty und anderen Transposons existieren bereits einfache nicht-induzierbare shRNA-Knock-down-Systeme (Chen *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2017; Heggestad *et al.*, 2004; Miskey *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2014).

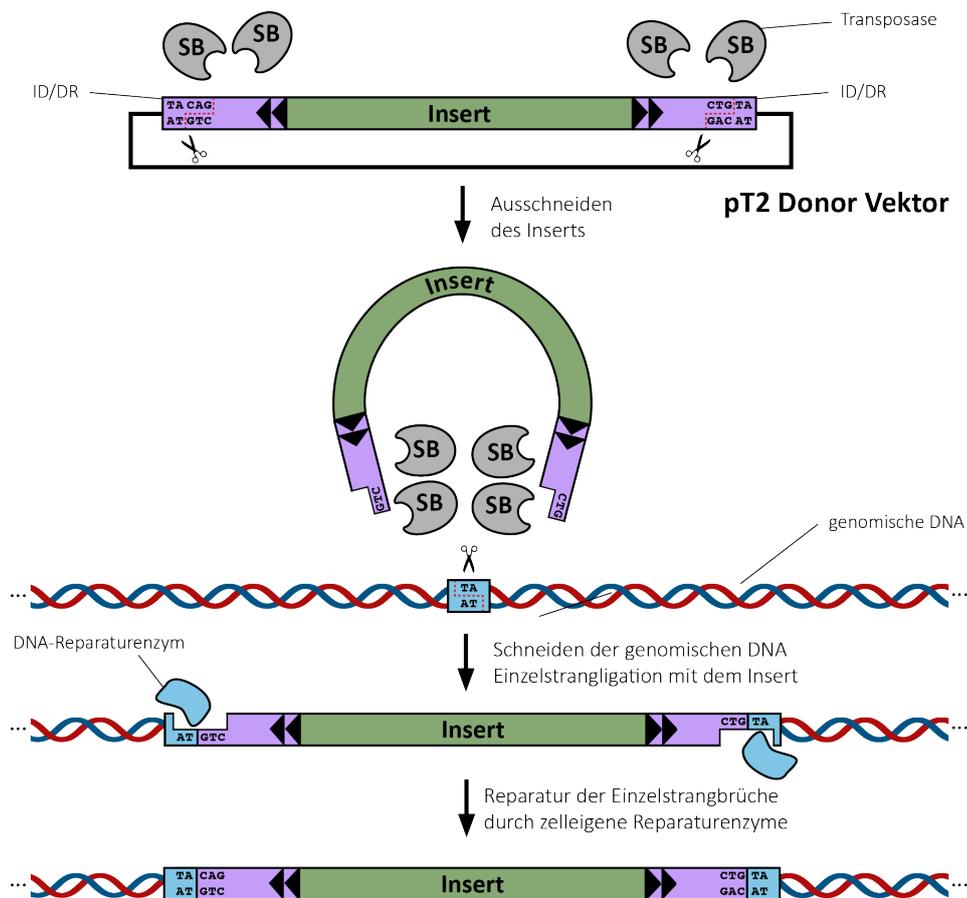


Abbildung 9: Mechanismus des Sleeping Beauty Transposon Systems (Izsvak *et al.*, 2000)

Das Transposon beziehungsweise das Insert (bei Nutzung als genetisches Werkzeug) wird auf beiden Seiten durch eine spiegelbildliche IR/DR („inverted repeats/direct repeats“) Struktur (circa gesamt 230 Basenpaare (bp); IR: 200 – 250 bp; DR: 15 – 20 bp) flankiert, welche von der Sleeping Beauty Transposase erkannt und ausgeschnitten wird. In diesem Fall ist das ein dafür geschaffener Vektor pT2, welcher im Insert bereits einen Promotor mit der gewünschten Resistenz mit einfügt. Bei der Anlagerung an die DNA formt die Sleeping Beauty Transposase ein Tetramer, welches vermutlich zur Stabilisierung beiträgt (Izsvak *et al.*, 2002). Anschließend wird das ausgeschnittene DNA-Molekül in ein anderes DNA-Molekül (zum Beispiel das Genom einer transfizierten Zelle) mit einer TA-Sequenz eingefügt.

1.2.4 Induzierbarkeit mit Tetrazyklin-kontrollierter Transkriptionsaktivierung (Tet-System)

Bei Knock-downs verbleibt im Gegensatz zu kompletten Knock-outs eine Restaktivität des Genprodukts. Das hat den Vorteil, dass, falls eine solche Restaktivität für das Überleben der Zellen essentiell ist, diese überleben können und weitere Versuche überhaupt möglich werden (Xue *et al.*, 2007). Dies imitiert somit eher die Wirkung von Medikamenten *in vivo*. Diese können häufig ebenfalls keine komplette Signalwegblockade vermitteln, da die Wirkstoffkonzentration aufgrund von Nebenwirkungen nicht beliebig hoch gewählt werden kann. Vollständige Gen-Knock-outs, zum Beispiel mit der CRISPR/Cas-Methode, sind insbesondere in hyperploiden Zellen schwierig zu erzielen, da alle Genkopien mutiert werden müssen. Dieser Zustand liegt allerdings, wie bereits dargelegt (siehe **1.1.7.1**), häufig beim MM vor. Auch in anderen Krebszelllinien liegen häufig vier oder mehr Chromosomenkopien vor (Paulsson *et al.*, 2013; Rondon-Lagos *et al.*, 2014). Durch die notwendige Suche nach homozygot betroffenen Klonen und der anschließenden Aufzucht größerer Zellzahlen ist ein Knock-out sehr zeitaufwendig im Vergleich zu Knock-downs mit RNAi. Durch diese Einzelklonselektion kann zudem keine ursprünglich etwaig vorhandene heterogene Zellpopulation abgebildet werden.

Die Induzierbarkeit von Knock-downs wird folglich aus verschiedenen Gründen benötigt. Manche Gene sind für das Überleben der zu untersuchenden Zellen essentiell, sodass ein induzierbarer Knock-down die einzige Möglichkeit ist, die Wirkung ohne Störeinflüsse zu beurteilen. Störfaktoren sind zum einen die Transfektion, zum Beispiel durch Elektroporation oder auch die Selektion mit Antibiotika. Hierdurch wird Zellstress verursacht, welcher Messwerte und Ergebnisse verfälscht. Diesen Nachteil besitzen sowohl nicht-induzierbare als auch transiente Knock-down-Methoden. Erst nach erfolgreicher Selektion kann durch Induktion mit einer für die Zelle nicht toxischen Substanz die biologische und molekulare Wirkung des Knock-downs beurteilt werden. Darüber hinaus besteht auf diese Weise auch die Möglichkeit effizient eine große Zellzahl zu generieren, um genügend Material für verschiedene Anwendungen, wie zum Beispiel Analysen von Western Blots, zu erhalten. Als weiterer Punkt hat sich die Reversibilität eines Knock-downs als hilfreich zur Beurteilung der Dynamik im Zellmodell erwiesen (Xue *et al.*, 2007).

Die Tetrazyklin-kontrollierte Transkriptionsaktivierung (Tet-System) wird in Eukaryoten am häufigsten verwendet, um eine induzierbare Expression zu erhalten. Die notwendigen Komponenten wurden aus *E. coli* isoliert. In *E. coli* und anderen Enterobakterien wird bei Exposition gegenüber Tetrazyklinen eine induzierte Resistenz durch die Expression des TetA vermittelt, welches als Membranprotein das Tetrazyklin aus der Zelle pumpt. Das Tetrazyklin

bindet an das Tet Repressor Protein (TetR oder tTR), wodurch die Repression der Expression des TetA-Proteins aufgehoben wird (Postle *et al.*, 1984). Dieses System hat gegenüber anderen induzierbaren Genexpressionssystemen verschiedene Vorteile. Dazu zählt zum einen die schon angesprochene große Verbreitung in der wissenschaftlichen Gemeinschaft und die mittlerweile gesammelte Erfahrung in der Anwendung. Zum anderen ist die Induktion im Gegensatz zum Cre- und FRT-System reversibel. Das Estrogenrezeptor (ER)-System ist ebenfalls reversibel induzierbar, aber besitzt den Nachteil, dass es keine ausreichende Suppression der Expression bietet (Sohal *et al.*, 2001).

Man unterscheidet zwei Hauptgruppen des Tet-Systems, die beide von Gossen *et al.* entwickelt wurden. Das zuerst beschriebene Tet-Off-System mit dem Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator (tTA) stellt bei Zugabe eines Tetrazyklins die Expression ein (Gossen und Bujard, 1992). Dieses wird eingesetzt, wenn das Zielgen die meiste Zeit exprimiert und nur für eine kurze Zeit abgeschaltet werden soll. Für den spiegelbildlichen Anwendungsfall wurde ebenfalls von Gossen *et al.* (1995) das Tet-On-System entwickelt, welches durch die Verwendung eines reversen Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivators (rtTA) erst bei Zugabe eines Tetrazyklins aktiviert wird. Von allen Tetrazyklinen kommt hierbei Doxycyclin am häufigsten zum Einsatz, da es mit hoher Affinität an tTA und rtTA bindet, eine gute Gewebeverteilung aufweist, für eukaryotische Zellen eine nur geringe Toxizität besitzt, eine bekannte Halbwertszeit von 24 Stunden hat und sehr kostengünstig ist. Um eine versehentliche Aktivierung zu vermeiden, ist es wichtig darauf zu achten, dass das für die Zellkultur verwendete Medium keine Tetrazykline enthält. Ist eine noch tiefere Suppression notwendig als bei den normalerweise verwendeten Tet-Systemen zu erreichen ist, kann ein Fusionsprotein aus TetR und der Krüppel-associated Box (KRAB) exprimiert werden (Margolin *et al.*, 1994). Durch das Fusionsprotein wird die Bildung von Heterochromatin im Bereich von etwa 3 kb induziert und die Transkription durch RNA-Polymerasen wirkungsvoll unterbunden. Auf diese Weise kommt es zu keiner ungewollten basalen Expression (Kappel *et al.*, 2007). Darüber hinaus existiert das T-REx-System, welches funktionell gesehen dem Tet-On-System entspricht, da es bei der Zugabe von Tetrazyklinen zur Transkription führt. Im Gegensatz zum Tet-On-System wird aber das ursprüngliche TetR-Protein allein verwendet. Dieses blockiert durch die Bindung an zwei TetO-Sequenzen hinter der TATA-Box ohne Zugabe von Tetrazyklinen die Transkription. Bei Zugabe von Tetrazyklinen geht die Bindung verloren und die Transkription startet (Yao *et al.*, 1998). Dies entspricht somit eher der physiologischen Wirkungsweise in Bakterien (Hillen und Berens, 1994). So vermeidet das T-REx-System durch den Verzicht auf den viralen Transkriptionsfaktor VP16 mögliche negative Effekte auf die Zelle.

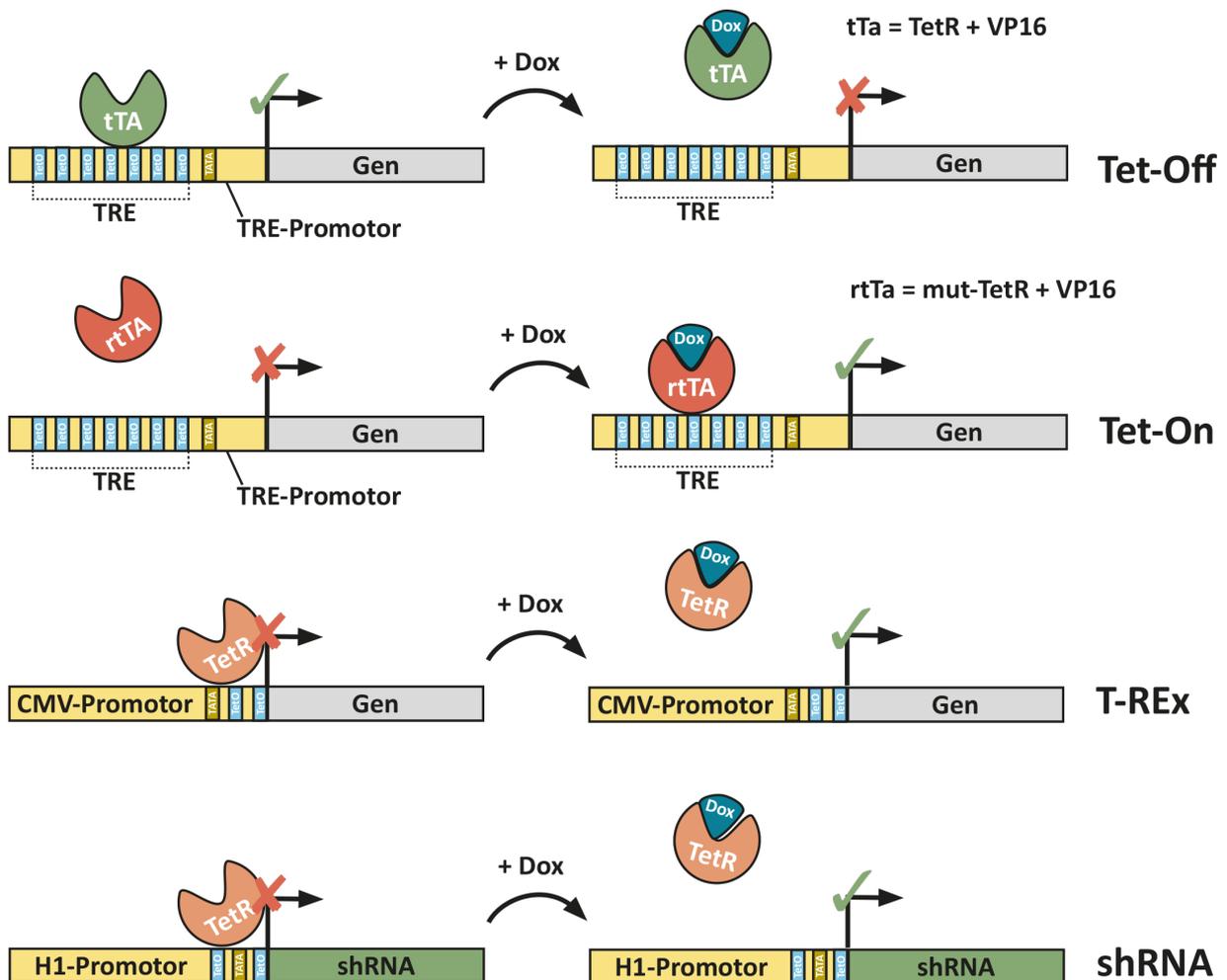


Abbildung 10: Tetrazyklin-regulierte Systeme

Tet-Off-System: Der verwendete TRE-Promotor besitzt keine basale Expression und enthält das Tet Response Element (TRE), welches durch 7 TetO-Sequenzen gebildet wird. Das Fusionsprotein Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator (tTA) besteht aus TetR und der C-terminalen Domäne des Virion Proteins 16 (VP16), welches ein Transkriptionsfaktor aus dem Herpes Simplex Virus ist. Bei der Abwesenheit von Tetrazyklinen bindet der TetR-Teil an die TetO-Sequenzen und der VP16-Teil vermittelt eine Induktion der Transkription. Bei der Zugabe eines Tetrazyklins bindet dieses an TetR, wodurch die Bindung an die TetO-Sequenzen aufgehoben wird und somit die Transkription beendet wird (Gossen und Bujard, 1992).

Tet-On-System: Durch Mutation des TetR wurde eine Variante gefunden, dessen Bindungseigenschaften zu TetO genau umgekehrt sind. In Kombination mit VP16 heißt dieses Protein reverser Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator (rtTA) und dieses bindet bei Anwesenheit von Tetrazyklinen an TetO und induziert die Transkription (Gossen et al., 1995).

T-Rex-System: Funktionell gesehen arbeitet das T-Rex-System wie das Tet-On-System, da es bei der Zugabe von Tetrazyklinen zur Induktion der Transkription kommt. Im Gegensatz zum Tet-On-System wird aber das ursprüngliche TetR-Protein verwendet. Dieses blockiert durch die Bindung an zwei TetO-Sequenzen hinter der TATA-Box ohne Zugabe von Tetrazyklinen die Transkription. Bei Zugabe von Tetrazyklinen geht die Bindung verloren und die Transkription startet (Yao et al., 1998).

Induzierbarer shRNA-Promotor: Die publizierten Versionen von induzierbaren H1- und U6-Promotoren ähneln stark vom Mechanismus her dem T-Rex-System. Hierbei werden ein oder zwei TetO-Sequenzen nach und/oder vor der TATA-Box platziert. Funktionell entspricht es damit auch dem Tet-On-System, welches bei der Zugabe von Tetrazyklinen mit der Transkription startet (Henriksen et al., 2007; van de Wetering et al., 2003).

Gossen *et al.* validierten die Systeme zunächst für die Expression von Genen, zum Beispiel mittels induzierbaren CMV-Promotors, die durch die RNA-Polymerase II transkribiert werden. Später konnte auch gezeigt werden, dass das Prinzip auf den H1- und U6-Promotor ausgeweitet werden kann. Diese beiden Promotoren werden für die Expression von shRNA genutzt, wobei hier die Transkription zum größten Teil durch die RNA-Polymerase III stattfindet (Gao *et al.*, 2018). Gerade bei der Expression von shRNA ist es notwendig, im nicht-induzierten Zustand die Expression auf das absolute Minimum zu beschränken, um nicht schon vor der Induktion einen partiellen Knock-down zu erhalten. Die ersten induzierbaren Polymerase II Promotoren wurde von Ohkawa und Taira (2000) für den U6-Promotor und van de Wetering *et al.* (2003) für den H1-Promotor mit je einer TetO-Bindungsstelle beschrieben. In einer Studie von Henriksen *et al.* (2007) wurden verschiedene induzierbare H1- und U6-Promotoren auf ihre basale und induzierte Expression mittels Knock-down von Luciferase untersucht und verglichen. Es zeigte sich, dass der in dieser Arbeit erstmalig beschriebene H1-Promotor mit zwei die TATA-Box flankierenden TetO-Bindungsstellen eine sehr geringe basale Expression und gleichzeitig eine sehr gute induzierte Expression besitzt. Durch die RNAi resultiert dann für geeignete Konstrukte und Ziele ein über 90-prozentiger Knock-down (Henriksen *et al.*, 2007). Der Knock-down Effekt erwies sich in diesen Untersuchungen für den H1-Promotor gegenüber ähnlichen U6-Promotor Konfigurationen als besser (Kappel *et al.*, 2006). Grundsätzlich waren sowohl für H1- als auch U6-Promotoren zwei TetO-Sequenzen notwendig, um eine ausreichend niedrige basale Expression zu erreichen (Henriksen *et al.*, 2007).

1.3 Zielsetzung und Fragestellung

Die Anforderungen unserer Forschungsgruppe an ein Knock-down-System zur Evaluation potentieller Zielproteine sind zum einen, dass es schnell, kostengünstig und unter einer geringen Sicherheitsstufe (S1) durchführbar ist und zum anderen die Möglichkeit bietet, mehrere Gen-Knock-downs gleichzeitig, dauerhaft und induzierbar auszuführen. Wie schon vorher dargelegt, ist das Multiple Myelom eine genetisch heterogene Erkrankung, bei der verschiedene Signalwege gleichzeitig dereguliert sind. Daher wird vermutet, dass mehrere Signalwege gleichzeitig durch eine Therapie beeinflusst werden müssen, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Hierfür entsteht die genannte Notwendigkeit für unsere Versuche *in vitro*, ebenfalls mehrere Proteine und damit Signalwege gleichzeitig herunterregulieren zu müssen. In unserer Forschungsgruppe konnten bereits Erfahrungen mit RNAi unter Verwendung des H1-Promotors und mit dem Transposon System „Sleeping Beauty“ gesammelt werden, sodass diese als Grundlage für dieses Projekt dienen sollten.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war folgende:

- I. Konzeption und Klonierung eines induzierbaren RNAi-Systems mit multiplen shRNA-Kassetten unter Verwendung eines Tet-On-Systems und des Sleeping Beauty Transposon Systems (SBTS) in Zelllinien des Multiplen Myeloms.
 - a. Klonierung und Evaluation eines induzierbaren Promotors zur Expression von shRNA
 - b. stabile Expression von shRNA-Konstrukten in MM Zelllinien mit dem SBTS
 - c. stabile Expression eines Tet-Repressor-Proteins in MM Zelllinien mit dem SBTS
- II. Anwendung und Etablierung des Systems in MM Zelllinien am Beispiel des mitogenaktivierten Protein-Kinase (MAPK)-Wegs

2 Material

2.1 Geräte und Software

Name	Hersteller
Adobe Creative Cloud CC 2019	Adobe Systems, San José, USA
BioRender	BioRender, Toronto, Kanada
Canvas X	Canvas GFX, Fort Lauderdale, USA
CellQuest Pro 6.0	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
EndNote X9	Clarivate Analytics, Boston, USA
Findings 2.1	Findings Software, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
FlowJo 8.8.7 bis 10.3.0	FlowJo, Ashland, USA
Microsoft Office 365	Microsoft, Seattle, USA
SnapGene 3.3.4 bis 4.1.9	GSL Biotech, Chicago, USA

Tabelle 3: Software

Name	Hersteller
Bakterienschüttler MaxQ 4000 & 4450	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Benchtopzentrifugen 5416 & 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschrank Modell 500	Memmert, Schwabach, Deutschland
CO ₂ -Brutschrank HERAccl 150	Thermo Fisher Scientific
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Elektroporationsgerät Gene Pulser	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Microplate Reader 680	Bio-Rad Laboratories
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Sicherheitswerkbank BDK SK	Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Spektrophotometer Peqlab NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific
Thermocycler C1000 Touch	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Thermocycler Primus 25	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Ultraschallprozessor UP50H mit Sonotrode MS1	Hielscher, Teltow, Deutschland
UV-Transilluminator	INTAS Science Imaging, Göttingen, Deutschland
Western Blot System Mini Transblot	Bio-Rad Laboratories
Zentrifuge 5810	Eppendorf
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland

Tabelle 4: Geräte

2.2 Reagenzien

2.2.1 Chemikalien

Name	Hersteller
Adenosintriphosphat (ATP, 10 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Agar	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich
alamarBlue	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Annexin V-FITC	Bender MedSystems, Wien, Österreich
Annexin V/PE	Bender MedSystems
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
CD4-beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
DMEM Low Glucose (1 g/dl)	GE Healthcare, Chicago, USA
DNA Gel Loading Dye (6X)	Fermentas
dNTPs	Fermentas
Ethanol 96 %	Apotheke Uniklinikum Würzburg, Würzburg, Deutschland
Fluoresceinisothiocyanat	Sigma-Aldrich
GeneRuler 1kB DNA Ladder	Fermentas
Geneticin (G418)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glycerin	Merck
Glycin	Roth
HDGreen Plus Safe DNA Dye	Intas Science Imaging, Göttingen, Deutschland
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Apotheke Universität Würzburg
Kaliumacetat	Merck
LB-Medium	Roth
Luminol	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Real, Düsseldorf, Deutschland
Magnesiumacetat	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
Mercaptoethanol	Roth

Methanol	Sigma-Aldrich
Natriumacetat (3 M)	Roth
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydroxid	Natriumhydroxid
p-Coumarsäure	Sigma-Aldrich
Page Ruler Unstained Protein Lader	Thermo Fisher Scientific
Ponceau-S	Applichem, Darmstadt, Deutschland
PromoFluor 647	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich
Protein A/G PLUS Agarose	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Puromycin	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Rotiphorese (Acrylamid)	Roth
Salzsäure 37 % (HCl)	Merck
SDS	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
TEMED	Roth
TRIS	Roth
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	Sigma Aldrich
Trypton	Roth
Tween 20	Roth
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth

Tabelle 5: Chemikalien

2.2.2 Zellkultur

Name	Hersteller
Fötales Rinderserum (FBS; 10 %)	GE Healthcare
Fötales Rinderserum (FBS) Tet System Approved (10 %)	Clontech, Mountain View, USA
Interleukin-6 (IL-6; 2 ng/ml)	Herstellung mit Vektor pET-15b-IL6 in <i>E. coli</i>
L-Glutamin (2 mM)	Invitrogen
Natriumpyruvat (1 mM)	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Penicillin (100 U/ml)	Pan Biotech
RPMI-1604	Sigma-Aldrich
Streptomycin (100 µg/ml)	Pan Biotech

Tabelle 6: Reagenzien in der Zellkultur

2.2.3 Enzyme

Name	Hersteller	Artikelnummer
DNase I	Fermentas	EN0521
Pfu DNA Polymerase	Fermentas	EP0501
PfuUltra II Fusion	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	600670
Proteinase K	Fermentas	EO0491
Ribonuclease A	Roth	7156.2
RNase A	Fermentas	EN0531
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas	EF0511
T4 DNA Ligase	Fermentas	EL0011
T4 DNA Polymerase	Fermentas	EP0061
T4 Polynucleotide Kinase	Fermentas	EK0031
Taq DNA Polymerase	Fermentas	EP0402

Tabelle 7: Allgemeine Enzyme

Name	Hersteller	Artikelnummer
AatII	Thermo Fisher Scientific	FD0994
BglII	Fermentas	FD0083
BsmI	Fermentas	ER0961
BstXI	Fermentas	ER1021
DpnI	New England Biolabs, Ipswich, USA	R0176
EcoRI	Fermentas	ER0271
HindIII	Fermentas	ER0501
NheI	Fermentas	FD0974
NotI	Fermentas	ER0595
SacI	Thermo Fisher Scientific	FD1133
SalI	Fermentas	ER0641
SfiI	Thermo Fisher Scientific	ER1821
XbaI	Thermo Fisher Scientific	ER0681

Tabelle 8: Restriktionsenzyme

2.2.4 Antikörper

Name	Hersteller	Spezies
Alpha-tubulin	Biozol, Eching, Deutschland	Ratte
Anti-Kaninchen, HRP-konjugiert	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien	Ziege
Anti-Maus, HRP-konjugiert	Jackson ImmunoResearch	Ziege
Anti-Ratte, HRP-konjugiert	Jackson ImmunoResearch	Ziege
Beta-Actin	Sigma-Aldrich	Maus
ERK1/2	Santa Cruz	Kaninchen
ERK1/2 Phospho	Cell Signaling, Frankfurt am Main, Deutschland	Kaninchen
HA-Tag	Abcam, Cambridge, Großbritannien	Kaninchen
Hsp90 β /Hsp84	Merck Millipore, Burlington, USA	Kaninchen
Mek1/2	Cell Signaling	Kaninchen
Mek1/2 Phospho	Cell Signaling	Kaninchen
Tet-Repressor	Merck Millipore	Kaninchen

Tabelle 9: Antikörper

2.3 Pufferlösungen

Name	Menge	Reagenzien
Annexin V Bindepuffer	10 mM 140 mM 2,5 mM	HEPES NaCl CaCl ₂
Blockingpuffer	0,1 % 5 %	Tween 20 Milchpulver
Blottingpuffer	400 ml 28,8 g 6 g	Methanol Glycin TRIS
	auf 50 ml mit dH ₂ O aufgefüllt	
Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Lösung	10 ml 100 μ l 20 μ l 3 μ l	TRIS (100 mM; pH 8,8) Luminol Stock (250 mM) p-Coumarsäure (100 mM) H ₂ O ₂ (30 %)
4x Lämmli-puffer	5 % 5 ml 3 ml 5 ml 0,5 ml	SDS (20 %) Glycerin TRIS (1M, pH 6,8) β -Mercaptoethanol Bromphenolblau 0,01 %
	auf 50 ml mit dH ₂ O aufgefüllt	

LB-Medium mit Ampicillin	5 g/l 10 g/l 10 g/l 0,1 mg/ml	Hefeextrakt Trypton NaCl Ampicillin
2x Lysepuffer je Aliquot (500 µl)	10 µl 10 µl 1 µl 10 µl 5 µl 100 µl 364 µl	PMSF (100 mM) Pefablock (4 mg/ml) Aprotinin (1 mg/ml) Na-O-Vanad (100 mM) DTT (100 mM) NP40 Zelllyse Puffer (10 %) dH ₂ O
Sammelgel	2,9 ml 1,05 ml 5,25 µl 63 µl 1,3 ml	dH ₂ O Rotiphorese TEMED APS (10 %) 4x Sammelgel-Puffer (pH 6,8; 0,5 M TRIS; 0,015 M SDS)
Oligonukleotid Annealing Buffer (OAB)	100 mM 30 mM 2 mM	Kaliumacetat HEPES Magnesiumacetat
50x TAE Puffer	2 M 1 M 50 mM	TRIS Acetat EDTA
	auf 1 l mit dH ₂ O aufgefüllt und mit HCl auf pH 8,0 eingestellt	
1x TAE Puffer	20 ml 980 ml	50x TAE dH ₂ O
10x TBS Puffer	24,2 g 80 g	TRIS NaCl
	auf 1 l mit dH ₂ O aufgefüllt und mit HCl auf pH 7,6 eingestellt	
1x TBS Puffer	10 ml 90 ml 1 ml	10x TBS dH ₂ O Tween
10x TGS Puffer	60 g 284 g 20 g	TRIS Glycin SDS
	auf 2 l mit dH ₂ O aufgefüllt	
1x TGS Puffer	10 ml 90 ml	10x TGS dH ₂ O
Trenngel (10 %)	4,1 ml 4,7 ml 16,1 µl 135 µl 2,9 ml	dH ₂ O Rotiphorese TEMED APS (10 %) 4x Trenngelpuffer (pH 8,8; 1,5M TRIS; 0,015 M SDS)

Tabelle 10: Eigene Pufferlösungen und Medien

Name	Hersteller
10x Pfu Puffer	Fermentas
Quick Ligase Puffer	New England Biolabs
10x Restriktionsenzym-Puffer (Rot, Grün, Blau, Orange, Tango)	Fermentas
T4 DNA Ligase Puffer	Fermentas
T4 PNK Puffer	Fermentas
10x UltraPfu Puffer	Agilent Technologies

Tabelle 11: Kommerzielle Puffer

2.4 Molekularbiologische Kits

Name	Hersteller
DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories
innuPREP Plasmid MIDI Direct Kit	Analytik Jena, Jena, Deutschland
innuPREP Plasmid Mini Kit	Analytik Jena
Large Cell Separation Columns	Miltenyi Biotec
Mix & Go <i>E. coli</i> Transformation Kit & Buffer Set	Zymo Research Corporation, Irvine, USA
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Zyppy Plasmid Mini Kit	Zymo Research Corporation

Tabelle 12: Molekularbiologische Kits

2.5 Plasmide

2.5.1 Protein-Expression

Name	Hersteller
pCAGGS	Geschenk von Hitoshi Niwa (Hitoshi <i>et al.</i> , 1991)
pCD4 Δ	Einklonierung der cDNA CD4 aus pMACS 4.1 (Miltenyi Biotec) in die EcoRI/HindIII-Schnittstellen von pcDNA3.1(-) (Chatterjee <i>et al.</i> (2004)
pcDNA3.1(-)	Invitrogen
pcDNA6/TR	Invitrogen
pEGFP-N3	Clontech, Heidelberg, Germany
pLVCT-tTR-KRAB	Patrick Aebischer und Didier Trono (Szulc <i>et al.</i> , 2006) Addgene Plasmid #11643; http://n2t.net/addgene:11643 ; RRID:Addgene_11643
pSelect HA-Tag	InvivoGen, San Diego, USA

Tabelle 13: Protein-Expressionsvektoren

2.5.2 Sleeping Beauty Transposon System

Name	Ursprung
pCMV(CAT)T7-SB100	Zsuzsanna Izsvák (Mates <i>et al.</i> , 2009) Addgene Plasmid #34879; http://n2t.net/addgene:34879 ; RRID:Addgene_34879
pT2/SVNeo	Perry Hackett (Cui <i>et al.</i> , 2002) Addgene Plasmid #26553; http://n2t.net/addgene:26553 ; RRID:Addgene_26553
pT2B/puro	Geschenk von Zsuzsanna Izsvák (Kuzmin <i>et al.</i> , 2010)

Tabelle 14: Sleeping Beauty Transposon System Vektoren

2.5.3 Klonierung

Name	Hersteller
pBluescript SK(-)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
pGEM-T Easy	Promega, Madison, USA

Tabelle 15: Klonierungsvektoren

2.5.4 shRNA-Expression

Name	Hersteller
pSUPER	Geschenk von Reuven Agami (Brummelkamp <i>et al.</i> , 2002)
pTER	Geschenk von Hans Clevers (van de Wetering <i>et al.</i> , 2003)
pTRIPZ	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 16: shRNA-Expressionsvektoren

2.6 DNA-Oligonukleotidsequenzen

Alle verwendeten DNA-Oligonukleotide wurden von Sigma Aldrich, München, Deutschland synthetisiert. Bei einer Basenpaarlänge von über 45 wurde eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) – Aufreinigung durch Sigma Aldrich veranlasst.

2.6.1 Primer

2.6.1.1 Sequenzierung und PCR-Screening

Name	Sequenz (5' → 3')
Su-5'	TGGCAGGAAGATGGCTGT
CMV-5'	GCAAATGGGCGGTAGGCGT
CMV-3'	ATGATCTAGAGTCGCGGCC
CMV-F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
BstXI-5'	CTAGAAACCCAGAGCTGTGG

CMV-rev	TATGTAACGCGGAACTCCAT
CAG-3'	TCAGATGCTCAAGGGGCTTCA
CAG-5'	TTCGGCTTCTGGCGTGTGA
GFP-FWD	ACACCCCCATCGGCGACGGC
GFP-REV	CAGATGAACTTCAGGGTCAG
pcDNA3.1-3'	TAGAAGGCACAGTCGAG
pT2-3'	CTTTCCACACCTGGTTGC
T3-3'	AATTAACCCTCACTAAAGG
SP6-3'	ATTTAGGTGACACTATAGA
pT2-5'	GGCTTTAGAAAGCTTCCCAC
T7-5'	TAATACGACTCACTATAGG

Tabelle 17: Sequenzierungs- und PCR-Screening-Primer

2.6.1.2 PCR-Synthese

Name	Sequenz (5' → 3')	Intro
IRES-3'	GTTCCAGGCGGCCGCTCAGGCACCGGGCTTG	NotI
IRES-5'	CGAAGTTATGGATCCGCGG	
SV-Puro-3'	CGACCTCTAGAAGCTAATTCTGTGGAATGTG	XbaI
SV-Puro-5'	AGCTCGCTAGCTGTATTTCAAGGGATCCAGACATG	XbaI
tTR-3'	TCTCTTCTAGATTTACGACCCACTTTCACATTTAAGTTGT	Stop, XbaI
tTRKRAB-3'	GCTAGTCTAGAACCTTAAACTGATGATTTGATTTCAAATG	XbaI
tTRpan-5'	CGATGTCTAGACCATGGCTAGATTAGATAAAAAGTAA	XbaI

Tabelle 18: DNA-Oligonukleotide als Primer für die PCR-Synthese

2.6.2 Klonierungen

2.6.2.1 Mutation

MUT-S2: pSUSTER zu pSUSTER2	
fwd	AATCACCATAAACGTGAAATCCCTATCAGTGATAGAGACTTATAAGTTCCCTATCAGT
rev	ACTGATAGGGAAGTTATAAGTCTCTATCACTGATAGGGATTTACGTTTTATGGTGATT
MUT-Blue-EcoRI: pBluescript SK(-) zu pBluescript SK(-) 2xEcoRI	
fwd	TATAGGGCGAATTCGGTACCGGGCCCC
rev	GGGGCCCCGGTACCGAATTCGCCCTATA

MUT-tTR-HA: pBluescript SK(-) -tTR zu pBluescript SK(-) tTR-HA	
fwd	CTTAMTGTGAAAGTGGGTCGTATCCCTATGATGTGCCAGACTATGCTTAAATCTAG AGCGGCCGCCAC
rev	GTGGCGGCCGCTCTAGATTTAAGCATAGTCTGGCACATCATAGGGATACGACCCAC TTTCACATTTAAG
MUT-pcDNA6+Nhe-EcoRI: pcDNA6 TR zu pcDNA6 TR+Nhe-EcoRI	
fwd	CCGCGTACAGCGGATCCCGGGAATTTAGATCTTATTAAGCTAGCACTTGTTTATTG CAGCTTATAATGG
rev	CCATTATAAGCTGCAATAACAAGTGCTAGCTTAATAAGATCTAAATTCCCGGGAT CCGCTGTACGCGG

Tabelle 19: DNA-Oligonukleotide für Mutationsreaktionen

2.6.2.2 Polylinker

pT2-CMV-npIF	
fwd	CTAGCAGTGTACAGACACGTGGAACCGGTGAGTATACGTGC
rev	GGCCGCACGTATACTCACCGGTTCCACGTGTCTGTACACTG

Tabelle 20: DNA-Oligonukleotide für Polylinker

2.6.2.3 shRNA

ERK1	
fwd	GATCTCC GCCATGAGAGATGTCTAC ATTCAAGAGAT GTAGACATCTCTCATGGCTTTTTG GAAGAGCT
rev	CTTCCAAA AAGCCATGAGAGATGTCTAC ATCTCTTGAAT GTAGACATCTCTCATGGCGGA
ERK2	
fwd	GATCTCC GAGGATTGAAGTAGAACAG TTCAAGAGACT GTTCTACTTCAATCCTCTTTTTG GAAGAGCT
rev	CTTCCAAA AAGAGGATTGAAGTAGAACAG TCTCTTGA ACTGTTCTACTTCAATCCTCGGA
MEK1	
fwd	GATCTCC GAGGGAGAAGCACAAGATCA TTCAAGAGAT GATCTTGTGCTTCTCCCTCTTTTTG GAAGAGCT
rev	CTTCCAAA AAGAGGGAGAAGCACAAGATCA TCTCTTGAAT GATCTTGTGCTTCTCCCTCGGA
MEK2	
fwd	GATCTCC GAAGGAGAGCCTCACAGCA TTCAAGAGAT GCTGTGAGGCTCTCCTTCTTTTTG GAAGAGCT
rev	CTTCCAAA AGAAGGAGAGCCTCACAGCA TCTCTTGAAT GCTGTGAGGCTCTCCTTCGGA

Tabelle 21: DNA-Oligonukleotide für die Einklonierung in pSUS, pSUSTER und pSUSTER2

Die Zielsequenzen für humanes ERK1 (5'-GCCATGAGAGATGTCTACA; cDNA Position 340 – 358) und ERK2 (5'-GAGGATTGAAGTAGAACAG; cDNA Position 900 – 918) wurden bereits

in vorherigen Arbeiten von unserer Forschungsgruppe untersucht und die entsprechenden Ergebnisse veröffentlicht (Chatterjee *et al.*, 2004). Die Zielsequenzen für humanes MEK1 (5'-GAGGGAGAAGCACAAGATCA; cDNA Position 612 – 631; TRCN0000002331) wurden von unserer Forschungsgruppe aus der Datenbank des Broad Institutes ausgewählt. Die Zielsequenzen für humanes MEK2 (5'-GAAGGAGAGCCTCACAGCA; cDNA Position 862 – 880) wurde auf Grundlage einer veröffentlichten siRNA gewählt (Ussar und Voss, 2004).

2.6.3 Bakterienstamm XL1-Blue

Dies ist ein effizienter *Escherichia coli*-Stamm für Klonierungsarbeiten und ermöglicht eine Blau-Weiß-Selektion mit pBluescript. Der Genotyp ist folgender: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tetr)] (Stratagene, 2004). Daraus folgt eine endA- und recA-Defizienz, dies erhöht die Qualität der Plasmide aus der DNA-Präparation und die Insert-Stabilität. Die hsdR-Mutation verhindert eine Spaltung der Plasmid-DNA. Darüber hinaus ist der Stamm gegen Tetrazykline resistent. Optimale Selektionsbedingungen für transfizierte Bakterien werden mit 100 µg/ml Ampicillin erreicht.

2.7 Zelllinien

Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um etablierte, stabile Zelllinien. Im Vergleich zu primären Zellen besitzen diese den Vorteil der einfacheren Verfügbarkeit, da sie kommerziell erwerbbar und, da immortalisiert, einfach zu vervielfältigen sind. Dies ermöglicht eine Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit verschiedener Experimente, die so mit einer Kultur von Primärzellen nicht zu erreichen ist. Auch der Ausschluss von Kontamination ist bei Zelllinien einfacher zu erreichen, da diese durch die Verwendung einer Stockbank regelmäßig auf den Ausgangszustand „zurückgesetzt“ werden können. Aus diesen Gründen bieten sich diese stabilen Zelllinien für die Etablierung eines neuen Systems an.

Die Zelllinien AMO-1, JJN-3 und L-363 wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) und MM.1S von LGC Standards (Wesel, Deutschland) gekauft. Die INA-6 Zellen waren ein Geschenk von Martin Gramatzki (II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universität Kiel). Direkt nach dem Erwerb der Zellen wurde eine Stockbank angelegt und auf Tubes aliquotiert, welche im flüssigen Stickstoff aufbewahrt werden. Die Kultur wurde negativ auf Mycoplasmen getestet (Uphoff und Drexler, 2011).

2.7.1 AMO-1

Entität	IgA-κ Plasmozytom
Etablierungsjahr	1984
Zelldichte	0,5 – 1,2 x 10 ⁶ Zellen/ml
Morphologie	rund, einzeln in Suspension
Verdoppelungszeit	circa 80 Stunden
Patient	Aszitesflüssigkeit einer 64-jährigen Frau mit Plasmozytom des Duodenums
DSMZ Nummer	ACC 538

Tabelle 22: Zelllinie AMO-1 (Drexler und Matsuo, 2000; DSMZ, 2018a; Shimizu et al., 1993)

2.7.2 INA-6

Entität	IgG-κ Plasmozytom
Etablierungsjahr	1994
Zelldichte	0,5 – 1,2 x 10 ⁶ Zellen/ml
Morphologie	rund, einzeln in Suspension, hohes Verhältnis von Nucleus zu Zytoplasma
Verdoppelungszeit	circa 24 Stunden (eigene Beobachtungen)
Ursprung	Pleuraerguss eines 80-jährigen Patienten mit Plasmazelleukämie
Besonderheit	Interleukin-6 abhängig

Tabelle 23: Zelllinie INA-6 (Brocke-Heidrich et al., 2004; Burger et al., 2001; Burger et al., 1994)

2.7.3 JJN-3

Entität	IgA-κ Plasmozytom
Etablierungsjahr	1987
Zelldichte	0,5 – 1,2 x 10 ⁶ Zellen/ml
Morphologie	rund, einzeln in Suspension, sowohl einzel- als auch multinukleär
Verdoppelungszeit	circa 80 Stunden
Ursprung	Knochenmark einer 57-jährigen Patientin mit Plasmazelleukämie
Besonderheit	Subklon der Zelllinie JJN-1
DSMZ Nummer	ACC 541

Tabelle 24: Zelllinie JJN-3 (Drexler und Matsuo, 2000; DSMZ, 2018b; Jackson et al., 1989)

2.7.4 L-363

Entität	IgA-κ Plasmozytom
Etablierungsjahr	1977
Zelldichte	0,2 – 0,5 x 10 ⁶ Zellen/ml
Morphologie	rund oder oval, einzeln und groß in Suspension
Verdoppelungszeit	circa 25 Stunden
Ursprung	Blut einer 36-jährigen Frau mit Plasmazellleukämie
DSMZ Nummer	ACC 49

Tabelle 25: Zelllinie L-363 (Diehl et al., 1978; DSMZ, 2018c)

2.7.5 MM.1S

Entität	λ-Leichtketten Plasmazellleukämie
Etablierungsjahr	1977
Zelldichte	0,2 – 0,5 x 10 ⁶ Zellen/ml
Morphologie	sowohl in Suspension als auch adhärent
Verdoppelungszeit	circa 72 Stunden
Ursprung	42-jährige Patientin mit Multiplem Myelom
Besonderheit	Subklon der Zelllinie MM.1 und im Gegensatz zu MM.1R sensitiv gegen Dexamethason

Tabelle 26: Zelllinie MM.1S (ATCC, 2018; Goldman-Leikin et al., 1989; Greenstein et al., 2003)

3 Methoden

Molekularbiologische Methoden wurden, wenn nicht anders beschrieben, gemäß Protokollen von Green und Sambrook (2012) durchgeführt.

3.1 Zellbiologische Techniken

3.1.1 Zellkultivierung

Alle 3 Monate wurden alle Zellen – ausgenommen die Zellen der Versuche, die einen noch längeren Beobachtungszeitraum benötigten – verworfen und aus der Stockbank frisch aufgetaut (sogenannte „dead-end culture“). Dies stellt sicher, dass die ursprüngliche Authentizität der Zellen gewahrt wird. Die Zellen wurden bei 5 % CO₂ und 37 °C in RPMI-1640 Medium mit 10 % FBS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Dem Medium der INA-6 Zellen wurde zudem 2 ng/ml rekombinantes humanes Interleukin-6 (IL-6) zugegeben. Die Zellen in Kultur wurden regelmäßig auf Mycoplasmen mittels PCR getestet.

3.1.2 Passagieren der Zellen

Die Zellen in der Zellkultur wurden jeweils alle 2 bis 3 Tage abhängig von der Zelldichte und den anstehenden Versuchen im Verhältnis von 1:2 bis 1:8 geteilt. Bei den Zelllinien JJN-3 und MM.1S mussten zuvor die Zellen zunächst mit einem Zellschaber vom Boden entfernt werden, da diese ein adhärentes Wachstum zeigen. Durch vorsichtiges Schütteln der Zellkulturflasche wurde dann eine gleichmäßige Durchmischung erzielt, anschließend wurde Medium mit Zellen entfernt und anschließend frisches Medium zugegeben, um die unter dem **Abschnitt 2.7** beschriebenen optimalen Zelldichten zu gewährleisten.

3.1.3 Zellzählung

Während die Membran von lebenden Zellen für Trypanblau undurchlässig ist, kann es in tote Zellen eindringen und diese so anfärben. Dadurch ist eine Unterscheidung unter dem Mikroskop möglich und die Anzahl viabler Zellen kann mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt werden. Die beiden Zelllinien JJN-3 und MM.1S wurden zunächst durch Kratzen mit einem Zellschaber vom Boden entfernt. Durch Schütteln von Zellkulturflaschen beziehungsweise mehrmaliges Hoch- und Herunter-Pipettieren des Lumens von Well-Platten wurde eine optimale Durchmischung der Zellen im Medium erreicht. Hiervon wurden 15 µl abpipettiert und mit weiteren 15 µl 0,4 % Trypanblau durch mehrere Male Hoch- und Herunter-Pipettieren gemischt. Hiervon wurden dann 10 µl in eine Neubauer Zählkammer eingebracht und alle lebenden Zellen in den 4 Groß-Quadraten ausgezählt. Der Mittelwert aus diesen Quadraten wurde mit 10⁴

multipliziert, um die Zellzahl pro 1 ml Lösung zu ermitteln. Hierbei konnte auch die Anzahl der toten Zellen auf dieselbe Weise ermittelt werden.

3.1.4 Nachweis von Mykoplasmen durch PCR

Mykoplasmen stellen eine Kontamination von Zellkulturen dar, welche durch ihren intrazellulären, parasitären Befall der kultivierten Zellen Versuchsergebnisse erheblich verändern können (Drexler und Uphoff, 2002). Gegen die in der Zellkultur üblichen Antibiotika sind diese resistent, da sie keine Zellwand besitzen, sodass eine regelmäßige Überprüfung auf eine etwaige Kontamination notwendig wird. Da sich Mykoplasmen im Lichtmikroskop nicht nachweisen lassen, ist das Mittel der Wahl ein Nachweis von verschiedenen Genen mittels PCR (Uphoff und Drexler, 2004; Uphoff und Drexler, 2011).

Die zu testenden Proben wurden wie folgt gewonnen: Zunächst wurde 1 ml aus der Zellsuspension entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und anschließend bei 4.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Hiervon wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und anschließend bei 99 °C für 5 min erhitzt. Anschließend wurde die Probe noch einmal bei 4.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Neben den hier gewonnenen Proben wurde jeweils eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle verwendet. Für die PCR wurden jeweils 1 µl der Probe, 1 µl MykoPrimer-Mix 5' und 1 µl MykoPrimer-Mix 3' mit 0,3 µl DreamTaq verwendet. Für diese wurden 35 Zyklen mit folgenden Einstellungen gewählt:

Denaturierung:	94 °C	30 s
Primeranlagerung:	60 °C	30 s
Elongation:	72 °C	60 s

Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die auftretenden Banden mit denen der Kontrollen verglichen. Positiv getestete Zellen wären verworfen worden.

3.1.5 Transfektion durch Elektroporation

Es wurden Zellen aus der normalen Zellkultur bei einer für die Zelllinie optimalen Dichte (siehe 2.7) entnommen und bei 1200 rpm 3 min lang pelletiert und mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) gewaschen und erneut bei 1200 rpm 3 min lang zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit frischem RPMI-1640 Medium ohne Zusätze resuspendiert. Wichtig ist hierbei, dass der pH der ungeöffneten RPMI-1640 Medium Flasche entspricht. Dies kann dadurch erreicht werden, dass Aliquots des Mediums in 15 ml Tubes, welche bis zum Deckel gefüllt sind, bei 4 °C gelagert werden.

Für die Elektroporation in der 2 mm Küvette wurden standardmäßig 1×10^6 Zellen in 200 μ l und in der 4 mm Küvette 1×10^7 Zellen in 500 μ l verwendet. Die Zellen wurden zusammen mit den Plasmiden mit einer standardmäßigen End-Konzentration von 20 μ g/ml in 1,5 ml Eppendorf Tubes vorbereitet und durch Hoch- und Herunter-Pipettieren vermischt. Zur Bestimmung der Elektroporationseffizienz können 5 – 20 μ g/ml des pEGFP-N3 Plasmids zugegeben werden.

Diese wurden dann mit einem Gene Pulser bei einer Kapazität von 960 μ F und Spannungen von 150 – 320 V durch einen einzigen exponentiell abfallenden Puls elektroporiert. Sofort danach wurde die Lösung in frische Tubes mit 500 μ l Medium ohne Zusätze überführt. Für die Zelllinien-spezifischen Werte siehe **Tabelle 27**.

Anschließend wurde die Zellsuspension in vorgewärmte Well-Platten oder Zellkulturflaschen mit Medium mit allen standardmäßigen Zusätzen überführt. Für alle Experimente wurde die Küvette zwischen aufeinanderfolgender Elektroporationen mit PBS aus einer Spritzflasche gereinigt und anschließend ausgeklopft. Nach allen Elektroporationen wurden die Küvetten mit PBS und 60%igem Ethanol gespült und an der Luft getrocknet.

Zelllinie	2 mm Küvette	4 mm Küvette	Transfektionseffizienz
AMO-1	170 – 180 V	270 – 310 V	20 – 30 %
INA-6	170 – 180 V	270 – 310 V	20 – 30 %
JJN-3	170 – 180 V	270 – 310 V	20 – 30 %
L-363	170 – 180 V	270 – 310 V	20 – 30 %
MM1.S	180 – 200 V	300 – 320 V	20 – 30 %

Tabelle 27: Elektroparationsparameter für verschiedene MM Zelllinien (Steinbrunn *et al.*, 2014)

3.1.6 Säulenaufreinigung mit CD4 MicroBeads

Mit potenzieller Ausnahme von AMO-1 exprimieren alle verwendeten Zelllinien keine CD4-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Durch die Zugabe von 20 μ g/ml des Plasmids pCD4 Δ bei der Elektroporation kann auf transfizierten Zellen der CD4-Rezeptor ohne die intrazelluläre Signaldomäne exprimiert werden, sodass stark transfizierte Zellen anschließend mit Hilfe von MACSelect 4 MicroBeads von nicht oder nur schwach transfizierten Zellen getrennt werden können (Chatterjee *et al.*, 2004; Steinbrunn *et al.*, 2014). Die MicroBeads binden an die trunkierten CD4-Rezeptoren und halten diese beim Durchlaufen durch MACS Trennsäulen für große Zellen, welche in einem Permanentmagneten stehen, zurück. Dahingegen können Zellen ohne CD4-Rezeptor ungehindert durch die Säule hindurchfließen. Nach Entfernung des Permanentmagneten können so die CD4-positiven und somit sicher transfizierten Zellen eluiert werden.

Am ersten oder zweiten Tag nach Elektroporation werden Zellen hierfür zweimal bei 1200 rpm 5 min pelletiert und mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wird anschließend mit MACS-Puffer von 4 °C gewaschen und erneut hierfür bei 1200 rpm 5 min pelletiert. Mit 360 µl MACS-Puffer von 4 °C wird das Zellpellet resuspendiert und mit 40 µl MACSelect 4 MicroBeads versetzt. Die Zellsuspension wird anschließend für 15 min in einem Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Währenddessen werden die MACS Trennsäulen für große Zellen mit 100 µl 70 % EtOH benetzt und anschließend mit 1 ml MACS Puffer mit einer Temperatur von 4 °C gespült. Es wird erneut 1 ml MACS Puffer von 4 °C zugegeben und auf den Ausfluss der Säule eine 23 Gauge Kanüle aufgesteckt, wodurch die Ausflussgeschwindigkeit etwas reduziert wird. Nun wird die Zellsuspension aus dem Überkopfschüttler zugegeben und nach erfolgtem Säulendurchlauf mit 1 ml kaltem MACS Puffer nachgespült. Anschließend wird die Säule aus dem Permanentmagneten entfernt und in ein FACS-Röhrchen gestellt. Die CD4-positiven Zellen werden nun mit 3 ml Medium und durch Druck mit einem Stempel aus den Säulen eluiert. Das FACS-Röhrchen enthält nun transfizierte und tote Zellen, dies wird durch eine FACS-Messung der EGFP- und PI-positiven Zellen bestätigt. Um auch die toten Zellen aus der Zellsuspension zu entfernen, muss anschließend eine OptiPrep-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt werden. Um die Säule zu recyceln und vor Rost zu schützen, wird sie mit heißem Wasser, dann mit deionisiertem Wasser und anschließend mit 96 % Ethanol gespült und jeweils mit Hilfe des Stempels ausgedrückt. Die Säule wird anschließend sofort im Wärmeschrank bei 65 °C getrocknet.

3.1.7 OptiPrep Zellaufreinigung

Tote Zellen und Zelltrümmer können mit Hilfe einer Dichtegradienten-Zentrifugation von lebenden Zellen getrennt werden (Graham, 2002). Hierfür wurde eine Mischung aus OptiPrep (60 % Iodixanol in Wasser, Dichte 1,32 g/ml) und Vollmedium verwendet, welche eine höhere Dichte hat als lebendige Zellen. Im Gegensatz dazu kann die Lösung in tote Zellen eindringen, wodurch diese eine höhere Dichte als das Gemisch aufweisen. Dieses wird mit PBS überschichtet, wodurch sich bei Zentrifugation die flottierenden lebenden Zellen an der Phasengrenze sammeln, da deren Dichte höher als das PBS ist. Zunächst wird die Zellsuspension in 1 ml Vollmedium aufgenommen und mit 300 µl OptiPrep durch Pipettieren gemischt. Dieses Gemisch wird dann vorsichtig mit 200 µl PBS überschichtet und bei 2500 rpm 5 min lang zentrifugiert. Die lebenden Zellen sind nun an der Phasengrenze sichtbar und werden abpipettiert und in ein FACS-Röhrchen mit 4 ml Vollmedium gegeben und, um Reste des OptiPreps zu entfernen, erneut bei 1200 rpm 5 min pelletiert, in 1 ml Vollmedium aufgenommen und mittels der Neubauer Zählkammer gezählt. Eine FACS-Messung kann anschließend bestätigen, dass nach Durchführung von

Säulenaufreinigung und OptiPrep fast nur noch EGFP-positive und PI-negative Zellen und somit lebende, stark transfizierte Zellen in der Suspension enthalten sind.

3.1.8 Stabile Transfektion mit dem Sleeping Beauty Transposon System

Für die stabile Transfektion von MM Zellen mit dem Sleeping Beauty Transposon System wurden für die Elektroporation 20 µg/ml des pT2-basierten Donor Vektors mit Aminoglykosid- oder Puromycin-Resistenz und 30 µg/ml des Transposase Expressionsplasmids pCMV-SB100X (Mates *et al.*, 2009) verwendet. Das optimale Transposase Donor Plasmid-Verhältnis war bereits in unserer Forschungsgruppe durch Titration bestimmt worden. Dieses entspricht ungefähr 2:3, sodass die Verwendung der DNA-Konzentration eine gute Näherung für die verwendeten Vektoren darstellt. Hierfür wurde als Donor-Plasmid pT2/SVNeo CMV-EGFP genutzt und unter der Annahme, dass die am stärksten EGFP exprimierenden Zellen auch die meisten Integrationen besitzen auf dieses Maximum hin titriert. Zur Beurteilung des Elektroporationserfolges wurden allen Transfektionen – abgesehen von pT2 Donor Vektoren, welche selber EGFP exprimieren – 5 µg/ml des Vektors pEGFP-N3 zugegeben. Durch eine FACS-Messung am zweiten Tag nach Elektroporation lässt sich somit frühzeitig beurteilen, ob eine Fortführung des Experimentes erfolgversprechend ist. Lag die Elektroporationseffizienz im erwarteten Bereich (siehe **Tabelle 27**), wurde ebenfalls am zweiten Tag nach Elektroporation die Selektion mittels 0,75 – 1 mg/ml Geneticin und/oder 0,5 – 1,25 µg/ml Puromycin eingeleitet (siehe auch **4.2**). Anschließend wurden die Zellen für 2 Wochen kultiviert und Medium jeweils durch frisches Medium mit der passenden Antibiotikakonzentration ausgetauscht. Hiermit ist die Selektion abgeschlossen, es sind nur noch stabil mit dem Insert des pT2-basierten Donor Vektors transfizierte Zellen vorhanden. Bei der Verwendung zweier pT2-basierter Vektoren mit verschiedenen Resistenzen, um zwei verschiedene Inserts stabil zu transfizieren, besteht die Möglichkeit diese hintereinander durchzuführen oder auch gleichzeitig. Zur Sicherstellung, dass auch beide Inserts stabil transfiziert wurden, wird bei der gleichzeitigen Selektion sofort mit beiden Antibiotika selektiert und bei der hintereinander durchgeführten Variante dann im Anschluss an die zweite Transfektion.

3.2 Molekularbiologische Techniken

3.2.1 DNA-Präparation aus *E. coli*

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurden verschiedene Kits je nach benötigter Menge DNA verwendet. Sie alle basieren auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterien und der Denaturierung der Proteine der Zellen. Für DNA-Mini- und Midipräparationen wurden von Analytik Jena das innuPREP Plasmid Mini Kit und das innuPREP Plasmid MIDI Direct Kit eingesetzt, für die DNA-Maxipräparationen das Plasmid Maxi Kit von Qiagen. Hierfür wurden jeweils 2 ml, 20 ml beziehungsweise 250 ml Übernachtskulturen mit LB-Medium angesetzt und am folgenden Tag die Plasmid-DNA gemäß dem Protokoll des Herstellers isoliert. Bei allen Kits wird die bakterielle RNA mit Hilfe der RNase A entfernt. Durch Zentrifugieren werden die ausgefällte chromosomale DNA und Proteine entfernt. Durch das Verwenden von Säulen mit geeigneter Matrix kann dann die Plasmid-DNA gebunden werden. Im Gegensatz dazu werden die anderen Komponenten der bakteriellen Zelle ausgewaschen. Anschließend wird die Plasmid-DNA jeweils in 50 µl, 200 µl beziehungsweise 15 ml des Elutionspuffers des jeweiligen Herstellers eluiert; für den exakten Ablauf siehe Anleitung des jeweiligen Herstellers. Zur Konzentration der eluierten DNA wurde gegebenenfalls eine Ethanol-fällung durchgeführt. Anschließend wurde die Gesamtmenge der gewonnenen DNA photometrisch durch Bestimmung des Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt, und die Konzentration bei Bedarf durch Verdünnung mit Wasser auf einen praktischen Gebrauchswert (5 µg/µl) eingestellt.

3.2.2 Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese

Um DNA-Fragmente für analytische und präparative Zwecke nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde ein horizontales 1%iges Agarosegel verwendet. Die DNA besitzt aufgrund ihrer negativ geladenen Zucker-Phosphat-Bausteine grundsätzlich eine negative Nettoladung und die Laufgeschwindigkeit in Richtung Kathode ist daher für lineare DNA-Doppelstränge hauptsächlich von der Molekülgröße abhängig (Green und Sambrook, 2012). Durch die Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes, welcher mit der DNA interkaliert, kann diese unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Hierfür wird Agarose mit 1x TAE Puffer im Verhältnis 1:100 aufgekocht bis die Lösung vollständig transparent geworden ist. Nach einigen Minuten Abkühlen wird dann je 100ml Agarosegel mit 5 µl des Farbstoffes Intas HD-Green versetzt und in die verwendete Form gegossen. Das fertige auf Zimmertemperatur abgekühlte Gel wird dann in die mit 1x TAE Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer gegeben. Die Proben wurden mit 6x Loading Dye versetzt und

neben einen DNA-Größenmarker (hauptsächlich GeneRuler 1kB DNA Ladder der Firma Fermentas) in die Geltaschen pipettiert.

Die Gelelektrophorese wurde standardmäßig bei einer Spannung von 110 V durchgeführt und die Laufweite je nach Fragestellung variiert. Die Darstellung des an DNA gebundenen Farbstoffes erfolgte unter einer UV-Beleuchtung und konnte mithilfe einer Kamera digital gespeichert werden. Zur Isolierung eines DNA-Fragments aus dem Agarosegel wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht dargestellt und mittels eines Skalpell aus geschnitten und in ein Eppendorf Tube überführt. Die Isolation erfolgte dann gemäß dem Protokoll des DNA Extraktionskits „NucleoSpin Gel and PCR-Clean-up Kit“.

3.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion wird zur Trennung von Proteinen und Nucleinsäuren aus wässrigen Lösungen eingesetzt. In dieser Arbeit wurde sie hauptsächlich zur irreversiblen Inaktivierung und Entfernung von Enzymen verwendet. Aufgrund unterschiedlicher Löslichkeit verbleiben die Nucleinsäuren in der wässrigen, oberen Phase, welche dann abpipettiert werden können (Chomczynski und Sacchi, 1987; Chomczynski und Sacchi, 2006).

Die Proteine werden durch das Lösungsmittelgemisch denaturiert und sammeln sich an der Phasengrenze (Interphase).

Zunächst wird zur wässrigen Lösung das gleiche Volumen an Phenol zugegeben und anschließend mit dem Vortexer gemischt bis sich eine gleichmäßige Trübung einstellt. Nach zweiminütigem Zentrifugieren bei 14.000 rpm wird die obere wässrige Phase abpipettiert und das gleiche Volumen wie die Ausgangslösung an Chloroform mit Isoamylalkohol (24 : 1) zugegeben. Das Zusetzen von Isoamylalkohol erleichtert hierbei das spätere Abpipettieren der wässrigen Phase. Nach erneutem zweiminütigem Zentrifugieren bei 14.000 rpm liegt eine Trennung in eine untere organische Phenolphase, dazwischen die Interphase mit den denaturierten Proteinen und eine obere wässrige Phase mit den Nucleinsäuren vor.

Die obere wässrige Phase wird in ein neues Tube überführt, welches dann nur noch die Nucleinsäuren (DNA/RNA) enthält.

3.2.4 Ethanolfällung

Die Probe wird mit 125 µl Ethanol 96 % und 5 µl 3 M Natriumacetat versetzt. Nach Durchmischen mittels Vortexer wird die Probe für 20 min bei -80 °C eingefroren, wodurch ein erleichtertes Ausfällen der DNA beim anschließenden zwanzigminütigen Zentrifugieren bei 14.000 rpm und 4 °C erreicht wird (Zeugin und Hartley, 1985). Im Anschluss wird der Überstand abpipettiert und das DNA-Pellet mit dem gewünschten Volumen Wasser resuspendiert.

3.2.5 Gewinnung von DNA-Fragmenten

3.2.5.1 Restriktionsverdau

Für analytische Zwecke oder für weitere Klonierungen wurden mit Hilfe von Restriktionsenzymen Vektoren und DNA-Fragmente geschnitten. Hierfür wurde Reaktionslösung gemäß Protokoll des Herstellers vorbereitet und mindestens 1 h lang bei 37 °C inkubiert. Zur Verwendung mehrerer Restriktionsenzyme wurde entweder ein kompatibler Puffer für die Enzyme ausgewählt oder nach jedem einzelnen Restriktionsverdau mit Hilfe einer Ethanol-fällung ein Pufferwechsel durchgeführt. Geschnittene Vektoren wurden für anschließende Klonierungen dephosphoryliert. Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegel aufgetrennt und durch DNA-Extraktion isoliert.

3.2.5.2 Phosphorylierung

Die T4 Polynucleotide Kinase (T4 PNK) fügt am 5'-Ende von Nukleotidsubstraten Phosphatreste hinzu. Hierfür wird 1 µl T4 PNK (=1 U) zu 10 µl DNA-haltiger Lösung mit 1 µl PNK Puffer A, 1 µl ATP (1mM-Stock) gegeben und 2 h lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die T4 PNK durch 10 min Inkubation des Reaktionsansatzes bei 70 °C inaktiviert.

3.2.5.3 Dephosphorylierung

Die Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) entfernt am 5'-Ende die Phosphatreste von Nukleotiden. Hierfür wird 1 µl SAP (=1 U) zu 20 µl DNA-haltiger Lösung gegeben und eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die SAP durch 10 min Inkubation des Reaktionsansatzes bei 70 °C inaktiviert.

3.2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine in vitro durchgeführte DNA-Replikation durch die DNA-Sequenzen vervielfältigt werden können. Im Gegensatz zur DNA-Replikation in vivo kann mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase das Trennen der DNA-Stränge durch Hitze durchgeführt werden. Hierfür wurden die PCR-Maschinen Thermocycler Primus 25 und Thermocycler C1000 Touch benutzt. Darüber hinaus benötigt man für die Reaktionslösung jeweils einen Primer als Ansatz für die Polymerase und anschließende Synthese des Sinn- und Gegensinnstrangs. Aus diesem Grund müssen zumindest teilweise die Basensequenzen der zu amplifizierenden Sequenz bekannt sein. Neben der DNA-Matrize sind außerdem noch ein Puffer, dNTPs und MgCl₂ für die Funktion der DNA-Polymerase notwendig. Nach einer initialen Erhitzung der Reaktionslösung auf 95 °C für 3 min zur vollständigen Trennung der DNA-Doppelstränge gliedern sich die Zyklen in Denaturierung, Annealing der Primer und DNA-Synthese. Die Anzahl der gewählten Zyklen variiert vor allem von der Anzahl der Ausgangskopien

der zu vervielfältigenden Matrize und zusätzlich noch je nach benötigter DNA-Menge und notwendiger Genauigkeit der DNA-Sequenz für weitere Versuche. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird die DNA durch Erhitzen auf 95 °C in Einzelstränge aufgetrennt.

Im nächsten Schritt, dem Annealing, wird die Temperatur soweit gesenkt, dass die Primer sich an ihre revers komplementäre Sequenz in der Matrize anlagern können. Die Annealing-Temperatur hängt von der Länge und dem GC-Gehalt der Primer ab. Als letzter Schritt folgt dann die DNA-Synthese bei 72 °C durch die DNA-Polymerase, welche die Primer am freien 3'-OH-Ende mit den dNTPs verlängert und somit die Doppelsträngigkeit der DNA wiederherstellt. Die Dauer der Synthesephase wird abhängig von der Geschwindigkeit der DNA-Polymerase und der Länge der zu vervielfältigenden Sequenz gewählt. Durch jeden Zyklus wird dann die Menge der Ziel-DNA-Sequenz in etwa verdoppelt.

Für TA-Klonierungen und analytische Maßnahmen wurde die Taq-Polymerase eingesetzt, für Vervielfältigung von anderen Fragmenten zum Klonieren die Pfu DNA Polymerase und für Mutationsreaktionen die PfuUltra II Fusion.

3.2.5.4.1 PCR-Synthese

Für die PCR-Synthese von DNA-Fragmenten – für die Verwendung als Insert in Vektoren in weiteren Klonierungsarbeiten – wurde die Pfu- oder Taq-Polymerase verwendet. Der Vorteil der Taq-Polymerase ist, dass diese einen 3'-Desoxyadenosin-Überhang an das PCR-Produkt anhängt und dadurch die sogenannte TA-Klonierung möglich ist. Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pGEM-T Easy liegt vom Hersteller bereits als linearisierter Vektor mit Desoxythymidin-Überhängen an beiden 3'-Enden vor und ermöglicht daher TA-Klonierungen. Dies verhindert außerdem eine Rezirkularisierung. Der Vektor kodiert das Enzym β -Galaktosidase, weshalb eine Blau-Weiß-Selektion von transformierten Bakterienkolonien möglich ist, wenn die LB-Agar-Substratplatte mit X-Gal (40 μ l 5% in Dimethylformamid) und IPTG (100 μ l 40 mM in H₂O) vorbestrichen wird. Wenn ein Insert einkloniert ist, wird die Funktionsfähigkeit des Enzyms zerstört, sodass kein blauer Farbstoff gebildet wird und die entsprechenden Kolonien weiß erscheinen. Der Vorteil der Pfu-Polymerase ist die höhere Genauigkeit bei der Amplifikation, da sie eine Korrekturlesefunktion besitzt. Im Gegensatz zur Taq-Polymerase erstellt diese glatte DNA-Enden (sogenannte „blunt ends“). Über die Einfügung bestimmter Sequenzen durch die verwendeten Primer ist es möglich, Restriktionsschnittstellen an den Enden des PCR-Produktes einzufügen oder schon existierende Schnittstellen zu nutzen. Nach Aufreinigung des Produktes über ein Agarosegel wird es mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und kann in einen Klonierungs- oder sonstigen Zielvektor einkloniert werden. Als Klonierungsvektor wurde

häufig pBluescript KS(-) verwendet, da er ebenfalls das Enzym β -Galaktosidase kodiert und eine Blau-Weiß-Selektion äquivalent zum Vektor pGEM-T Easy ermöglicht.

Die PCRs wurden mit 18 Zyklen mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Denaturierung	94 °C	1 min
Primeranlagerung	55 °C	1 min
Elongation	72 °C	1 min pro 1 kb Insertlänge

Bei Verwendung der Pfu-DNA-Polymerase wurde die Elongationsdauer verdoppelt, da diese eine geringere Amplifikationsgeschwindigkeit besitzt.

Für die Synthese von PCR-Fragmenten wurde der folgende PCR-Ansatz verwendet:

Menge	Reagenzien
2,5 μ l	10x Pfu-Puffer beziehungsweise 10x Taq-Puffer
1,0 μ l	Plasmid (50 ng/ μ l)
1,0 μ l	Primer-3' (15 μ M)
1,0 μ l	Primer-5' (15 μ M)
1,5 μ l	dNTP Mix
17 μ l	dH ₂ O
1,0 μ l	Pfu- beziehungsweise Taq-Polymerase
25 μ l	Gesamtansatz

Tabelle 28: PCR-Synthese Reaktionsansatz

3.2.5.4.2 PCR-Mutation

Bei der Sequenzwahl der Primer für die Mutation wurde eine Basenlänge (sofern möglich) zwischen 25 und 45 gewählt und die durchzuführende Mutation in die Mitte der Sequenz der Primer platziert. Es wurde ein minimaler Guanin- und Cytosin (GC)-Anteil von mindestens 40 % angestrebt und dieser zur besseren Bindung für die letzten Basen favorisiert. Der Zielwert der Schmelztemperatur (T_m) war ≥ 78 °C und wurde mit folgender Formel berechnet:

$$T_m = 81,5 + 0,41 \times \text{GC-Anteil (\%)} - \frac{675}{\text{Primer Länge (bp)}} + 100 - \text{Übereinstimmung (\%)}$$

Die verwendeten Primer wurden von Sigma-Aldrich hergestellt und mittels HPLC aufgereinigt.

Die PCR wird mit 18 Zyklen mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Denaturierung	94 °C	1 min
Primeranlagerung	55 °C	1 min
Elongation	72 °C	1 min pro 1 kb Plasmidlänge

Für die Synthese von mutierten Plasmiden wurde der folgende PCR-Ansatz verwendet:

Menge	Reagenzien
2,5 µl	10x PfuUltra II Puffer
1,0 µl	Plasmid (50 ng/µl)
1,0 µl	Primer-3' (15 µM)
1,0 µl	Primer-5' (15 µM)
1,5 µl	dNTP Mix
17 µl	dH ₂ O
1,0 µl	PfuUltra II Fusion
25 µl	Gesamtansatz

Tabelle 29: PCR-Mutation Reaktionsansatz

Alle verwendeten Plasmide wurden mittels *dam*⁺ *E. coli*-Stämmen hergestellt, da durch die verwendete Pfu Polymerase keine Methylierung des Produkts erfolgt. Es handelt sich hierbei um eine lineare PCR. Die Primer können jeweils nur an einen der beiden Einzelstränge binden. Der Unterschied des Ausgangsplasmids und des mutierten Produkts besteht dann neben der geänderten Sequenz in der unterschiedlichen Methylierung.

Bei Raumtemperatur lagern sich die komplementären Stränge zusammen. Durch Zugabe des Enzyms DpnI, welches ausschließlich methylierte oder hemimethylierte DNA spaltet (Zielsequenz: Gm⁶ATC), wird DNA mit einem oder beiden Strängen des Ausgangsplasmids in kleine Fragmente zerschnitten. Hierfür erfolgt eine Inkubation von 1 h bei 37 °C. Somit liegen nach diesem Schritt nur noch die neuen linearen Stränge vor. Durch die Verwendung zweier verschiedener Primer entstehen unterschiedliche Ausgangspunkte der PCR auf dem jeweiligen Strang, sodass sich zwei sogenannte „staggered nicks“ ausbilden. Dies führt zu einer doppelsträngigen Zirkularisierung des Produkts, wodurch dieses äquivalent zu einem Plasmid genutzt werden kann.

Das zirkuläre Produkt kann dann in *E. coli* transformiert, repliziert und im Rahmen von Minipräparationen dann das endgültige Plasmid ohne Lücken gewonnen werden. Isolierte Plasmide wurden für den Bereich der Mutation zur Kontrolle und zum Ausschluss von fehlerhaften oder fehlenden Mutationen grundsätzlich sequenziert.

3.2.5.5 Aufbau der shRNA-DNA-Oligonukleotide

Für die Expression von shRNA wurde der pSUPER-Vektor (Brummelkamp *et al.*, 2002) und dessen im Labor weiter entwickelte Derivate pSUS, pSUSTER und pSUSTER2 verwendet. In diesen Vektoren wird mit einem H1-Promotor die shRNA mit ihrer Loop-Struktur exprimiert. Im pSUPER-Vektor werden die DNA-Oligonukleotide über BglII- und HindIII-Schnittstellen

einkloniert. In den Vektor-Derivaten wird dies durch eine BglII- und SacI-Schnittstelle bewerkstelligt. Abgesehen von den veränderten Einklonierungsschnittstellen im Vergleich zu pSUPER wurden in pSUS, pSUSTER und pSUSTER2 die gleichen Regeln für die Erstellung der DNA-Oligonukleotide wie für die shRNA-Expression angewendet. Diese sehen dann wie folgt aus:



X¹⁹ symbolisiert hierbei den gewählten Sequenzabschnitt der Ziel-mRNA von 19 Basenpaaren Länge und Y¹⁹ die dazu revers komplementäre Sequenz. Die 9 Basenpaare zwischen X¹⁹ und Y¹⁹ bilden dann die Loop-Struktur der transkribierten RNA. Die 5 Thymidine (T) am 3'-Ende dienen als Stopp-Signal für die RNA-Polymerase III. Für die in dieser Arbeit gewählten Zielsequenzen siehe **Tabelle 21**.

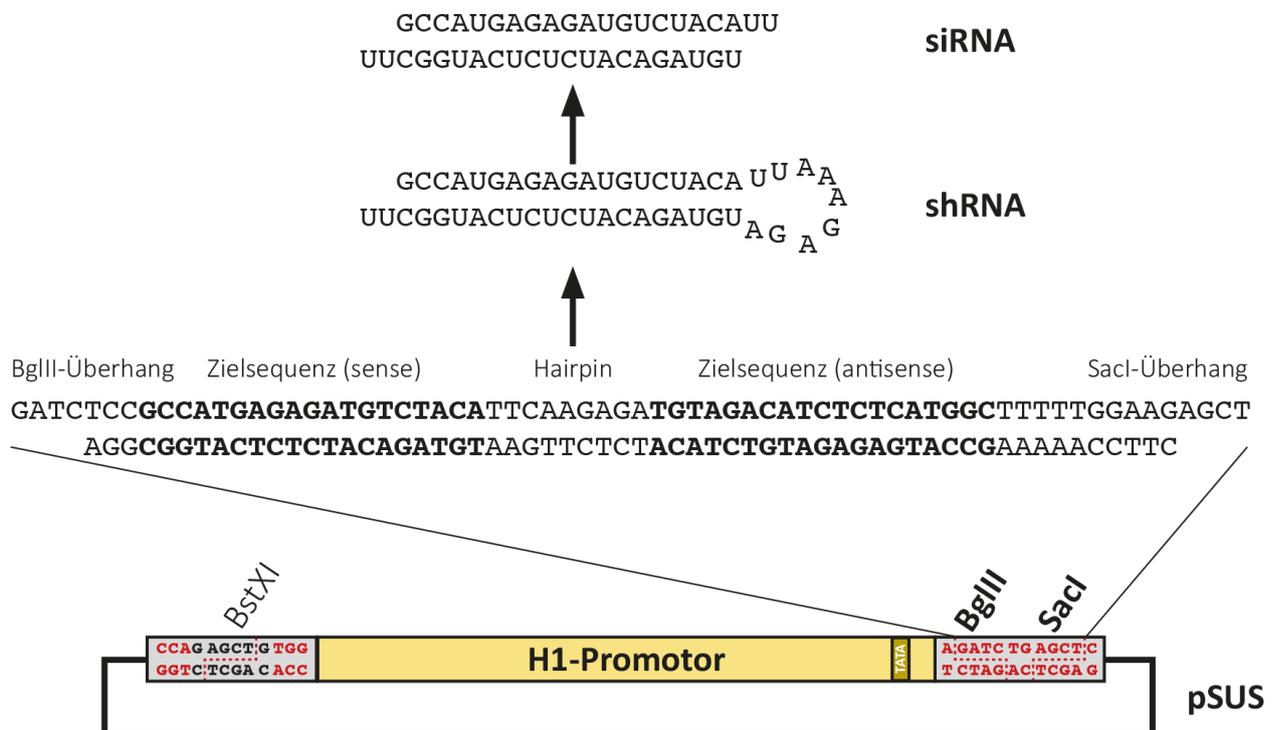


Abbildung 11: Einklonierung von shRNA-DNA-Oligonukleotiden und shRNA-Expression am Beispiel pSUS-ERK2

Über die BglII- und SacI-Schnittstellen werden die shRNA-DNA-Oligonukleotide in die Vektoren pSUS, pSUSTER oder pSUSTER2 einkloniert. In diesem Beispiel handelt es sich um eine Zielsequenz für ERK2. Nach Transfektion des Vektors pSUS-ERK2 erfolgt die Expression der shRNA durch den H1-Promotor und die Prozessierung zur entsprechenden siRNA.

3.2.5.6 Annealing von (shRNA-)DNA-Oligonukleotiden

Zur Aneinanderlagerung von zwei einzelsträngigen DNA-Oligonukleotiden werden diese in dH₂O zu jeweils 100 µM gelöst und je 1,5 µl der Oligonukleotid-Lösungen zu 47 µl Oligonukleotid Annealing Puffer (OAB) gegeben. Der Ansatz wird mit dem Vortexer durchmischt, in ein 95 °C

heißes Wasserbad gestellt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Dieses langsame Abkühlen ist nur bei dem Annealing von shRNA-Oligonukleotiden notwendig, da diese per Design über 19 bp lange revers komplementäre Sequenzen verfügen und bei hinreichend niedriger Temperatur präferentiell intramolekulare Doppelstränge bilden, beziehungsweise komplexe (und klonierfähige) Strukturen aus mehr als 2 Oligonukleotiden formen können. Alle anderen Oligonukleotide wurden kurz im Heizblock auf 70 °C erhitzt und bei Raumtemperatur 30 min zum Abkühlen stehen gelassen. Anschließend wurden die annealten Oligonukleotide phosphoryliert und in den dephosphorylierten und mit dem Restriktionsenzym BglIII geschnittenen pSUPER-Vektor beziehungsweise eines seiner Derivate ligiert. Kolonien mit Insert wurden dann durch PCR-Screening selektiert und anschließend durch Sequenzierung verifiziert.

3.2.5.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch DNA-Ligasen können die Sticky- und Blunt-Enden von DNA-Fragmenten ligiert werden. In dieser Arbeit wurde jeweils ein geschnittener Vektor, welcher zuvor dephosphoryliert wurde, mit dem gewählten Insert mit kompatiblen Schnittenden durch die QuickLigase oder die hochkonzentrierte T4 Ligase ligiert. Hierfür wurde ein Molaritätsverhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 gewählt. Die Reaktionsmischung wurde gemäß Herstellerprotokoll der Ligasen vorbereitet und anschließend 20 min beziehungsweise 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das ligierte Konstrukt in *E. coli* transformiert.

3.2.6 Transformation von kompetenten *E. coli*

Mit dem Mix & Go *E. coli* Transformation Kit wurden hochkompetente XL-1 Blue *E. coli* Aliquots gemäß Kitprotokoll mit je 0,05 ml Bakterien im Kit-Puffer vorbereitet und bei -80 °C für spätere Transformationen aufbewahrt. Durch diese Vorbehandlung wird der Transformationsprozess einfacher und kürzer. Für die Transformation wurden die Bakterien auf Eis stehend aufgetaut und dann mit 1 – 3 µl Ligationsansatz vermischt. Anschließend wurde das Tube erneut für 5 min auf Eis belassen und der Transformationsansatz dann auf vorgewärmte Kulturplatten (LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen.

3.2.7 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Das LB-Festmedium wird aus einem Ansatz von 500 ml LB-Medium, 500 ml Aqua und 15 g Bacto Agar hergestellt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf circa 60 °C wird dieses mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt und auf sterile Petrischalen aufgeteilt (je 20 ml).

Nach Transformation wurden *E. coli* auf Agarplatten für 16 – 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend maximal 4 Wochen lang bei 4 °C gelagert. Die Kultivierung von *E. coli* zur DNA-Präparation erfolgte nach Animpfen von Einzelzellkolonien in LB-Medium mit

100 µg/ml Ampicillin bei 250 rpm und 37 °C im Inkubationsschüttler. Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterien wurde ein Glycerinstock angelegt. Hierfür wurde einer Übernachtskultur 15 % Glycerin zugesetzt und diese bei -80 °C gelagert.

3.2.8 Selektion der Kolonien

Um einen effektiveren Ablauf von Klonierungen zu ermöglichen, wurden in dieser Arbeit die Blau-Weiß-Selektion und das PCR-Screening verwendet, um bereits vor der DNA-Präparation von Plasmiden eine Auswahl der richtigen Kolonien treffen zu können. Hierdurch konnten unnötige DNA-Präparation, Restriktionsverdauungen und Sequenzierungen vermieden werden.

3.2.8.1 Blau-Weiß-Selektion

Die beiden verwendeten Klonierungsvektoren pGEM-T Easy und pBluescript KS(-) kodieren in IPTG-induzierbarer Form das Enzym β -Galactosidase, wodurch X-Gal zu Galaktose und einem blauen Indigo-Farbstoff umgesetzt werden kann. Wenn ein Insert erfolgreich inkloniert wurde, wird dadurch die kodierende Sequenz des Enzyms zerstört und der Farbstoff nicht gebildet. Das bedeutet, dass XL1-Blue Kolonien auf mit IPTG/X-Gal bestrichenen Kulturplatten mit Insert eine weiße und ohne eine blaue Färbung besitzen.

3.2.8.2 PCR-Screening

In dieser Arbeit wurden viele Klonierungen mit anderen Vektoren als pGEM-T Easy oder pBluescript KS(-) durchgeführt, bei denen keine Blau-Weiß-Selektion möglich war. Um dennoch gerade bei Klonierungen mit geringer Effizienz herausfinden zu können, welche Kolonien mit dem gewünschten Produkt erfolgreich transfiziert wurden, wurde die PCR-Screening Methode etabliert. Da die PCR schon sehr geringe DNA-Mengen nachweisen kann, konnten die Kolonien direkt genutzt werden, um einen Klonierungserfolg anzuzeigen. Hierfür wurden für die hauptsächlich verwendeten Vektoren Primerpaare ausgewählt, zwischen denen die Klonierungsstellen liegen. Die verwendeten Primerpaare sind in **Tabelle 17** und die Zuordnung zu den verschiedenen Vektoren in **Tabelle 31** dargestellt. Hierdurch konnten mit Hilfe des Programmes SnapGene die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente mit und ohne Insert berechnet und die Produkte im DNA-Gel entsprechend zugeordnet werden. Bei nicht-gerichteten Klonierungen wurden für die PCR bevorzugt auch Primerpaare verwendet, in denen ein Primer innerhalb des inklonierten Fragments liegt, sodass nur ein in richtiger Orientierung inkloniertes Fragment zu einem PCR-Produkt führen kann. Zunächst wurden die gewählten Kolonien auf der LB-Platte mit Nummern markiert und anschließend mit einem Zahnstocher in jeweils ein vorbereitetes PCR-Tube mit einem PCR-Reaktionsmix getaucht.

Menge	Reagenzien
2,5µl	10x Taq-Puffer
0,5µl	dNTP-Mix
0,1µl	5'-Primer
0,1µl	3'-Primer
0,2µl	Taq-Polymerase
20,1µl	dH ₂ O
25 µl	Gesamtansatz

Tabelle 30: PCR-Screening Reaktionsansatz

Zusätzlich wurde eine Leerkontrolle ohne Template angesetzt. Mit allen Proben wurden 35 Zyklen des folgenden PCR-Schemas durchgeführt:

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

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

Vektor	5'-Primer	3'-Primer	PCR-Produkt	Orientierung
pSUPER	T7-5'	T3-3'	381 bp	nein
pSUS	pSUPER-5'		213 bp	nein
pSUSTER pSUSTER2	BstXI-5'		variabel	ja
pcDNA3.1(-)	T7-5'	pcDNA3.1-3'	177 bp	nein
CMV-Promotor	CMV-F-5'	CMV-3'	132 bp	nein
CAG-Promotor	CAG-3'	CAG-5'	321 bp	nein
pGEM-T Easy	T7-5'	SP6-3'	175 bp	nein
pT2 + Derivate	pT2-5'	pT2-3'	194 bp	nein
	BstXI-5'		variabel	ja

Tabelle 31: Standardkombinationen für das Koloniescreening

Wie beispielhaft das Ergebnis des PCR-Screenings mittels Gelelektrophorese aussieht, ist in **Abbildung 12** dargestellt.

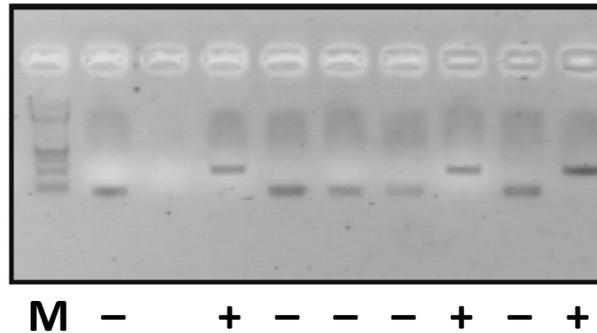


Abbildung 12: Ergebnis eines PCR-Screenings von Kolonien

Dieses Beispiel zeigt das Ergebnis des PCR-Screenings für 9 Kolonien von einer Agarplatte. Auf der ersten Bande ist der DNA-Größen-Marker (M) sichtbar. 3 Kolonien (Bahnen 4, 8 und 10) enthalten hier das gewünschte Insert (+), hier hat das PCR-Produkt die vorausgesagte Größe. Alle anderen Banden zeigen ein PCR-Produkt ohne Insert (-) oder wie in Bahn 3 sogar gar kein PCR-Produkt.

3.2.9 Sequenzierung

Zur Kontrolle der verschiedenen Klonierungen wurden die Ergebnisse stets sequenziert. Auf diese Weise konnten Fehler wie die falsche Orientierung des Inserts, Punktmutationen oder auch Verwechslungen ausgeschlossen werden. Die Sequenzierungen wurden von der LGC Genomics GmbH nach dem Sequenzierungsverfahren nach Sanger durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden vier verschiedene 2',3'-Dideoxynucleosid-5'-Triphosphate verwendet, die zu dem Abbruch der Elongation führen, da keine 3'-Hydroxylgruppe vorhanden ist. Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten 2',3'-Dideoxynucleosid-Resten können die entstandenen Kettenabbauprodukte nach ihrer Länge durch Kapillarelektrophorese und den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen durch Sequenzierautomaten den jeweiligen Positionen und Basen zugeordnet werden. Die Auswertung der von der LGC Genomics GmbH zur Verfügung gestellten Signaldaten erfolgte mit Hilfe der Software SnapGene.

3.3 Messmethoden

3.3.1 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Bei der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie, häufig auch als FACS (fluorescence-activated cell sorting) bezeichnet, wird eine Zellsuspension angesaugt und hydrodynamisch so fokussiert, dass immer nur eine Zelle den Messbereich durchquert. Diese Zelle wird von einem Argon-Laser angestrahlt und das entstehende Streulicht wird mit Linsen gebündelt und gemessen. Das gerade abgestrahlte Licht, der sogenannte Forward Scatter (FSC), korreliert mit der Größe der Zelle und das im rechten Winkel abgestrahlte Licht, der sogenannte Side Scatter (SSC), korreliert mit der Granularität der Zelle. Durch diese zwei Messparameter kann man verschiedene Zellen

voneinander unterscheiden. Auch können bereits relativ gut tote von lebenden Zellen unterschieden werden, da diese verschiedene Größen und Granularitäten besitzen. Neben den Streulichtsignalen kann mit Hilfe von Spiegeln und Filtern das Licht auch nach verschiedenen Wellenlängen aufgetrennt und gemessen werden. Dies macht sich die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie zu Nutze, sodass neben dem FSC und dem SSC bei jeder Zelle auch emittiertes Licht gemessen werden kann. In dieser Arbeit wurde sowohl die Fluoreszenz von EGFP und Propidiumiodid (PI) in den Zellen als auch von an die Zellenmembran gebundenem Annexin V, welches mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder PromoFluor 647 gekoppelt ist, gemessen. EGFP wurde von den gemessenen Zellen durch die Transfektion eines entsprechenden Plasmids selbst produziert. PI ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit einem Emissionsmaximum bei 590 nm, wobei sich dieses bei Interkalierung mit DNA zu 617 nm verschiebt. Da die intakte Zellwand für PI nicht permeabel ist, kann PI nur in spät-apoptotische und nekrotische Zellen eindringen und somit können diese Zellen durch FACS-Messung von vitalen Zellen unterschieden werden.

Apoptotische Zellen verlagern als „eat-me“ Signal für Phagozyten Phosphatidylserin (PS) von der inneren in die äußere Membran. Dies macht man sich zu Nutze, um den Übergang in die Apoptose frühzeitig messen zu können (Logue *et al.*, 2009). Zur Messung von (pro-)apoptotischen Zellen wird Annexin V eingesetzt, welches ein 35 – 36 kDa Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-Bindeprotein mit hoher Affinität zu PS ist. Eine Koppelung des Annexin V an einen fluoreszierenden Farbstoff ermöglicht eine Messung mittels der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Vermees *et al.*, 1995). Das verwendete Annexin V wurde gemäß Protokoll von Logue *et al.* (2009) im Labor hergestellt und entweder mit PromoFluor 647 oder FITC verknüpft. Durch die gleichzeitige Messung von PI und Annexin ist eine Unterscheidung von vitalen, früh-apoptotischen und spät-apoptotischen Zellen möglich.

Um Zellen zu messen, wurde die Probe in ein FACS-Röhrchen überführt und zunächst bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert und somit pelletiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und die Probe mit 4 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde die Probe erneut pelletiert und das FACS-Röhrchen zur weitgehenden Entfernung des PBS auf Papier ausgeklopft. Die zu untersuchenden Zellen werden in 200 μl PBS (Messung von EGFP und/oder PI) oder Annexin V- Bindepuffer (Messung von Annexin V und EGFP und/oder PI) resuspendiert. Für die Messung mit Annexin wurde dem Ansatz 1 μl Annexin V-FITC oder PromoFluor 647-Stammlösung und für die Messung von PI 4 μl PI-Stammlösung zugesetzt und die Mischung für 10 min unter Lichtausschluss inkubiert. Da Annexin V-FITC und EGFP im gleichen Frequenzbereich Licht emittieren, muss bei gleichzeitiger

Messung das rot fluoreszierende mit PromoFluor 647 gekoppelte Annexin V benutzt werden. Alle Proben wurden mit dem Gerät FACSCalibur und der Software CellQuest gemessen. Die Auswertung erfolgte anschließend mit der Software FlowJo. Auf diese Weise konnte die FACS-Messung in dieser Arbeit zur Bestimmung der Zellvitalität und der Transfektionseffizienz eingesetzt werden.

3.3.2 AlamarBlue Zellviabilitätsassay

Mit Hilfe von alamarBlue kann die Viabilität von Zellen gemessen werden (Page *et al.*, 1993). Der aktive Inhaltsstoff von alamarBlue ist das für die Zelle nicht toxische Resazurin. Dieses kann durch die Zellmembran ungehindert eindringen und wird von vitalen Zellen mit dem Coenzym NADH zu Resorufin reduziert. Dieses hat eine rote Farbe und ist stark fluoreszierend, wohingegen Resazurin blau und nicht fluoreszierend ist. Die Fähigkeit der Zellen Resazurin zu reduzieren, korreliert mit deren Viabilität. Daher kann durch die Messung des Farbunterschieds mit Hilfe eines Photometers bei 570 nm und 600 nm als Referenzwert die Viabilität und Proliferation der Zellen quantitativ gemessen werden.

3.3.3 Western Blot

Das in unserer Arbeitsgruppe standardmäßig benutzte Protokoll zur Durchführung des Western Blots ist ausführlich in der Publikation von Hausmann *et al.* (2015) beschrieben. Auf dieser basiert die folgende Darstellung der Durchführung der verschiedenen Schritte.

3.3.3.1 Proteinisolation

Zur Proteinisolation aus Zellen wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Zum einen wurden die Zellen mittels Ultraschall und zum anderen mittels eines Puffers lysiert.

Für beide Methoden wurde die Zellzahl zunächst möglichst genau mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt und anschließend die gewünschte Zellzahl entnommen, in Eppendorf Tubes überführt und bei 1200 rpm 5 min herunterzentrifugiert und der Überstand abgekippt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und schließlich in flüssigem Stickstoff oder bei -80 °C tiefgefroren. Für Zellmengen von 100.000 – 500.000 wurde meist die Ultraschalllyse durchgeführt, für größere Zellmengen die Zellyse mittels Lysepuffer gewählt und anschließend eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt.

3.3.3.1.1 Zellyse durch Ultraschall

Die Zellen wurden für mindestens 20 min bei -80 °C tiefgefroren. Anschließend wurden für die Ultraschalllyse je 100.000 Zellen 10 µl Lämmliemilchpuffer zugegeben und unter Eiskühlung mit Ultraschallpulsen behandelt (Hielscher UP50H mit Sonotrode MS1, Amplitudeneinstellung: 1).

3.3.3.1.2 Zelllyse durch Lysepuffer und Proteinkonzentrationsbestimmung

Der Vorteil der Isolation mittels Lysepuffer besteht darin, dass eine anschließende Proteinkonzentrationsbestimmung möglich ist und so neben der Zellzählung eine weitere Messung zur Verfügung steht, um eine äquivalente Proteinmenge beim Western Blot aufzutragen. Diese Methode hat sich allerdings nur für größere Zellmengen als hinreichend genau erwiesen.

Die Proteinbestimmung wurde mit dem BIO-RAD DC Protein Assay Kit nach einer modifizierten Methode nach Lowry durchgeführt. Diese basiert auf einer Folin Reaktion, bei der im alkalischen Milieu vor allem Tyrosin- und Tryptophanreste der Proteine mit Kupferacetat reagieren. Die entstehenden Protein-Kupfer-Komplexe haben ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 750 nm und -minimum bei 405 nm. Dieser Komplex bleibt über 1 h lang stabil und ermöglicht so im Vergleich mit einer Standardreihe und dem Leerwert eine Proteinquantifizierung. Zu den zu untersuchenden gefrorenen Zellpellets wurden 35 µl des Lysepuffers hinzugegeben und diese resuspendiert. Anschließend wurde das Lysat 20 min auf Eis inkubiert und mit einer gekühlten Zentrifuge bei 4 °C 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und zur Proteinbestimmung genutzt. Die Bestimmung wurde mit Doppelwerten in einer 96-Well-Platte vorgenommen. Neben den Proben wurden jeweils der Leerwert (Lysepuffer) und die Referenzprobe gemessen. Von den Proben (Leerwert/Referenzprobe/Messprobe) wurden jeweils 5 µl zu 25 µl Mix-Reagenz (1 ml Reagenz A und 20 µl Reagenz S) und 200 µl Reagenz B gegeben. Nach 15 min Inkubation unter Lichtausschluss wurde die Absorption bei 750 nm gemessen und die Proteinkonzentration aus Interpolation mit dem Null- und Referenzwert ermittelt.

3.3.3.2 Natriumdodecylsulfate-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem molekularen Gewicht erfolgte mit Hilfe der Natriumdodecylsulfate-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) (Laemmli, 1970).

Die gefrorenen Proben wurden in Lämmli-puffer gelöst. Durch diesen werden die bereits durch Hitze denaturierten Proteine weiter linearisiert und auf ihre Primärstruktur reduziert. Disulfidbrücken werden durch das enthaltene β-Mercaptoethanol durch Reduktion gespalten. Das Natriumdodecylsulfat (SDS) im Lämmli-puffer und im Laufpuffer lagert sich als anionisches Detergenz an die hydrophoben Regionen der Proteine an. Dies sorgt dafür, dass die Proteine alle eine konstant negative Ladung aufweisen, sodass deren eigene Ladung vernachlässigbar ist und die Sekundär- und Tertiärstruktur aufgelöst wird. Dadurch, dass die Proteine linearisiert sind und sie eine annähernd gleiche negative Ladung haben, ist die Laufgeschwindigkeit im Gel hauptsächlich von ihrer Länge abhängig. In einem 1x TGS-Puffer wurde zunächst eine

Konzentration der Proteine in einem grobmaschigen, pH-neutralen Sammelgel mit einer langsamen Laufgeschwindigkeit bei 80 V für 15 min durchgeführt. Anschließend erfolgte die weitere Auftrennung nach molekularem Gewicht im feinporigen, basischen Trenngel bei 110 V, bis die durch Bromphenolblau sichtbare Lauffront das untere Ende des Gels erreichte.

3.3.3.3 Proteintransfer und Proteindetektion

Die aufgetrennten Proteine wurden nach dem Semi-Dry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Kyhse-Andersen, 1984). Hierfür wird ein sogenanntes Sandwich aus einem Filterpapier, einer Nitrozellulosemembran, dem SDS-Gel und einem weiteren Filterpapier gebildet. Dieses wird in Blottingpuffer mit der Nitrozellulosemembran in Richtung der Anode für 1 h einer Spannung von 100 V ausgesetzt. Zur Bestätigung des Transfers der Proteine auf die Nitrozellulosemembran und einer Einschätzung der Gleichmäßigkeit der Beladung wird diese mit Ponceau S gefärbt, welches an Aminogruppen bindet. Das Ergebnis wurde durch Einscannen dokumentiert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation in TBS-Puffer mit 1 % Tween 20 (TBS-T-Puffer) und 5 % Magermilchpulver auf einem Schüttler, um Ponceau S zu entfernen und unspezifische Bindungen der später verwendeten Antikörper zu vermindern.

3.3.3.4 Immundetektion

Die Immundetektion erfolgt durch Verwendung spezifischer Antikörper (Primärantikörper) für das gesuchte Protein. Diese wurden hierfür in einer Verdünnung von 1:1000 bis 1:10.000 in TBS-T-Puffer mit 5 % Magermilchpulver und 0,1 % Natriumazid verwendet und für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden zuvor durch dreimaliges je fünfminütiges Waschen durch TBS-T-Puffer entfernt. Nachdem diese an das Protein gebunden haben, bindet an deren Fc-Teil ein zweiter Antikörper (Sekundärantikörper). Dieser wurde mit einer Verdünnung von 1:20.000 für 1–2 h in TBS-T-Puffer mit 5 % Magermilchpulver inkubiert und anschließend erneut dreimal für je 10 min mit TBS-T-Puffer gewaschen. Dieser für die Spezies des primären Antikörpers spezifische sekundäre Antikörper ist mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt und durch die Zugabe von ECL-Gebrauchslösung wird im Rahmen einer chemischen Reaktion Licht emittiert. Somit kann durch Belichtung eines Röntgenfilms die Schwärzung mit der Anwesenheit und - im Vergleich mit anderen Proben - auch der relativen Abundanz des Zielproteins korrelieren.

4 Ergebnisse

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen eines Teilprojektes der DFG-geförderten Klinischen Forschergruppe 216 am Universitätsklinikum Würzburg durchgeführt. Ziel war die Entwicklung und Etablierung eines einfach anzuwendenden, induzierbaren und stabilen shRNA-Knock-down Systems zur simultanen Blockierung der Expression mehrerer Zielproteine unter Verwendung von Sleeping Beauty Transposon Plasmiden. Ein solches System sollte die Möglichkeit eröffnen verschiedene Signalwege des MM gleichzeitig per shRNA-Knock-down zu adressieren, um neue grundlegende pathophysiologische Erkenntnisse zu gewinnen und Ansatzpunkte für die medikamentöse Therapie zu finden. Im Rahmen der Promotion von Bernhard Roth wurden hierfür bereits erste grundlegende Fortschritte erzielt, auf denen diese Arbeit aufbaut. Aus dem kommerziell verfügbaren pSUPER-Plasmid mit einem H1-Promotor zur transienten shRNA-Expression konnte Roth das pSUS (pSUPER-SacI)-Vektorsystem (siehe 4.3.1) konstruieren und validieren. Dieses erlaubt den modifizierbaren Aufbau von Kassettensystemen zur simultanen Co-Expression verschiedener shRNAs (sogenannte combinatorial RNAi) mittels eines einzelnen Vektors. Die Klonierung der Kassetten erfolgt mit geringem zeitlichem und materiellem Aufwand mit Hilfe eines „cut & paste“ Mechanismus von einem pSUS-Plasmid in ein anderes pSUS-Plasmid. Ermöglicht wird dieser Mechanismus durch die Verwendung von sich nur teilweise selbst regenerierenden Restriktionsenzym-Schnittstellen. Des Weiteren konnte Roth zeigen, dass der mit transientscher Transfektion erreichbare Knock-down von einzelnen bis vier kombinierten Kassetten im pSUS-Vektorsystem bei semiquantitativer Beurteilung im Western Blot vollkommen äquivalent zum erreichbaren Knock-down mittels separater pSUPER-Vektoren und zudem unabhängig von der Reihenfolge der einklonierten H1-Promotor-shRNA-Expressionskassetten ist. Daraus lässt sich schließen, dass sich die shRNA-Kassetten gegenseitig nicht negativ beeinflussen, und bei den Klonierungsarbeiten keine Rücksicht auf Positionseffekte genommen werden muss. Für die Validierung dieses Ansatzes wurde der mitogenaktivierte Protein-Kinase (MAPK)-Weg gewählt. Dabei gelang es Roth, neben dem schon etablierten shRNA-Knock-down von ERK1 und ERK2 (Chatterjee *et al.*, 2004), effektive shRNA-Sequenzen für den Knock-down der Isoformen MEK1 und MEK2 zu finden. In der vorliegenden Arbeit wurde an diese Vorarbeit angeknüpft, um ein Tet-On-System für stabil transfizierbare, induzierbare und multiple shRNA-Expressionskassetten zu konstruieren, zu etablieren und dessen Funktionsfähigkeit zu verifizieren. Im Anschluss an diese Dissertation wurde das etablierte System im genannten Projekt der Klinischen Forschergruppe 216 im Zuge der Promotion von Laurens Zugelder für weitere klinisch relevante Zielstrukturen eingesetzt.

4.1 Konzeption

Das neu entwickelte Knock-down-System benötigt folgende Komponenten, um induzierbare und multiple Knock-downs von Zielproteinen im MM zu ermöglichen:

1. Sleeping Beauty Transposon System zur stabilen Transfektion (siehe 1.2.3.2) der zwei folgenden Komponenten zur TetR- und shRNA-Expression
2. induzierbare shRNA-Expressionskassetten mit sehr gutem Knock-down bei fehlender Suppression durch TetR (siehe 1.2.4)
3. adäquate und kontinuierliche TetR-Expression zur Suppression der shRNA-Expression im nicht-induzierten Zustand (siehe 1.2.4)
4. induzierbare Expression der shRNA-Expression durch Zugabe eines Tetrazyklins mit dem Ziel eines effektiven Knock-downs (siehe 1.2.4)

Die beiden Komponenten zur TetR- und shRNA-Expression können mit dem Sleeping Beauty Transposon System entweder zusammen auf einem Plasmid oder unabhängig voneinander auf zwei Plasmiden transfiziert werden. Im Folgenden werden beide Herangehensweisen untersucht und diskutiert. Die favorisierte Verwendung von zwei Plasmiden ist in **Abbildung 13** dargestellt.

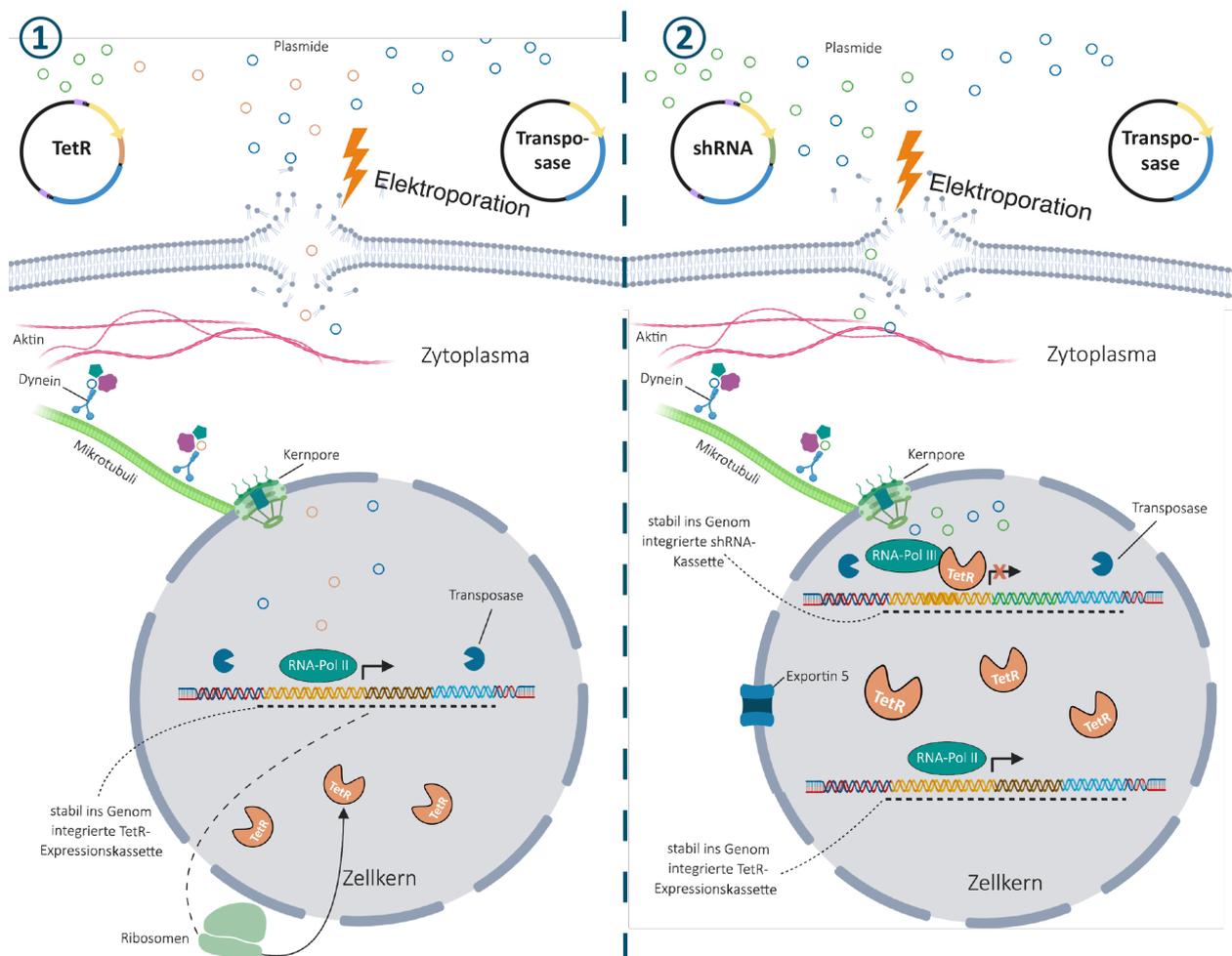
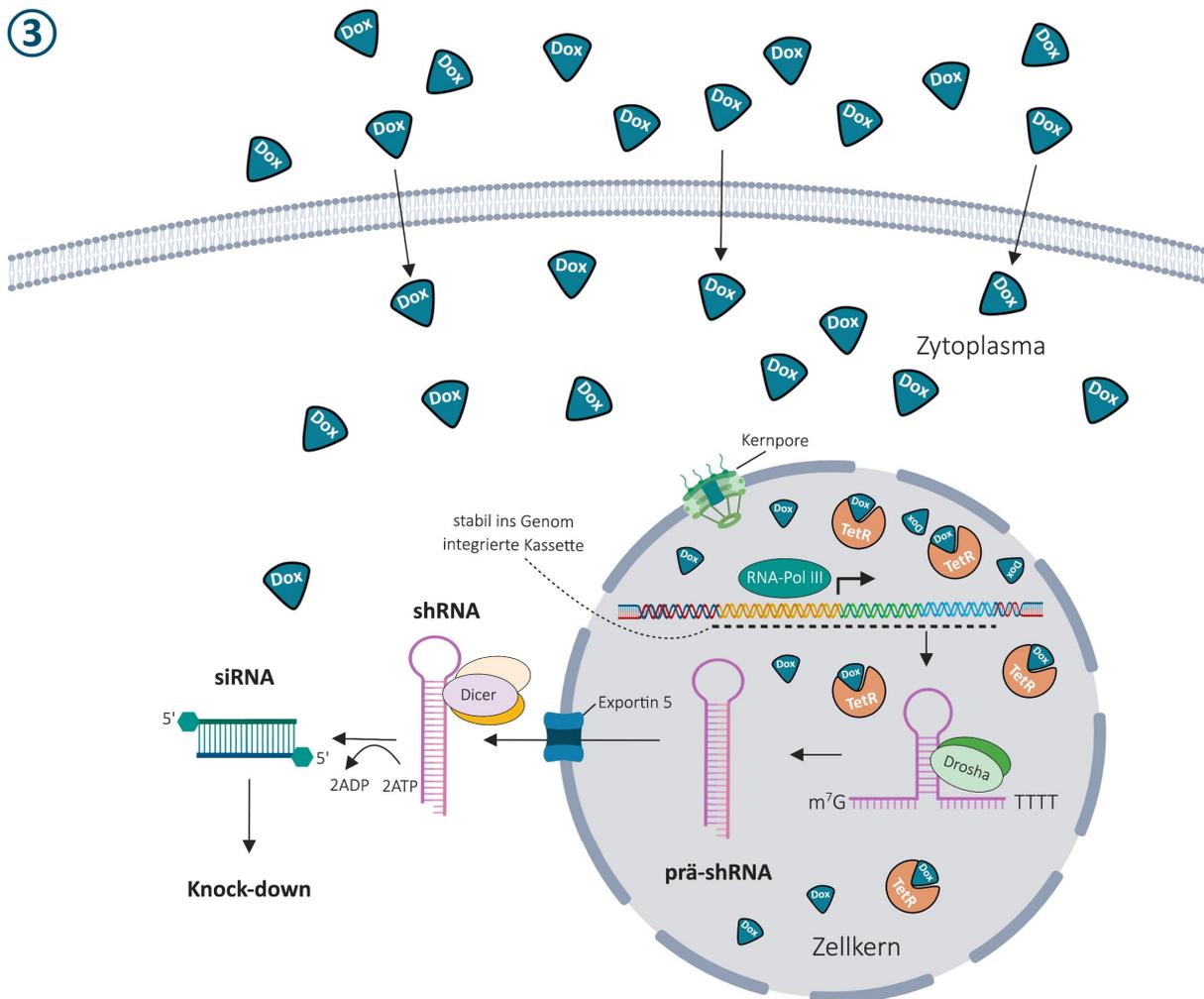


Abbildung 13: Funktionelles Konzept des induzierbaren shRNA-Knock-down-Systems mit dem SBTS

- ① Durch eine erste Elektroporation werden mit Hilfe des Sleeping Beauty Transposon Systems die MM Zellen stabil mit der Expressionskassette (Promotor gelb, TetR-Gen braun) des TetR-Gens transfiziert. Durch die streng gekoppelte Resistenzkassette (hellblau) können durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums alle MM Zellen selektiert werden, welche stabil TetR exprimieren. Alle anderen Zellen werden durch die fehlende Expression der Antibiotikaresistenz abgetötet.
- ② Durch eine weitere Elektroporation der im 1. Schritt selektierten MM Zellen wird mittels Sleeping Beauty Transposon System eine andere Resistenzkassette (hellblau) verknüpft an eine oder mehrere shRNA-Expressionskassetten (grün) stabil in das Genom integriert. Da diese Zellen konstitutiv den TetR produzieren, bindet TetR an den induzierbaren Promotor und verhindert somit eine Expression der shRNAs. Durch eine anschließende Selektion mit den beiden Antibiotika, gegen die die doppelt stabil transfizierten Zellen nun resistent sind, wird sichergestellt, dass die beiden Komponenten des Systems in sämtlichen Zellen stabil integriert sind.



Fortsetzung Abbildung 15: Funktionelles Konzept des induzierbaren shRNA-Knock-down-Systems mit dem SBTS

- ③ Durch die Zugabe eines Tetrazyklins – meistens Doxycyclin (DOX) – wird die Bindung des TetR an den induzierbaren Promotor und die Blockierung der Transkription aufgehoben. Die RNA-Polymerase III kann nun ungehindert die RNA produzieren, die über verschiedene Schritte zu shRNA und dann zu siRNA umgewandelt wird. Diese verhindert dann zusammen mit dem RISC, dass die Ziel-mRNA zum entsprechenden Protein translatiert wird. Für den genauen Mechanismus der RNAi siehe auch 1.2.2 und **Abbildung 8 (S. 36)**.

Diese Abbildung wurde erstellt mit BioRenderer.com

4.2 Nutzung des Sleeping Beauty Transposon Systems im Multiplen Myelom

Für ein funktionsfähiges Tet-On-System (siehe **1.2.4**) müssen sowohl die Expressionskassette des Tet-Repressor-Proteins als auch die der induzierbaren shRNA-Promotoren stabil in das Genom der Zelle integriert sein. Hierfür muss grundsätzlich zunächst die Nutzung des SBTS im Multiplen Myelom etabliert sein und die Möglichkeit bestehen, dauerhaft Proteine und shRNAs induzierbar zu exprimieren. Dies entspricht dem Punkt 1 der Konzeption (siehe **4.1**).

4.2.1 Stabile Expression von Proteinen in MM Zellen am Beispiel EGFP

Zur Etablierung des Sleeping Beauty Transposon Systems (siehe **1.2.3.2**) in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien wurde die Expression des grün fluoreszierenden Proteins EGFP ausgewählt. Der Vorteil von EGFP besteht darin, dass dessen Expression quantitativ durch die Messung der grünen Fluoreszenz mittels FACS bestimmbar ist. Zunächst sollten die stabile Integration der EGFP-Expressionskassette ins Genom erzielt und optimale Selektionsbedingungen (insbesondere bezüglich Dauer und Stärke der Antibiotikaexposition) bestimmt werden. Das Sleeping Beauty Transposon System integriert – zusätzlich zum gewünschten Insert – eine Expressionskassette für eine Antibiotika-Resistenz ins Genom, wodurch stabil transfizierte Zellen gegen dieses Antibiotikum dauerhaft resistent werden. Um nachfolgend ausschließlich die stabil mit dem Vektor transfizierten Zellen zu selektionieren, muss die notwendige Antibiotikakonzentration ermittelt werden, welche nicht transfizierte, naive Zellen vollständig abtötet. In dieser Arbeit wurden Vektoren mit Antibiotikaresistenzen zum einen gegen Aminoglykoside (zum Beispiel Neomycin oder Geneticin) und zum anderen gegen Puromycin verwendet. Die notwendigen Selektionsbedingungen mit Geneticin (G418) waren bereits im Vorfeld von unserer Forschungsgruppe bestimmt worden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geneticin-Konzentrationen für eine Dauer von 10 Tagen sind 750 µg/ml für die Zelllinien JJN-3, AMO-1 und MM.1S und 1.000 µg/ml für L-363 und INA-6. Die Bestimmung der notwendigen Selektionskonzentrationen für Puromycin ist im folgenden **Abschnitt 4.2.2** beschrieben.

Im Rahmen von transienten Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass in allen verwendeten Zelllinien eine gute Expression von EGFP, das über einen CMV-Promotor exprimiert wird, erreicht wird. Der verwendete Sleeping Beauty Donor Vektor pT2/SVNeo CMV EGFP (Vektorkarte: **S. 161**) besitzt eine Neomycin-Resistenzkassette sowie eine CMV-EGFP-Kassette. Durch die Transposase SB100X, welche durch Co-Transfektion des Vektors pCMV(CAT)T7-SB100 transient exprimiert wird, erfolgt die stabile Integration dieser beiden streng gekoppelten Expressionskassetten ins Genom der Zellen. Anschließend sollte bestimmt

werden, wie stabil die Expression auf Dauer ist, und inwieweit eine beständige beziehungsweise erneute Selektion mit Antibiotika notwendig ist. Hier konnte auf Zellen verschiedener MM Zelllinien mit stabiler EGFP-Expression und Neomycin-Resistenz zurückgegriffen werden, die bereits vor Beginn dieser Arbeit etabliert worden waren. Die Elektroporation (siehe 3.1.5) erfolgte unter optimierten Bedingungen für die jeweils verwendeten Zelllinien und die verwendeten Sleeping Beauty Transposon Plasmide (siehe 3.1.8). Es wurde jeweils die optimale Elektroporationsspannung für die verwendete Zelllinie gewählt. Am zweiten Tag nach der Elektroporation wurde die für die Zelllinie ermittelte Selektionskonzentration an Neomycin zugesetzt. Hierdurch wurden alle nicht stabil transfizierten Zellen innerhalb von 10 Tagen abgetötet.

AMO-1

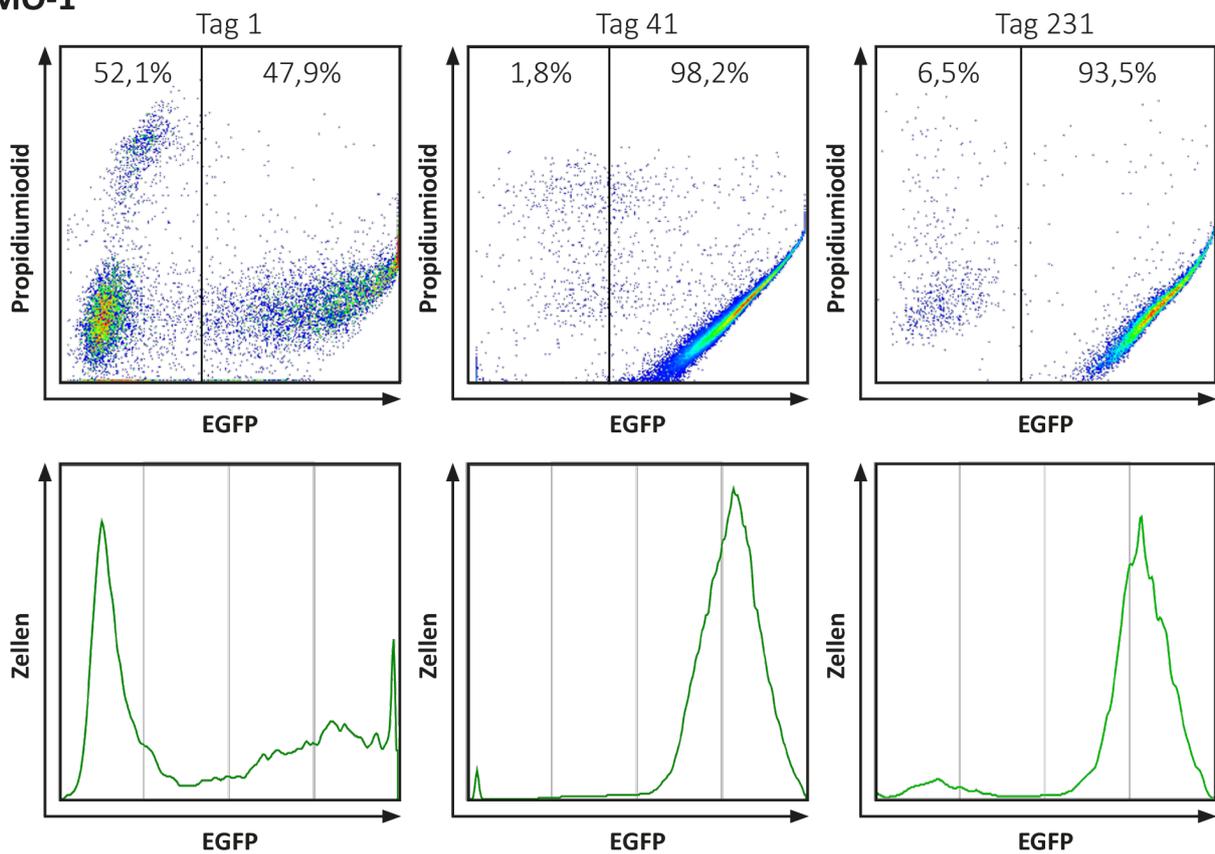


Abbildung 14: Zeitliche Stabilität der EGFP-Expression in MM Zellen

Initial zeigt sich am Tag 1 nach Elektroporation mit dem pT2/SVNeo CMV EGFP Vektor knapp die Hälfte der Zellen EGFP-positiv. Nach erfolgter Selektion mit Geneticin steigt dieser Anteil auf über 95 % an und bleibt über einen Zeitraum von 231 Tagen auch ohne weitere Selektion mit Geneticin in diesem Bereich. Die restlichen knapp 5 % stellen hierbei zum einen tote Zellen dar. Zum anderen existiert möglicherweise eine kleine, fast gleichbleibende Zahl an Zellen, welche zwar die Resistenz exprimieren, aber keine oder eine nur sehr schwache EGFP-Expression besitzen. Vermutlich handelt es sich hierbei um Zellen, bei welchen eine zufällige Integration der Neomycin-Resistenz stattgefunden hat. Diese kann zum Beispiel durch einen Doppel-Strang-Brech im Bereich der EGFP-Kassette bei der Integration stattfinden. Der leicht steigende Anteil lässt sich möglicherweise durch einen geringen Proliferationsvorteil der Zellen ohne EGFP erklären.

Verifiziert wurde dies mit Hilfe von FACS-Analysen der Zellen, in denen die EGFP-Expression und PI-Aufnahme gemessen wurden. Die resultierenden FACS-Messdatenreihen, die bereits über Monate hinweg erfasst worden waren, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit weitergeführt. Dabei ist insbesondere anzumerken, dass die EGFP-Expression im erfassten Messzeitraum von insgesamt 231 Tagen ohne erneute Selektion mit Geneticin stabil blieb (siehe **Abbildung 14**). Da keine erneute Selektion notwendig war, ist davon auszugehen, dass diese Messreihen auch für die Selektion mit anderen Antibiotika wie zum Beispiel Puromycin repräsentativ sind.

Aus diesen Messdaten lässt sich schließen, dass in den untersuchten Zelllinien über den untersuchten Zeitraum hinweg kein Silencing des CMV-Promotors stattfand und die EGFP-Expression keinen substanziellen Einfluss auf das Wachstum und Überleben der Zellen hat. Dabei ist die Verdopplungszeit der Zellen mit der von nicht transfizierten Kontrollzellen vergleichbar. Bei der ebenfalls durchgeführten FACS-Analyse mit Annexin V und PI zeigte sich kein erhöhter Anteil toter beziehungsweise proapoptotischer Zellen im Vergleich zur normalen Zellkultur.

4.2.2 Etablierung eines Sleeping Beauty Donor Vektors mit Puromycin-Resistenz

Beim Sleeping Beauty Transposon System handelt es sich um ein Vektor/Plasmid-basiertes System, wodurch die Möglichkeit besteht, die zu transfizierenden Komponenten auf ein oder zwei (mehrere) Plasmide zu verteilen. Sofern alle Elemente auf einem Plasmid liegen, ist gewährleistet, dass nach Transfektion und erfolgter Selektion diese auch stabil in das Genom der Zielzellen integriert sind. Um dies auch bei der Verwendung von zwei (oder mehr) Plasmiden sicherzustellen, ist es notwendig, dass jedes weitere Plasmid eine weitere, andere Antibiotikaresistenz vermittelt. Dies hat den Zweck, dass diejenigen Zellen selektiert werden können, welche beide (alle) transfizierten Bestandteile zweifelsfrei stabil in ihr Genom integriert haben. Im konkreten Anwendungsfall bietet es sich an, dass der induzierbare H1-Promotor gemeinsam mit der TetR-Expressionskassette auf einem Plasmid durch eine einzige Elektroporation in die Zelle eingebracht (Ein-Vektor-System) wird oder nacheinander auf zwei verschiedenen Plasmiden durch insgesamt zwei Elektroporationen (Zwei-Vektor-System).

Bei der zuletzt genannten Möglichkeit wird sinnvollerweise als Erstes der Vektor mit dem TetR transfiziert. Dadurch kann eine vorzeitige, unerwünschte shRNA-Expression durch die suppressive Wirkung des TetR verhindert werden. Bei der Verwendung eines Ein-Vektor-Systems kann dies hingegen nicht ausgeschlossen werden, da die Produktion von shRNA und TetR in den Zellen gleichzeitig beginnt. Man kann davon ausgehen, dass die Expression von shRNA durch die zunächst fehlende beziehungsweise noch zu niedrige TetR-Konzentration nicht komplett unterbunden werden kann. Um diesen Effekt möglichst weitgehend zu vermeiden, ist es sinnvoll

die Expressionskassetten von shRNA und TetR auf zwei verschiedene Vektoren aufzuteilen. Durch die Verwendung zweier Vektoren besteht außerdem der Vorteil, dass die Klonierungs- und Transfektionsvektoren eine geringere Anzahl an Basenpaaren besitzen. Somit können Klonierungen mit höherer Erfolgsrate durchgeführt werden und beide verwendeten Plasmide bei der Elektroporation aufgrund der geringeren Größe besser in die Zelle eindringen. Nachteilig ist hingegen, dass ein höherer Zeitaufwand besteht, da zweimal eine Selektion der Zellen durchgeführt werden muss. Das kann aber durch die Etablierung von Zelllinien, die stabil TetR exprimieren, auf einfache Weise umgangen werden. Dies ermöglicht nach erfolgter Etablierung die komplette erste Elektroporation und Selektion nicht jedes Mal erneut durchzuführen zu müssen. Darüber hinaus ist somit die Anwendung in Zelllinien anderer Forschungsgruppen, welche bereits TetR exprimieren, möglich. Dieser modulare Aufbau macht das Zwei-Vektor-System äußerst flexibel nutzbar und ist deswegen zu bevorzugen.

Als zweiter Vektor wurde zunächst der Vektor pT2B/Puro verwendet, da dieser mit Puromycin einen anderen Selektionsmarker als der von uns zuvor verwendete Sleeping Beauty Donor Vektor pT2/SVNeo für die shRNA-Expressionskassetten innehat. Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Zsuzsanna Izsvák zur Verfügung gestellt. Im Weiteren stellte sich heraus, dass der Vektor für die geplante Anwendung in der Ausgangsform nicht geeignet ist (siehe 4.2.2).

4.2.2.1 Bestimmung der notwendigen Selektionskonzentration an Puromycin

Für die Selektionskonzentration von Puromycin lagen in MM Zelllinien zu diesem Zeitpunkt noch keine Messungen vor. Daher war es nötig zunächst eine sogenannte „Kill-Kurve“ zu erstellen, um die minimale Konzentration ausfindig zu machen, die bei fehlender Resistenz ohne Ausnahme zum Zelltod führt. Hierfür wurden jeweils eine Million Zellen, die aus der normalen Zellkultur der verschiedenen Zelllinien entnommen wurden, in 8-Well-Platten in je 3 ml Medium kultiviert. Neben einer Kontrolle ohne Zugabe von Puromycin, wurden für die verwendeten Zelllinien AMO-1, JJN-3, L-363 und MM.1S die Konzentrationen 5,0 - 2,5 - 1,25 - 0,625 - 0,3125 µg/ml Puromycin verwendet. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 8 Tagen täglich im PI-Annexin V-Puffer mittels FACS gemessen, wodurch jeweils die minimale Antibiotika-Konzentration, bei der alle Zellen abgestorben waren, bestimmt werden konnte.

Für die Zelllinien MM.1S und L-363 führten alle gewählten Konzentrationen zum Zelltod, weshalb es für diese zunächst nicht möglich war, die minimale notwendige Konzentration zu ermitteln. Infolgedessen wurde eine weitere Testreihe mit einer Kontrolle und Proben mit niedrigeren Puromycin-Konzentrationen (0,5 - 0,25 - 0,125 - 0,0625 µg/ml) durchgeführt. Aus diesen Messungen ergaben sich optimale Selektionskonzentrationen für MM.1S und L-363 von

0,5 µg/ml, von 0,625 µg/ml für JJN-3 und von 1,25 µg/ml für AMO-1 bei einem Anwendungszeitraum von 7 Tagen.

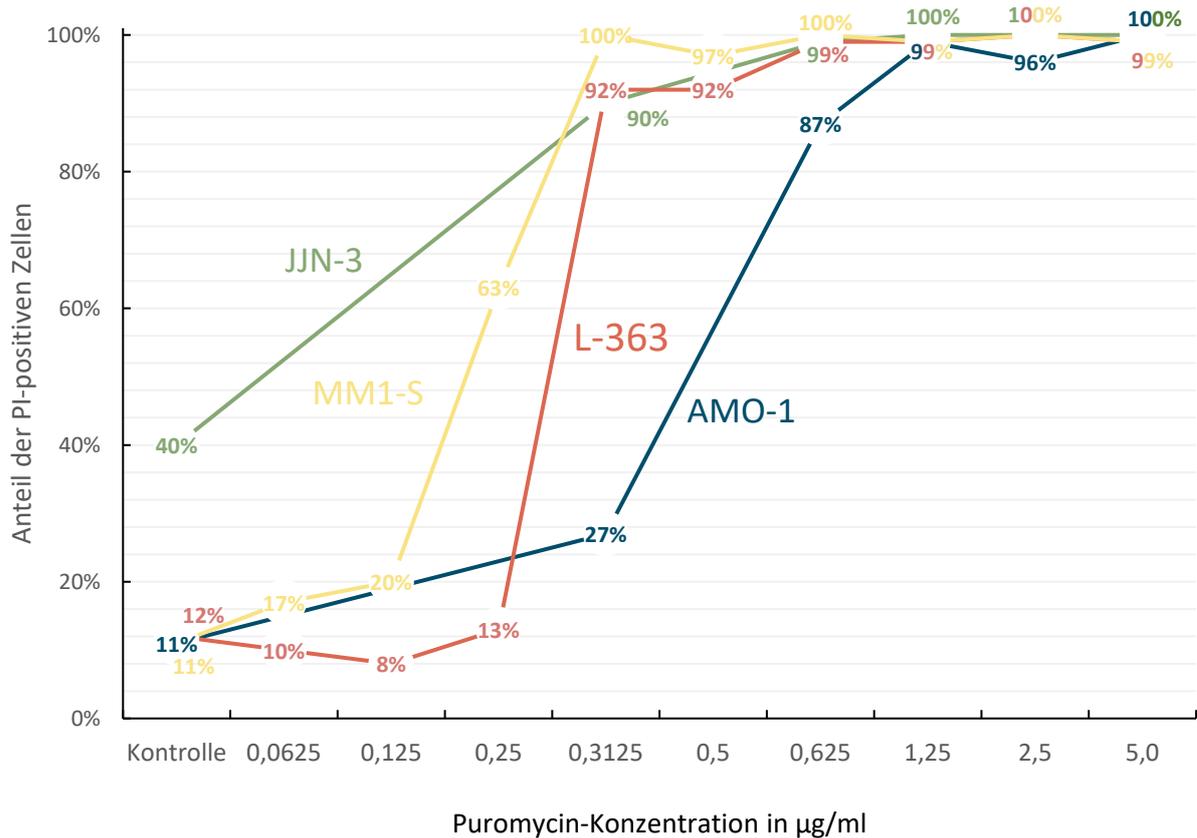


Abbildung 15: Kill Kurve mit Puromycin für verschiedene MM Zelllinien

Täglich wurde mittels FACS-Analyse der Anteil der PI- und Annexin V-positiven Zellen für die jeweiligen Puromycin-Konzentrationen bestimmt. PI-positive Zellen werden hierbei als spätapoptotische/nekrotische Zellen gewertet. In dieser Abbildung werden Ergebnisse aus den beiden Messungen mit höheren und niedrigeren Puromycin-Konzentrationen kombiniert dargestellt. Die Messungen am Tag 7 der Selektion mit Puromycin zeigen, dass alle Zellen der Zelllinien L-363 und MM.1S bei Konzentrationen von 0,5 µg/ml Puromycin und höher vollständig abgestorben sind. Für JJN-3 trifft dies ab einer Konzentration von 0,625 µl/ml und für JJN-3 und AMO-1 ab 1,25 µl/ml zu.

4.2.2.2 Klonierung eines Sleeping Beauty Donor Vektors mit Puromycinresistenz

Der Vektor mit Puromycin-Resistenz sollte zur Proteinexpression (TetR) genutzt werden. Aus diesem Grund wurde zunächst die mit EcoRI geschnittene CMV-Promotor-Kassette in die EcoRI-Schnittstelle von pT2B/Puro einkloniert (siehe **Klonierung 1**).

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2B/Puro
Verdau	EcoRI
Insert	pT2/SVNeo CMV
Verdau	EcoRI
Produkt	pT2B/Puro CMV
Screening	PCR (Primer M13 & CMV-rev)
Verifikation	Sequenzierung (Primer M13)

Klonierung 1: pT2B/Puro zu pT2B/Puro CMV

Initiale Versuche TetR beziehungsweise TetR-Krab mittels pT2B/Puro CMV tTR beziehungsweise tTR-Krab (siehe **Klonierung 2** und **Klonierung 3**) stabil zu exprimieren und somit gleichzeitig funktionell den Knock-down von ERK2 durch pT2/SVNeo BN S2 E2 (siehe **4.3.3**) zu verhindern, blieben erfolglos. Weder konnte TetR beziehungsweise TetR-KRAB im Western Blot nachgewiesen, noch konnte der Knock-down von ERK2 supprimiert werden.

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2B/Puro CMV
Verdau	NheI
Insert	pcDNA3.1(-) tTR
Verdau	XbaI
Produkt	pT2B/Puro CMV tTR
Screening	PCR (Primer CMV-F & tTR3)
Verifikation	Sequenzierung (Primer CMV-F)

Klonierung 2: pT2B/Puro CMV zu pT2B/Puro CMV tTR

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2B/Puro CMV
Verdau	NheI
Insert	pcDNA3.1(-) tTR-KRAB
Verdau	XbaI
Produkt	pT2B/Puro CMV tTR-KRAB
Screening	PCR (Primer CMV-F & tTRKRAB3)
Verifikation	Sequenzierung (Primer CMV-F)

Klonierung 3: pT2B/Puro CMV zu pT2B/Puro CMV tTR-KRAB

Um möglichst schnell verschiedene Vektoren funktionell testen zu können, wurden beide Vektoren zunächst gleichzeitig transfiziert. Anschließend wurde die Selektion mit beiden

Antibiotika gleichzeitig bei den für die Zelllinie ermittelten toxischen Konzentrationen 14 Tage lang durchgeführt. Durch die erfolgreiche Selektion von vitalen Zellen konnte die zusätzliche Erkenntnis gewonnen werden, dass auch eine Doppelselektion mit Geneticin und Puromycin möglich ist. Da im Rahmen der Problemanalyse pT2B/Puro im Verlauf als ungeeignet identifiziert werden konnte, wird hier auf die detaillierte Darstellung der durchgeführten Herangehensweise zur Etablierung der stabilen TetR-Expression verzichtet. Dies wird im Folgenden unter **Abschnitt 4.4** ausführlich dargelegt. Der Vektor pT2B/Puro war zuvor noch nicht in unserer Forschungsgruppe verwendet worden. Daher sollte zum Ausschluss dieses Vektors als Ursache für die mangelnde TetR-Expression dessen Funktion durch die Nutzung zur EGFP-Produktion verifiziert werden.

Hierfür wurde die CMV-EGFP Kassette mittels EcoRI aus pT2/SVNeo CMV EGFP ausgeschnitten und in den mit EcoRI geschnittenen pT2B/Puro Vektor inkloniert (siehe **Klonierung 4**) und anschließend unter Standardbedingungen in L-363-Zellen transfiziert.

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2B/Puro
Verdau	EcoRI
Insert	pEGFP-N3-mod
Verdau	EcoRI
Produkt	pT2B/Puro CMV EGFP
Screening	PCR (Primer CMV-REV & pT2-3')
Verifikation	Sequenzierung (Primer M13)

Klonierung 4: pT2B/Puro zu pT2B/Puro CMV EGFP

Hier zeigte sich in der FACS-Analyse zunächst eine EGFP-Expression, welche aber im zeitlichen Verlauf zunehmend geringer wurde. Unter Puromycin-Selektion bildete sich nach 10 Tagen eine zum allergrößten Teil EGFP-negative und PI-negative Population heraus (siehe **Abbildung 16**). Dementsprechend musste die Schlussfolgerung gezogen werden, dass diese Population zwar stabil die Puromycin-Resistenz exprimiert, nicht aber EGFP. Zum verwendeten Vektor pT2B/Puro existierten bis dahin keine Vektorkarten, welche die repetitiven Erkennungssequenzen IR/DR, die die Transposase als Begrenzung für den „cut & paste“-Mechanismus erkennt, abbilden. Zudem waren zu diesem Zeitpunkt in unserer Forschungsgruppe deren genaue Sequenzen noch nicht bekannt.

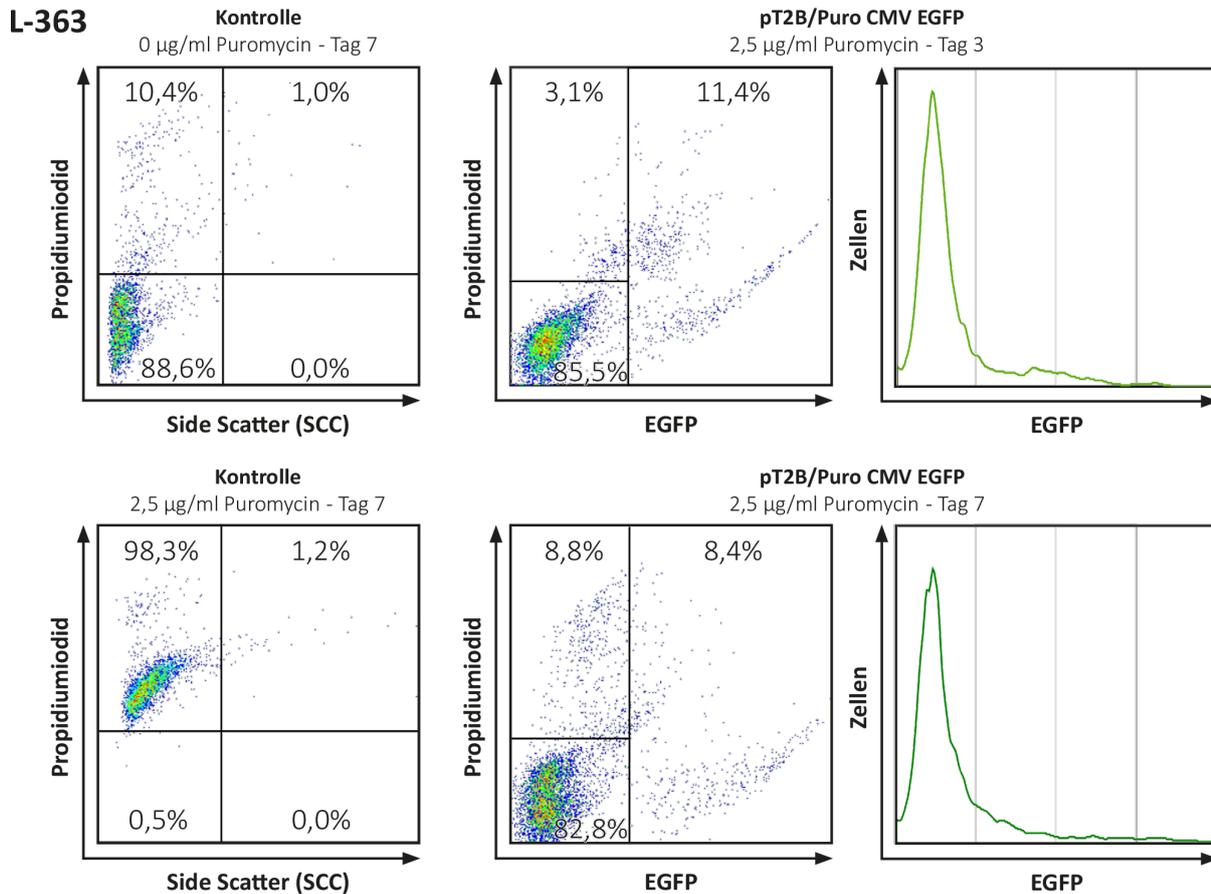


Abbildung 16: FACS-Analyse von stabil mit pT2B/Puro CMV EGFP transfizierten L-363 Zellen

In der FACS-Analyse der stabil mit dem Vektor pT2B/Puro CMV EGFP transfizierten Zellen stellt sich nach Selektion mit Puromycin für 7 Tage heraus, dass sich hauptsächlich eine EGFP-negative und PI-negative Population bildet (unten rechts). Erwartungsgemäß sollte diese Population – analog zu Versuchen mit dem Vektor pT2/SVNeo CMV EGFP – ungefähr 95% der gemessenen Zellen darstellen. Dies lässt vermuten, dass die EGFP-Kassette nicht stabil ins Genom der Zellen transfiziert wird. Abgesehen von zufälligen - nicht durch das SBTS vermittelten - Integrationen der EGFP- und Puromycin- Expressionskassetten ins Genom ist somit die EGFP-Expression allein auf die transiente Expression direkt vom frisch elektroporierten Plasmid zurückzuführen (oben rechts). Die Kontrollzellen werden erwartungsgemäß komplett abgetötet (linke Seite).

Nachdem durch Recherche in den Veröffentlichungen von Ivics *et al.* die genaue Sequenz der IR/DR ermittelt werden konnte, zeigte die Analyse des Vektors, dass die verwendete EcoRI-Schnittstelle außerhalb der repetitiven Sequenzen (IR/DR) liegt (siehe **Abbildung 17**). Somit wird die CMV-Kassette nicht stabil in das Genom der Zelle integriert und es findet nur eine transiente EGFP-Expression statt. Im Kontrast dazu wird die Puromycin-Kassette jedoch stabil ins Genom integriert, wodurch die Selektion mit Puromycin erfolgreich durchgeführt werden kann. Die Recherche zur ursprünglichen Verwendung von pT2B/Puro zeigte, dass dieser von Kuzmin *et al.* (2010) nur zur alleinigen Validierung des SBTS durch Puromycin-Resistenzexpression verwendet wurde und nicht für die Expression anderer Komponenten. Hierfür besitzt der Vektor auch keine verwendbaren Restriktionsschnittstellen.

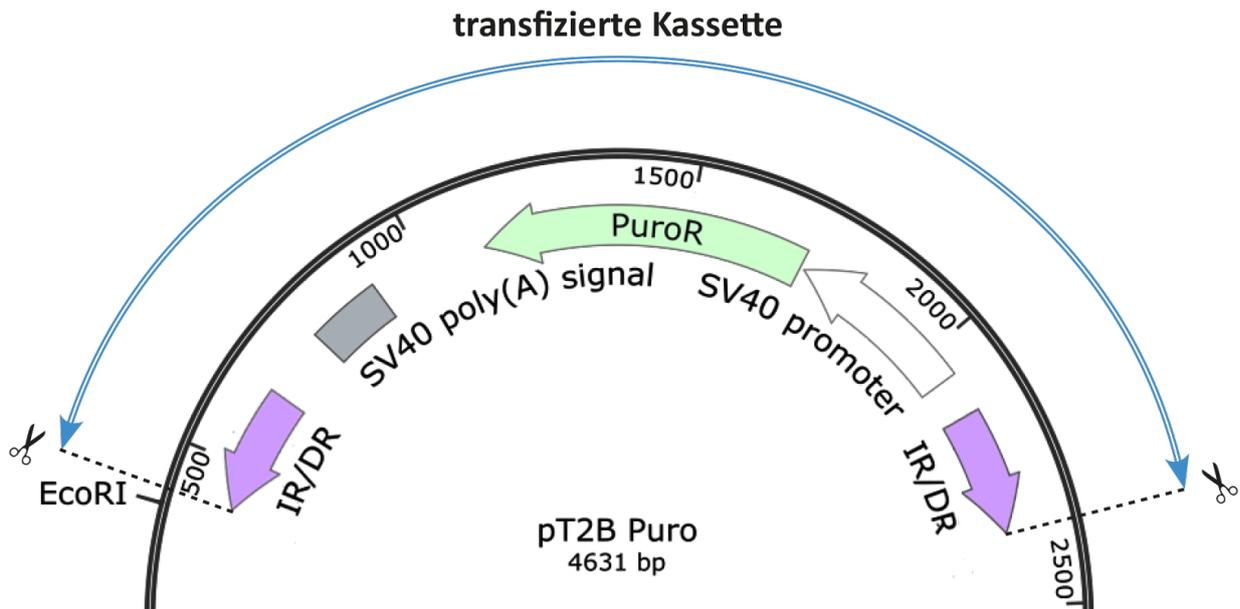


Abbildung 17: Transfizierte Kasette und EcoRI-Schnittstelle des Vektors pT2B/Puro

Die EcoRI-Schnittstelle liegt außerhalb der Erkennungssequenzen (IR/DR) für die Sleeping Beauty Transposase. Somit wird die Kasette, die in die EcoRI-Schnittstelle einkloniert wird, nicht ausgeschnitten und auch nicht stabil ins Genom der Zelle integriert. Nur die mittels SV40-Promotor exprimierte Puromycin-Resistenz wird stabil transfiziert.

Dies machte es notwendig, einen eigenen geeigneten Sleeping Beauty Vektor mit Puromycin-Resistenz zu konstruieren. Hierfür wurde mit zwei Klonierungsschritten ein Vektor mit Puromycin-Resistenz aus dem existierenden Vektor pT2/SVNeo BN abgeleitet. Die IR/DR-Sequenzen sind hierbei beim Vektor pT2B/Puro auf beiden Seiten identisch. Diese entsprechen der IR/DR-Sequenz auf der 3'-Seite des Vektors pT2/SVNeo. Die IR/DR-Sequenz der 5'-Seite des Vektors pT2/SVNeo unterscheidet sich in 85 bp von der IR/DR-Sequenz der 3'-Seite. Die weitere Recherche ergab, dass unterschiedliche Sequenzen auf beiden Seiten den Normalzustand widerspiegeln (Ivics *et al.*, 1997). Der verwendete Ausgangsvektor pT2/SVNeo BN enthält im Gegensatz zum Vektor pT2/SVNeo NB die Polylinkersequenz mit den EcoRI und BstXI-Schnittstellen in entgegengesetzter Orientierung. Zunächst wurde durch Verdau mit NotI und BsmI die SV40-Expressionskasette für die Neomycin-Resistenz ausgeschnitten und der Vektor religiert (siehe **Klonierung 5**). Das Plasmid pT2 BN stellt damit einen Sleeping Beauty Donor „Basis“-Vektor ohne Antibiotikaresistenz dar. Das Puromycin-Resistenzgen wurde mittels PCR aus dem Plasmid pT2B/Puro vervielfältigt und in den Vektor pT2 BN einkloniert. Die PCR-Primer wurden so gestaltet, dass am 5'-Ende des PCR-Fragments eine NheI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine XbaI-Schnittstelle entsteht. Auf diese Weise wurde beim Einklonieren des Fragments in den mit XbaI linearisierten Vektor nur an der 3'-Seite eine XbaI-Schnittstelle regeneriert. Um diesen Vektor vorsichtshalber sofort funktionell zu validieren, wurde erneut die Expression von EGFP angewendet.

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2/SVNeo BN
Verdau	NotI, BsmI
Produkt	pT2 BN
Screening	PCR (Primer pT2-5 & T3)
Verifikation	Sequenzierung (Primer pT2-5)

Klonierung 5: pT2/SVNeo BN zu pT2 BN

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2 BN
Verdau	XbaI
Insert	pT2B/Puro
PCR	Primer Puro-Xba-3' & Puro-Nhe-3'
Verdau	XbaI und NheI
Produkt	pT2 BN SVPuro
Screening	PCR (Primer pT2-5' & SV-Puro-3')
Verifikation	Sequenzierung (Primer pT2-5)

Klonierung 6: pT2 BN zu pT2 BN SVPuro

Daher wurde in die EcoRI-Schnittstelle des neu entwickelten Vektors die CMV-EGFP Kasette einkloniert (siehe **Klonierung 7**). Der Vektor pT2 BN SVPuro CMV EGFP wurde in AMO-1-Zellen transponiert. FACS-Messungen über einen Zeitraum von zwei Wochen zeigten die erfolgreiche Etablierung einer stabil EGFP-positiven Zellenkultur nach Puromycinselektion an. Auf diese Weise wurde ein Vektor mit Puromycin-Resistenz äquivalent zum Vektor pT2/SVNeo BN mit Aminoglykosid-Resistenz geschaffen. Um einen universellen CMV-getriebenen Expressionsvektor für mRNAs/Proteine zu bekommen, erfolgte außerdem die Klonierung von pT2 BN SVPuro CMV (siehe **Klonierung 8**), in dem sich statt des kodierenden Bereichs für EGFP ein Polylinker befindet.

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2 BN SVPuro
Verdau	EcoRI
Insert	pT2/SVNeo CMV EGFP
Verdau	EcoRI
Produkt	pT2 BN SVPuro CMV EGFP
Screening	PCR (Primer pT2-5 & CMV-rev)
Verifikation	Sequenzierung (Primer pT2-5)

Klonierung 7: pT2 BN SVPuro zu pT2 BN SVPuro CMV EGFP

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2 BN SVPuro
Verdau	EcoRI
Insert	pT2 BN SVPuro CMV
Verdau	EcoRI
Produkt	pT2 BN SVPuro CMV
Screening	PCR (Primer pT2-5 & CMV-rev)
Verifikation	Sequenzierung (Primer pT2-5)

Klonierung 8: pT2 BN SVPuro zu pT2 BN SVPuro CMV

Ausgehend von dem hier etablierten Plasmid pT2 BN SVPuro konnte darüber hinaus ein Protein-Expressionsvektor mit CAG-Promotor entwickelt werden. Dieser ermöglicht eine dauerhafte, adäquate TetR-Expression in MM Zellen. Für die weiteren Details der Notwendigkeit einen anderen Promotor zu nutzen, sei auf **Abschnitt 4.4** verwiesen. Auch eine Etablierung einer stabilen shRNA-Expression mit dem SBTS ist für ein funktionierendes Tet-On Knock-down System notwendig. Aus thematischen Gründen ist diese Etablierung im folgenden Kapitel unter **Abschnitt 4.3.3** zu finden, da dies zunächst die Existenz von funktionalen H1-Promotor-Kassetten voraussetzt. Deren Prinzip und Entstehung wird im folgenden Kapitel erläutert.

4.3 H1-Promotor-Kassetten zur stabilen und induzierbaren shRNA-Expression

Um das Ziel einer stabilen und regulierbaren Expression mehrerer shRNAs in Zellen des MM zu erreichen, sollten die Kassetten mit den H1-Promotoren in einen Vektor des Sleeping Beauty Transposon Systems überführt werden, um zunächst die Praktikierbarkeit der Selektion und Effektivität einer konstitutiven shRNA-Expression exemplarisch zu beurteilen.

Entsprechend Punkt 2 der Konzeption (siehe 4.1) wurde dann im nächsten Schritt das Ziel einer induzierbaren shRNA-Expression verfolgt (konzeptionelle Begründung, siehe 1.2.4). Hierfür wurde der H1-Promotor des pSUS-Vektors derart modifiziert, dass er in einem Tet-On-System nutzbar ist. Daraus resultiert, dass die Transkription von shRNA erst nach Zugabe eines Tetrazyklins beginnt. Zuvor wird diese durch die Bindung des Tet-Repressor-Proteins (TetR) unterbunden. Die Veröffentlichungen von van de Wetering *et al.* (2003) und Henriksen *et al.* (2007) dienen hierfür als Orientierungshilfe.

4.3.1 Restriktionsenzym-basiertes shRNA-Kassettensystem

Dieser Teil der Arbeit beruht auf dem von Dr. Thorsten Stühmer entworfenen und von Roth etablierten Restriktionsenzym-basierten shRNA-Kassettensystem auf Grundlage des pSUS-Vektors. Für das weitere Verständnis ist eine Kenntnis der detaillierten Funktionsweise hiervon notwendig, sodass diese nachfolgend dargelegt wird.

Für die transienten shRNA-vermittelten Knock-down Versuche war in unserer Forschungsgruppe bereits der pSUPER-Vektor (Brummelkamp *et al.*, 2002) verwendet worden. Um eine stabile Integration des H1-Promotors aus dem pSUPER-Vektor zu ermöglichen, mussten sowohl der pSUPER-Vektor als auch das Sleeping Beauty Transposon System derart angepasst werden, dass diese bezüglich der verwendeten Klonierungsschnittstellen untereinander kompatibel sind. Aufgrund der Vorgabe, beliebig viele shRNA-Expressionskassetten auf einem einzigen Plasmid zusammenzuführen, konnte der pSUPER-Vektor nicht unverändert verwendet werden. Dies

resultierte in der Konstruktion der Vektoren pSUS, pSUSTER und pSUSTER2, welche für die Einklonierung in das Sleeping Beauty Transposon System kompatibel sind.

Der pSUPER-Vektor wurde zunächst derart modifiziert, dass über eine sich selbst regenerierende Restriktionsenzym-Schnittstelle mehrere H1-Promotor-Kassetten (siehe auch 1.2.2) in einen Vektor einkloniert werden können (siehe **Abbildung 18**). Der hierfür konstruierte Vektor pSUS nutzt zum Einklonieren von shRNA-kodierenden dsDNA-Oligonukleotiden hinter dem H1-Promotor eine BglII- und eine SacI-Schnittstelle und zum Ausschneiden der gesamten H1-Promotor-Kassette die Restriktionsenzyme BstXI und SacI.

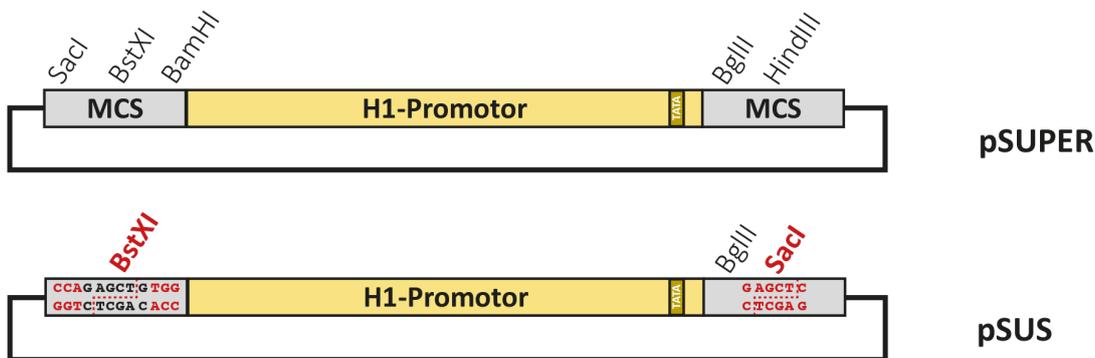


Abbildung 18: Unterschiede zwischen dem pSUS-Vektor und Ursprungsvektor pSUPER

Aus dem pSUPER-Vektor wurde durch Mutation der pSUS-Vektor konstruiert. Hierbei wurde zum einen die Sequenz der BstXI-Schnittstelle derart verändert, dass der entstehende Überhang SacI-kompatibel ist. Im Zuge dessen wurden die stromaufwärts vom H1-Promotor gelegene SacI- und BamHI-Schnittstelle entfernt. Zum anderen wurde die stromabwärts vom H1-Promotor gelegene HindIII-Schnittstelle in eine SacI-Schnittstelle umgewandelt.

Die BstXI-Schnittstelle wurde so konstruiert, dass bei deren Restriktionsverdau ein SacI-kompatibler Überhang entsteht. Somit kann die durch einen Verdau mit BstXI und SacI entstandene Kasette in einen anderen nur mit BstXI geschnittenen pSUS-Vektor einkloniert werden. Dies wird durch eine Besonderheit der BstXI-Schnittstelle ermöglicht, welche zwischen der palindromen Erkennungssequenz 6 frei wählbare Basenpaare aufweist. Die dazu gewählten ersten 5 Basen entsprechen der SacI-Schnittstelle (GAGCTC), doch wurde als 6. Base ein Guanin anstelle eines Cytosins verwendet. Auf diese Weise entsteht beim Schneiden mit BstXI zwar ein SacI-kompatibler-Überhang, jedoch werden beim Einklonieren einer mit BstXI und SacI geschnittenen shRNA-Expressionskasette aus einem anderen pSUS-Vektor an der Verknüpfungsstelle beider Kassetten weder die BstXI noch die SacI-Schnittstelle regeneriert. Am 5'-Ende hingegen wird die SacI-kompatible BstXI-Schnittstelle sehr wohl regeneriert, während die am weitesten 3' gelegene SacI-Schnittstelle unangetastet bleibt. Das entstandene Doppel-shRNA Expressionskassetten-Fragment ist daher - wie vorher die Einzelkassetten - wiederum von

singulären BstXI- und SacI-Schnittstellen flankiert. Die Nutzung des Kassettensystems auf Basis des Vektors pSUS ist in **Abbildung 19** dargestellt.

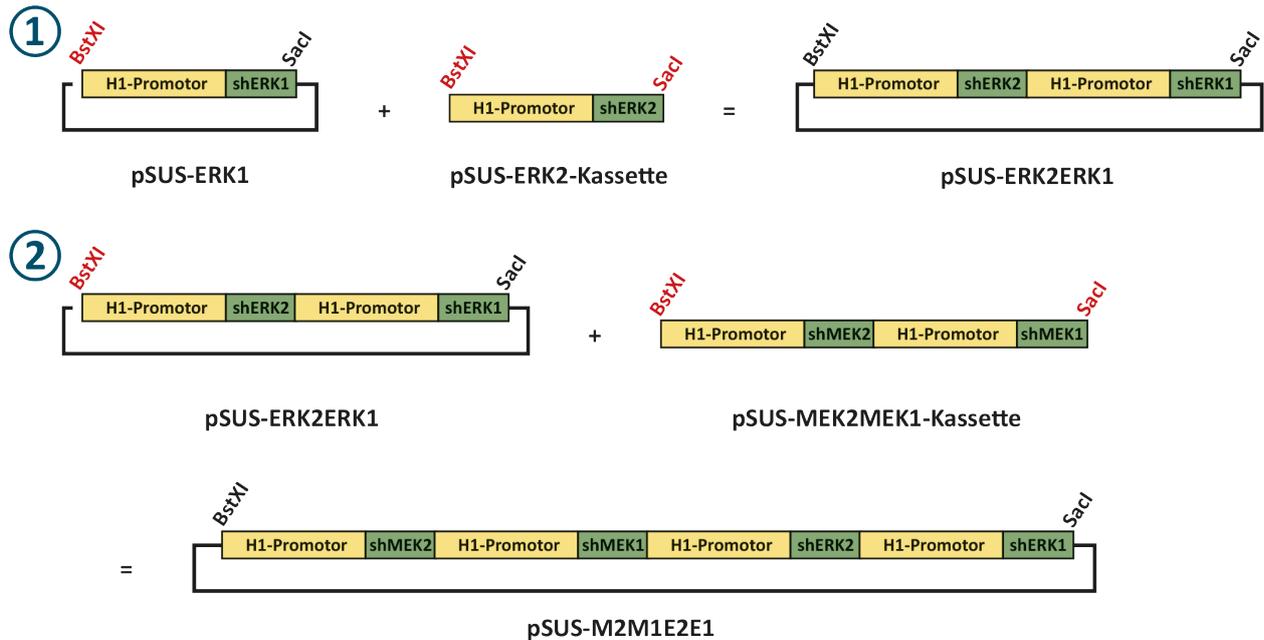


Abbildung 19: Restriktionsenzym-basiertes Kassettensystem mit dem Vektor pSUS zur multiplen shRNA-Expression

In dieser Abbildung ist exemplarisch die Einklonierung ① einer einzelnen H1-Promotor-Kassette aus pSUS-ERK2 in den shRNA-Expressionsvektor pSUS-ERK1 dargestellt. Es entsteht der Vektor pSUS-ERK2ERK1, welcher sowohl shRNAs mit dem Ziel ERK1 als auch ERK2 exprimiert. Darüber hinaus ist die Klonierung ② der Kassette aus pSUS-MEK1MEK2 in pSUS-ERK2ERK1 zu pSUS-M2M1E2E1 dargestellt, wodurch ein shRNA-Expressionsvektor entsteht, der gegen vier verschiedene Ziel-mRNAs gerichtet ist. Hierbei sind die verwendeten Restriktionschnittstellen rot hervorgehoben. Aufgrund der Sequenzwahl der BstXI-Schnittstelle wird die BstXI-Schnittstelle regeneriert. Zwischen den einzelnen H1-Promotor-Expressionskassetten bilden sich hierbei keine neuen Schnittstellen. Dies macht ein Kassettensystem von H1-Promotor-Expressionskassetten möglich, die in beliebiger Weise und quasi unbegrenzt hintereinander kloniert werden können. Außerdem bleibt die Gesamtheit der shRNA-Expressionskassetten jederzeit durch die 5'-gelegene SacI-kompatible BstXI-Schnittstelle, und die 3'-gelegene SacI-Schnittstelle flankiert, die somit ein Ausschneiden und weiteres Subklonieren zum Beispiel in einen geeigneten Sleeping Beauty Vektor erlauben. Im Gegensatz zum pSUPER-Vektor bietet der pSUS-Vektor somit die Möglichkeit mehrere shRNAs von einem Vektor zu exprimieren.

① In einen mit den Restriktionsenzymen **BstXI** geschnittenen Vektor pSUS-ERK2 kann eine aus einem anderen pSUS-Vektor ausgeschnittene pSUS-ERK2-Kassette einkloniert werden.

② In einen mit den Restriktionsenzymen **BstXI** geschnittenen Vektor pSUS-ERK2ERK1 kann eine aus einem anderen pSUS-Vektor ausgeschnittene pSUS-MEK1MEK2-Kassette einkloniert werden. Die Klonierung von pSUS-MEK1MEK2 erfolgt durch die Einklonierung der pSUS-MEK1-Kassette in pSUS-MEK2 äquivalent zu ①.

Sowohl in ① als auch ② wird die Kassette mit **BstXI** und **SacI** ausgeschnitten, wodurch auf beiden Seiten SacI-kompatible Überhänge entstehen.

Für pSUS war in mehreren Versuchen von Roth die Gleichwertigkeit der Knock-Down-Funktionalität zu pSUPER nachgewiesen worden (Fink *et al.*, 2018) und wird im Folgenden als Grundlage vorausgesetzt. Durch Ersetzen des H1-Promotors im pSUS-Vektor durch den H1-Promotor des pTER-Vektors (van de Wetering *et al.*, 2003), welcher sich durch eine TetO-Sequenz 3' der TATA-Box vom H1-Promotor im pSUS-Vektor unterscheidet, wurde der erste potentiell induzierbare und Kassettensystem-fähige shRNA-Expressionsvektor hergestellt. Dieser Vektor wird als pSUSTER bezeichnet (Vektorkarte: **S. 157**).

Zur Herstellung von pSUSTER wurden die Vektoren pTER und pSUS mit BglII und AatII geschnitten und das circa 200 bp lange H1-Promotor-Fragment aus pTER in pSUS einkloniert (siehe **Klonierung 9**). Da nur eine TetO-Sequenz für eine vollständige Repression der shRNA-Expression im nicht-induzierten Zustand als zumeist unzureichend („Leakiness“) beschrieben wurde (van de Wetering *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007), wurde durch Mutation von pSUSTER eine weitere TetO-Sequenz vor der TATA-Box generiert (siehe **Mutation 1**). Dieser Vektor wurde aufgrund seiner zwei TetO-Sequenzen pSUSTER2 (=pS2) genannt (Vektorkarte: **S. 158**; Fink *et al.* (2018)).

Restriktion & Ligation	
Vektor	pSUS
Verdau	BglII & AatII
Insert	pTER
Verdau	BglII & AatII
Produkt	pSUSTER
Verifikation	Sequenzierung (Primer T7)

Klonierung 9: pSUS zu pSUSTER

Mutation	
Vektor	pSUSTER
Oligos	MUT-S2
Produkt	pSUSTER2 (=pS2)
Verifikation	Sequenzierung (Primer T7)

Mutation 1: pSUSTER zu pSUSTER2

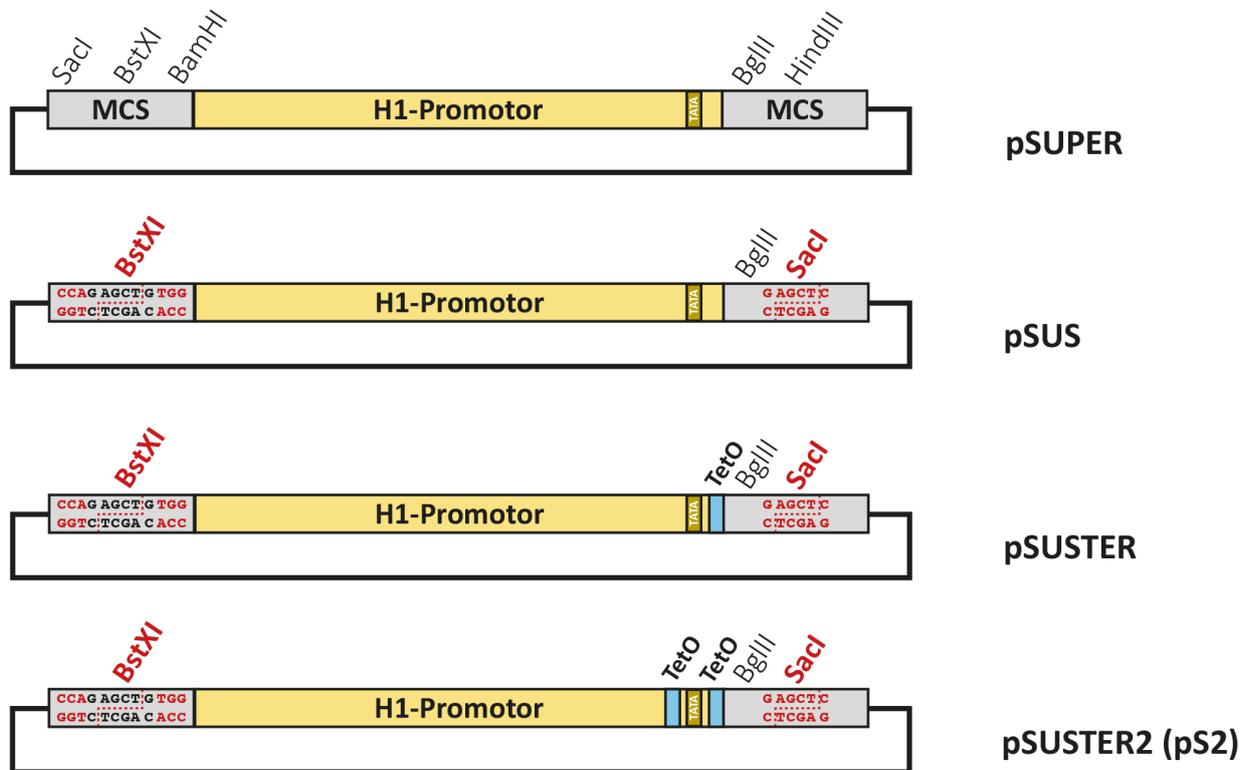


Abbildung 20: Aufbau der Vektoren pSUPER, pSUS, pSUSTER und pSUSTER2

Übersicht der Veränderungen des pSUPER-Vektors bis hin zum pSUSTER2-Vektor. Dem pSUS-Vektor wurden ein beziehungsweise zwei TetO-Sequenzen hinzugefügt, um eine induzierbare Version des H1-Promotors zu erzeugen. Dieser kann ebenfalls im etablierten pSUS-Kassettenystem verwendet werden. Der Vektor pSUSTER besitzt eine TetO-Sequenz nach der TATA-Box und wurde bereits von van de Wetering et al. (2003) untersucht. Eine weitere Version mit zwei TetO-Sequenzen stellt der pSUSTER2-Vektor dar, der eine TetO-Sequenz genau wie der pSUSTER-Vektor nach der TATA-Box besitzt, aber zusätzlich noch eine weitere TetO-Sequenz vor der TATA-Box. Diese Konfiguration des H1-Promotors wurde von Henriksen et al. (2007) als der beste induzierbare Promotor zur shRNA-Expression identifiziert.

Die Sequenz und Position des TetO für das Design der Mutations-DNA-Oligonukleotide wurde hierbei von Henriksen *et al.* (2007) übernommen. Für die modifizierten, induzierbaren H1-Promotoren, welche in pSUSTER und pSUSTER2 vorliegen, konnte von van de Wetering *et al.* (2003) und Henriksen *et al.* (2007) in verschiedenen Zelllinien bereits gezeigt werden, dass die Knock-down Effizienz bei Induktion genauso gut ist wie beim ursprünglichen, unmodifizierten H1-Promotor in pSUPER. Da gemäß Literaturrecherche noch keine Erkenntnisse über die Nutzung in MM Zelllinien sowohl für transiente als auch stabile Knock-downs mit diesen beiden induzierbaren H1-Promotoren vorlagen, wurde zunächst die potenzielle Knock-down Effizienz für beide Vektoren in MM Zellen validiert. Hierfür wurde in transient transfizierten Zellen der unveränderten Zelllinien (also in Abwesenheit des TetR-Proteins) semiquantitativ die Tiefe des konstitutiven Knock-downs von ERK2 durch die Vektoren pSUSTER beziehungsweise pSUSTER2 mit der von pSUS und pSUPER verglichen.

4.3.2 Äquivalenz des transienten Knock-downs verschiedener Modifikationen des H1-Promotors

Aufgrund der früheren Verfügbarkeit des Vektors pSUSTER-ERK2 wurde zunächst eine transiente Transfektion mit diesem im Vergleich zu pSUS-ERK2 in der Zelllinie L-363 durchgeführt. Hierfür wurden L-363 Zellen mit dem Plasmid pCD4 Δ zur späteren Säulenaufreinigung dem Plasmid pEGFP-N3 zur Beurteilung der Elektroporationseffizienz und dem Plasmid pSUS-ERK2 beziehungsweise pSUSTER-ERK2 elektroporiert. Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz nur mit pCD4 Δ und pEGFP-N3 transfiziert. Aufgereinigte transfizierte Zellen wurden an Tag 3 nach Elektroporation geerntet und per Western Blotting auf die Expression von ERK2 hin untersucht. Äquivalent wurde dies für pSUSTER2, nachdem dessen Klonierung abgeschlossen war, mit JJN-3 Zellen durchgeführt. Es wurde hier, um eine Übersicht und größere vertikale Validität zu erreichen, die normale Zellkultur mit pSUPER ohne shRNA, pSUPER-ERK2, pSUS-ERK2 und pSUSTER2-ERK2 verglichen. Zusätzlich wurde in JJN-3 ein Vergleich von pSUPER ohne shRNA, pSUPER-ERK2, pSUS-ERK2, pSUSTER-ERK2 und pSUSTER2-ERK2 durchgeführt. Diese Versuche zeigten homogene Knock-down Qualitäten aller verwendeten Vektoren. In **Abbildung 21** sind die Western Blots der beiden Versuche mit JJN-3 Zellen dargestellt. Der hier nicht dargestellte Versuch mit L-363 Zellen führte zu demselben Ergebnis mit gleichwertigem Knock-down aller untersuchten Vektoren.

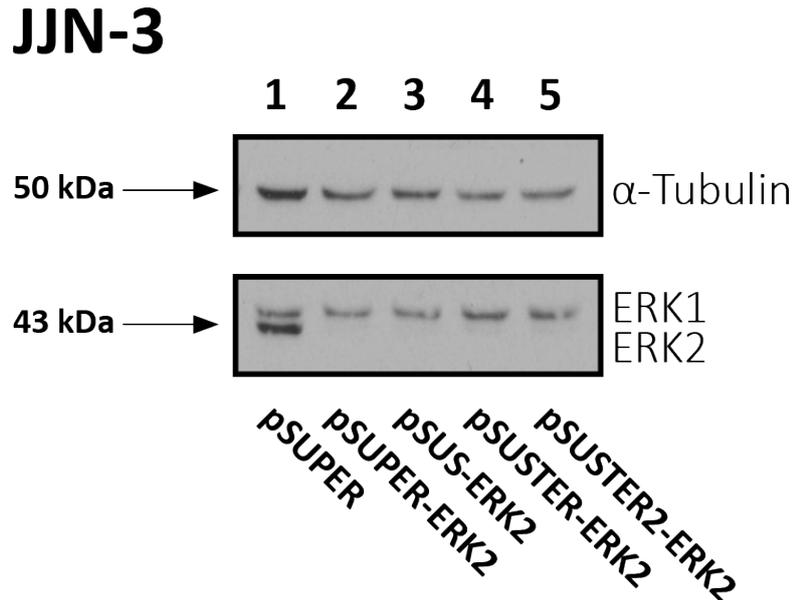


Abbildung 21: Vergleich des Knock-downs von ERK2 mit pSUPER, pSUS, pSUSTER und pSUSTER2 in JJN-3

Der Knock-down von ERK2 durch pSUPER, pSUS, pSUSTER und pSUSTER2 (Bahnen 2 bis 5) jeweils mit derselben shRNA gegen ERK2 stellt sich sowohl in der Zelllinie L-363 (hier nicht dargestellt) als auch in der Zelllinie JJN-3 als gleichwertig heraus. Alle verwendeten Konstrukte zeigen einen sehr guten Knock-down von ERK2 gegenüber der Kontrolle von Zellen der normalen Zellkultur beziehungsweise bei Transfektion mit dem leeren pSUPER-Vektor (Bahn 1). Aufgrund dieser Erkenntnisse lässt sich annehmen, dass die durchgeführten Veränderungen am H1-Promotor zu keinen Einschränkungen der Knock-down Qualität in den untersuchten MM Zelllinien führen.

4.3.3 Stabile Expression von shRNA und Knock-down in MM Zellen am Beispiel von ERK2

Der nächste Schritt bestand – äquivalent zur stabilen EGFP-Expression – in der Etablierung der konstitutiven shRNA-Expression durch die stabile Integration von H1-Promotoren mit dem SBTS. Anschließend sollte zunächst untersucht werden, wie lange der shRNA-vermittelte Knock-down unvermindert oder aber mit Einschränkungen anhält. Als Zielproteine für die Etablierung des shRNA-Kassettensystems waren im transienten Rahmen in der Promotionsarbeit von Roth bereits Komponenten des mitogenaktivierten Protein-Kinase (MAPK)-Signalwegs ausgewählt worden. Dieser trägt zur Regulierung der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation und der Apoptose bei (Lippman und El-Naggar, 2012) und ist dabei einer der am besten untersuchten Signalwege überhaupt (Molina und Adjei, 2006). Bei einer Überaktivierung besitzt der Signalweg eine onkogene Wirkung. In bis zu 50 % aller MM können initial (Heuck et al., 2015) aktivierende Mutationen des mitogenaktivierten Protein-Kinase (MAPK)-Signalwegs nachgewiesen werden. Auch in anderen Malignomen können in 30 % der Fälle Mutationen dieses Signalwegs nachgewiesen werden (Garnett und Marais, 2004). Diese Mutationen betreffen hierbei häufig das G-Protein Ras oder die Proteinkinase Raf (Molina und Adjei, 2006), welche die aktivierenden Schritte des Signalweges vor MEK und ERK darstellen (Lippman und El-Naggar, 2012; Xu *et al.*, 2001). Der Ablauf der intrazellulären Signalweiterleitung und Wirkung des MAPK-Wegs sind in **Abbildung 22** schematisch abgebildet.

Die für spätere Knock-downs gewählten Proteine sind die beiden Isoformen MEK1 (MAP2K1) und MEK2 (MAP2K2) der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinase (MEK) sowie die beiden Isoformen ERK1 (MAPK3) und ERK2 (MAPK2) der Extrazellulärsignal-regulierten Kinase (ERK). MEK1/2 sind funktional identisch und können somit die im Signalweg folgenden ERK1/2 redundant aktivieren (Aoidi *et al.*, 2016).

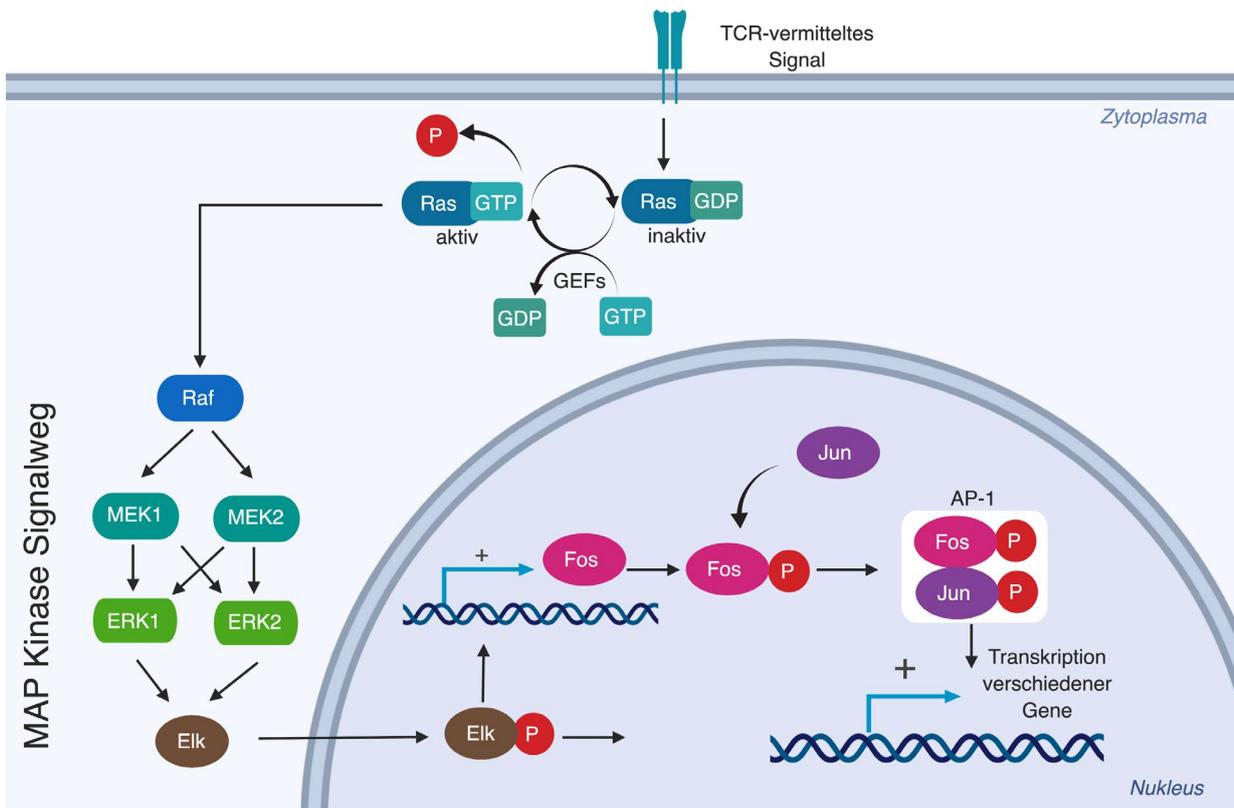


Abbildung 22: Signaltransduktion des mitogenaktivierten Protein-Kinase (MAPK)-Signalwegs

Der MAPK-Signalweg wird beispielsweise durch ein T-Zell-Rezeptor (TCR) vermitteltes Signal aktiviert und führt zur Aktivierung des G-Proteins Ras, welches wiederum die Kinase Raf aktiviert. Daraufhin schließt sich die Aktivierung der redundanten Kinasen MEK1 und MEK2 an. Diese führen zur erneut redundanten Aktivierung der Kinasen ERK1 und ERK2. Diese besitzen als Substrat den Transkriptionsfaktor Elk, der zur Freisetzung des weiteren Transkriptionsfaktors Fos führt. Als Fos-Jun-Komplex aktiviert dies die Transkription verschiedenster anderer Gene.

Diese Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com

Da dieser Teil des Signalwegs aus redundanten Zielstrukturen besteht, bietet sich hier die Anwendung mehrerer gleichzeitiger Knock-downs an. Als erstes Knock-down Ziel wurde ERK2 gewählt, da hier bereits ausgiebig Erfahrung mit transienten Knock-downs existierte und sich in allen verwendeten Zelllinien stets eine sehr gute Suppression mit der etablierten shRNA-Sequenz gezeigt hatte. Da außerdem die verwendeten Antikörper sowohl das ERK2 wie auch das ERK1 Protein erkennen, ist quasi eine intrinsische Ladekontrolle für die Beurteilung der spezifischen shRNA-Wirkung vorhanden. Zudem konnten Chatterjee *et al.* (2004) sowie Zhang und Fenton (2002) durch Verwendung von pharmakologischen MEK1/MEK2-Inhibitoren zeigen, dass auch eine praktisch vollständige Inhibition des gesamten MAPK-Signalwegs auf der Ebene von MEK keinen kurz- bis mittelfristigen Einfluss auf das Überleben von MM Zellen hat, was für die Interpretation aller transienten und konstitutiv stabilen Knock-down-Experimente eine wichtige Voraussetzung ist. Der theoretische Ablauf des stabilen Knock-downs von ERK2 in MM Zellen ist in **Abbildung 23** schrittweise wiedergegeben.

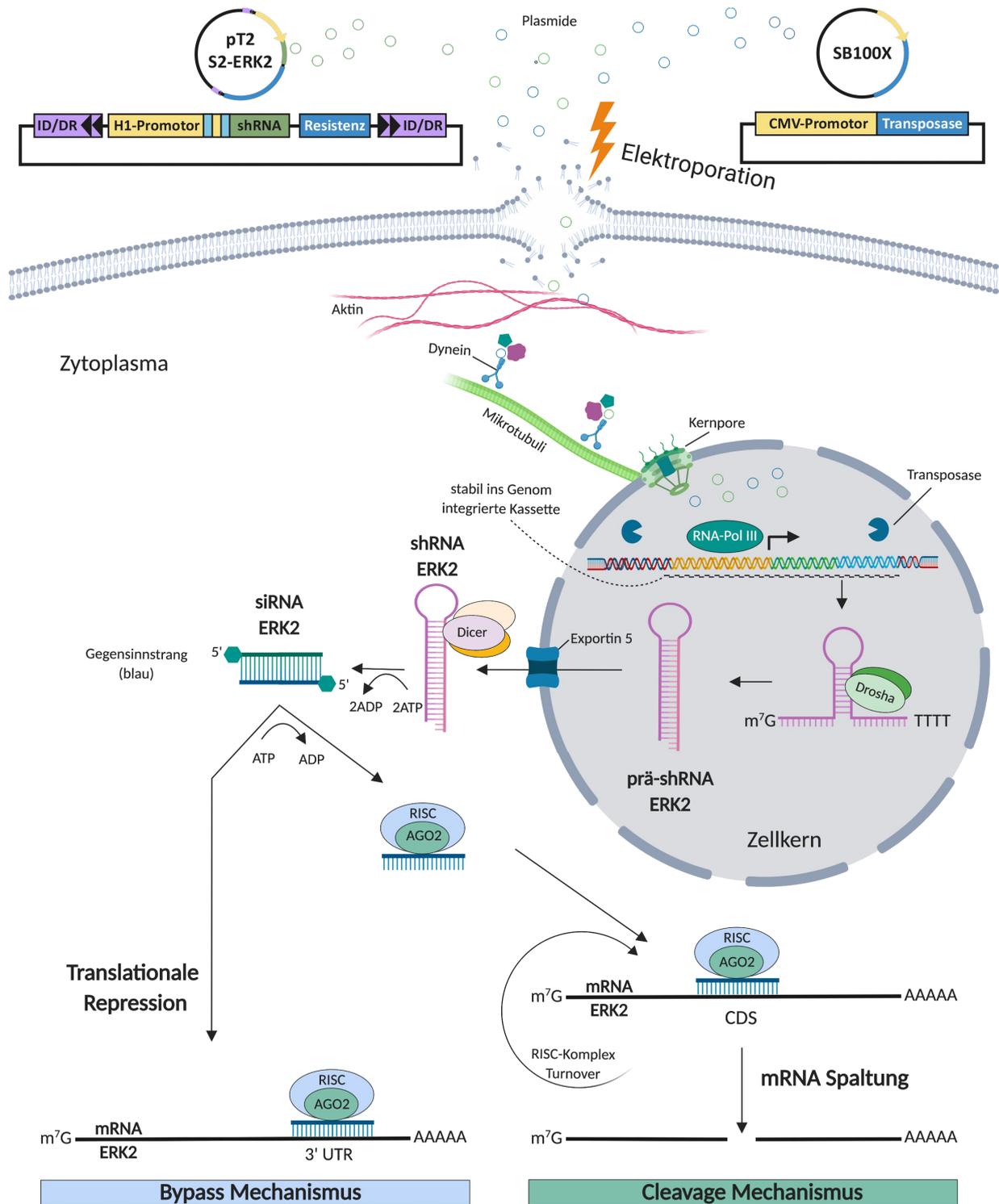


Abbildung 23: Stabiler shRNA-vermittelter Knock-down von ERK2 mit dem Sleeping Beauty Transposon System
 Durch Elektroporation wird das Expressionsplasmid für die Sleeping Beauty Transposase und der Sleeping Beauty Donor Vektor mit der H1-Promotor-Kassette aus pSUS, pSUSTER oder pSUSTER2 in die Zelle eingebracht. Durch die Transposase erfolgt die stabile Integration der H1-Promotor-Kassette ins Genom der Zelle. Anschließend erfolgt durch die RNA-Polymerase III die Expression der RNA, die durch weitere Schritte zu shRNA und dann zu siRNA prozessiert wird (siehe auch **Abbildung 8**). Daraufhin schließt sich dann der Knock-down durch mRNA Spaltung oder translationale Repression an. Die erfolgreich stabil transfizierten Zellen werden anschließend mittels Antibiotikum selektiert.

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2 NB/SVNeo NB
Verdau	BstXI
Insert	pSUSTER-ERK2
Verdau	BstXI & SacI
Produkt	pT2/SVNeo NB SUSTER-ERK2
Screening	PCR (Primer Su-5' & pT2-3')
Verifikation	Sequenzierung (Primer T7)

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2 NB/SVNeo NB
Verdau	BstXI
Insert	pSUSTER2-ERK2
Verdau	BstXI & SacI
Produkt	pT2/SVNeo NB SUSTER2-ERK2
Screening	PCR (Primer Su-5' & pT2-3')
Verifikation	Sequenzierung (Primer T7)

Klonierung 10: pT2/SVNeo NB zu pT2/SVNeo NB SUSTER-ERK2

Klonierung 11: pT2/SVNeo NB zu pT2/SVNeo NB SUSTER2-ERK2

Als vielversprechendstes Konstrukt für stabile, spätere induzierbare Knock-downs wurde das Plasmid pT2/SVNeo NB SUSTER2-ERK2 mit dem Sleeping Beauty Transposon System in verschiedene MM-Zelllinien transponiert (siehe **Klonierung 11**). Dazu wurden Zellen der Zelllinien L-363, AMO-1, JJN-3, INA-6 und MM1.S mit dem Vektor pCMV(CAT)T7-SB100 und dem Vektor pT2/SVNeo NB SUSTER2-ERK2 beziehungsweise pT2/SVNeo NB als Leervektor-Kontrolle transfiziert.

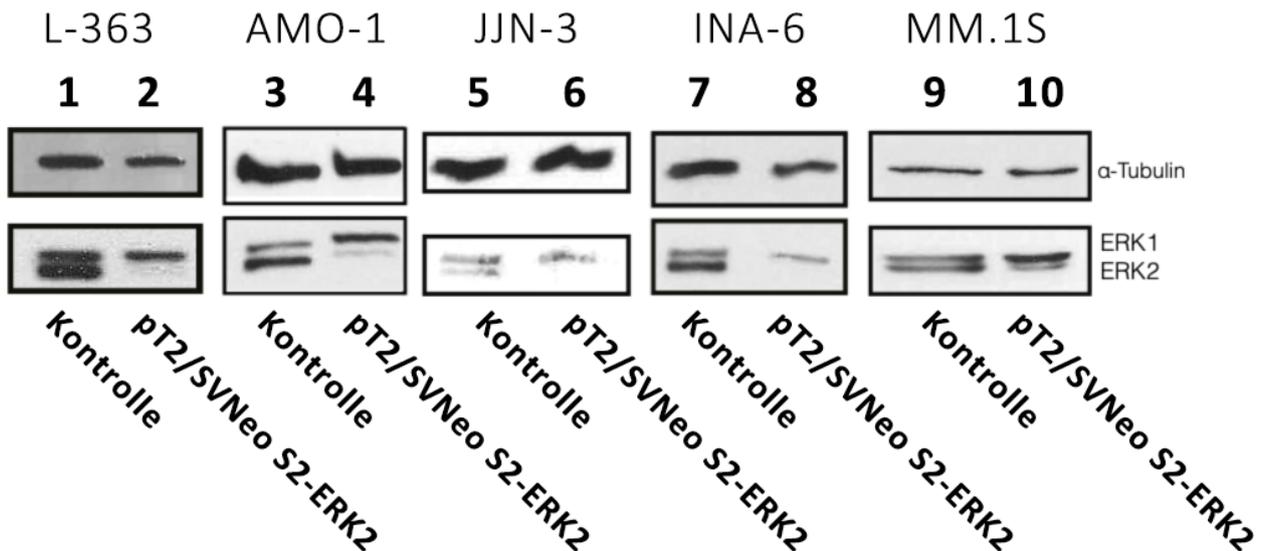


Abbildung 24: Stabiler shRNA-vermittelter Knock-down von ERK2 in verschiedenen MM Zelllinien

Die MM Zelllinien L-363, AMO-1, JJN-3, INA-6 und MM.1S wurden stabil mit dem Vektor pT2/SVNeo S2-ERK2 transfiziert. Nach einer Selektion mit Geneticin für 15 Tage zeigte sich für alle untersuchten MM Zelllinien im Western Blot ein sehr guter Knock-down von ERK2 (Bahnen 2, 4, 6, 8, 10) im Vergleich zu mit pT2/SVNeo NB transfizierten Kontrollzellen (Bahnen 1, 3, 5, 7, 10). Die Knock-down-Qualität entspricht hierbei dem Level, welches in transienten Versuchen mit dem Vektor pSUS-ERK2 beziehungsweise pSUPER-ERK2 erreicht werden konnte.

Die Zellen wurden 15 Tage lang mit Geneticin selektiert und anschließend wurde für jede Zelllinie ein Western Blot mit Färbung von ERK1/2 sowie alpha-Tubulin als Ladungskontrolle durchgeführt. Es zeigte sich, dass in allen verwendeten Zelllinien ein semiquantitativ guter bis sehr guter Knock-down erzielt werden konnte (siehe **Abbildung 24**).

4.3.4 Beständigkeit des stabilen Knock-downs verschiedener Modifikationen des H1-Promotors

Um herauszufinden, ob die Unterschiede in der H1-Promotor Sequenz von pT2/SVNeo SUSTER-ERK2 (siehe **Klonierung 10**) und pT2/SVNeo SUSTER2-ERK2 (H1-Promotor mit 1x TetO VS 2x TetO) einen potenziellen Einfluss auf die Beständigkeit des stabilen Knock-downs mit shRNA haben, wurden mit dem Vektor pT2/SVNeo SUSTER-ERK2 beziehungsweise pT2/SVNeo NB SUSTER2-ERK2 transfizierte L-363 Zellen nach Selektion mit Geneticin für 14 Tage insgesamt 65 Tage lang weiter kultiviert. Auf eine Untersuchung stabiler Knock-downs mit dem H1-Promotor ohne TetO-Sequenz (pT2/SVNeo NB SUS-ERK2) wurde, aufgrund der guten Ergebnisse des vorherigen Abschnitts und der Notwendigkeit ein induzierbares Konstrukt zu nutzen, verzichtet.

L-363

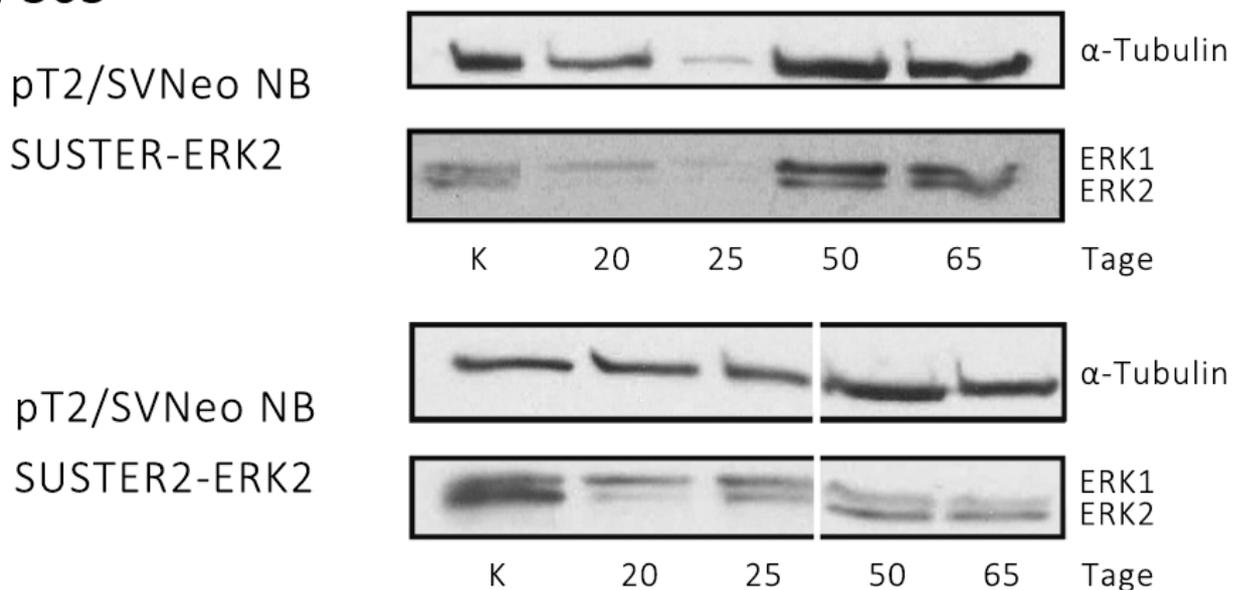


Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf des stabilen Knock-downs von ERK2 mit pT2/SVNeo SUSTER(2) ERK2

Um äquivalent zur EGFP-Expression eine Aussage über die Beständigkeit des stabilen shRNA-vermittelten Knock-downs machen zu können, wurden Western Blots zur Bestimmung der Knock-down Qualität zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Dies wurde für ERK2 in L-363 Zellen sowohl mit dem Vektor pT2/SVNeo SUSTER ERK2 als auch mit dem Vektor pT2/SVNeo SUSTER2 durchgeführt, um sicherzustellen, dass die zusätzliche TetO-Sequenz keinen Einfluss auf ein eventuelles Silencing hat. Es zeigte sich für die beiden H1-Promotoren, egal ob mit einer oder zwei TetO-Sequenzen, das gleiche Ergebnis mit einer stetig zunehmenden Expression von ERK2 mit Erreichen des Ausgangslevels der Kontrolle (K) – soweit das die Anzahl der Messpunkte zulässt – am Tag 50 nach Elektroporation.

Nachdem sich gezeigt hatte, dass auch der zeitliche Verlauf der Knock-down Qualität von pT2/SVNeo NB SUSTER-ERK2 und pT2/SVNeo NB SUSTER2-ERK2 das jeweils gleiche Niveau besitzt, wurde die Überprüfung der zeitlichen Beständigkeit auf die Zelllinien JJN-3, AMO-1 und INA-6 ausgeweitet und in L363 wiederholt. Es konnte gezeigt werden, dass in allen Zelllinien (dieses Mal auch in L-363) nach 50 Tagen noch ein Knock-down von ERK2 vorhanden ist. Allerdings ist ab diesem Zeitpunkt ein wieder zunehmendes ERK2 Signal zu beobachten. An Tag 65 nach Elektroporation ist in verschiedenen Zelllinien wieder eine gut sichtbare Expression von ERK2 im Western Blot zu verzeichnen. Gerade bei INA-6 Zellen, bei denen der MAPK-Signalweg Einfluss auf die Proliferation hat (Burger *et al.*, 2001), zeigt sich schon recht früh eine erneut ansteigende Expression von ERK2. Dies könnte ein Hinweis auf Selektionsvorteile zugunsten der funktionell am wenigsten durch die stabile Knock-down-Prozedur betroffenen Klone sein.

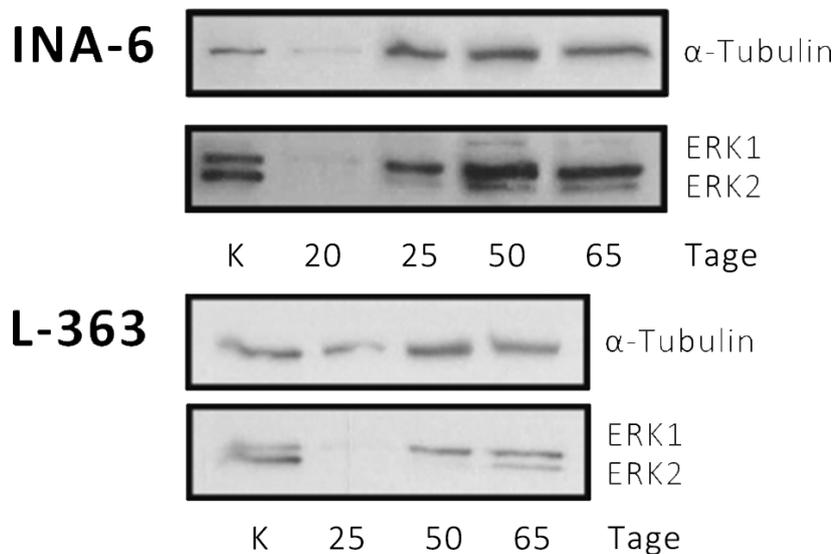


Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der Knock-down Qualität von ERK2 in verschiedenen MM Zelllinien

Äquivalent zum zeitlichen Verlauf des Knock-downs von ERK2 in L-363 Zellen zeigte sich auch in den Zelllinien AMO-1 und JJN-3 (hier nicht dargestellt) ein ähnliches Ergebnis mit einer stetigen Zunahme der ERK2-Expression nach initial gutem Knock-down im Vergleich zur Kontrolle (K). Insbesondere der hier dargestellte zeitliche Verlauf bis 65 Tage nach Transfektion in INA-6 Zelle zeigt mit einer geringeren Effizienz als in den anderen Zelllinien Unterschiede der Knock-down Persistenz in verschiedenen Zelllinien auf. Dies kann aber nur vermutet werden, da von einer Varianz zwischen verschiedenen Versuchen trotz ähnlicher Bedingungen ausgegangen werden muss. Beispielweise stellt sich im Kontrast zum vorherigen Versuch der Knock-down in L-363 nach 65 Tagen deutlich besser dar.

Wie bei transienten Versuchen hatten sich auch bei der stabilen Transfektion von MM Zellen keine Unterschiede zwischen den H1-Promotoren aus pSUSTER und pSUSTER2 bezüglich Knock-down Qualität und Beständigkeit gezeigt. Im Weiteren wurde nur noch der H1-Promotor mit zwei TetO-Sequenzen (aus pSUSTER2) verwendet, da dieser wie bereits ausgeführt gemäß Studienlage eine geringere Leakiness aufweist.

4.3.5 Stabiler und simultaner Knock-down von mehreren Zielproteinen

Analog zum stabilen Knock-down von ERK2 sollte durch den gleichzeitigen Knock-down von 4 verschiedenen Kinasen (ERK1, ERK2, MEK1, MEK2) die Eignung eines multiplen shRNA-Expressionsvektors für simultanes Targeting verschiedener Zielstrukturen getestet werden. Zunächst wurde für jedes einzelne Ziel ein eigener shRNA-Expressionsvektor auf Basis von pSUSTER2 kloniert (siehe 4.2), wobei die etablierten DNA-Oligonukleotide (siehe 4.3.1) erneut zum Einsatz kamen. Die BstXI/SacI Kompatibilität des Kassettensystems wurde genutzt, um die Vektoren pSUSTER2-MEK2/MEK1 (pS2-M2M1) und pSUSTER2-ERK2/ERK1 (pS2-E2E1) mit je zwei H1-Promotor-Kassetten zu erschaffen (siehe **Klonierung 12** und **Klonierung 13**).

Restriktion & Ligation	
Vektor	pSUSTER2-ERK1
Verdau	BstXI
Insert	pSUSTER2-ERK2
Verdau	BstXI & SacI
Produkt	pSUSTER2-ERK2ERK1(E2E1)
Screening	PCR (Primer T7 & T3)
Verifikation	-

Restriktion & Ligation	
Vektor	pSUSTER2-MEK1
Verdau	BstXI
Insert	pSUSTER2-MEK2
Verdau	BstXI & SacI
Produkt	pSUSTER2-MEK2MEK1(M2M1)
Screening	PCR (Primer T7 & T3)
Verifikation	-

Klonierung 12: pSUSTER2-ERK1 zu pSUSTER2-E2E1

Klonierung 13: pSUSTER2-MEK1 zu pSUSTER2-M2M1

Anschließend wurde die M2M1-Doppelkassette mit BstXI und SacI herausgeschnitten und in die BstXI-Schnittstelle von pS2-E2E1 inkloniert, wodurch der Vektor pSUSTER2-MEK1/MEK2/ERK1/ERK2 (pS2-M2M1E2E1) entstand (siehe **Klonierung 14**).

Restriktion & Ligation	
Vektor	pSUSTER2-E2E1
Verdau	BstXI
Insert	pSUSTER2-M2M1
Verdau	BstXI & SacI
Produkt	pSUSTER2-M2M1E2E1
Screening	PCR (Primer T7 & T3)
Verifikation	Sequenzierung (Primer T7)

Klonierung 14: pSUSTER2-E2E1 zu pSUSTER2-M2M1E2E1

Der Vektor pSUSTER2-M2M1E2E1 entspricht annähernd dem von Roth erstellten Vektor pSUS-MEK1/MEK2/ERK1/ERK2 (pSUS-M1M2E1E2). Naturgemäß enthält er im Kontrast dazu die für induzierbare Tet-Systeme notwendigen TetO-Sequenzen. Darüber hinaus unterscheidet sich die Reihenfolge der Kassetten entsprechend der Namensgebung leicht. Dies hat wie bereits nachgewiesen keinen Einfluss auf die Funktionalität. Für den Ablauf der Klonierung von einzelnen pSUSTER2 Plasmiden mit einer einzelnen Kasette bis hin zum pSUSTER2 mit insgesamt vier shRNA-Knock-down Kassetten mit den Zielen MEK1/2 und ERK1/2 siehe **Abbildung 27**.

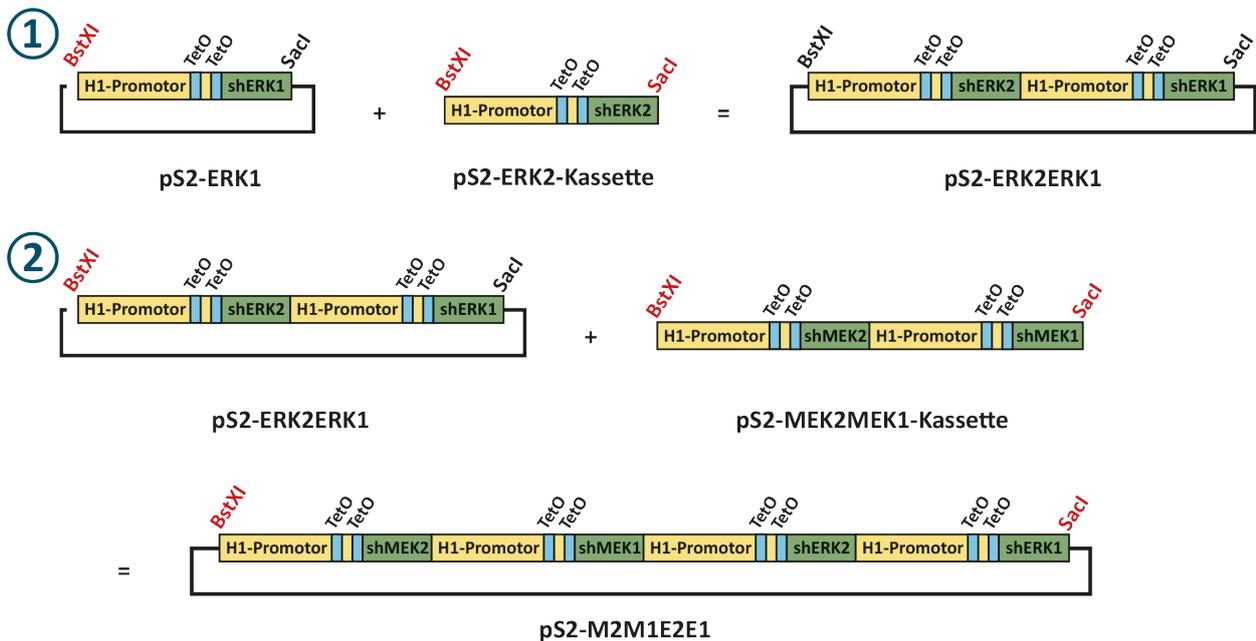


Abbildung 27: Restriktionsenzym-basiertes Kassettsystem mit dem Vektor pS2 zur multiplen shRNA-Expression

In dieser Abbildung ist exemplarisch die Einklonierung ① einer einzelnen H1-Promotor-Kassette aus pS2-ERK2 in den shRNA-Expressionsvektor pS2-ERK1 dargestellt. Es entsteht der Vektor pS2-ERK2ERK1, welcher sowohl shRNAs mit den Zielen ERK1 als auch ERK2 exprimiert. Darüber hinaus ist die Klonierung ② der Kasette aus pS2-MEK2MEK1 in pS2-ERK2ERK1 zu pS2-M2M1E2E1 dargestellt, wodurch ein shRNA-Expressionsvektor entsteht der gegen vier verschiedene Ziel-mRNAs gerichtet ist. Hierbei sind die verwendeten Restriktionsschnittstellen rot hervorgehoben. Aufgrund der Sequenzwahl der BstXI-Schnittstelle wird die BstXI-Schnittstelle regeneriert. Zwischen den einzelnen H1-Promotor-Expressionskassetten bilden sich hierbei keine neuen Schnittstellen. Dies macht ein Kassettsystem von H1-Promotor-Expressionskassetten möglich, die in beliebiger Weise hintereinander kloniert werden können. Außerdem bleibt die Gesamtheit der shRNA-Expressionskassetten jederzeit durch die 5'-gelegene SacI-kompatible BstXI-Schnittstelle, und die 3'-gelegene SacI-Schnittstelle flankiert, die somit ein Ausschneiden und weiteres Subklonieren, z.B. in einen geeigneten Sleeping Beauty Vektor, erlauben. Im Gegensatz zum pSUPER- und pSUS-Vektor bietet der pS2-Vektor somit die Möglichkeit mehrere shRNAs durch Induktion zu exprimieren.

① In einen mit den Restriktionsenzymen **BstXI** geschnittenen Vektor pS2-ERK2 kann eine aus einem anderen pSUS-Vektor ausgeschnittene pS2-ERK2-Kassette einkloniert werden.

② In einen mit den Restriktionsenzymen **BstXI** geschnittenen Vektor pS2-ERK2ERK1 kann eine aus einem anderen pS2-Vektor ausgeschnittene pS2-MEK2MEK1 -Kassette einkloniert werden. Die Klonierung von pS2-MEK2MEK1 erfolgt durch die Einklonierung der pS2-MEK1-Kassette in pS2-MEK2 äquivalent zu ①.

Sowohl in ① als auch ② wird die Kasette mit **BstXI** und **SacI** ausgeschnitten, wodurch auf beiden Seiten SacI-kompatible Überhänge entstehen.

Abschließend wurde das Fragment mit den vier shRNA-Expressionskassetten in den Sleeping Beauty Vektor pT2/SVNeo NB EGFP inkloniert (siehe **Klonierung 16**). Im Vergleich zu dem vorherigen für den stabilen ERK2-Knock-down verwendeten Vektor hat dieser die Besonderheit neben den shRNA-Expressionskassetten auch eine CMV-getriebene EGFP Expressionskassette zu besitzen (siehe **Klonierung 15**).

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2/SVNeo NB
Verdau	EcoRI
Insert	pT2/SVNeo EGFP
Verdau	EcoRI
Produkt	pT2/SVNeo NB EGFP
Screening	PCR (Primer T7 & CMV-rev)
Verifikation	Sequenzierung (Primer pT2-5')

Klonierung 15: pT2/SVNeo NB zu pT2/SVNeo NB EGFP

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2/SVNeo NB EGFP
Verdau	BstXI
Insert	pSUSTER2-M2M1E2E1
Verdau	BstXI & SacI
Produkt	pT2/SVNeo NB EGFP S2-M2M1E2E1
Screening	PCR (Primer T7 & CMV-rev)
Verifikation	Sequenzierung (Primer T7 & CMV-rev)

Klonierung 16: pT2/SVNeo NB EGFP zu pT2/SVNeo NB EGFP S2-M2M1E2E1

Da wiederum shRNA- und EGFP-Expressionskassetten streng gekoppelt sind und gemeinsam durch die Transposase in das Genom der Zielzelle transponiert werden, dient EGFP als Marker für den Transfektions- und Selektionserfolg. Mittels FACS-Messung lässt sich somit bestätigen, dass die untersuchten Zellen auch mit Sicherheit stabil transfiziert wurden. Auf diese Weise kann zumindest teilweise ein etwaiges Silencing ausgeschlossen werden, auch wenn keine Aussage darüber möglich ist, ob die Klone mit dem am stärksten herunterregulierten MAPK-Weg möglicherweise sterben oder nicht beziehungsweise schlecht proliferieren. Um den stabilen Knock-down zu testen, wurden L-363 Zellen dem Vektor pCMV(CAT)T7-SB100 und dem Vektor pT2/SVNeo NB EGFP S2-M2M1E2E1 beziehungsweise pT2/SVNeo NB als Kontrollansatz transfiziert. Diese wurden über 15 Tage mit Geneticin selektioniert und anschließend wurde ein Western Blot mit Färbung von ERK1/2 und MEK1/2 sowie alpha-Tubulin als Ladungskontrolle durchgeführt (siehe **Abbildung 28**). Die untersuchten Zellen zeigten alle eine starke EGFP Expression in der FACS-Analyse.

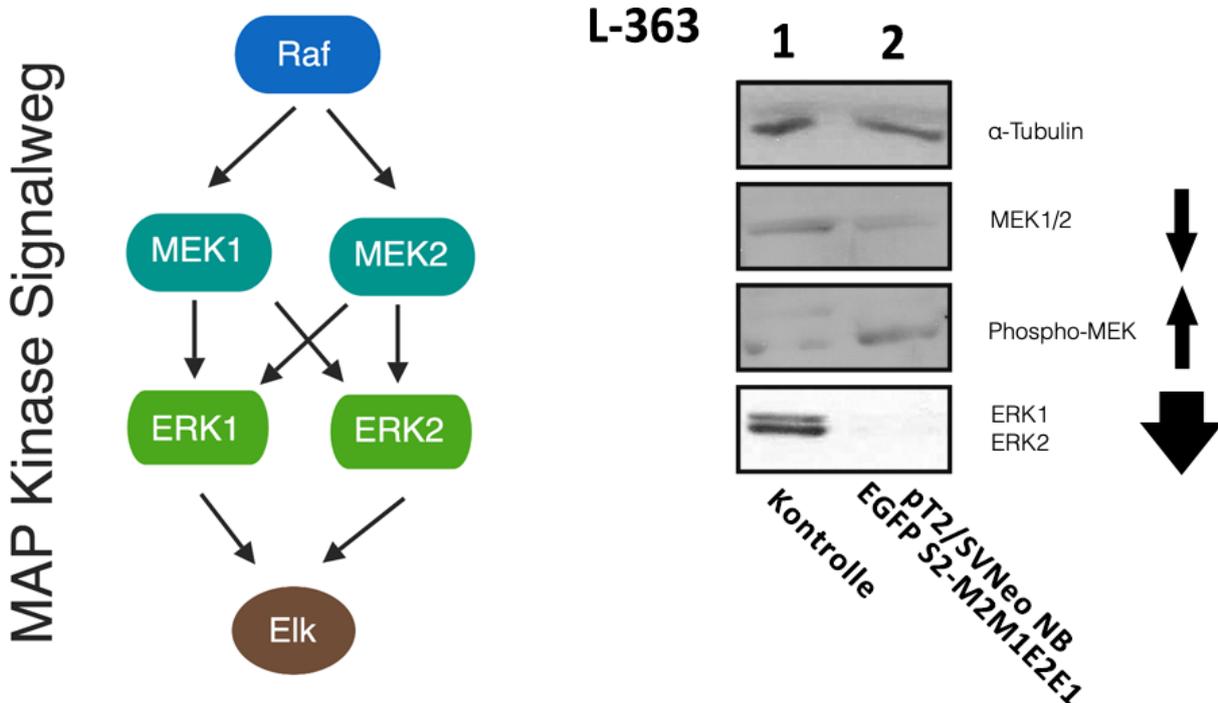


Abbildung 28: Stabiler Knock-down von vier verschiedenen Zielproteinen gleichzeitig in L-363

Zur kompletten Inaktivierung des MAPK-Wegs müssen sowohl MEK1/2 als auch ERK1/2 ausgeschaltet werden, da schon eine geringe Restaktivität der redundanten Kinasen reicht, um die Funktion des Signalweges aufrechtzuerhalten. Beim gleichzeitigen Knock-down dieser vier Ziele (Bahn 2) in L-363 zeigte sich im Western Blot nach 14 Tagen Selektion, dass die Menge von ERK1 und ERK2 äußerst gut und von MEK1 und MEK2 mittelmäßig reduziert wurde. Als Kontrolle dienen mit dem Vektor pT2/SVNeo NB transfizierte Zellen (Bahn 1). Eine Unterscheidung des Knock-downs von MEK1 und MEK2 ist aufgrund des ähnlich großen molekularen Gewichts und der fehlenden Spezifität der Antikörper im Western Blot nicht möglich. Die Färbung von Phospho-MEK zeigt zudem, dass die relative Menge an phosphorylierter (aktivierter) MEK1/2 zunimmt. Dies spricht für einen Gegenregulationsmechanismus der Zellen, um trotz der durch die Knock-downs bewirkten niedrigeren Proteinspiegel keine antiproliferativen Effekte zu erleiden.

Mit dem Vierfachkonstrukt gegen ERK1/2 und MEK1/2 zeigte sich ein guter Knock-down von ERK1 und ERK2, aber nur ein mittelmäßiger Knock-down von MEK1/2 (siehe **Abbildung 25**). Allerdings ist hier im Western Blot keine Unterscheidung der beiden Isoformen MEK1/2 möglich, da sich die molekulare Masse der beiden kaum unterscheidet (MEK1 43.439 Da und MEK2 44.424 Da) und der verwendete Antikörper unspezifisch an beide Isoformen bindet. Die relative Steigerung des Phospho-MEK Signals ist ein klares Indiz dafür, dass die Zellen versuchen den Signalweg hochzuregulieren. Die Knock-down Qualität im Western Blot entspricht für ERK1 und ERK2 der transient bestimmten Ergebnisse von Roth mit dem pSUS-M1M2E1E2 Vektor, die Knock-down Tiefe der MEK1/MEK2 Bande blieb hier jedoch hinter der im transienten Experiment erreichten zurück (Fink *et al.* (2018); Abb. 2D). Trotz des definitiven und vollumfänglichen stabilen Einbaus der Expressionskassetten kam es also vermutlich zu einer Anreicherung der am wenigsten vom Vierfach-Knock-down betroffenen Zellklone. Im Weiteren

erübrigte sich daher die Verwendung von EGFP als Marker der selektionierten Populationen. Mit diesem Experiment wird deutlich, dass nur ein induzierbares System geeignet ist, um potentiell toxische Knock-downs durchzuführen und um die genannten Effekte wie Silencing, Selektionsdruck und überlagernde Transfektionstoxizität klar von einer nur inadäquaten Knock-down Effizienz zu unterscheiden. Wie im **Abschnitt 1.2.4** bereits erörtert, ist dies auch die Grundlage, um überhaupt funktionelle biologische Aussagen mit Proliferations- oder Apoptose-Assays zu gewinnen.

4.4 Adäquate und kontinuierliche TetR-Expression

Die essentielle Komponente für ein funktionell nutzbares Tet-On-System ist neben einem induzierbaren Promotor die dauerhafte und hinreichende Expression des Tet-Repressor Proteins (TetR). Hierdurch wird die Suppression der shRNA-Expression im nicht-induzierten Zustand vermittelt. Die durchgeführte Literaturrecherche ergab, dass in den MM Zelllinien MM.1S und L-363 bereits jeweils ein Tet-On-System mittels Lentivirus beziehungsweise Einzelklonselektion etabliert werden konnte (Li *et al.*, 2013; Reijmers *et al.*, 2010). Dagegen lagen für die MM Zelllinien AMO-1, INA-6 und JJN-3 noch keinerlei Veröffentlichungen für die Nutzung eines Tet-Systems vor. Analog zur erfolgreichen stabilen Transposition von MM Zellen mit EGFP sollte daher im Folgenden der TetR mit dem Sleeping Beauty Transposon System dauerhaft von MM Zellen exprimiert werden. Der Nachweis einer erfolgreichen Expression des TetR sollte auf zweierlei Weise mittels Western Blotting erfolgen, nämlich einerseits durch direkten Nachweis des TetR-Proteins und andererseits indirekt über den ERK2-Spiegel. Die Menge an exprimierten ERK2 sollte bei vollständiger Repression einer stabil oder gleichzeitig transfizierten shRNA-Expressionskassette gegen ERK2 durch TetR derjenigen der Ausgangszelllinie entsprechen. Um eine akzidentielle Induktion zu verhindern, wurden in allen folgenden Versuchen die Zellen in Tetrazyklin-freiem Medium kultiviert.

4.4.1 Transiente Expression von TetR mittels CMV-Promotor

Um die Funktionsfähigkeit des dargelegten Konzepts zu belegen, sollte zum einen zunächst in transienten Versuchen die erfolgreiche Expression von TetR in MM Zellen durch direkten Nachweis mittels Western Blot belegt werden. Zum anderen sollte die Expression und Funktionalität des TetR durch die gleichzeitige Suppression der shRNA-Expression und somit des Knock-downs eines transfizierten Vektors mit induzierbaren H1-Promotoren (pSUSTER oder pSUSTER2) nachgewiesen werden. Um einen transienten Expressionsvektor mit CMV-Promotor

für TetR herzustellen, wurde das TetR-Gen zunächst in den Vektor pcDNA3.1(-) inkloniert (siehe **Klonierung 17** und **Klonierung 18**).

Restriktion & Ligation	
Vektor	pBluescript SK(-)
Verdau	XbaI
Insert	pLVCT-tTR-KRAB
PCR (Pfu)	Primer tTR3 & tTRpan5
Verdau	XbaI
Produkt	pBluescript SK(-) tTR
Screening	Blau-Weiß-Selektion
Verifikation	Sequenzierung (Primer T7)

Restriktion & Ligation	
Vektor	pcDNA3.1(-)
Verdau	XbaI
Insert	pBluescript SK(-) tTR
Verdau	XbaI
Produkt	pcDNA3.1(-) tTR
Screening	PCR (Primer T7 & tTR3)
Verifikation	Sequenzierung (Primer T7)

Klonierung 18: pcDNA3.1(-) zu pcDNA3.1(-) tTR

Klonierung 17: pBluescript SK(-) zu pBluescript SK(-) tTR

Für den ersten Versuch, TetR transient in MM zu exprimieren, wurden JJN-3 Zellen mit dem Plasmid pCD4Δ zur späteren Säulenaufreinigung dem Plasmid pEGFP-N3 zur Beurteilung der Elektroporationseffizienz und den beiden Plasmiden pcDNA3.1(-) tTR und pSUSTER2-ERK2 elektroporiert. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne die letzten beiden genannten Plasmide transfiziert. Erfolgreich transfizierte Zellen wurden unter Verwendung von paramagnetischen Säulen und anschließender OptiPrep Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt.

Der direkte Nachweis einer Expression des TetR-Proteins in den transfizierten MM Zellen konnte im Western Blot nicht erbracht werden. Allerdings gelang mit dem verwendeten Antikörper im Western Blot ebenfalls nicht die Färbung einer Positiv-Kontrolle mit Zelllysaten von HEK-293-Zellen, welche gesichert rtTa3 – eine optimierte Variante des rTA (Markusic *et al.*, 2005) – exprimieren. Diese Zellen waren stabil mit dem Virus, welches aus dem Vektor pTRIPZ hergestellt wurde, transfiziert worden. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass rtTA3 dem hier verwendeten TetR nur ähnelt und somit als Positiv-Kontrolle nur eine begrenzte Validität besitzt. Eine Positiv-Kontrolle mit dem hier verwendeten TetR stand jedoch nicht zur Verfügung. Hieraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass entweder zu geringe Mengen TetR exprimiert werden, um nachgewiesen zu werden, oder dass der Antikörper nicht sensitiv genug für das exprimierte TetR ist. In der verwendeten Konzentration von 1:1000 liegt die Detektionsgrenze laut Herstellerangaben bei 0,8 ng.

Um den Antikörper als Fehlerquelle auszuschließen, wurde durch eine Mutationsreaktion die Sequenz des HA-Tags (Field *et al.*, 1988) leserastergerecht an das 3'-Ende des TetR-Gens

gesetzt (siehe **Mutation 2**) und das Konstrukt wiederum in pcDNA3.1(-) einkloniert (siehe **Klonierung 19**). Der verwendete HA-Tag-Antikörper wies bereits in anderen in unserem Labor durchgeführten Versuchen zur Proteinexpression eine hohe Sensitivität auf (Steinbrunn *et al.*, 2011).

Mutation	
Vektor	pBluescript SK(-) tTR
Oligos	MUT-tTR-HA
Produkt	pBluescript SK(-) tTR HA
Verifikation	Sequenzierung (Primer T3)

Mutation 2: pBluescript SK(-) tTR zu pBluescript SK(-) tTR HA

Restriktion & Ligation	
Vektor	pcDNA3.1(-)
Verdau	XbaI
Insert	pBluescript SK(-) tTR-HA
Verdau	XbaI
Produkt	pcDNA3.1(-) tTR HA
Screening	PCR (Primer T7 & tTR3)
Verifikation	Sequenzierung (Primer T7)

Klonierung 19: pcDNA3.1(-) zu pcDNA3.1(-) tTR- HA

Der Versuch mit pcDNA3.1(-) tTR-**HA** wurde analog zur Transfektion von pcDNA3.1(-) tTR mit L-363 Zellen durchgeführt. Die Expression des mit dem HA-Tag markierten TetR konnte ebenfalls im Western Blot nicht nachgewiesen werden. Auch der funktionelle Nachweis zeigte nicht die erwartete Suppression der shRNA-Expression, sondern vielmehr einen unverändert guten Knock-down von ERK2. Hieraus konnte gefolgert werden, dass nicht der Antikörper das Problem darstellt, sondern dass die in der transienten Expression erreichten Spiegel des TetR im MM mit dem verwendeten Vektor für funktionelle Effekte offensichtlich nicht ausreichend sind.

Wie bereits dargelegt, existiert die Möglichkeit anstelle des TetR auch ein Fusionsprotein aus TetR und KRAB zu nutzen (siehe **1.2.4**), welches eine noch stärkere Repression der Transkription vermittelt. Mit dem Ansatz, dass bei Verwendung des Fusionsproteins möglicherweise eine geringere Menge des Repressor-Proteins ausreicht, wurde das TetR-KRAB ebenfalls in pcDNA3.1(-) einkloniert (siehe **Klonierung 20** und **Klonierung 21**). Die schon mit dem Vektor pcDNA3.1(-) tTR transient durchgeführten Versuche wurden nun in L-363 mit dem Vektor pcDNA3.1(-) tTR-KRAB wiederholt. Hier konnte jedoch ebenfalls weder mittels Western Blot noch funktionell die Expression von TetR-KRAB nachgewiesen werden.

Möglicherweise werden bei einem transienten Versuch die shRNA schneller gebildet, als dass das neu gebildete TetR beziehungsweise TetR-KRAB den H1-Promotor blockieren kann. Um dies auszuschließen, muss die Expression des TetR vor der Expression der shRNA stattfinden. Dies funktioniert am besten durch stabile Transfektion der Zellen mit einer Expressionskassette für

TetR. Da sowohl die transiente Expression von TetR als auch TetR-KRAB nicht das gewünschte Ergebnis erbracht hatte, wurden weiterführend verschiedene Strategien verfolgt, um die Expression des TetR zu steigern, beziehungsweise überhaupt zu erreichen.

TA-Klonierung & Ligation	
Vektor	pGEM-T Easy
Insert	pLVCT-tTR-KRAB
PCR (Taq)	Primer tTRKRAB3 & tTRpan5
Produkt	pGEM-T Easy tTR-KRAB
Screening	Blau-Weiß-Selektion
Verifikation	Sequenzierungen (Primer T7 & SP6)

Klonierung 20: pGEM-T Easy zu pGEM-T Easy tTR-KRAB

Restriktion & Ligation	
Vektor	pcDNA3.1(-)
Verdau	XbaI
Insert	pGEM-T Easy tTR-KRAB
Verdau	XbaI
Produkt	pcDNA3.1(-) tTR-KRAB
Screening	PCR (Primer T7 & tTRKRAB3)
Verifikation	diagnostischer Verdau (SalI) Sequenzierung (Primer T7)

Klonierung 21: pcDNA3.1(-) zu pcDNA3.1(-) tTR-KRAB

Einerseits wurde von der stabilen, dauerhaften Expression des TetR eine Akkumulation des Proteins erhofft. Andererseits wurde durch das Hinzufügen des beta-Globulin-Introns als Enhancer zur Protein-Expressionskassette eine erhöhte Expression erwartet. Außerdem wurde eine an IRES-gekoppelte Expression des TetR mit dem Resistenz vermittelnden Protein erprobt, um somit die Zellen mit der stärksten TetR-Expression zu selektieren. Abschließend wurde mit Erfolg die Verwendung einer CAG-Promotor-getriebenen Expressionskassette an Stelle der CMV-Kassette zur TetR-Expression erprobt. Die Ergebnisse dieser Versuche werden im Folgenden erörtert.

4.4.2 Stabile Expression von TetR mittels CMV-Promotor

4.4.2.1 Ein-Vektor-System

Um einen allgemein verwendbaren Protein-Expressionsvektor für das Sleeping Beauty Transposon System zu erstellen, wurde die EGFP-Sequenz aus dem pT2/SVNeo CMV-EGFP Vektor herausgeschnitten und mittels DNA-Oligonukleotid-Klonierung durch eine Reihe von singulären Klonierungsschnittstellen ersetzt (siehe **Klonierung 22**). Der entstandene Vektor pT2/SVNeo CMV bietet über den neuen Polylinker die Möglichkeit, Gene von Proteinen über die NheI-, BsrGI-, NotI- oder AgeI-Schnittstelle einzuklonieren. Um sowohl die Proteinexpressionskassette als auch die shRNA-Expressionskassetten auf dem gleichen Vektor zu nutzen, wurde die leere CMV-Kassette mit dem neuen Polylinker anschließend in den Vektor pT2/SVNeo NB S2-E2 inkloniert (siehe **Klonierung 23**). Da bei dem alleinigen Knock-down von ERK2, wie ausgeführt, kein substanzieller Einfluss auf die Proliferation und das Überleben von Zellen zu

erwarten ist, ist für den rein konzeptionellen Beweis keine vorherige Expression von TetR und daraus resultierend zunächst keine Verwendung des Zwei-Vektor-Systems notwendig.

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2/SVNeo CMV EGFP
Verdau	NheI, NotI
Insert	Oligos pT2-CMV-npIF
Produkt	pT2/SVNeo CMV
Verifikation	Sequenzierung (Primer CMV-F)

Klonierung 22: pT2/SVNeo CMV EGFP zu pT2/SVNeo CMV

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2/SVNeo NB S2-E2
Verdau	EcoRI
Insert	pT2/SVNeo CMV
Verdau	EcoRI
Produkt	pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV
Screening	PCR (Primer pT2-5' & CMV-rev)
Verifikation	Sequenzierung (Primer pT2-5')

Klonierung 23: pT2/SVNeo NB S2-E2 zu pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV

In den entstandenen Vektor pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV konnten dann die schon bei der Klonierung in die transienten Expressionsvektoren verwendeten Gene für TetR und TetR-KRAB einkloniert werden (siehe **Klonierung 24** und **Klonierung 25**). Dies entspricht dem unter 4.2.2 erörterten Ein-Vektor-System mit beiden Komponenten des Tet-Systems auf einem Plasmid.

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV
Verdau	NheI
Insert	pcDNA3.1(-) tTR
Verdau	XbaI
Produkt	pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV tTR
Screening	PCR (Primer CMV-F & tTR3)
Verifikation	Sequenzierung (Primer CMV-F)

Klonierung 24: pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV zu pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV tTR

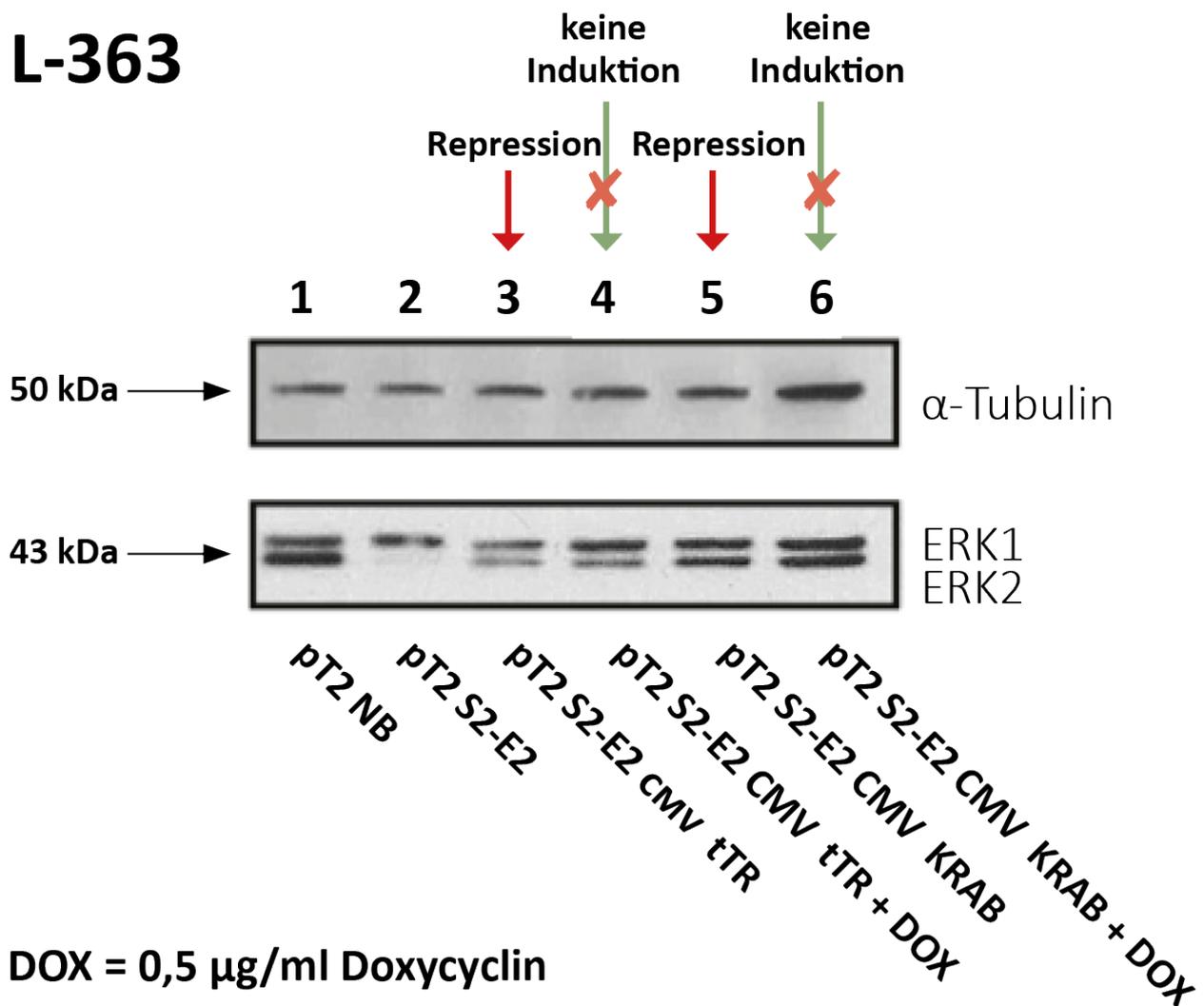
Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV
Verdau	NheI
Insert	pcDNA3.1(-) tTR-KRAB
Verdau	XbaI
Produkt	pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV tTR-KRAB
Screening	PCR (Primer CMV-F & tTRKRAB3)
Verifikation	Sequenzierung (Primer CMV-F)

Klonierung 25: pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV zu pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV tTR-KRAB

Hiermit waren zwei Vektoren verfügbar, welche alle Komponenten für ein Tet-On-System zur induzierbaren shRNA-Expression mitbringen. Um den stabilen, induzierbaren Knock-down zu testen, wurden jeweils Zellen der Zelllinien L-363 und AMO-1 mit dem Vektor pCMV(CAT)T7-SB100 und dem Vektor pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV tTR, pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV tTR-

KRAB beziehungsweise pT2/SVNeo NB als Leervektor-Kontrolle und pT2/SVNeo NB S2-E2 als Knock-down-Funktionskontrolle transfiziert. Diese wurden 15 Tage lang mit Geneticin selektioniert. Die Zellen, welche mit pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV tTR beziehungsweise pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV tTR-KRAB transfiziert worden waren, wurden daraufhin zu gleichen Teilen aufgeteilt. Für die eine Hälfte der Zellen erfolgte für 48 Stunden eine Zugabe von 0,5 µg/ml Doxycyclin für L-363 beziehungsweise 2,5 µg/ml Doxycyclin für AMO-1. Anschließend wurde für jede Probe der Zelllinien ein Western Blot mit Färbung von ERK1/2 und alpha-Tubulin zur Beladungskontrolle durchgeführt.

L-363

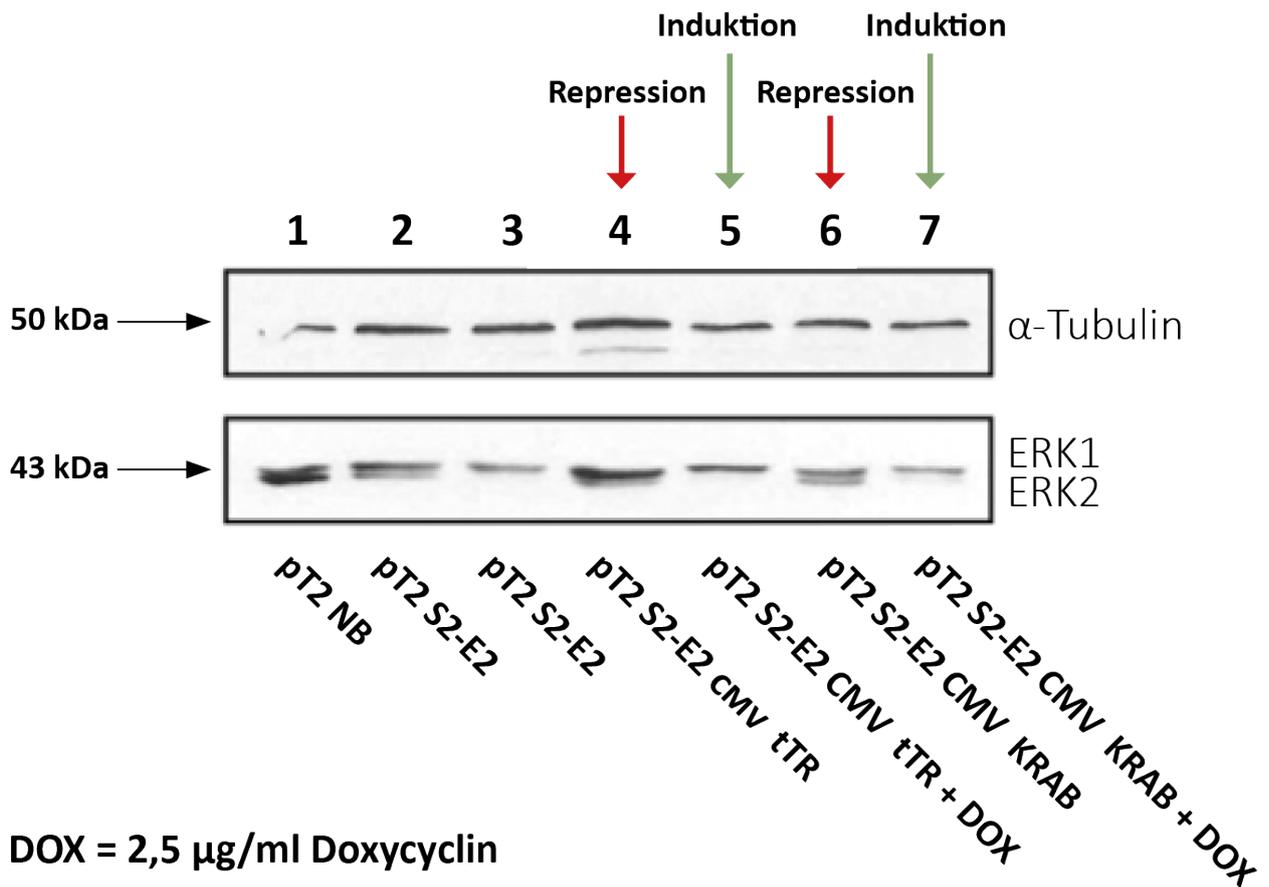


DOX = 0,5 µg/ml Doxycyclin

Abbildung 29: Repression und (fehlende) Induktion des Knock-downs von ERK2 in L-363 und AMO-1 Zellen

Im Western Blot ist die erste erfolgreiche Repression des konstitutiven Knock-downs von ERK2 durch den TetR beziehungsweise durch TetR-KRAB sowohl in L-363 als auch in AMO-1 Zellen dargestellt (Bahnen 3 und 5). Die Repression ist hierbei in L-363 zufriedenstellend, aber eine Konzentration von 0,5 µg/ml Doxycyclin scheint in L-363 nicht auszureichend, um den ERK2 Knock-down zu induzieren (Bahnen 4 und 6).

AMO-1



DOX = 2,5 µg/ml Doxycyclin

Fortsetzung Abbildung 29: Repression und Induktion des Knock-downs von ERK2 in L-363 und AMO-1 Zellen

Die Repression des Knock-downs von ERK2 ist in AMO-1 sowohl mit TetR als auch TetR-KRAB (Bahnen 3 und 5) im Vergleich zur Kontrolle mit dem Leervektor (Bahn 2) nicht vollständig ausgeprägt. Mit der höheren Doxycyclin-Konzentration von 2,5 µg/ml gelingt in AMO-1 die Induktion des Knock-downs nach 48 h (Bahne 4 und 6). Hierbei wird ein vollständiger Knock-down auf dem gleichem Niveau wie dem Knock-down ohne TetR beziehungsweise TetR-Krab (Bahn 2) erreicht. Die beiden Komponenten zur Expression von shRNA und TetR beziehungsweise TetR-KRAB wurden in diesen Versuchen gemeinsam auf einem Sleeping Beauty Donor Vektor in die Zelle transfiziert.

Für L-363 zeigte sich, dass der Knock-down sowohl durch das Konstrukt mit dem TetR als auch mit TetR-KRAB zu großen Teilen verhindert wird, aber die Zugabe von 0,5 µg/ml Doxycyclin zu keiner Induktion des Knock-downs führt. Im Kontrast dazu ist bei Zugabe von 2,5 µg/ml Doxycyclin im AMO-1 Modell ein sehr guter Knock-down zu beobachten. Hierbei stellte sich allerdings die Suppression des Knock-downs durch TetR beziehungsweise TetR-KRAB im Vergleich zur Negativ-Kontrolle als nur moderat gut dar. In beiden Zelllinien scheint die Wirkung von TetR-KRAB im Vergleich zu TetR nur marginal stärker zu sein. Die fehlende Induktion in L-363 lässt sich auf die verwendete, recht niedrige Doxycyclin-Konzentration zurückführen. Dass die Ursache in den unterschiedlichen Eigenschaften dieser beiden Zelllinien liegt, konnte in

späteren Versuchen ausgeschlossen werden. Hier war bei höheren Doxycyclin-Konzentrationen ebenfalls eine Induktion in L-363 äquivalent zu AMO-1 möglich.

Zusammenfassend zeigte sich hier, dass eine Repression und Induktion des ERK2 Knock-downs möglich ist, wodurch insbesondere die prinzipielle Exprimierbarkeit und Funktionalität des TetR-Proteins in MM Zellen bestätigt wurde. Die aufgestellte These, dass durch stabile Expression des Repressor-Proteins die shRNA-Expression blockiert werden kann, erwies sich als korrekt.

Zum einen wird dies vermutlich dadurch erreicht, dass die Zellen während der Antibiotikaselektion genügend Zeit haben, TetR zu bilden und dieses akkumulieren kann. Zum anderen ist auch die Zahl der shRNA-Kassetten im stabilen System geringer, sodass auch hierdurch das Verhältnis von TetR zur Zahl der shRNA-Kassetten deutlich besser ist.

Leider erreichte die ERK2-Expression ohne Induktion nicht das Vergleichsniveau der Leervektor-transfizierten Zellen, die erreichte Repression durch TetR musste somit nur als partiell eingestuft werden. Auch mit dem Fusionsprotein TetR-KRAB zeigte sich eine nur geringfügig bessere Repression im nicht-induzierten Zustand.

Daher wurden, wie bereits zuvor erwähnt, verschiedene Versuche durchgeführt, welche die Expressionsspiegel von TetR steigern sollten. Da TetR-KRAB anscheinend keinen größeren Vorteil in der Repression innehat, und bei einem so kleinen Promotor wie dem H1-Promotor der Wirkung über eine größere Distanz im Genom nur geringe Bedeutung zugemessen wird, konzentrierten sich die weiteren Versuche auf das reine TetR-Protein.

4.4.2.2 Zwei-Vektor-System

Wie bereits erörtert, besitzt ein Zwei-Vektor-System gravierende Vorteile, sodass die weiteren Versuche nur noch unter Verwendung von zwei verschiedenen Sleeping Beauty Donor Vektoren durchgeführt wurden. Dafür mussten zunächst die erfolgreichen Ansätze aus diesen Versuchen im Ein-Vektor-System auf das Zwei-Vektor-System übertragen werden.

Der Vektor pT2 BN SVPuro enthält sowohl eine EcoRI als auch eine SacI-kompatible BstXI-Schnittstelle. Dadurch besteht die Möglichkeit sowohl Proteinexpressions-Kassetten als auch shRNA-Expressionskassetten aus dem pSUSTER2 Kassettensystem einzufügen.

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2 BN SVPuro CMV
Verdau	NheI
Insert	pcDNA3.1(-) tTR
Verdau	XbaI
Produkt	pT2 BN SVPuro CMV tTR
Screening	PCR (Primer CMV-REV & pT2-3')
Verifikation	Sequenzierung (Primer M13)

Klonierung 26: pT2 BN SVPuro CMV zu pT2 BN SVPuro CMV tTR

Um mit diesem Vektor TetR zu exprimieren, wurde zunächst der CMV-Promotor mit dem neuen Polylinker in die EcoRI-Schnittstelle inkloniert (siehe **Klonierung 8**). Als Nächstes wurde erneut, wie schon im pT2B/Puro CMV Vektor, das mit XbaI geschnittene TetR-Gen in den Vektor pT2 BN SVPuro CMV inkloniert (siehe **Klonierung 26**). Daraufhin wurden AMO-1-Zellen mit den Vektoren pCMV(CAT)T7-SB100, pEGFP-N3 und jeweils dem Vektor pT2/SVNeo NB als Leervektor-Kontrolle beziehungsweise pT2/SVNeo NB S2-E2 als Knock-down-Funktionskontrolle sowie dem Vektor pT2/SVNeo NB S2-E2 zusammen mit dem Vektor pT2 BN SVPuro CMV tTR transfiziert. Dann wurden alle Proben mit Geneticin und die Probe mit pT2 BN SVPuro CMV tTR zusätzlich mit Puromycin für 10 Tage selektiert. Anschließend wurden die Zellen, welche mit pT2/SVNeo NB S2-E2 zusammen mit pT2 BN SVPuro CMV tTR transfiziert worden waren, halbiert. Zu einer Hälfte der Zellen wurde für 48 Stunden 2,5 µg/ml Doxycyclin zugegeben. Von den Zellen wurde dann ein Western Blot mit Färbung von ERK1/2 und HSP90beta als Ladungskontrolle durchgeführt (**Abbildung 30**).

AMO-1

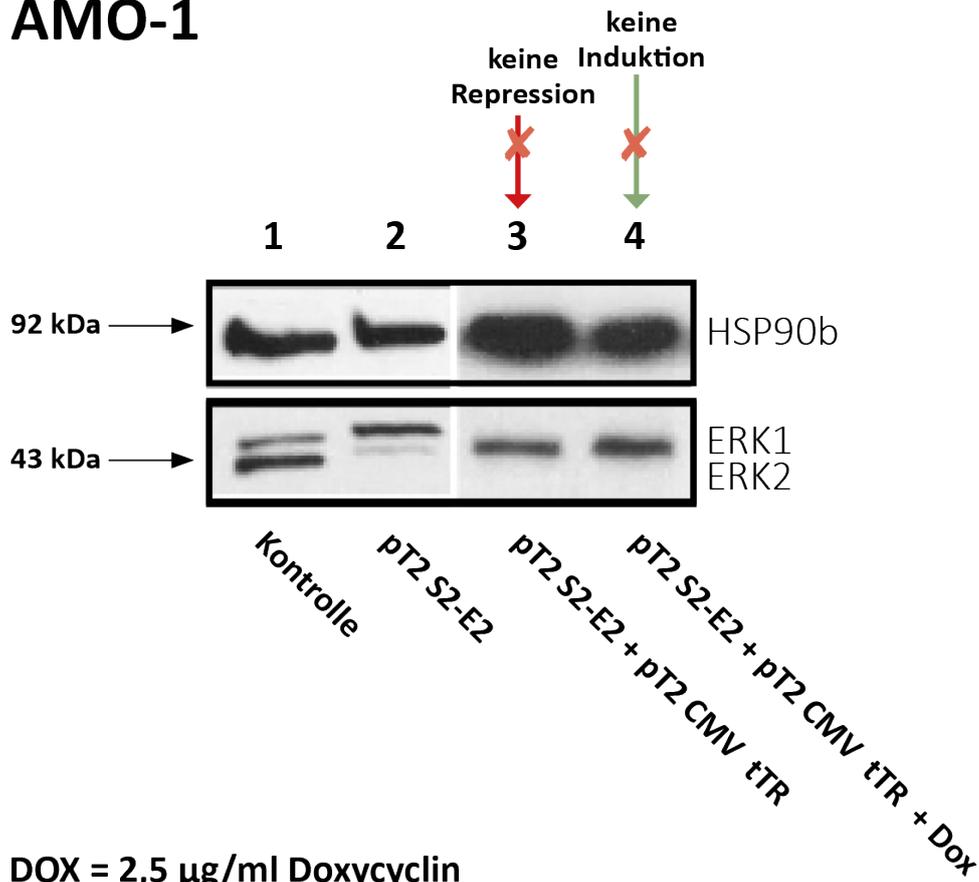


Abbildung 30: Induzierbarer Knock-down von ERK2 in AMO-1 Zellen mit Expression des Repressors durch CMV tTR
 Im Western Blot zeigte sich bei Versuchen mit dem Zwei-Vektor-System mit dem Vektor pT2/SVNeo NB S2-E2 und pT2/SVPuro BN CMV tTR keine Repression des konstitutiven Knock-downs (Bahn 3). Dieses Resultat unterscheidet sich in unerwarteterweise von den Versuchen im Ein-Vektor-System mit denselben Komponenten, wo eine gute Repression erreicht werden konnte. Der Induktionsversuch mit 2,5 µg/ml Doxycyclin über 48 h (Bahn 4) ist aufgrund der fehlenden Repression der ERK2 shRNA-Synthese nicht aussagekräftig. Diese Abbildung stellt einen Teil der vergleichenden **Abbildung 35** dar und wird zur besseren Veranschaulichung auch hier gezeigt.

Dieser Versuch wurde zudem auch im Vergleich mit dem CAG-Promotor und dem CMV-Promotor mit beta-tTR durchgeführt, sodass diese Abbildung einem Teil der **Abbildung 35** (S. 129) entspricht. Zur Verdeutlichung wird diese Teilabbildung jedoch auch hier, also in ihrem historischen Kontext im Verlauf der funktionellen Experimente zur Entwicklung des induzierbaren shRNA-Systems, gezeigt. Eine Repression des konstitutiven ERK2 Knock-downs war im Western Blot nicht zu erkennen, sodass folglich auch keine Induktion nachzuvollziehen war. Zwar war die Repression in AMO-1-Zellen bereits im Ein-Vektor-System mit TetR nicht vollständig ausgeprägt gewesen (siehe **Abbildung 26**, S. 102), dennoch gelang dort immerhin eine eindeutige partielle Repression. Die Ursache dieses schlechteren Ergebnisses im Vergleich zum Ein-Vektor-System ist unklar. Vielleicht spielte hier die Varianz in der

Transfektionseffizienz und der Anzahl der Genkopien und/oder der Integrationsorte im Genom eine Rolle.

4.4.3 Verstärkung der TetR-Expression

Eine CMV-Promotor getriebene Expressionskassette scheint nicht geeignet zu sein, um eine hinreichende Expression von TetR in MM Zellen sicherzustellen. Im Allgemeinen kann dieses Problem für die Expression anderer Proteine mit diesem Vektor nicht beobachtet werden, doch gibt es auch Ausnahmen, zum Beispiel für die Expression der Ras-Proteine (Steinbrunn *et al.*, 2011). Der Vektor pT2 BN SVPuro CMV wurde im Weiteren aufgrund der schnellen Selektierbarkeit von nur 7 Tagen mit Puromycin im Vergleich zu 10 bis 14 Tagen mit Geneticin zur Proteinexpression in unserer und anderen Forschungsgruppen verwendet (Barrio *et al.*, 2019). Da mit dem CMV-Promotor allein keine besseren Ergebnisse bezüglich der Repression der shRNA-Expression zu erwarten waren, wurden im Folgenden verschiedene Versuche durchgeführt, um die TetR-Expression zu steigern.

4.4.3.1 Nutzung des beta-Globin Enhancer Elements zur verstärkten TetR-Expression

Nachdem sich die Expression von TetR als nicht ausreichend gezeigt hatte, wurde als erster Ansatz, das Expressionslevel zu steigern, das beta-Globin Intron als Verstärker-Element vor das TetR-Gen kloniert. Hierdurch kann ein bis zu fünffaches Expressionsniveau erreicht werden (Haddad-Mashadrizeh *et al.*, 2009). Für transiente Versuche wurde der kommerziell erhältliche Vektor pcDNA6/TR verwendet, der mittels CMV-Promotor und beta-Globin Intron TetR exprimiert. Die Sequenz des TetR Gens unterscheidet sich dabei gegenüber der bisher verwendeten Sequenz aus dem Vektor pLVCT-tTR-Krab um ein Basenpaar. Hierdurch ist die zweite Aminosäure des TetR im Vektor pcDNA6/TR ein Serin wie in der ursprünglich isolierten Version aus *E. coli* und im Vektor pLVCT-tTR-Krab ein Alanin. Inwiefern hier ein Unterschied in der Funktion zwischen der Variante des Proteins mit der hydrophoben, unpolaren Aminosäure Alanin und der ungeladenen polaren Aminosäure Serin besteht, ist nicht eindeutig zu eruieren. Sowohl im Ausgangsvektor pWH510 (Altschmied *et al.*, 1988), in welchen die genomische DNA des TetR inkloniert wurde, als auch den Vektoren für Tet-Systeme (Gossen und Bujard, 1992) war der Austausch von Serin zu Alanin noch nicht vorhanden. Die Vektoren von Gossen und Bujard (1992) wurden dann zur Einklonierung des TetR Gens in den Vektor pLVCT-tTR-Krab verwendet. Hier kann von einer zufälligen Mutation bei der Konstruktion ausgegangen werden, da dazu auch in der Veröffentlichung des Vektors pLVCT-tTR-Krab nichts vermerkt ist (Szulc *et al.*, 2006). Der Vektor pLVCT-tTR-Krab wurde bereits häufig erfolgreich eingesetzt, sodass die Mutation keinen Einfluss auf die Funktion zu haben scheint. Bei den analog zu mit dem Vektor

pcDNA3.1(-) TetR (siehe **4.4.1**) durchgeführten transienten Versuchen mit pcDNA6/TR konnte erneut weder der Nachweis des TetR mittels Western Blot erbracht noch eine funktionale Verhinderung der Suppression von ERK2 durch pSUSTER2-EKR2 beobachtet werden.

Bereits durchgeführte Ergebnisse der stabilen Transfektion mit dem Vektor pT2B Puro CMV beta-Globin tTR mussten verworfen werden, da – wie bereits dargelegt – dieser keine stabile Transfektion der in die EcoRI-Schnittstelle einklonierten Kasette vermitteln konnte. Nachdem das Problem bei Verwendung des Vektors pT2B/Puro gefunden worden war, wurde als funktionsfähige Alternative der Vektor pT2 BN SVPuro CMV beta-tTR hergestellt (siehe **Klonierung 27**). Hierfür wurde dem Vektor pcDNA6/TR zunächst durch Mutation eine NheI-Schnittstelle hinzugefügt und die EcoRI-Schnittstelle entfernt (siehe **Mutation 3**).

Mutation	
Vektor	pcDNA6/TR
Oligos	MUT-pcDNA6+Nhe-EcoRI
Produkt	pcDNA6 TR +NheI-EcoRI
Verifikation	Verdau (NheI, EcoRI)

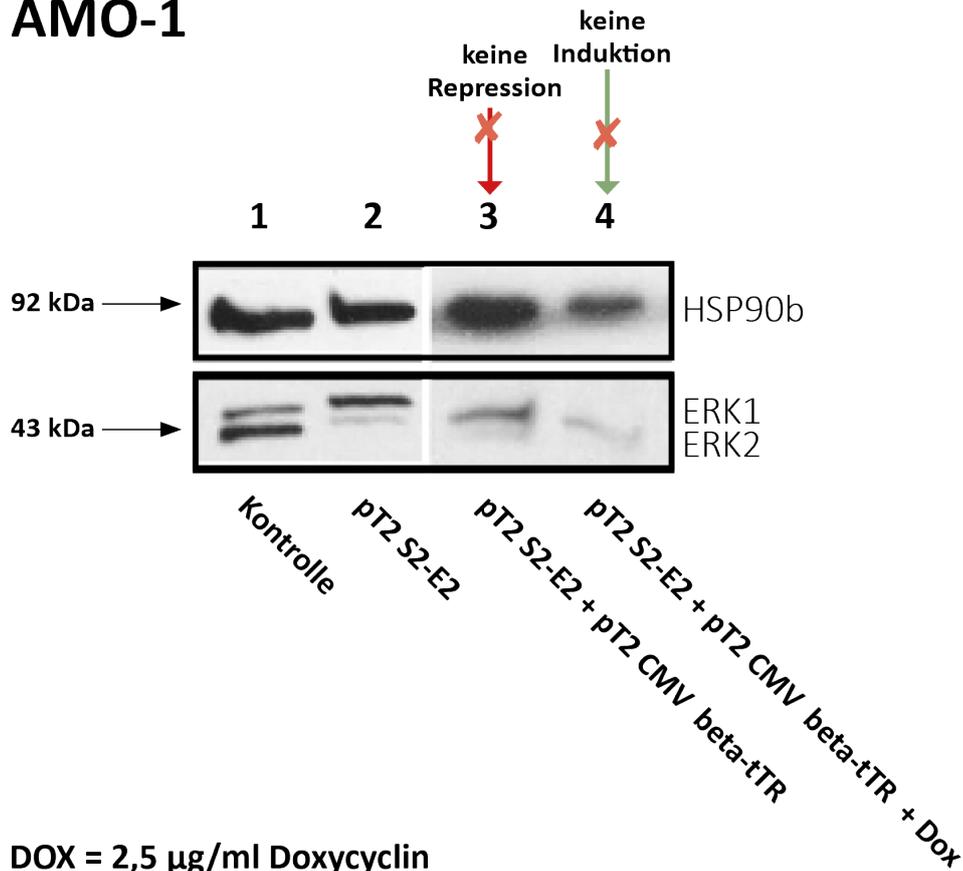
Mutation 3: pcDNA6/TR zu pcDNA6 TR+NheI-EcoRI

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2 BN SVPuro CMV
Verdau	NheI
Insert	pcDNA6 TR+NheI-EcoRI
Verdau	NheI
Produkt	pT2 BN SVPuro CMV beta-tTR
Screening	PCR (Primer CMV-3' & CMV-5')
Verifikation	Sequenzierung (Primer CMV-3')

Klonierung 27: pT2 BN SVPuro CMV zu pT2 BN SVPuro CMV beta-tTR

Der entstandene Vektor pT2 BN SVPuro CMV beta-tTR wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen wie der Vektor pT2 BN SVPuro CMV tTR in AMO-1 Zellen transfiziert (siehe **4.4.2**). Dann wurden alle Ansätze mit Geneticin und der Ansatz mit pT2 BN SVPuro CMV beta-tTR zusätzlich mit Puromycin für 10 Tage selektiert. Auf dem gegen ERK1/2 und HSP90beta zur Ladungskontrolle gefärbten Western Blot scheint die Repression mit dem beta-Globin Enhancer Element marginal besser zu sein als ohne (siehe **Abbildung 31**, Bahn 3 und **Abbildung 35**, S. 129, Bahn 13 im Vergleich zu Bahnen 9 und 11). Dies bewegt sich aber in einem Bereich, welcher durchaus auch auf technisch bedingte Ungenauigkeiten des semiquantitativen Western Blots zurückzuführen sein kann. Daher mussten weitere Ansätze zur Steigerung der Expression untersucht werden. Es zeigte sich, dass auch eine stabile Transfektion einer CMV-Kasette mit beta-Globin Intron vor dem TetR-Gen nicht den erhofften Expressionszuwachs vermitteln konnte.

AMO-1



DOX = 2,5 µg/ml Doxycyclin

Abbildung 31: Induzierbarer Knock-down von ERK2 in AMO-1 mit Expression des Repressors durch CMV beta-tTR
 Im Western Blot zeigt sich bei Versuchen mit dem Zwei-Vektor-System mit dem Vektor pT2/SVNeo NB S2 E2 und pT2/SVPuro BN CMV beta-tTR keine Repression des Knock-downs. Dies unterscheidet sich hierbei von den Versuchen im Ein-Vektor-System mit denselben Komponenten, wo eine deutliche, partielle Repression erreicht werden konnte. Die Induktion mit 2,5 µg/ml Doxycyclin über 48 h ist aufgrund der mangelnden Repression nicht beurteilbar. Diese Abbildung stellt einen Teil der vergleichenden **Abbildung 35** dar und wird zur besseren Veranschaulichung auch hier abgebildet.

4.4.3.2 IRES-gekoppelte Resistenzexpression zur verstärkten TetR-Expression

Die stabile Transfektion von Zellen mit der CMV-EGFP Kassette hatte gezeigt, dass die Verteilung der Stärke der messbaren EGFP Expression mittels FACS-Analyse nach Selektion in etwa einer Gauß-Verteilung entspricht. Es muss davon ausgegangen werden, dass dieser Unterschied der Stärke der Expression mit der Anzahl der Kopien, die stabil ins Genom integriert werden, korreliert und zudem möglicherweise abhängig vom Ort der Integration im Genom ist. Unabhängig von dem Mechanismus dieser unterschiedlich starken Expression, sollte es möglich sein, sich diese Varianz zu Nutze zu machen, um die Zellen mit der stärksten Expression zu selektieren. Sollte dies mit TetR exprimierenden Zellen gelingen, besteht die Möglichkeit eine Stockbank dieser Zellen anzulegen und diese für weitere Versuchen mit dem Tet-On-System zu verwenden. Um die Selektion mit der Protein-Expression zu koppeln, muss das Resistenz vermittelnde Protein im gleichen Verhältnis zum zu exprimierenden Protein transkribiert werden.

Dies kann mit Hilfe einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) erreicht werden. Hierbei werden mittels eines Promotors zwei Exons in Folge von der RNA-Polymerase abgelesen. Die entstandene mRNA kann dann sowohl von der 5'-Cap-Struktur aus als auch von der IRES-Sequenz aus von den Ribosomen translatiert werden (Bouabe *et al.*, 2008; Li und Wang, 2012; Mizuguchi *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2002). Zur Untersuchung des Potentials dieses Ansatzes wurde zunächst die Expression von EGFP gekoppelt mit der Puromycin-Resistenz verfolgt. Aus dem pT2/SVNeo BN Vektor wurde durch Schneiden mit NotI und BsmI die Expressionskassette für die Neomycin-Resistenz ausgeschnitten und der Vektor ohne diese anschließend wieder ligiert. In diesen pT2 BN Vektor wurde die CMV EGFP Kasette in die EcoRI-Schnittstelle einkloniert (siehe **Klonierung 2**) und anschließend hinter EGFP in die NotI-Schnittstelle die IRES-Puro Kasette einkloniert. Diese wurde dafür mittels PCR aus dem Vektor pTRIPZ amplifiziert und durch das gewählte Primer-Paar IRES-5' und IRES-3' wurden auf beiden Seiten NotI-Schnittstellen hinzugefügt (siehe **Klonierung 29**).

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2 BN
Verdau	EcoRI
Insert	pT2/SVNeo CMV EGFP
Verdau	EcoRI
Produkt	pT2 BN CMV EGFP
Screening	PCR (Primer pT2-5' & CMV-rev')
Verifikation	Sequenzierung (Primer pT2-5')

Klonierung 28: pT2 BN zu pT2 BN CMV EGFP

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2 BN CMV EGFP
Verdau	NotI
Insert	pTRIPZ
PCR	Primer IRES-5' & IRES-3'
Verdau	NotI
Produkt	pT2 BN CMV EGFP-IRES-Puro
Screening	PCR (Primer EGFP-fwd & CMV-3')
Verifikation	Sequenzierung (Primer EGFP-fwd)

Klonierung 29: pT2 BN CMV EGFP zu pT2 BN CMV EGFP-IRES-Puro

Der entstandene Vektor pT2 BN EGFP-IRES-Puro wurde stabil in L-363 Zellen transfiziert und anschließend wurde bei Puromycin-Konzentrationen von 1 µg/ml bis 50 µg/ml die Selektion durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die bei 50 µg/ml selektierten Zellen eine im Durchschnitt fünffach so hohe Expression von EGFP besitzen. Der Zugewinn an Expression von EGFP war bei niedrigeren Selektionskonzentrationen (1 – 20 µg/ml) hingegen eher gering.

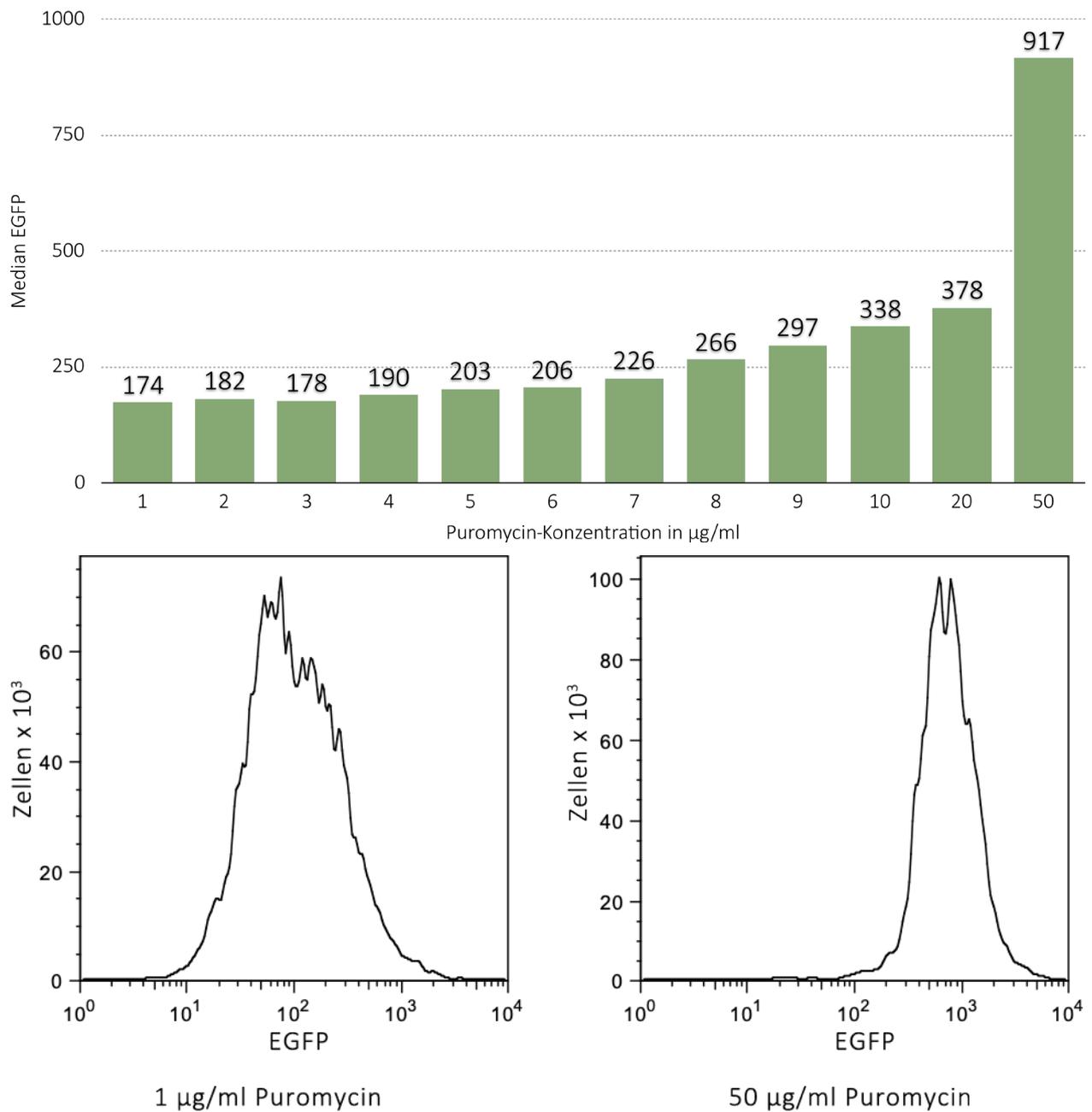


Abbildung 32: EGFP Expression bei verschiedenen Selektionskonzentrationen mit Puromycin

Nach der Selektion von stabil transfizierten L-363 Zellen zeigt sich eine Zunahme der EGFP-Intensität mit steigender Puromycin-Konzentration. Eine Verzehnfachung der normalen Selektionskonzentration von 1 µg/ml Puromycin erreichte eine Verdoppelung der mittleren EGFP-Expression. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml Puromycin zeigte sich eine Verfünffachung der mittleren EGFP-Expression. Zudem zeigte sich in der FACS-Analyse eine geringere Variabilität der EGFP-Expression der einzelnen Zellen im Vergleich zur Selektion bei 1 µg/ml Puromycin.

Um dies analog zu EGFP mit TetR zu erreichen, wurde über EcoRI in pT2 BN eine leere CMV-Kassette einkloniert. Diese wurde mit NotI geschnitten und das schon für den pT2 BN EGFP-IRES-Puro Vektor verwendete IRES-Puro PCR-Fragment einkloniert (siehe **Klonierung 30** und **Klonierung 31**).

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2 BN
Verdau	EcoRI
Insert	pT2/SVNeo CMV
Verdau	EcoRI
Produkt	pT2 BN CMV
Screening	PCR (Primer pT2-5' & CMV-rev')
Verifikation	Sequenzierung (Primer pT2-5')

Klonierung 30: pT2 BN zu pT2 BN CMV

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2 BN CMV
Verdau	NotI
Insert	pTRIPZ
PCR	Primer IRES-5' & IRES-3'
Verdau	NotI
Produkt	pT2 BN CMV IRES-Puro
Screening	PCR (Primer CMV-5' & CMV-3)
Verifikation	Sequenzierung (Primer CMV-5')

Klonierung 31: pT2 BN CMV zu pT2 BN CMV IRES-Puro

Das TetR-Fragment mit HA-Tag beziehungsweise mit beta-Globin Intron wurde über NotI einkloniert (siehe **Klonierung 32** und **Klonierung 33**). Es wurden die Fragmente benutzt, welche auch schon mit pcDNA3.1(-) verwendet worden waren.

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2 BN CMV IRES-Puro
Verdau	NheI
Insert	pcDNA3.1(-) tTR-HA
Verdau	XbaI
Produkt	pT2 BN CMV tTR-HA-IRES-Puro
Screening	PCR (Primer pT2-5' & tTR3)
Verifikation	Sequenzierung (Primer pT2-5')

Klonierung 32: pT2 BN CMV IRES-Puro zu pT2 BN CMV tTR-HA-IRES-Puro

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2 BN CMV IRES-Puro
Verdau	NheI
Insert	pT2B/Puro CMV beta-tTR
Verdau	XbaI
Produkt	pT2 BN CMV beta-tTR-IRES-Puro
Screening	PCR (Primer pT2-5' & MUT-tTR-HA-3')
Verifikation	Sequenzierung (Primer pT2-5')

Klonierung 33: pT2 BN CMV IRES-Puro zu pT2 BN CMV beta-tTR-IRES-Puro

Wie bei den EGFP-IRES-Puro Zellen wurde die Selektion ebenfalls bei Konzentrationen von 1 µg/ml bis 50 µg/ml Puromycin durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnten aber keine Zellen erfolgreich selektiert werden. Nach einer Woche Selektion stellte sich durch FACS-Analyse heraus, dass alle transfizierten Zellen tot waren. Dies lässt darauf schließen, dass die Puromycin-Resistenz von den Zellen nicht exprimiert wurde. Der Unterschied zwischen dem EGFP-IRES-Puro und dem TetR-IRES-Puro Vektor besteht im Abstand zwischen der Sequenz von EGFP

beziehungsweise TetR und dem IRES-Element. Der Abstand beträgt zwischen EGFP und IRES 17 bp und zwischen TetR und IRES 56 bp. Aus diesem Grund muss davon ausgegangen werden, dass die RNA-Polymerase hier die Transkription durch den großen Abstand terminiert und die Puromycin-Resistenz nicht exprimiert wird.

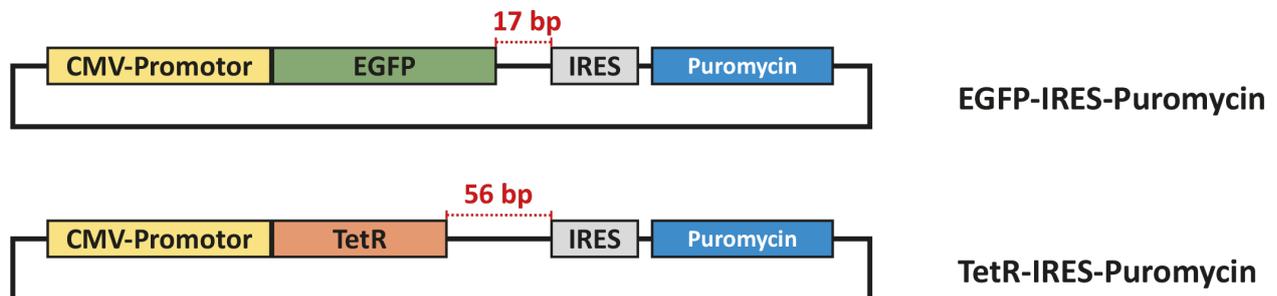


Abbildung 33: IRES-gekoppelte Resistenzexpression

Der Aufbau der Vektoren, welche zur IRES gekoppelten Resistenzexpression konstruiert wurden, variiert aufgrund der unterschiedlichen Möglichkeit die Gene einzuklonieren im Abstand zwischen dem Gen und der IRES-Sequenz. Zwischen dem Gen für EGFP und der IRES-Sequenz besteht ein Abstand von 17 bp. Im Gegensatz dazu besteht zwischen IRES und den Genen für TetR, beta-TetR und TetR-Krab ein Abstand von 56 bp. Da dies den Hauptunterschied zwischen den beiden Konstrukten darstellt, ist davon auszugehen, dass der Abstand zwischen den verschiedenen Versionen des TetR-Gens und der IRES-Sequenz zu groß ist und deshalb die Resistenz gegen Puromycin nicht exprimiert wird. Dies hat zur Folge, dass keine mit diesem Vektor transfizierten Zellen erfolgreich selektiert werden können.

Dieser Abstand ist eine Ursache, die man durchaus durch Mutation oder andere Klonierungen relativ einfach korrigieren hätte können. Nachdem aber parallel schon der Ansatz mittels CAG-Promotor zur Steigerung der Expression erfolgreich gewesen war, wurde dieses Ziel nicht weiterverfolgt. Zudem ist die für eine Verhundertfachung der Expression notwendige Selektionskonzentration von 50 µg/ml Puromycin, welche dem 50-fachen der normalen Selektionskonzentration entspricht, durchaus kritisch zu sehen. Bei derartig hohen Konzentration ist nicht bekannt, welche unspezifischen Wirkungen Puromycin in den Zellen entfaltet.

4.4.3.3 Nutzung des CAG-Promotors zur stabilen TetR-Expression

Als weiterer Ansatz, die Expression des TetR zu erhöhen, wurde die Verwendung des CAG-Promotors erprobt. In einem systematischen Vergleich verschiedener Promotoren konnte von Qin *et al.* (2010) zeigen, dass der CAG-Promotor in allen untersuchten Zelllinien bei geringer Varianz eine starke Expression zeigte. Im Vergleich hierzu können mit dem CMV-Promotor zwar in einigen Zelllinien hohe Expressionswerte erreicht werden, aber in einzelnen Zelllinien zeigt sich eine nur geringe Expression. Im Vergleich zum CAG-Promotor findet sich eine deutlich größere Varianz über verschiedene Zelllinien hinweg. Zudem wurde beobachtet, dass es in verschiedenen

Zelllinien im zeitlichen Verlauf zur verminderten Expression durch Methylierung (Curradi et al., 2002) und/oder Histondeacetylierung (Rietveld et al., 2002) des CMV-Promotors kommt.

Der CAG-Promotor ist aus dem ersten Enhancer-Element des Humanen Cytomegalievirus, dem Promotor des beta-Aktin Gens von Hühnern und dessen erstem nicht translatiertem Exon und dem ersten Intron (5'-Teil) sowie dem zweiten Intron (3'-Teil) und dritten Exon (5'-Teil) des beta-Globin-Gens von Kaninchen zusammengesetzt (Jun-ichi *et al.*, 1989).

Der Ausgangsvektor pCAGGS, der für die weiteren Klonierungen verwendet wurde, enthält zusätzlich das Polyadenylierungssignal des beta-Globins (Hitoshi *et al.*, 1991). In unserer Forschungsgruppe wurde der Vektor pCAGGS bereits vor dieser Arbeit verwendet und modifiziert. Es waren bereits weitere Restriktionsschnittstellen (Vektor pCAGGS/SE) hinzugefügt worden (Stühmer *et al.*, 2002). Die Multiple Cloning Site wurde anschließend so modifiziert, dass sie mit dem bereits etablierten Sleeping Beauty System kompatibel war. Insbesondere die dabei resultierende Entfernung einer EcoRI-Schnittstelle stellte einen wichtigen Schritt für weitere Klonierungen dar, da das vollständige CAG-Promotor-Fragment in die EcoRI-Schnittstelle des Sleeping Beauty Vektors subkloniert werden sollte. Um die Enden des CAG-Promotors mit EcoRI-Schnittstellen zu flankieren, wurde der Klonierungsvektor pBluescript SK(-) verwendet und zunächst zum Vektor pBluescript SK(-) 2xEcoRI mutiert.

Mutation	
Vektor	pBluescript SK(-)
Oligos	MUT-Blue-EcoRI
Produkt	pBluescript SK(-) 2xEcoRI
Verifikation	Sequenzierung (Primer M13-fwd)

Mutation 4: pBluescript SK(-) zu pBluescript SK(-) 2xEcoRI

Restriktion & Ligation	
Vektor	pBluescript SK(-) 2xEcoRI
Verdau	Sall, HindIII
Insert	pCAGGS-npl
Verdau	Sall, HindIII
Produkt	pBluescript SK(-) 2xEcoRI CAG
Screening	PCR (Primer T7 & T3)
Verifikation	Sequenzierung (Primer M13-fwd)

Klonierung 34: pBluescript SK(-) 2xEcoRI zu pBluescript SK(-) 2xEcoRI CAG

Durch diese Mutation wurde 5' von der bestehenden EcoRI-Schnittstelle eine weitere EcoRI-Schnittstelle hinzugefügt (siehe **Mutation 4**). Hierdurch werden die Sall- und die HindIII-Schnittstellen des pBluescript Vektors von den beiden EcoRI-Schnittstellen flankiert. Die Vektoren pCAGGS-npl und pBluescript SK(-) 2xEcoRI wurden anschließend mit Sall und HindIII

geschnitten und das aufgereinigte CAG-Promotor-Fragment in pBluescript SK(-) 2xEcoRI inkloniert. Anschließend wurde der so entstandene pBluescript SK(-) 2xEcoRI CAG Vektor mit EcoRI geschnitten und das Fragment in die EcoRI-Schnittstelle des Vektors pT2 BN SVPuro inkloniert (siehe **Klonierung 35**).

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2 BN SVPuro
Verdau	EcoRI
Insert	pBluescript SK(-) 2xEcoRI CAG
Verdau	EcoRI
Produkt	pT2 BN SVPuro CAG
Screening	PCR (Primer CAG-5' & pT2-3')
Verifikation	Sequenzierung (Primer pT2-5')

Klonierung 35: pT2 BN SVPuro zu pT2 BN SVPuro CAG

In diesen neu geschaffenen Sleeping Beauty Donor Vektor mit CAG-Promotor wurden die Fragmente für die Gene von TetR-HA und beta-TetR über die NheI-Schnittstelle inkloniert (siehe **Klonierung 36** und **Klonierung 37**).

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2 BN SVPuro CAG
Verdau	NheI
Insert	pcDNA3.1(-) tTR-HA
Verdau	XbaI
Produkt	pT2 BN SVPuro CAG tTR-HA
Screening	PCR (Primer CAG-5' & CAG -3')
Verifikation	Sequenzierung (Primer CAG -5')

Klonierung 36: pT2 BN SVPuro CAG zu pT2 BN SVPuro CAG tTR-HA

Restriktion & Ligation	
Vektor	pT2 BN SVPuro CAG
Verdau	NheI
Insert	pcDNA6 TR+NheI-EcoRI
Verdau	NheI
Produkt	pT2 BN SVPuro CAG beta-tTR
Screening	PCR (Primer CAG-5' & CAG-3')
Verifikation	Sequenzierung (Primer CAG -5')

Klonierung 37: pT2 BN SVPuro CAG zu pT2 BN SVPuro CAG beta-tTR

Daraufhin wurden AMO-1-Zellen mit den Vektoren pCMV(CAT)T7-SB100, pEGFP-N3 und dem Vektor pT2/SVNeo NB als Leervektor-Kontrolle sowie dem Vektor pT2/SVNeo NB S2-E2 als Knock-down-Funktionskontrolle sowie pT2/SVNeo NB S2-E2 zusammen mit pT2 BN SVPuro CAG tTR-HA beziehungsweise pT2 BN SVPuro CAG beta-tTR transfiziert. Es wurde mit

Geneticin und Puromycin zugleich für 10 Tage selektiert. Anschließend wurden die Zellen, welche mit pT2/SVNeo NB S2-E2 zusammen mit pT2 BN SVPuro CAG tTR-HA beziehungsweise pT2 BN SVPuro CAG beta-tTR transfiziert worden waren, gesplittet und zu der einen Hälfte für 48 Stunden 2,5 µg/ml Doxycyclin zugegeben. Von den Zellen wurde dann ein Western Blot mit Färbung von ERK1/2 sowie TetR beziehungsweise des HA-Tags und von HSP90beta als Ladungskontrolle durchgeführt.

In diesem Western Blot (siehe **Abbildung 34**) war es das erste Mal gelungen die TetR-Bildung direkt nachzuweisen. Bei der Färbung mit dem TetR-Antikörper war eine Bande bei der erwarteten Größe von 27 kDa schwach, aber dennoch spezifisch nachweisbar. Die HA-Tag Färbung war zudem sehr ausgeprägt, sodass die Expression des TetR durch die CAG-Promotor getriebene Expressionskassette offensichtlich deutlich höhere Konzentrationen in den Zellen bewirkte als alle vorher getesteten CMV-Promotor getriebenen Konstrukte. Zudem gelang nunmehr eine praktisch vollständige Repression des konstitutiven ERK2 Knock-downs in den mit pT2/SVNeo NB S2-E2 und pT2 BN SVPuro CAG tTR-HA beziehungsweise pT2 BN SVPuro CAG beta-tTR doppelt transponierten Zellen. Dies liefert den Beweis, dass das TetR-Protein in diesem System in ausreichenden Mengen gebildet wird und seine Funktion erfüllt. Dies belegt somit die aufgestellte These, dass eine zu geringe Expression von TetR ursächlich für die fehlende Repression war. Es zeigte sich jedoch kein Knock-down von ERK2 bei der Induktion mit Doxycyclin. Dies ist insofern überraschend, da die Induktion bereits erfolgreich beim Versuch im Ein-Vektor-System funktioniert hatte (siehe **Abbildung 29**). In weiteren Schritten sollte die Ursache für die fehlende Induktion ermittelt werden und die Expression mit dem CAG-Promotor direkt mit den vorher untersuchten Konstrukten verglichen werden.

AMO-1

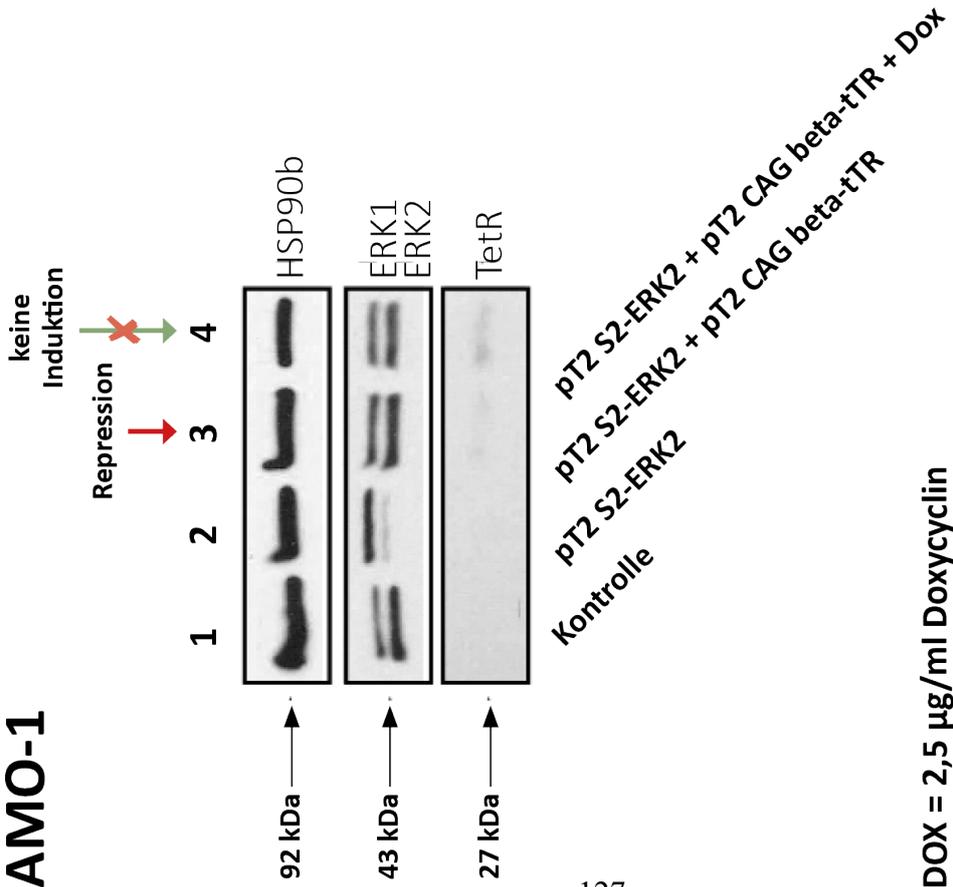
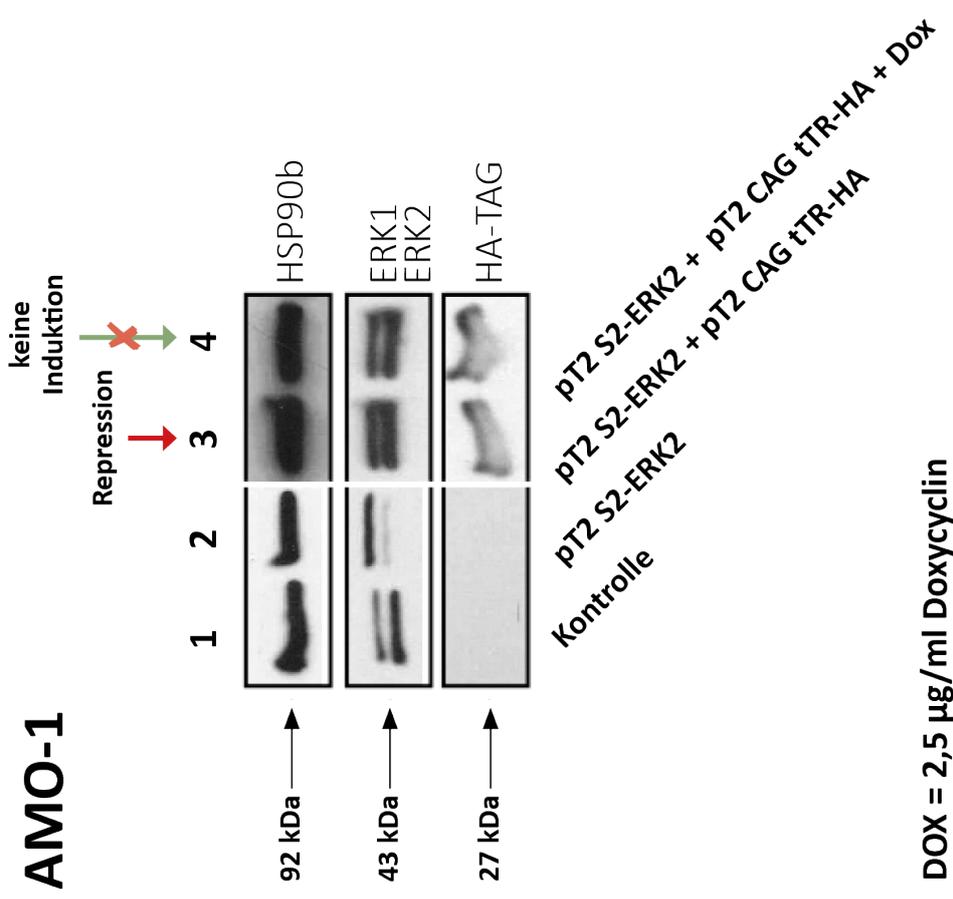


Abbildung 34: Nachweis der TetR- und HA-Tag-Expression im Western Blot in AMO-1 Zellen

Im Western Blot konnte der TetR, der mittels CAG-Promotor exprimiert wird, das erste Mal mittels Antikörper gegen TetR nachgewiesen werden. Ebenso gelang der Nachweis des TetR mit HA-Tag mittels Antikörper überaus deutlich. Neben diesem direkten Nachweis des TetR als Bande im Western Blot konnte dessen Wirkung funktionell durch die quasi vollständige Repression des konstitutiven Knock-downs von ERK2 bewiesen werden. Warum die Induktion für 48 Stunden mit 2,5 µg/ml Doxycyclin versagte, blieb zunächst unklar.

AMO-1

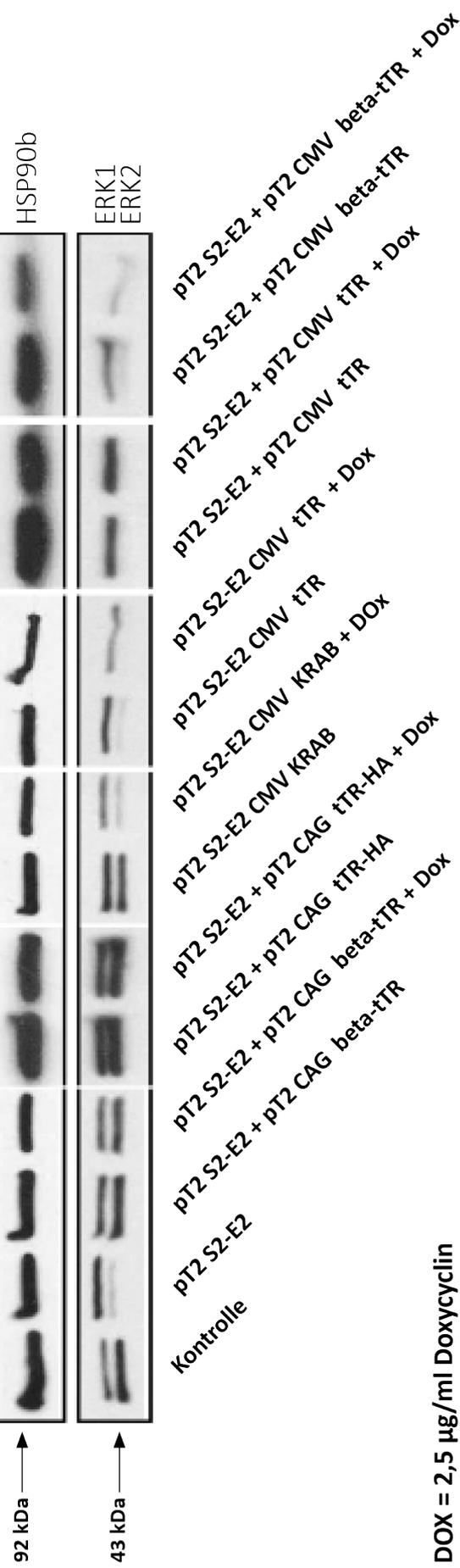
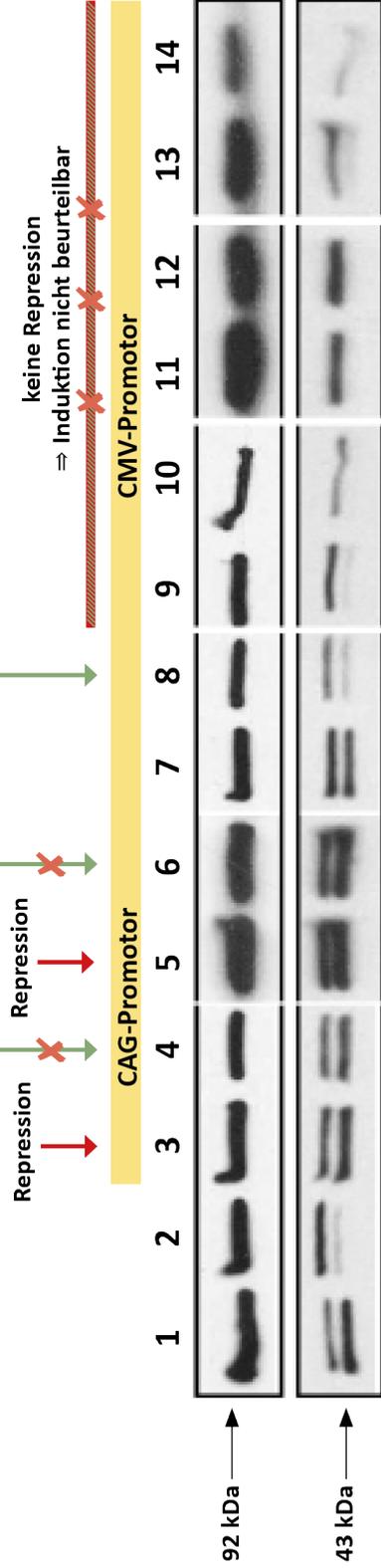


4.5 Induzierbare shRNA-Expression

Nachdem sich gezeigt hatte, dass sich mittels CAG-Promotor verlässlich eine robuste Expression des TetR und Repression des konstitutiven ERK2 Knock-downs erzielen ließ, fehlte als einziger Schritt zu einem voll funktionsfähigen induzierbaren shRNA-Tet-System die Induktion des Knock-downs. Dass dies prinzipiell möglich ist, wurde bereits bei Verwendung eines Vektors (Ein-Vektor-System) unter **Abschnitt 4.4.2.1** gezeigt, war aber in den letzten Versuchen im Zwei-Vektor-System nicht reproduzierbar gewesen. Die bis dahin verwendeten Kombinationen können der **Abbildung 35** entnommen werden.

Durch die Gegenüberstellung der Ansätze zur Etablierung eines Tet-On-System ist es möglich, die Effizienz der verschiedenen Kombinationen besser zu beurteilen. Auch im direkten Vergleich zeigte sich der CAG-Promotor mit beta-TetR beziehungsweise TetR-HA allen anderen untersuchten Konstrukten überlegen. Allein der Vektor pT2/SVNeo S2 E2 CMV KRAB konnte eine annähernd ähnliche gute Suppression des Knock-downs erreichen. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen vorher durchgeführter Versuche, welche zunächst keinen großen Vorteil von TetR-KRAB gegenüber TetR zeigen konnten. Erneut konnte keine Induktion des Knock-downs bei Verwendung des CAG-Promotors erreicht werden. Die Induktion bei Verwendung des Vektors pT2/SVNeo S2 E2 CMV KRAB funktionierte hingegen. Warum diese Induktion funktionierte und die der anderen Konstrukte nicht, ist unklar. Die Induktion der anderen Konstrukte ist nicht beurteilbar, da der Knock-down bereits im nicht-induzierten Zustand komplett ausgeprägt ist und keine Repression des Knock-downs stattzufinden scheint.

AMO-1



DOX = 2,5 µg/ml Doxycyclin

Abbildung 35: Vergleich verschiedener stabiler, induzierbarer Knock-downs von ERK2 in AMO-1

Um eine klare Aussage über die Qualität der unterschiedlichen untersuchten Konstrukte machen zu können, wurden diese im direkten Vergleich untersucht. Im Western Blot stellte sich die Repression mittels CAG-Promotor als klar überlegen heraus. Als einziges Konstrukt konnte hier die Expression von TetR-Krab eine annähernd gleichwertige Repression erreichen. Warum die Induktion für 48 Stunden mit 2,5 µg/ml Doxycyclin bei allen Konstrukten – abgesehen von CMV Krab – weiterhin versagte, wurde im Folgenden genauer untersucht.

Zur Analyse der Ursache der fehlenden Induktion bei genannter Herangehensweise wurde von den mit 5 µg/ml Doxycyclin induzierten AMO-1 Zellen vor und nach der Induktion eine FACS-Messung durchgeführt. Hier stellte sich heraus, dass alle induzierten Zellen PI- und Annexin V-positiv waren. Aufgrund dieser Messdaten ist davon auszugehen, dass alle untersuchten Zellen (pro-)apoptotisch/nekrotisch sind. Dies erklärt, dass kein funktioneller Knock-down durch Induktion mit Doxycyclin erreicht werden konnte, da Zellen in (beginnender) Apoptose nicht mehr hinreichend in der Lage sind shRNA zu produzieren.

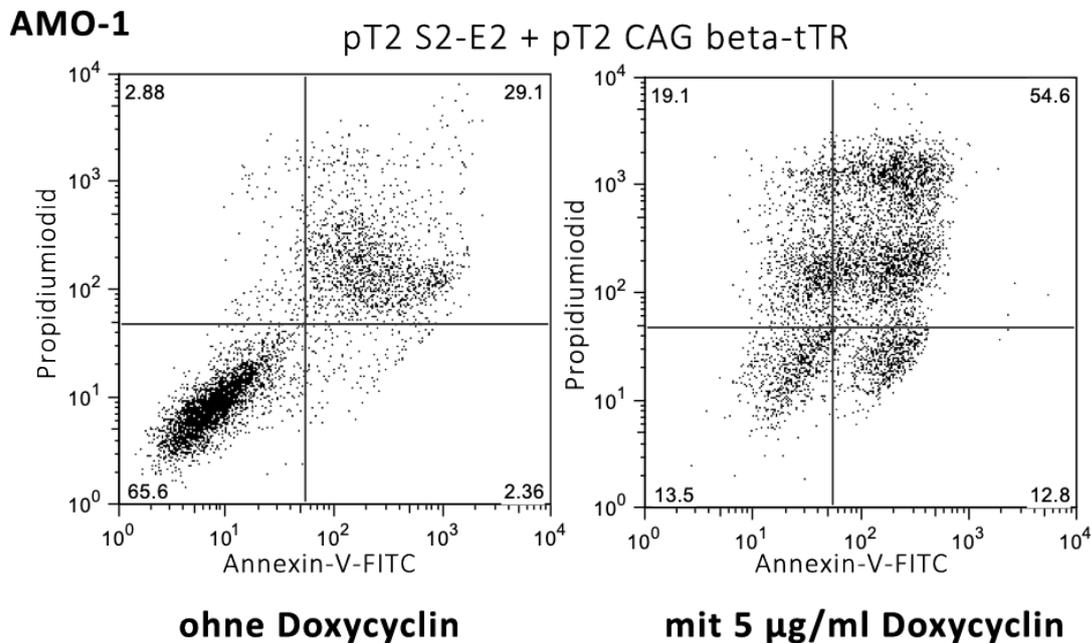


Abbildung 36: Apoptose nach Induktion mit Doxycyclin

Die FACS-Analyse nach für 48 Stunden durchgeführter Induktion mit 5 µg/ml Doxycyclin zeigt, dass dies zur Apoptose oder Nekrose der AMO-1 Zellen führt. Diese Schlussfolgerung ergibt sich aus der Tatsache, dass praktisch alle gemessenen Zellen (rechte Seite) sowohl PI als auch Annexin V positiv sind. Die Messung vor Induktion (linke Seite) ergibt einen Anteil an 65% vitaler Zellen. Daher lässt sich schließen, dass das verwendete Doxycyclin ursächlich für den Zelltod ist. Dies erklärt auch die fehlende Induktion, da tote Zellen keine shRNA mehr bilden, welche zu einem Knock-down führen würden.

Es stellte sich die Frage nach der Ursache für die Apoptose der Zellen. Zum einen könnte natürlich die Konzentration des TetR bei Verwendung des CAG-Promotors so hoch sein, dass es schädliche Einflüsse auf die Zellen besitzt. Da sich die Apoptose aber erst bei Zugabe von Doxycyclin entwickelt, könnte eine Kontamination beziehungsweise fehlerhaftes Ansetzen die Ursache sein. Um dies zu untersuchen, wurde das bisher verwendete Doxycyclin verworfen und die verwendete Lösung komplett neu auf die verwendeten Konzentrationen titriert. Daraufhin wurden AMO-1-Zellen erneut transfiziert und nach Selektion mit 2,5 µg/ml beziehungsweise 5,0 µg/ml Doxycyclin für 48, 96 beziehungsweise 144 Stunden induziert. Von den Zellen wurde dann ein Western Blot durchgeführt und gegen ERK1/2, TetR und als Ladungskontrolle gegen HSP90beta gefärbt.

JJN-3

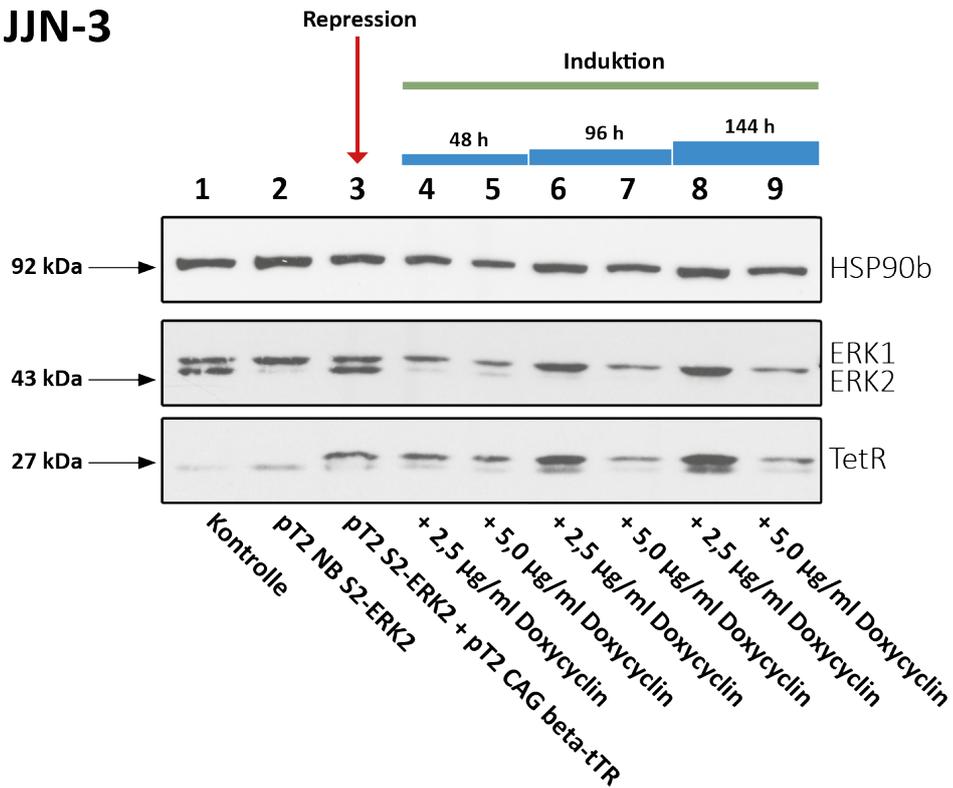


Abbildung 37: Induzierbarer Knock-down von ERK2 in JJN-3 nach verschiedenen Induktionsdauern

In JJN-3 wurde der Knock-down von ERK2 mit zwei verschiedenen Konzentrationen von frisch angesetzttem Doxycyclin nach verschiedenen Induktionszeiträumen untersucht. Die Expression des TetR wurde hierbei mit CAG-Promotor mit dem beta-TetR-Konstrukt vermittelt. Im Western Blot konnte die Expression des TetR eindeutig mittels Antikörper nachgewiesen werden (Bahnen 3 bis 9). Die Repression des Knock-downs zeigte sich im nicht-induzierten Zustand (Bahn 3) auf dem Ausgangsniveau der Negativ-Kontrolle (Bahn 1, normale Zellkultur). Die Induktion nach 48 h, 96 h und 144 h zeigte bei beiden Doxycyclin-Konzentrationen einen sehr guten Knock-down (Bahnen 4 bis 9), der der Qualität der Positiv-Kontrolle (SUSTER2 ohne TetR-Expression) entspricht.

In diesem Western Blot konnte eine äußerst gute Repression des nicht-induzierten Konstrukts nachgewiesen werden. Qualitativ entsprach die Repression der Negativ-Kontrolle. Zudem zeigte sich eine sehr gute Induktion des Knock-downs bei allen untersuchten Doxycyclin-Konzentrationen und Induktionszeiträumen. Der Knock-down von ERK2 entsprach hierbei der Positiv-Kontrolle mit pT2/SVNeo NB S2 E2 ohne Repressorprotein. Die Verwendung eines frischen titrierten Ansatzes an Doxycyclin stellte sich als erfolgreich heraus. Es lässt sich zudem ableiten, dass 2,5 µg/ml Doxycyclin zur Induktion ausreichend sind. Womöglich lassen sich sogar noch niedrigere Konzentrationen verwenden. Für den induzierten ERK2 Knock-down ist eine Induktionsdauer von 48 Stunden ausreichend, eine längere Induktion konnte hier keine Vorteile in Bezug auf die Knock-down Qualität aufweisen. Neben der Restproduktion („Leakiness“) beim Knock-down durch shRNA hängt die nachgewiesene Proteinkonzentration auch noch von der nach Knock-down-Beginn noch nicht abgebauten Proteinmenge ab. Da die Halbwertszeiten für verschiedene Proteine unterschiedlich sind, kann die Induktionsdauer für andere Zielproteine als

ERK2 durchaus auch von den hier verwendeten 48 Stunden abweichen. Auch der Nachweis von TetR konnte in diesem Western Blot deutlich erbracht werden.

Schlussendlich zeigte sich, dass die Kombination aus H1-Promotor mit zwei TetO-Sequenzen und dem CAG-Promotor zur TetR-Expression sowohl äußerst gute Repressions- als auch Induktionseigenschaften aufweist. Somit konnte ein äußerst leistungsfähiges Tet-On-System für RNAi im MM etabliert werden.

5 Diskussion

5.1 Übersicht

Das Ziel, ein Sleeping Beauty Transposon-basiertes System zum induzierbaren shRNA-vermittelten stabilen Knock-down von Zielproteinen zu entwickeln, konnte in dieser Arbeit gänzlich erreicht werden. Zudem konnte die Expertise, mit dem Sleeping Beauty Transposon System DNA-Funktionselemente stabil in das Genom von Myelomzellen zu integrieren, deutlich ausgebaut werden. Aufbauend auf schon vorhandenen Daten konnte am Beispiel des EGFP gezeigt werden, dass eine stabile Proteinexpression für mindestens 231 Tage ohne weitere Selektion mit Antibiotika möglich ist. Für die stabile und konstitutive shRNA-Expression zeigte sich am Beispiel des Zielproteins ERK2, dessen alleinige Blockade nur wenig bis keinen Einfluss auf die Proliferation hat, in verschiedenen Zelllinien ein signifikanter Knock-down in den ersten ein bis zwei Monaten, wonach sich dieser Effekt in manchen Zelllinien wieder abschwächte. Neben den schon bekannten Selektionsbedingungen für Geneticin, konnten die Bedingungen für die Selektion mit Puromycin etabliert werden, und es wurde gezeigt, dass auch eine gleichzeitige Selektion mit Geneticin und Puromycin möglich ist. Dies stellt eine essentielle Grundlage für die stabile Integration der verschiedenen SBTS-basierten Komponenten des entwickelten Systems dar.

Für das Tet-On-System konnte der H1-Promotor so modifiziert werden, dass die Expression der shRNA durch das Andocken des TetR-Proteins an zwei TetO-Sequenzen, welche vor und nach der TATA-Box liegen, inhibiert wird. Durch die Zugabe von Doxycyclin wird diese Inhibition durch Konformationsänderung des TetR-Proteins durch Doxycyclin aufgehoben. Sowohl in transienten Versuchen als auch mit stabil transfizierten Zellen konnte nachgewiesen werden, dass der konstitutive Knock-down mit dem modifizierten H1-Promotor genauso effizient ist wie beim H1-Promotor des Ausgangsvektors pSUPER. Auch der simultane multiple Knock-down von vier verschiedenen Zielproteinen (ERK1/2 und MEK1/2), der von Bernhard Roth bereits ausgiebig in Versuchsansätzen mit transient transfizierten MM Zellen und dem pSUS-Vektor erprobt wurde, konnte mit dem Sleeping Beauty Transposon System stabil in MM Zellen durchgeführt werden.

Die Knock-down Qualität zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den mit transienten Ansätzen erreichten Ergebnissen von Bernhard Roth. Die stabil integrierte induzierbare Version des Quadrupel-Knock-down Vektors gegen ERK1/2 und MEK1/2 zu testen und zu optimieren, wurde von Laurens Zugelder im Rahmen seiner Dissertation wahrgenommen.

Die womöglich größte Herausforderung dieser Arbeit stellte die adäquate Expression des TetR-Proteins in MM Zellen dar. Nachdem zunächst weder das TetR-Protein im Western Blot nachgewiesen werden konnte, noch eine funktionelle Wirkung (Blockade der konstitutiven shRNA-Expression gegen ERK2) beobachtet werden konnte, zeigte sich als initialer Erfolg im Ein-Vektor-System (mit induzierbarem(n) H1-Promotor(en) und einer CMV-TetR-Expressionskassette zusammen im Vektor pT2/SVNeo NB) eine nachweisbare Abschwächung des konstitutiven ERK2 Knock-downs und eine Induzierbarkeit durch Doxycyclin. Allerdings stellte sich heraus, dass die Repression nicht ausreichend effektiv war und eine sogenannte „Leakiness“ bestand. Dies deutet in Verbindung mit dem fehlenden Nachweis von TetR-Protein, dass dieses nicht ausreichend vorhanden war. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass eine Doxycyclin-Konzentration von 0,5 µg/ml nicht ausreichte, um eine hinreichende Induktion zu bewirken, sodass in weiteren Versuchen höhere Konzentrationen verwendet wurden.

Anschließend wurden verschiedene Schritte unternommen, um die Expression zu steigern. Bereits im Ein-Vektor-System zeigte sich, dass das Fusionsprotein aus TetR und KRAB für den induzierbaren H1-Promotor keinen messbaren Vorteil bezüglich der „Leakiness“ besitzt. Um das Vektorsystem flexibler zu gestalten, wurde versucht die shRNA-Expression und die Expression des TetR auf zwei verschiedene Vektoren mit unterschiedlichen Antibiotika-Resistenzen zu legen. Im Gegensatz zum Ein-Vektor-System konnte hier zunächst keine Repression des shRNA-Knock-downs beobachtet werden. Intensive Analysen zu möglichen Fehlerquellen konnten schließlich den verwendeten pT2B Puro Vektor, der als Expressionsvektor für TetR verwendet wurde, als Ursache für die fehlende TetR-Expression ausmachen. Bei Tests mit einem modifizierten Vektor, welcher EGFP statt TetR exprimiert, überlebten nach Selektion mit Puromycin Zellen, die nur transient oder gar nicht EGFP exprimierten. Eine detaillierte Analyse der verwendeten Klonierungsschnittstelle zeigte, dass diese außerhalb der repetitiven Sequenzen (IR/DR), die der Sleeping Beauty Transposase als Erkennungssequenz dienen, liegt, sodass zwar die Antibiotikaresistenz, nicht aber die gewünschte Nutzlast in das Genom der Zielzellen eingeschleust wurde. Dies führte zur Notwendigkeit, einen zu unseren Ansprüchen passenden, neuen Sleeping Beauty Donor Vektor mit Puromycin-Resistenz zu entwickeln. Dieses neue Plasmid konnte mittlerweile in verschiedenen anderen Forschungsprojekten Anwendung finden

(Barrio *et al.*, 2018; Barrio *et al.*, 2019; Munawar *et al.*, 2019; Weissbach *et al.*, 2020). Anschließend wurde versucht mit diesem Vektor die TetR-Expression durch das Hinzufügen des beta-Globin Enhancers vor die TetR-Sequenz im CMV-Promotor zu steigern. Transiente Versuche konnten jedoch keinen messbaren Nachweis des TetR erbringen. Die stabile Transfektion einer CMV-Kassette mit beta-Globin Enhancer vor dem TetR-Gen erbrachte ebenfalls keine adäquate Repression. Im Vergleich zum Ein-Vektor-System waren die Resultate im Zwei-Vektor-System bei gleicher TetR-Expressionskassette unerwarteterweise bezüglich der Repression sogar schlechter, jedoch funktionierte das TetR-KRAB-Fusionsprotein vergleichsweise besser. Da sich hierfür keine offensichtliche mechanistische Erklärung finden lässt, ist die wahrscheinlichste Deutung, dass es durch Unterschiede in der Transfektionseffizienz zwischen den einzelnen Versuchen zu einer unterschiedlich großen Anzahl von Integrationen der Expressionskassetten ins Genom kam.

Als weiterer Ansatz wurde versucht mit dem IRES-Element die Expression des TetR und der Antibiotika-Resistenz miteinander zu verknüpfen. Durch eine höhere Antibiotikakonzentration sollten nur Klone mit einer verstärkten Expression der Resistenz und von TetR selektiert werden. Für EGFP konnte hierbei eine bis zu fünffach stärkere Expression im Vergleich zur normalen Selektionskonzentration erreicht werden. Dasselbe Prinzip stellte sich für TetR jedoch als nicht erfolgreich heraus. Es konnten keine stabilen Klone selektiert werden, sodass davon auszugehen ist, dass die Antibiotika-Resistenz nicht exprimiert wird. In diesem Zusammenhang lässt sich vermuten, dass auf dem Vektor das Gen für TetR im Vergleich zum EGFP-Gen zu viele Basenpaare von der IRES-Sequenz entfernt liegt. Zuletzt, und mithin erfolgreich, wurde schließlich die Verwendung des CAG-Promotors erprobt. Mittels Western Blot konnte auf diese Weise das erste Mal eine deutliche TetR-Expression nachgewiesen werden. Ebenfalls zeigte sich eine äußerst gute Repression (keine messbare „Leakiness“) und Induktion des H1-Promotors. Hierbei wurden in eine CAG-Promotor-getriebene Expressionskassette der beta-Globin Enhancer und das TetR-Gen einkloniert. Beim Versuch den mit einem HA-Tag markierten Repressor (TetR-HA; ohne den beta-Globin Enhancer) mittels CAG-Promotor zu exprimieren, zeigte sich nach HA-Tag-Antikörperfärbung eine deutlich spezifische Bande im Western Blot. Analog zu früheren Beobachtungen für die Expression von Ras-Proteinen (Steinbrunn *et al.*, 2011) ist also offensichtlich für das TetR-Protein ein deutlich höheres Expressionsniveau im MM mit der CAG-Promotor-getriebenen als mit der CMV-Promotor-getriebenen Expressionskassette möglich. Neben einer absoluten höheren Menge an transkribierter mRNA ist ebenfalls eine erhöhte mRNA-Stabilität durch untranslatierte Bereiche der RNA denkbar. Gemäß Literaturlage scheint hierbei

die Effizienz des Promotors von der verwendeten Zelllinie abzuhängen (Damdindorj *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2010; Seo *et al.*, 2010). Mit den Vektoren pT2 BN SVPuro CAG beta-Globin tTR und pT2 BN SVNeo S2 ERK2 konnte der Nachweis dafür erbracht werden, dass ein gut reguliertes Knock-down-System mit induzierbarem H1-Promotor mit dem Sleeping Beauty Transposon System in MM Zellen möglich und effizient umsetzbar ist. Laurens Zugelder konnte bei der Weiterführung dieses Projektes zeigen, dass die Induzierbarkeit von Mehrfach-Konstrukten analog zu induzierbaren Einfach-Konstrukten ohne weitere Einschränkungen funktioniert (Fink *et al.*, 2018). Der prognostizierte Nutzen als biomolekulargenetisches Werkzeug im MM konnte unter anderem bereits am klinisch relevanten NFκB-Signalsystem unter Beweis gestellt werden (Zugelder, 2019).

5.2 Beurteilung der Unterschiede zwischen transienter und stabiler shRNA-Expression

Ein großer Unterschied zwischen transienten und stabilen Versuchen ist die Anzahl der Kopien der shRNA-Kassetten im Zellkern. Die Menge und Konzentration der verwendeten Vektoren in dieser Arbeit ähnelt auch der von vielen anderen Forschungsgruppen verwendeten Menge bei Elektroporationen anderer Zelllinien. Die DNA eines Plasmids pSUSTER2 ERK2 besitzt eine molekulare Masse von 2×10^6 Dalton. 1 µg entspricht daher 3×10^{11} Kopien des Plasmids und bei den standardmäßig verwendeten 30 µg (20 µg/ml auf 1,5ml) 9×10^{12} (9 Billionen) Kopien pro Elektroporationsansatz auf 20 Millionen Zellen. Dies entspricht durchschnittlich $3,5 \times 10^6$ (3,5 Millionen) Plasmiden pro Zelle. Die Anzahl, die tatsächlich in die Zelle eindringt, ist bedeutend geringer, da das Zellvolumen im Vergleich zum Gesamtvolumen des Elektroporationsansatzes um einiges kleiner ist. Noch dazu kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Zellmembran trotz Elektroporation überhaupt keine Barriere mehr für die DNA darstellt. Andererseits ist unklar, inwieweit sich vielleicht durch Anlagerung an die Zellmembran auch eine lokale Anreicherung günstig auf die Zahl der aufgenommenen Plasmidmoleküle auswirken könnte. Außerdem ist es für die Transkription entscheidend, dass die Plasmide in den Zellkern aufgenommen werden. Messdaten, die mittels RT-PCR bestimmt wurden, zeigen für ähnliche Plasmid-Konzentrationen, dass im Zellkern 75 bis 50.000 Kopien ankommen (Cohen *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse sind jedoch nicht ohne Weiteres auf die Elektroporation von MM Zellen übertragbar, da andere Zellarten verwendet und die Transfektion mit Lipofectamin beziehungsweise Polyethylenimin (PEI) durchgeführt wurde. Die Elektroporation scheint mit diesen Transfektionsmethoden aber bezüglich der Anzahl der transfizierten Plasmide in Zellen und Zytoplasma vergleichbar zu sein. Van Gaal *et al.* (2011) konnten bei einer Elektroporation mit

einem Ansatz von $1,3 \times 10^6$ Plasmiden pro Zelle anschließend ungefähr $1,5 \times 10^3$ Plasmidkopien pro Zelle nachweisen. Im Vergleich dazu waren es bei der Transfektion mit PEI $1,4 \times 10^3$ und mit Lipofectamin $4,9 \times 10^2$ pro Zelle. Für die Elektroporation wurde in dieser Veröffentlichung die Anzahl der Plasmide im Zellkern nicht bestimmt. Es ist aber kein großer Unterschied zu erwarten, da der Transportmechanismus der Plasmide in den Zellkern durch Zellkernporen bei allen Transfektionsarten der gleiche ist. Eventuell läuft der Transport in den Zellkern nach Elektroporation sogar etwas effizienter ab, da die Plasmide nicht an ein Transfektionsagens gekoppelt sind. In einer Messung von Rosazza *et al.* (2013) kamen nach Elektroporation 2.000 bis 10.000 Plasmide im Zellkern an. In sich teilenden Zellen sinkt die Anzahl der Plasmide schnell. So konnten nach 24 bis 36 Stunden nur noch 20 bis 1.000 Plasmide nachgewiesen werden (Coonrod *et al.*, 1997; James und Giorgio, 2000; Tseng *et al.*, 1997). Möglicherweise ist diese Menge im Zellkern aber schon ausreichend, um den Transkriptions- und Translationsprozess zu sättigen. Aufgrund dieser Annahme würde eine höhere Anzahl an Kopien keine oder eine nur sehr gering verstärkte Expression vermitteln (van Gaal *et al.*, 2011).

Bei der stabilen Integration durch das Sleeping Beauty Transposon System konnte nachgewiesen werden, dass abhängig von der Gesamtkonzentration und den Konzentrationsverhältnissen des Transposase-Plasmids und des Donor-Plasmids bis zu 40 Integrationen pro Zelle vorkommen. Im Durchschnitt sind hierbei circa 10 Integrationen pro Zelle mit einer Häufung von zwei bis sechs Integrationen pro Zelle zu finden. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Transpositionseffizienz wieder ab, sodass vermutet wird, dass sich ab einer bestimmten Konzentration die Transposase-Proteine gegenseitig behindern (Balasubramanian *et al.*, 2016).

Der Vergleich dieser Zahlen der Kopien von Plasmiden – beziehungsweise Integrationen im Zellkern von transienter zu stabiler Transfektion – lässt höchstwahrscheinlich höhere shRNA-Konzentration bei den transienten Versuchen erwarten. In den in der vorliegenden Arbeit und auch in den folgenden von Laurens Zugelder durchgeführten Versuchen konnten bei dem semiquantitativen Nachweis mittels Western Blot keine signifikanten Unterschiede in der Knock-down-Qualität zwischen transienten und stabilen Versuchen gefunden werden, und das obwohl für die transienten Analysen nur die spezifisch angereicherte, am stärksten transfizierte Zellpopulation verwendet worden war. Hierfür kommen mehrere mögliche Ursachen in Betracht: Womöglich sind die hier verwendeten shRNA-Sequenzen derart effizient, dass schon eine geringe Zahl von Expressionskassetten ausreicht, um auf diese Weise den maximal möglichen Knock-down zu erreichen. Auf der einen Seite kann dies daran liegen, dass der RNAi-Weg schon seine maximale Kapazität erreicht hat und bereits gesättigt ist (siehe auch **5.3.1**). Auf der anderen Seite handelt es

sich womöglich beim nachweisbaren Proteinrest im Western Blot um den Proteinanteil, der aufgrund der Dauer seiner Halbwertszeit noch nicht abgebaut worden ist. Nachdem durch den shRNA-Knock-down nur die Bildung des Proteins unterbunden wird, müsste zum Ausschluss dieser Möglichkeit der Beobachtungszeitraum ausgeweitet werden. Dies ist bei transienten Versuchen aber ohne erneute Transfektion nicht möglich. Es kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass die Transkription von stabil ins Genom integrierten Promotoren häufiger stattfindet als von Promotoren auf Plasmiden. Daher könnte es möglich sein, dass sich die shRNA-Konzentrationen nicht, wie angenommen, drastisch unterscheiden. Um eine genaue Aussage hierüber treffen zu können, müsste die shRNA-Menge zum Beispiel mit Hilfe der quantitativen RT-PCR gemessen werden. Es ist zu erwarten, dass eine niedrigere, aber ausreichende Konzentration von shRNA Vorteile besitzt, da weniger beziehungsweise gar keine Off-Target-Effekte auftreten. Bei transienten Versuchen sind diese zudem schlecht von Elektroporationseffekten zu differenzieren. Zusammenfassend lässt sich aus den vorliegenden Daten schlussfolgern, dass die Menge der exprimierten shRNA nur sekundäre Relevanz besitzt und vielmehr die Effektivität der gewählten Zielsequenzen der relevanteste Faktor bei RNAi darstellt (Fakhr *et al.*, 2016). Diesbezüglich hat sich die Nutzung von shRNA Datenbanken etabliert. Aktuell wird versucht mit Hilfe von Deep Learning Zielsequenzen vorherzusagen, welche noch erfolversprechender sind als die etablierten Konzepte zum shRNA-Design (Han *et al.*, 2018; Humphreys *et al.*, 2020).

Für nicht suffiziente Knock-downs trotz optimaler Wahl der shRNA-Zielsequenz oder für Gene mit unterschiedlichen Splicevarianten stellt das konzipierte Knock-down System, aufgrund der Möglichkeit mehrere shRNAs gleichzeitig zu exprimieren, eine bisher nicht verfügbare Option dar. Die Verwendung von zwei oder mehreren verschiedenen shRNA-Kassetten mit derselben Ziel-mRNA mit unterschiedlichen Zielsequenzen zeigt nämlich, dass hierdurch ein stärkerer Knock-down möglich ist (bisher unveröffentlichte Daten). Dies konnte am Beispiel von Syntaxin 4 (STX4) gezeigt werden, welches essentiell an der Sekretion von intrazellulären Vesikeln, die Antikörper enthalten, beteiligt ist (Gomez-Jaramillo *et al.*, 2014; Rahman *et al.*, 2013). Es ist zu prognostizieren, dass durch die Blockade der Sekretion über eine toxische Akkumulation der großen Menge an gebildeten monoklonalen Antikörpern in MM Zellen gezielt Zellstress bis hin zur Apoptose ausgeübt werden kann. Versuche mit Brefeldin A, das einen ähnlichen, aber breiteren Wirkmechanismus aufweist, konnten bereits eine sehr gute Wirksamkeit in Zellen des MM vermitteln (Carew *et al.*, 2006). Um diese Erkenntnisse nutzen zu können, ist es aufgrund der nicht selektiven Wirkung von Brefeldin notwendig, den kausalen Mechanismus

zu klären. STX4 besitzt im *Homo sapiens* drei verschiedene mRNA Varianten (NM_001272095.1, NM_001272096.1, NM_004604.4). Die Zielsequenzen für die shRNA wurden mit Hilfe des GPP Web Portals des Broad Institutes so ausgewählt, dass alle Splicevarianten die Zielsequenz der shRNA enthalten. Auf diese Weise wäre ebenfalls möglich gewesen, shRNAs nur gegen bestimmte Splicevarianten auszuwählen. In transienten Versuchen mit pSUSTER2 in L-363 und JJN-3 wurden jeweils die zwei besten Sequenzen ausgewählt, aus denen nachfolgend ein Doppelkonstrukt erstellt wurde. Sowohl in transienten als auch stabil transfizierten Zellen konnte gezeigt werden, dass das Doppelkonstrukt den jeweiligen Einzelkonstrukten semiquantitativ leicht überlegen ist. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Nagao *et al.* (2008) überein. Diese Forschergruppe konnte auf ähnliche Weise bessere Knock-downs erreichen.

5.3 Limitationen

5.3.1 Off-Target-Effekte von RNAi

Ein wichtiger Nebeneffekt, der bei RNAi beachtet werden muss, sind Off-Target-Effekte. Diese äußern sich zum einen durch einen Knock-down anderer Proteine und nicht – wie gewünscht – des Zielproteins und präsentieren sich zum Teil auch mit toxischer Wirkung auf die Zellen. Hierfür wird hauptsächlich der Eintritt von siRNA in den miRNA-Signalweg verantwortlich gemacht (Birmingham *et al.*, 2006; Pei und Tuschl, 2006). Zum anderen kann eine Überlastung der RNAi-Maschinerie zur Deregulierung der endogenen Geninhibition durch miRNA führen. Darüber hinaus sind in vivo noch weitere toxische Wirkungen zu beobachten, die durch Reaktionen des Immunsystems verursacht werden (Kanasty *et al.*, 2012). Zwar tritt dies nicht bei in vitro Versuchen auf, die zuvor genannten Punkte sind jedoch äußerst relevant für die Durchführung und Beurteilung von Versuchen (Fedorov *et al.*, 2006). Selbst shRNAs, die man bevorzugt als Kontrolle für Off-Target-Effekte einsetzt, so zum Beispiel shRNA gegen Luciferase, weisen zum Teil Off-Target-Effekte auf (Hasegawa *et al.*, 2017). Im Gegensatz zu früheren Annahmen, dass die RNAi extrem spezifisch für die gewählte Zielsequenz ist (Elbashir *et al.*, 2001), führen auch nur teilweise Übereinstimmungen der Sequenzen zu einer verminderten Expression anderer Proteine (Holen *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2003).

Eine weiterer Auslöser ist zudem die Prozessierung des falschen RNA-Stranges (Sinnstrang) durch den RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) und nicht, wie vorgesehen, die Prozessierung des Gegensinnstranges. Auch der Gegensinnstrang selbst kann Off-Target-Effekte verursachen, wenn dessen 5' Ende komplementär zu nicht translatierten 3'-Enden (3'-UTR) von mRNA ist (Jackson und Linsley, 2010). Durch diese inkomplette Hybridisierung mit bis zu hunderten

mRNAs (Farh *et al.*, 2005; Krek *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005), die dieselben 3'-UTRs besitzen, können die siRNA in den endogenen miRNA-Signalweg eintreten (Jackson *et al.*, 2003) und eine Deadenylierung sowie die Inhibition der Translation und somit eine verminderte Expression verschiedener Gene verursachen (Doench und Sharp, 2004; Jackson *et al.*, 2006; Laursen *et al.*, 2010; Semizarov *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006).

Durch eine geschickte Wahl der Sequenz der shRNA beziehungsweise siRNA können diese Effekte vermindert werden. Heutzutage werden Algorithmen verwendet, welche die Übereinstimmung mit den 3'UTRs zu minimieren versuchen (Boese *et al.*, 2005; Naito *et al.*, 2009). Für exogen zugeführte siRNA besteht zudem die Möglichkeit durch Modifikation in Form von Methylierung, Verwendung von „Unlocked nucleic acids“ (UNA) und „Locked nucleic acids“ (LNA) etwaige Off-Target-Effekte zu minimieren (Chiu und Rana, 2003; Judge *et al.*, 2005; Langkjaer *et al.*, 2009; Morrissey *et al.*, 2005). Für shRNA und damit für den in der vorliegenden Arbeit verwendeten H1-Promotor ist diese Modifikation nicht möglich. Dafür können jedoch mit Hilfe der Verwendung von shRNA durch eine Positionierung der Schnittstelle für Dicer zwei Nukleotide vor der Schleife ebenfalls Off-Target-Effekte vermindert werden.

Um das Vorliegen und die Relevanz von Off-Target-Effekten *in vitro* einschätzen zu können, kann zum einen das Zielgen mit einer modifizierten DNA-Sequenz wieder eingebracht werden, das durch die verwendete Zielsequenz nicht mehr erfasst wird (Cullen, 2006; Echeverri *et al.*, 2006). Persistierende Auswirkungen sind somit auf Off-Target-Effekte und nicht auf den Knock-down zurückzuführen. In der Praxis stellt sich dies jedoch als schwierig heraus, da es mit einem hohen Aufwand verbunden und zum Teil fehleranfällig ist (Jackson und Linsley, 2010). Alternativ kann der Knock-down desselben Gens mit verschiedenen Zielsequenzen wiederholt werden. Jede siRNA beziehungsweise shRNA besitzt unterschiedliche Off-Target-Effekte. Sollte die beobachtete Wirkung über die verschiedenen Versuche mit verschiedenen siRNA/shRNA-Sequenzen hinweg redundant sein, ist anzunehmen, dass nicht Off-Target-Effekte die beobachtete Wirkung verursachen, sondern der spezifische Knock-down (Cullen, 2006; Echeverri *et al.*, 2006; Jackson und Linsley, 2010). Eine andere Herangehensweise besteht darin, die verschiedenen siRNA beziehungsweise shRNA alle gleichzeitig zu verwenden. Hierdurch ist eine Mittelung der Off-Target-Effekte zu erwarten, wodurch die Wirkung des Knock-downs im Vordergrund stehen sollte (Kittler *et al.*, 2007). Dies ist eine Anwendung, für die sich das in vorliegender Arbeit entwickelte RNAi-Kassetten-System äußerst gut nutzen lässt.

Als andere Ursache für Off-Target-Effekte wird die Sättigung des RNAi-Signalwegs angenommen (Castanotto *et al.*, 2007; Grimm *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2009; Koller *et al.*, 2006; Vickers *et al.*,

2007). Auch unabhängig von dem gerade genannten Eintreten von siRNA in den miRNA-Signalweg teilen diese beiden RNAi-Wege verschiedene Komponenten miteinander, so zum Beispiel das Enzym Dicer, das Transportprotein Exportin-5 und RISC. Bei Versuchen mit transienter shRNA-Expression konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich Exportin-5 (Yi *et al.*, 2005), das für den Transport von shRNA und miRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma zuständig ist, aber auch weitere nachfolgende Komponenten, übersättigt werden (Castanotto *et al.*, 2007). Dies führte bei In-vitro-Versuchen mit hoher Expression von shRNA, die mit Mäusen durchgeführt wurden, zum Tod der Versuchstiere (Grimm *et al.*, 2006). Sowohl in vivo als auch in vitro konnte gezeigt werden, dass durch die Übersättigung des RNAi-Wegs die regulierende Funktion durch miRNA stark gestört wird (Snøve und Rossi, 2006).

Die aktuell einzig bekannte Lösung des Problems ist eine moderate Expression von shRNA. So stellte sich eine stabile Expression von shRNA durch einige wenige Kopien in Bezug auf Off-Target-Effekte im Vergleich zur Expression von Tausenden von Plasmiden in transienten Versuchen, als vorteilhaft heraus. Dies deckt sich mit den Beobachtungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit: Auch hier konnten bei den verwendeten stabil exprimierten shRNA-Konstrukten Off-Target-Effekte zumindest nicht gemessen werden. Eine komplette Eliminierung von Off-Target-Effekten mit RNAi scheint, nach aktuellem Forschungsstand, dennoch nicht möglich zu sein. Womöglich kann auch die Verstärkung des RNAi-Wegs eine Option für die Verminderung der Off-Target-Effekte sein. Es konnte gezeigt werden, dass beispielsweise die verstärkte Expression des Proteins Argonaute 2 (AGO2), welches Teil des RNAi-Wegs ist, zu einem besseren Knock-down führt (He *et al.*, 2015). Im Falle von toxischen Effekten bei Versuchen mit induzierbaren Tet-Systemen sollte zudem beachtet werden, dass das notwendige Doxycyclin ebenfalls eine toxische Wirkung auf Zellen haben kann (siehe 4.5). Eben dies überprüfte Laurens Zugelder im Rahmen seiner Promotion für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten MM Zelllinien und konnte bei den ebenfalls in der vorliegenden Arbeit verwendeten Doxycyclin-Konzentrationen keine toxischen Wirkungen beobachten, was eine mögliche Wirkung auf andere Zelllinien aber nicht ausschließt. Off-Target-Effekte können auch bei der Verwendung von pharmakologischen Inhibitoren, siRNA und CRISPR(i) auftreten. Es ist von bedeutsamem Vorteil eine Möglichkeit zu haben, einen solchen Verdacht durch Nutzung eines anderen Knock-down Mechanismus zu bestätigen oder auszuräumen. Gegenwärtig ist das etablierte Knock-down System für diesen Zweck das flexibelste, kosteneffizienteste und am schnellsten umsetzbare Werkzeug.

5.3.2 Effizienz des Knock-downs abhängig von der Kassettenanzahl

Die RNAi-Sättigung beeinflusst zudem nicht nur den endogenen miRNA-Pfad, sondern vermittelt wahrscheinlich auch eine Limitation der maximalen Anzahl an Zielgenen für den Knock-down durch shRNAs. Die Kenntnisse über die kombinierte Expression mehrerer shRNAs sind begrenzt. Forschungsgruppen konnten mittels RNA-Polymerase II Promotoren zwei (Zhou *et al.*, 2008), drei (Nagao *et al.*, 2008; Sahin *et al.*, 2007) und vier (Lambeth *et al.*, 2010; McIntyre *et al.*, 2011) shRNAs erfolgreich gleichzeitig exprimieren, wobei keines dieser verwendeten Plasmide beziehungsweise Viren einen induzierbaren Knock-down ermöglichte. In einer sehr umfangreichen Arbeit konnten McIntyre *et al.* (2011) eine signifikante Verringerung der individuellen Knock-downs mit steigender Anzahl (bis zu 4) von shRNAs nachweisen. Zu einem Teil stützen die empirischen Daten diese Beobachtung (Castanotto *et al.*, 2007; Holen *et al.*, 2002; McManus *et al.*, 2002), in anderen Experimenten jedoch konnten diese Effekte nicht beobachtet werden (Ji *et al.*, 2003; Kahana *et al.*, 2004; Schuck *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2003). Auch in der Arbeit von McIntyre *et al.* (2011) zeigte sich bei dem gleichzeitigen Knock-down von vier verschiedenen Zielproteinen durch vier verschiedene shRNA-Kassetten für eines der vier shRNA-Konstrukte keine Abnahme der Knock-down Qualität im Vergleich zum Einzel-Knock-down.

Es ist davon auszugehen, dass es sich diesbezüglich um ein äußerst effektives Konstrukt handelte, weshalb eine geringere shRNA-Konzentration keinen Einfluss auf die Qualität des Knock-downs hatte. Neben der mehrfachen Kassettenstrategie mit je einem Promotor pro shRNA wurde in der Veröffentlichung von McIntyre *et al.* (2011) auch die Nutzung mehrerer Vektoren mit je einem Promotor und shRNA-Konstrukt sowie die Expression mehrerer shRNA mit nur einem Promotor von einem Vektor untersucht. Abgesehen von der beobachteten Verminderung des Knock-downs bei der gleichzeitigen Expression von vier shRNAs, deckt sich das Fazit von McIntyre *et al.* (2011) mit dem der vorliegenden Arbeit. Insgesamt stellte sich das Kassettensystem als das effektivste und am einfachsten zu nutzende System heraus. Die Beobachtung von McIntyre *et al.* (2011), dass die mehrfache Expression des gleichen shRNA-Konstrukts in transienten Versuchen einen verstärkten Knock-down vermittelt, konnte durch unsere Forschungsgruppe nicht repliziert werden (unveröffentlichte Daten). Auch in den stabil transfizierten Zellen konnte die Beobachtung von McIntyre *et al.* (2011) nicht mehr nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen können Interferenzen zwischen den Promotoren (Cullen, 2005) oder transkriptionelles Silencing (Morris und Rossi, 2006) sein. Bezüglich der Promotor-Interferenz liegen bisher jedoch nur widersprüchliche Befunde vor (Anderson und Akkina, 2005; Gonzalez *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wiesen nach etwa einem Monat einen Silencing- beziehungsweise Selektions-Effekt des Knock-downs der Zielkinase ERK2 auf. Aufgrund der weitgehenden Redundanz im Signalweg war dies in diesem Ausmaß nicht prognostiziert worden. Ein Silencing der Expression der shRNA in diesem kurzem Zeitraum ist nicht komplett auszuschließen, aber aufgrund der Erkenntnisse anderer Forscher als eher unwahrscheinlich zu erachten (Yamagishi *et al.*, 2009). Vielmehr ist anzunehmen, dass bereits der kleine Überlebensvorteil von Zellen mit nur geringem ERK2-Knock-down ausreicht, um zu einer Selektion zu führen. Hierdurch wird nochmals die Notwendigkeit untermauert, Knock-downs unbedingt induzierbar durchführen zu können.

Sowohl die Qualität und Dauer des beobachteten Knock-downs als auch die erprobte Anzahl von vier gleichzeitigen Zielen ist für das anvisierte Anwendungsgebiet mehr als ausreichend zu erachten.

5.4 Übertragbarkeit auf andere Systeme

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des Sleeping Beauty Transposon Systems in Verbindung mit der Elektroporation ausreichende Transfektionsraten zur schnellen Selektion von Millionen stabil transfizierter MM Zellen bietet. Die von unserer Forschungsgruppe erreichten Transfektionsraten, gemessen an der EGFP-Expression am Tag nach der Elektroporation, liegen im Bereich von 10 bis 30 %. In anderen Zelllinien konnten Forscher sogar Transfektionsraten von 35 bis 50 % in humanen CD34⁺ Zellen mit der hyperaktiven Transposase erreichen (Mates *et al.*, 2009). Für die Transfektion immortalisierter Zelllinien sind diese Transfektionsraten durch Produktion weiterer stabil transfizierter Zellen durch Zellteilung mehr als ausreichend. Für primäre Zellen oder Zelllinien, die sehr geringe Transfektionsraten aufweisen, kann es notwendig sein anstelle eines Transposon Systems ein System auf Basis von Lentiviren, dem Adeno-assoziierten Virus oder dem γ -Retrovirus, zu nutzen. Das in der vorliegenden Arbeit etablierte induzierbare Kassettensystem kann auf einfache Weise adaptiert werden, um es in viralen Systemen zu verwenden. Aufgrund der Möglichkeit die Einfach- und Mehrfach-Konstrukte in pSUSTER2 vorzubereiten, kann(können) die gesamte(n) Kassette(n) in jeden Vektor kloniert werden, der eine einzelne SacI-kompatible Restriktionsschnittstelle besitzt. Ebenfalls ist es auf diese Weise möglich ein anderes Transposon System, wie zum Beispiel das piggyBac Transposon System, zu nutzen, das ähnlich effizient ist wie das Sleeping Beauty Transposon System (Balasubramanian *et al.*, 2016). Dies kann eventuell dann notwendig werden, wenn die Transfektionseffizienz mit dem Sleeping Beauty Transposon System in den verwendeten

Zellen gering ist oder Interaktionen mit humanen Proteinen wie zum Beispiel HMGB1 und Miz-1 auftreten (Grabundzija *et al.*, 2010; Ivics und Izsvák, 2010; Ivics und Izsvák, 2011). Im Gegensatz dazu scheint piggyBac in allen Zelltypen gleich gut zu funktionieren und bisher konnten keine Interaktionen mit humanen Proteinen beobachtet werden. Die Hürde, ein Hybrid-System aus Transposon System und Virus zu verwenden, ist dementsprechend ebenfalls relativ gering. Dies scheint gerade zum Zwecke der Gentherapie sehr vielversprechend zu sein (de Silva *et al.*, 2010; Moldt *et al.*, 2011; Vink *et al.*, 2009). Neben der Möglichkeit ein anderes Transfektionssystem zu verwenden, besteht auch die Alternative anstelle des H1-Promotors einen Promotor der eigenen Wahl zur shRNA-Expression zu nutzen. Hierfür können andere RNA-Polymerase II Promotoren, wie zum Beispiel U6 oder 7SK oder auch der RNA-Polymerase III minimale CMV-Promotor genutzt werden. Von U6- und CMV-Promotoren existieren im Tet-On-System induzierbare Versionen, sodass bei Nutzung einer dieser beiden Promotoren die gesamte Funktionalität des Systems inklusive Kassettensystem und induzierbarer shRNA-Expression voll erhalten bleibt. Durch die Unabhängigkeit des Kassettensystems vom Transfektionssystem und umgekehrt durch die Verwendung von zwei Vektoren kann stets das für das Forschungsvorhaben passendste System gewählt werden.

Eine Verwendung der CRISPR-Interferenz (CRISPRi) ist ebenfalls denkbar. Hierbei handelt es sich um eine verhältnismäßig neue Alternative zu RNAi, die 2013 von Larson *et al.* vorgestellt wurde und Knock-downs über die Transkriptionsebene ermöglicht. Im Rahmen dieser Studie von Larson *et al.* (2013) wurde das von Jinek *et al.* (2012) in Prokaryoten und von Cong *et al.* (2013) in Eukaryoten etablierte innovative Geneditierungswerkzeug CRISPR/Cas so verändert, dass die katalytische Aktivität, die Doppelstrangbrüche ins Genom einbringt, nicht vorhanden ist. Ebenso wie bei der Verwendung von CRISPR/Cas als Knock-out Werkzeug (CRISPRko) besteht CRISPRi aus der Endonuklease Cas9 und einer single guide RNA (sgRNA). Anstelle von Cas9 wurde hier eine, aufgrund von zwei Punktmutationen, inaktive Version verwendet (dCas9) (Jinek *et al.*, 2012). Auf diese Weise kommt es lediglich zu einer Anlagerung von dCas9 an die Ziel-DNA, jedoch ohne diese zu schneiden. Mit dieser Methode kann in *E. coli* bereits eine transkriptionelle Repression von bis zu 99,9 % erreicht werden (Qi *et al.*, 2013).

In Eukaryoten ist zusätzlich die Verwendung eines Fusionsproteins (dCas9-KRAB) aus dCas9 und dem transkriptionshemmenden KRAB-Protein nötig. Hierdurch wird eine Anlagerung von RNA-Polymerasen an die DNA verhindert, infolgedessen wird wiederum die Transkription zur RNA blockiert (Gilbert *et al.*, 2013). Diese Technologie war zum Zeitpunkt der Aufnahme der Arbeit an dieser Promotion Ende 2014 noch komplett neu. Es existierten kaum Erfahrungswerte in der

wissenschaftlichen Gemeinschaft. Zudem zeigte sich in den darauffolgenden Jahren, dass in Eukaryoten eine nennenswert gute Repression erst bei Verwendung des Fusionsproteins dCas9-KRAB-MeCP2 als Repressor erreicht werden konnte (Yeo *et al.*, 2018). Zu diesem damaligen Zeitpunkt bestand in unserer Forschungsgruppe bereits fundiertes Wissen zur Anwendung von RNAi. Die Arbeiten und Versuche zur Entwicklung des induzierbaren shRNA-Kassettensystem waren bereits von Bernhard Roth begonnen worden. Daher fiel damals die Wahl als Knock-down Werkzeug auf RNAi. Heutzutage stellt die CRISPRi-Technologie durchaus eine beachtenswerte Alternative zu der verwendeten RNAi dar. Zwar beschränken sich die Erfahrungswerte auf wenige Jahre, dennoch konnte CRISPRi bereits RNAi als bevorzugte genetische Hochdurchsatz-Screeningmethode ablösen (Sanson *et al.*, 2018). In einem systematischen Vergleich von RNAi, „Locked Nucleic Acid“ (LNA) und CRISPRi konnten Stojic *et al.* (2018) und andere (Evers *et al.*, 2016; Gilbert *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2017) zeigen, dass CRISPRi in polyklonalen Zellpopulationen den besten Knock-down mit den wenigsten Off-Target-Effekten ermöglicht. Dies ist vermutlich der größte Vorteil der CRISPRi. Doch CRISPRi besitzt auch moderate Off-Target-Effekte, die denen der RNAi ähneln und deshalb nicht komplett ignoriert werden können (Kuscu *et al.*, 2014; Stojic *et al.*, 2018; Thakore *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2014). Gegenüber RNAi hat es zudem den Vorteil einen effektiveren Knock-down von langen nicht-kodierenden RNAs (lncRNAs) zu vermitteln, wenn diese sich im Zellkern befinden (Goyal *et al.*, 2017; Lennox und Behlke, 2016; Liu *et al.*, 2017). Um alle anderen lncRNAs (das heißt außerhalb des Kerns) auf ihre Funktion hin zu untersuchen, lässt sich CRISPRi nicht als erste Wahl bezeichnen, da es nicht möglich ist, die verschiedenen Funktionen von lncRNAs, wie die Wirkung als cis-/trans-Element oder Enhancer, beim Knock-down zu differenzieren (Engreitz *et al.*, 2016; Fulco *et al.*, 2016; Kornienko *et al.*, 2013; Orom *et al.*, 2010; Paralkar *et al.*, 2016; Rinn und Chang, 2012; Yin *et al.*, 2015). Die Inhibition durch CRISPRi auf Translationsebene hat zudem den Nachteil, dass es schwierig ist bidirektionale Promotoren zu supprimieren (Rosenbluh *et al.*, 2017). Auch beim Versuch lncRNAs in der Nähe von anderen Promotoren zu inhibieren (Goyal *et al.*, 2017), treten Schwierigkeiten auf. Durch die Größe des Proteins dCas9 kann es dazu kommen, dass auch Nachbargene ungewollt betroffen sind (Stojic *et al.*, 2018). Zudem stellt die Transfektion von Cas9-KRAB-MeCP2 (Cao *et al.*, 2016) aufgrund einer Länge von fast 4,5 kbp eine nicht zu unterschätzende Herausforderung dar. Bei Verwendung des pT2 BN SVPuro CAG Vektors als Grundlage zur Expression macht dies dann ein Plasmid mit fast 12 kbp Länge notwendig.

Bei der Einzelzell-Selektion von Klonen für CRISPRi konnte gezeigt werden, dass die Expression des Fusionsproteins dCas9-KRAB alleine bereits zu weitgehenden Veränderungen im Transkriptionsprofil der Zellen führt. Daher sollten nur polyklonale Zellpopulationen für die Verwendung mit CRISPRi herangezogen werden, da hier summarische Unterschiede in der Transkription geringer ausfallen sollten (Stojic *et al.*, 2018).

Die Wahl der Zielsequenz für CRISPRi verläuft ähnlich wie bei der RNAi, wobei hier neben der sgRNA auch das Protospacer adjacent Motif (PAM) der Endonuklease Cas9 Sequenz-bestimmend ist. Hierbei entscheidend ist eine 14 bp lange Sequenz, welche aus 12 bp der sgRNA und 2 bp des PAM besteht und hauptsächlich durch Watson-Crick Basenpaarungen an die Ziel-DNA bindet. Hochgerechnet ergibt dies die Möglichkeit bei der Verwendung von Cas9 ungefähr für 10 % des menschlichen Genoms eindeutige Zielsequenzen zu wählen (Larson *et al.*, 2013). Durch die Verwendung einer anderen Endonuklease aus der Cas-Proteinfamilie mit einem anderen PAM ist zum einen möglich, andere Zielsequenzen zu wählen und zum anderen bei Verwendung eines längeren PAM zudem Off-Target-Effekte durch die Vermeidung von Bindungen an andere Sequenzen zu reduzieren. Auch die Verwendung von Computeralgorithmen zur Auswahl der besten Zielsequenz hilft, wie bei der RNAi, Off-Target-Effekte zu reduzieren.

Wie hier dargelegt, besitzen die verschiedenen molekulargenetischen Werkzeuge jeweils verschiedene Vor- und Nachteile, weshalb sich jeder Wissenschaftler vor der Durchführung seiner Versuche mit der Frage konfrontiert sieht, welche der verfügbaren Methoden die optimale für das eigene Vorhaben ist. Bei der Wahl kann die Publikation “Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR” (Boettcher und McManus, 2015) helfen, die Vor- und Nachteile der jeweiligen Methode abzuwägen.

Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene RNAi-Kassettensystem kann prinzipiell mit geringem Aufwand zu einem induzierbaren CRISPRi-Kassettensystem angepasst werden. Sowohl für CRISPRko (Bisht *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2016) als auch für CRISPRi (Smith *et al.*, 2016) wurden bereits induzierbare Systeme für eukaryotische Zellen beschrieben, welche auf einem Tet-On-System für die Expression entweder von (d)Cas9 oder von sgRNA basieren. Der induzierbare H1-Promotor, der in dieser Arbeit verwendet wurde, kann dazu verwendet werden anstelle von shRNA sgRNA zu exprimieren. Dies wurde mit der nicht-induzierten Form des H1-Promotors bereits von Zheng *et al.* (2014) erfolgreich durchgeführt. Daher müssen am pSUSTER2-Vektor selbst keine Modifikationen durchgeführt werden. Es ändert sich nur die Wahl der Oligonukleotide, deren Sequenz der Publikation von Zheng *et al.* (2014) entnommen werden kann. Diese können weiterhin über die Schnittstellen BglII und SacI inkloniert werden.

Möglicherweise besteht auch durch die Kombination von RNAi und CRISPRi die Möglichkeit, noch bessere induzierbare Knock-downs zu erreichen oder Spezialfälle wie lncRNA als Ziel zu verwenden. Darüber hinaus kann auch die maximale Anzahl gleichzeitiger Knock-downs erhöht werden, wenn RNAi, CRISPRi und andere Methoden zusammen verwendet werden (Banerjee *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005).

Der direkte Vergleich und die Übertragbarkeit auf andere Arten des Knock-downs beziehungsweise des Knock-outs unterstreicht nochmals die erhebliche Flexibilität und unkomplizierte Anwendung des entwickelten Systems. Für die proklamierte Nutzung zur Analyse von funktionellen Knock-downs übertrifft es die anderen Herangehensweisen an zeitlicher Effizienz bei zugleich deutlich geringerem Ressourcen-Einsatz und ist durch die Versatilität der SacI-kompatiblen BstXI Schnittstelle auch für komplexe Fragestellungen zweckmäßig einsetzbar.

5.5 Fazit im Rahmen des Gesamtprojekts

In dieser Dissertation konnten die proklamierten essentiellen Ziele dieses Teilprojekts der Klinischen Forschergruppe 216 erreicht werden. Insbesondere die durchgeführte systematische Problemanalyse stellt hierbei einen äußerst wichtigen Teilaspekt dar, ohne die die erfolgreiche Umsetzung nicht realisierbar gewesen wäre.

Dies führte schließlich zum erfolgreichen Abschluss und der Veröffentlichung des Gesamtprojekts in PLOS ONE: „A simple approach for multi-targeted shRNA-mediated inducible knockdowns using Sleeping Beauty vectors“ (2018). In dieser Publikation wurden die Teilprojekte von Bernhard Roth, Laurens Zugelder und dieser Arbeit zu einem Ganzen zusammengefügt. Zum einen wird hierdurch das Wissen zur Nutzung und Reproduktion des induzierbaren und stabilen shRNA-Knock-down Systems vermittelt. Zum anderen wird das Konzept des Kassettensystems (siehe 4.3.1), induzierbarer shRNA-Knock-Downs und dessen Anwendung in verschiedenen Zelllinien des Multiplen Myeloms am Beispiel des MAPK-Signalwegs dargelegt. Hier sei abschließend auf den erfolgreich durchgeführten gleichzeitigen und induzierten Knock-down von vier Kinasen (ERK1/2 und MEK1/2) des MAPK-Signalwegs verwiesen (siehe **Abbildung 38**). Hierbei werden alle Aspekte (Induktion, multiple Kassetten) des entwickelten Systems demonstriert.

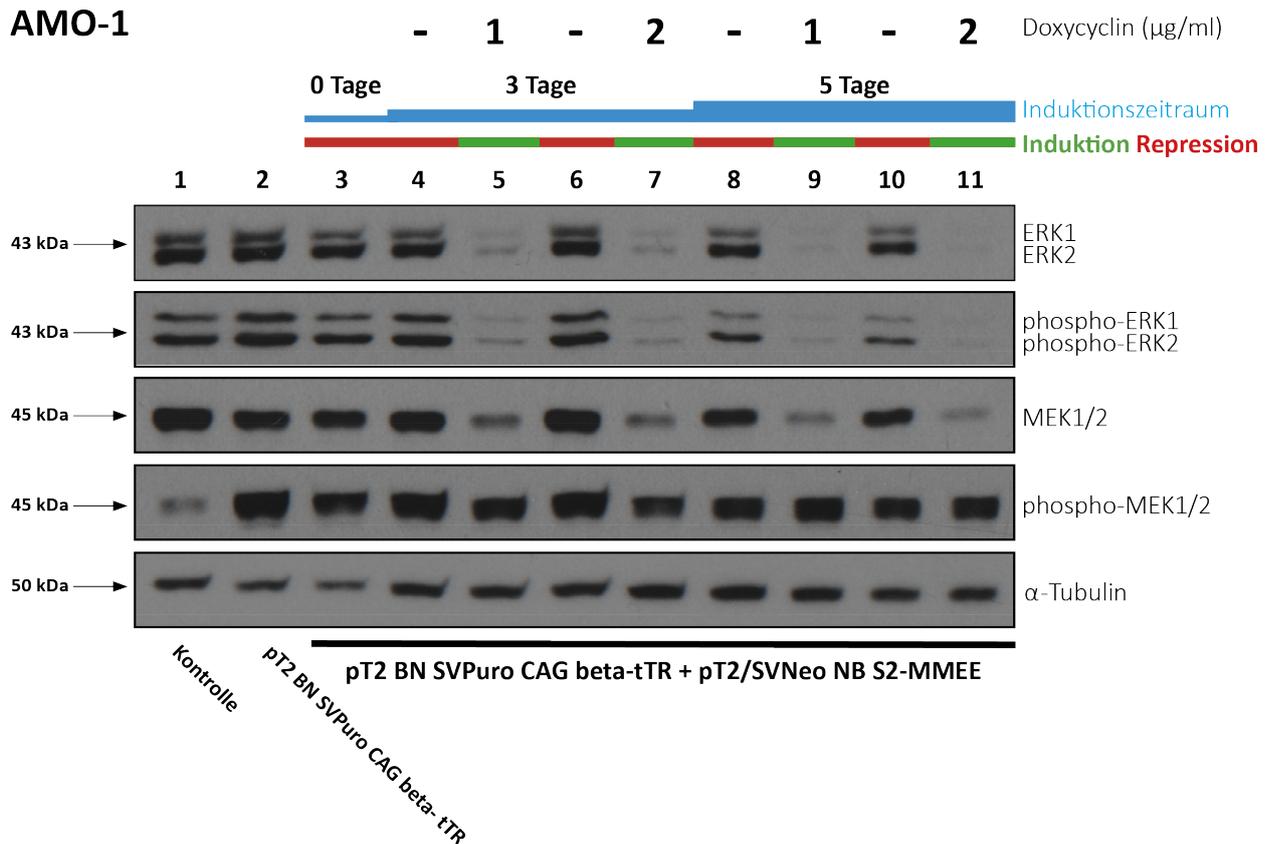


Abbildung 38: Gleichzeitiger, induzierter Knock-down von ERK1/2 und MEK1/2 in AMO-1 Zellen (Fink et al., 2018)
 Als Ausgangszellen dienen AMO-1 Zellen aus einer angelegten Stock-Bank, welche bereits TetR exprimieren. Die stabile Expression von TetR war durch eine erste Transfektion mit dem Vektor pT2 BN SVPuro CAG beta-tTR erreicht worden. Diese Ausgangszellen wurden dann in einer zweiten Transfektion mit dem Vektor pT2/SVNeo NB S2 MMEE transfiziert. Dieser Vektor enthält H1-Promotor Kassetten gegen vier Komponenten (ERK1/2 und MEK1/2) des MAPK-Wegs. Nach erfolgreicher Selektion mit Puromycin und Geneticin nach der zweiten Transfektion zeigt sich eine sehr gute Repression des Knock-downs (0 Tage), die dem Ausgangsniveau der ERK1/2 beziehungsweise MEK1/2 Expression der Kontrolle entspricht. Nach Induktion von 3 beziehungsweise 5 Tagen mit Doxycyclin von einer Konzentration von 1,0 µg/ml beziehungsweise 2, 0 µg/ml zeigte sich allumfassend ein guter Knock-down. Der Knock-down nach 5 Tagen stellt sich dabei etwas ausgeprägter dar. Ein Unterschied zwischen den beiden verwendeten Doxycyclin-Konzentrationen ist nicht zu erkennen. Reaktiv zeigt sich eine Hochregulation des phospho-MEK1/2. Bei dieser Abbildung handelt es sich um eine Adaptation der Abbildung 5A aus der Veröffentlichung (Fink et al., 2018).

Abschließend zeichnet sich das entwickelte System insbesondere durch die folgenden Alleinstellungsmerkmale aus: Es ist derzeit das einzig bekannte, auf ein Transposon System aufbauende induzierbare shRNA-System. Zudem existiert kein weiteres, flexibel erweiterbares Kassettensystem mit Restriktionsenzymen für die shRNA-Expression mit jeweils eigenem Promotor.

Dieses Praxisbeispiel zeigt, dass das in der vorliegenden Arbeit entwickelte, etablierte stabile und induzierbare Einzel- und Multikassettensystem für shRNA-Knock-downs eine einfache, kostengünstige und zeitsparende Möglichkeit darstellt, Knock-down-Experimente durchzuführen, wobei die Anwendung nicht nur auf das MM beschränkt ist.

6 Zusammenfassung

Das Multiple Myelom (MM) ist ein B-Zell-Lymphom weitestgehend unklarer Ätiologie und stellt die dritthäufigste hämatologische Neoplasie dar. Ungeachtet neuer medikamentöser Therapien handelt es sich weiterhin um eine für die allermeisten Patienten unheilbare Erkrankung. Aktuelle, großangelegte Whole-Genome-Sequenzierungen konnten die Annahme, dass hierfür die große genetische Heterogenität des MM verantwortlich ist, nochmals bestätigen. Um die Therapieoptionen zu erweitern, besteht die Notwendigkeit, die neu erlangten Erkenntnisse zum komplexen onkogenen Signalnetzwerk des MM zu nutzen und potenziell relevante Zielstrukturen auf ihren therapeutischen Nutzen zu überprüfen. Um dies auf effiziente Weise durchzuführen, wurde in dieser Arbeit ein induzierbares Knock-down-System basierend auf der weitverbreiteten RNA-Interferenz und dem neuen, innovativen Sleeping Beauty Transposon System (SBTS) entwickelt und etabliert. Durch die Entwicklung eines Restriktionsenzym-basierten regenerativen Kassettensystems für die shRNA-Expression ist es möglich, verschiedene Bestandteile des onkogenen Signalnetzwerks gleichzeitig zu adressieren. Die erfolgreiche Etablierung des SBTS im MM zeigte, dass die CMV-Promotor-vermittelte EGFP-Expression über 231 Tage ohne weitere Antibiotikaselektion stabil ist. Die Verwendung des SBTS ermöglicht es, Zellen bei niedrigster biologischer Schutzstufe (S1) stabil zu transfizieren. Am Beispiel des MAPK-Signalweges konnten stabile shRNA-vermittelte Knock-downs für ein einzelnes (ERK2) und vier (ERK1/2, MEK1/2) gleichzeitige Ziele in verschiedenen MM-Zelllinien erfolgreich durchgeführt werden. Um ein induzierbares Tet-On-System zur shRNA-Expression zu erstellen, wurden zum einen dem verwendeten H1-Promotor zwei TetO-Sequenzen hinzugefügt. Zum anderen wurde durch die Verwendung eines zweiten, neu konstruierten SBTS Vektors mit anderer Selektionsresistenz in den verwendeten Zellen das Tet-Repressor-Protein (TetR) stabil exprimiert. Nach Erprobung verschiedener Ansätze konnte die notwendige Expression von TetR mittels CAG-Promotor erreicht und auch mittels Western Blot nachgewiesen werden. Am Beispiel von ERK2 konnte gezeigt werden, dass es durch die stabile Transfektion und die Induktion des Knock-downs mit Doxycyclin möglich ist, den Knock-down Effekt darzustellen ohne toxische Nebenwirkungen, die bei der zur Transfektion von MM Zellen notwendigen Elektroporation auftreten können, zu generieren. Das hier etablierte Plasmid-basierte System stellt somit ein versatiles, einfach anwendbares, kostengünstiges und zeitsparendes Werkzeug dar, induzierbare Knock-downs durch RNA-Interferenz für einzelne oder mehrere mRNAs/Proteine gleichzeitig zu erzielen (Fink *et al.*, 2018). Es ist davon auszugehen, dass die Anwendung aufgrund der Verwendung etablierter Techniken und der leichten Modifizierbarkeit nicht nur auf das MM begrenzt sein wird.

7 Summary

Multiple Myeloma (MM) is a B-cell-lymphoma of mostly unknown etiology and represents the third most frequent hematological neoplasia. Regardless of new drug therapies, it is still an incurable disease for the majority of patients. Large-scale whole-genome-sequencing studies strongly support the assumption that the reason for this is the large genetic heterogeneity of MM. To further refine current treatment options it is desirable to use knowledge gained from the complex oncogenetic signalling network for more individualised therapies and to evaluate potentially relevant targets for their therapeutic benefit.

In order to do this in an efficient way, in this work, a system for inducible knock-downs based on the wide-spread RNA-interference and the new, innovative Sleeping Beauty Transposon System (SBTS) was developed and established. The development of a restriction-enzyme based cassette-system for shRNA-expression makes it possible to address various parts of the oncogenetic signal network at once. The successful establishment of the SBTS in MM revealed that EGFP-expression by a CMV-promotor is at least stable for 231 days without any further selection by antibiotics. The use of SBTS makes it possible to transfect cells stably at the lowest biological safety level (S1). Utilizing the MAPK-signal path as an example it was possible to successfully demonstrate shRNA-provided knock-downs for one (ERK1) or four targets (ERK1/2, MEK1/2) at once in several different MM-cell lines. In order to create an inducible Tet-on-system for shRNA-Expression, two TetO-sequences were added to the used H1-Promotor. Furthermore, the required Tet-repressor-protein (TetR) was expressed by another newly constructed SBTS vector, which contains another selection resistance. After trying different approaches, it was possible to express the necessary amount of TetR by using the CAG-Promotor, which was verified by Western Blot. Using ERK2 as a sample target, it was possible to show that with stable transfection and induction of the knock-down with doxycycline it is possible to measure knock-down results without the toxic side effects of the electroporation necessary for transfection. The established plasmid-based system serves as an easily applicable, cost-efficient and time-saving tool for inducible knock-downs by RNAi for single or multiple mRNAs/proteins (Fink *et al.*, 2018). It is assumed that because already established techniques were used and easy customization is possible the application is not just limited to MM.

8 Abbildungen

Abbildung 1: Diagnosekriterien verschiedener MM Stadien	11
Abbildung 2: Maligner Transformationsprozess	13
Abbildung 3: Physiologische Plasmazellentwicklung	22
Abbildung 4: VDJ-Rekombination und Translokationen im Multiplen Myelom	24
Abbildung 5: Cyclin D Regulation bei Hyperdiploidie und Nicht-Hyperdiploidie	26
Abbildung 6: Zelluläre Vernetzung einer typischen MM Zelle	28
Abbildung 7: Modell für die molekulare Pathogenese von MGUS und MM	31
Abbildung 8: Anwendung von RNA-Interferenz	36
Abbildung 9: Mechanismus des Sleeping Beauty Transposon Systems	39
Abbildung 10: Tetrazyklin-regulierte Systeme	42
Abbildung 11: Einklonierung von shRNA-DNA-Oligonukleotiden und shRNA-Expression am Beispiel pSUS-ERK2	69
Abbildung 12: Ergebnis eines PCR-Screenings von Kolonien	73
Abbildung 13: Funktionelles Konzept des induzierbaren shRNA-Knock-down-Systems mit dem SBTS	80
Abbildung 14: Zeitliche Stabilität der EGFP-Expression in MM Zellen	82
Abbildung 15: Kill Kurve mit Puromycin für verschiedene MM Zelllinien	85
Abbildung 16: FASC-Analyse von stabil mit pT2B/Puro CMV EGFP transfizierten L-363 Zellen	88
Abbildung 17: Transfizierte Kasette und EcoRI-Schnittstelle des Vektors pT2B/Puro	89
Abbildung 18: Unterschiede zwischen dem pSUS-Vektor und Ursprungsvektor pSUPER	92
Abbildung 19: Restriktionsenzym-basiertes Kassettensystem mit dem Vektor pSUS zur multiplen shRNA-Expression	93
Abbildung 20: Aufbau der Vektoren pSUPER, pSUS, pSUSTER und pSUSTER2	95
Abbildung 21: Vergleich des Knock-downs von ERK2 mit pSUPER, pSUS, pSUSTER und pSUSTER2 in JJN-3	96
Abbildung 22: Signaltransduktion des mitogenaktivierten Protein-Kinase (MAPK)- Signalwegs	98
Abbildung 23: Stabiler shRNA-vermittelter Knock-down von ERK2 mit dem Sleeping Beauty Transposon System	99
Abbildung 24: Stabiler shRNA-vermittelter Knock-down von ERK2 in verschiedenen MM Zelllinien	100

Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf des stabilen Knock-downs von ERK2 mit pT2/SVNeo SUSTER(2) ERK2	101
Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der Knock-down Qualität von ERK2 in verschiedenen MM Zelllinien	102
Abbildung 27: Restriktionsenzym-basiertes Kassettensystem mit dem Vektor pS2 zur multiplen shRNA-Expression	104
Abbildung 28: Stabiler Knock-down von vier verschiedenen Zielproteinen gleichzeitig in L-363	106
Abbildung 29: Repression und (fehlende) Induktion des Knock-downs von ERK2 in L-363 und AMO-1 Zellen	112
Abbildung 30: Induzierbarer Knock-down von ERK2 in AMO-1 Zellen mit Expression des Repressors durch CMV tTR	116
Abbildung 31: Induzierbarer Knock-down von ERK2 in AMO-1 mit Expression des Repressors durch CMV beta-tTR	119
Abbildung 32: EGFP Expression bei verschiedenen Selektionskonzentrationen mit Puromycin	121
Abbildung 33: IRES-gekoppelte Resistenzexpression	123
Abbildung 34: Nachweis der TetR- und HA-Tag-Expression im Western Blot in AMO-1 Zellen	127
Abbildung 35: Vergleich verschiedener stabiler, induzierbarer Knock-downs von ERK2 in AMO-1	129
Abbildung 36: Apoptose nach Induktion mit Doxycyclin	130
Abbildung 37: Induzierbarer Knock-down von ERK2 in JJN-3 nach verschiedenen Induktionsdauern	131
Abbildung 38: Gleichzeitiger, induzierter Knock-down von ERK1/2 und MEK1/2 in AMO-1 Zellen	147

9 Tabellen

Tabelle 1: Stadieneinteilung gemäß International Staging System	14
Tabelle 2: Stadieneinteilung gemäß Revised International Staging System	14
Tabelle 3: Software	45
Tabelle 4: Geräte	45
Tabelle 5: Chemikalien	47

Tabelle 6: Reagenzien in der Zellkultur.....	47
Tabelle 7: Allgemeine Enzyme.....	48
Tabelle 8: Restriktionsenzyme.....	48
Tabelle 9: Antikörper.....	49
Tabelle 10: Eigene Pufferlösungen und Medien.....	50
Tabelle 11: Kommerzielle Puffer.....	51
Tabelle 12: Molekularbiologische Kits.....	51
Tabelle 13: Protein-Expressionsvektoren.....	51
Tabelle 14: Sleeping Beauty Transposon System Vektoren.....	52
Tabelle 15: Klonierungsvektoren.....	52
Tabelle 16: shRNA-Expressionsvektoren.....	52
Tabelle 17: Sequenzierungs- und PCR-Screening-Primer.....	53
Tabelle 18: DNA-Oligonukleotide als Primer für die PCR-Synthese.....	53
Tabelle 19: DNA-Oligonukleotide für Mutationsreaktionen.....	54
Tabelle 20: DNA-Oligonukleotide für Polylinker.....	54
Tabelle 21: DNA-Oligonukleotide für die Einklonierung in pSUS, pSUSTER und pSUSTER2.....	54
Tabelle 22: Zelllinie AMO-1.....	56
Tabelle 23: Zelllinie INA-6.....	56
Tabelle 24: Zelllinie JJN-3.....	56
Tabelle 25: Zelllinie L-363.....	57
Tabelle 26: Zelllinie MM.1S.....	57
Tabelle 27: Elektroporationsparameter für verschiedene MM Zelllinien.....	60
Tabelle 28: PCR-Synthese Reaktionsansatz.....	67
Tabelle 29: PCR-Mutation Reaktionsansatz.....	68
Tabelle 30: PCR-Screening Reaktionsansatz.....	72
Tabelle 31: Standardkombinationen für das Koloniescreening.....	72

10 Klonierungen

Klonierung 1: pT2B/Puro zu pT2B/Puro CMV.....	86
Klonierung 2: pT2B/Puro CMV zu pT2B/Puro CMV tTR.....	86
Klonierung 3: pT2B/Puro CMV zu pT2B/Puro CMV tTR-KRAB.....	86
Klonierung 4: pT2B/Puro zu pT2B/Puro CMV EGFP.....	87

Klonierung 5: pT2/SVNeo BN zu pT2 BN	90
Klonierung 6: pT2 BN zu pT2 BN SVPuro.....	90
Klonierung 7: pT2 BN SVPuro zu pT2 BN SVPuro CMV EGFP	90
Klonierung 8: pT2 BN SVPuro zu pT2 BN SVPuro CMV	90
Klonierung 9: pSUS zu pSUSTER.....	94
Klonierung 10: pT2/SVNeo NB zu pT2/SVNeo NB SUSTER-ERK2	100
Klonierung 11: pT2/SVNeo NB zu pT2/SVNeo NB SUSTER2-ERK2	100
Klonierung 12: pSUSTER2-ERK1 zu pSUSTER2-E2E1	103
Klonierung 13: pSUSTER2-MEK1 zu pSUSTER2-M2M1	103
Klonierung 14: pSUSTER2-E2E1 zu pSUSTER2-M2M1E2E1	103
Klonierung 15: pT2/SVNeo NB zu pT2/SVNeo NB EGFP.....	105
Klonierung 16: pT2/SVNeo NB EGFP zu pT2/SVNeo NB EGFP S2-M2M1E2E1	105
Klonierung 17: pBluescript SK(-) zu pBluescript SK(-) tTR.....	108
Klonierung 18: pcDNA3.1(-) zu pcDNA3.1(-) tTR	108
Klonierung 19: pcDNA3.1(-) zu pcDNA3.1(-) tTR- HA	109
Klonierung 20: pGEM-T Easy zu pGEM-T Easy tTR-KRAB.....	110
Klonierung 21: pcDNA3.1(-) zu pcDNA3.1(-) tTR-KRAB.....	110
Klonierung 22: pT2/SVNeo CMV EGFP zu pT2/SVNeo CMV.....	111
Klonierung 23: pT2/SVNeo NB S2-E2 zu pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV	111
Klonierung 24: pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV zu pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV tTR.....	111
Klonierung 25: pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV zu pT2/SVNeo NB S2-E2 CMV tTR-KRAB... 111	
Klonierung 26: pT2 BN SVPuro CMV zu pT2 BN SVPuro CMV tTR	115
Klonierung 27: pT2 BN SVPuro CMV zu pT2 BN SVPuro CMV beta-tTR	118
Klonierung 28: pT2 BN zu pT2 BN CMV EGFP	120
Klonierung 29: pT2 BN CMV EGFP zu pT2 BN CMV EGFP-IRES-Puro.....	120
Klonierung 30: pT2 BN zu pT2 BN CMV	122
Klonierung 31: pT2 BN CMV zu pT2 BN CMV IRES-Puro	122
Klonierung 32: pT2 BN CMV IRES-Puro zu pT2 BN CMV tTR-HA-IRES-Puro	122
Klonierung 33: pT2 BN CMV IRES-Puro zu pT2 BN CMV beta-tTR-IRES-Puro	122
Klonierung 34: pBluescript SK(-) 2xEcoRI zu pBluescript SK(-) 2xEcoRI CAG	124
Klonierung 35: pT2 BN SVPuro zu pT2 BN SVPuro CAG	125
Klonierung 36: pT2 BN SVPuro CAG zu pT2 BN SVPuro CAG tTR-HA.....	125
Klonierung 37: pT2 BN SVPuro CAG zu pT2 BN SVPuro CAG beta-tTR.....	125

11 Mutationen

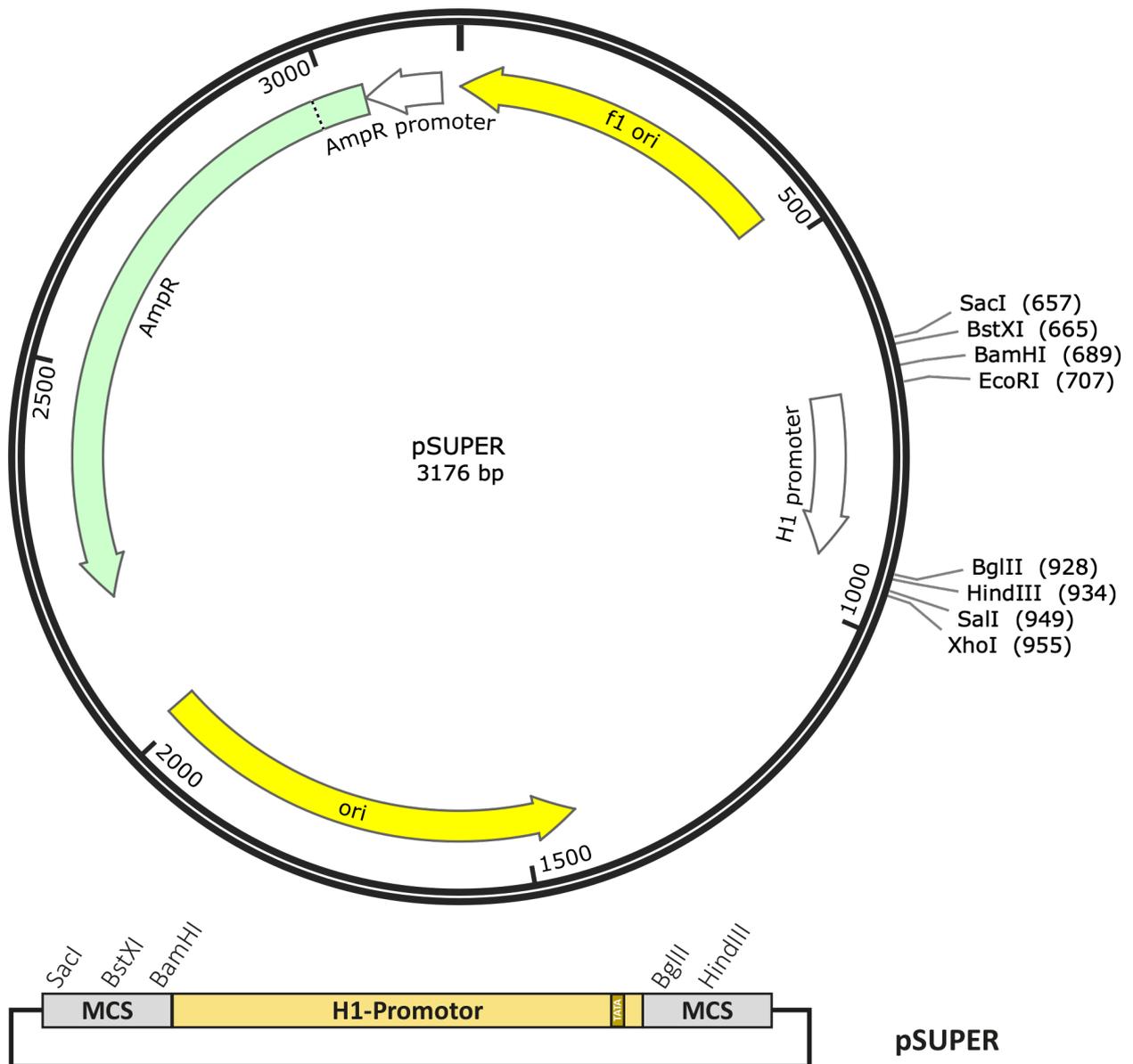
Mutation 1: pSUSTER zu pSUSTER2.....	94
Mutation 2: pBluescript SK(-) tTR zu pBluescript	109
Mutation 3: pcDNA6/TR zu pcDNA6 TR+NheI-EcoRI	118
Mutation 4: pBluescript SK(-) zu pBluescript SK(-) 2xEcoRI	124

12 Plasmide

Plasmid 1: pSUPER	155
Plasmid 2: pSUS	156
Plasmid 3: pSUSTER.....	157
Plasmid 4: pSUSTER2 (=pS2)	158
Plasmid 5: pT2B/Puro.....	159
Plasmid 6: pT2/SVNeo	160
Plasmid 7: pT2/SVNeo CMV EGFP	161
Plasmid 8: pT2/SVNeo NB.....	162
Plasmid 9: pT2/SVNeo NB S2 M2M1E2E1	163
Plasmid 10: pT2 BN SVPuro.....	164
Plasmid 11: pT2 BN SVPuro CMV	165
Plasmid 12: pT2 BN SVPuro CAG beta-tTR	166

13 Anhang

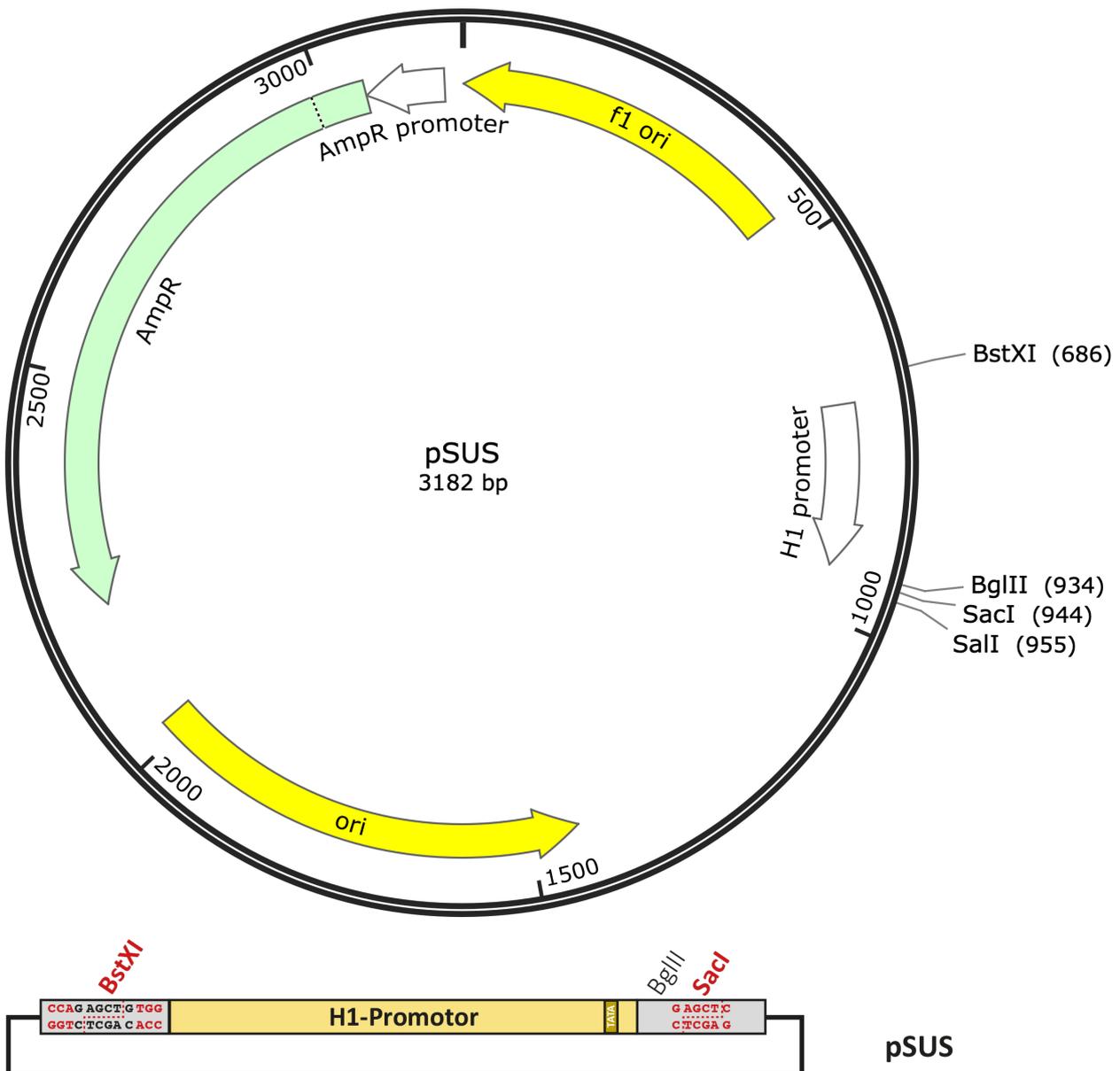
pSUPER



Plasmid 1: pSUPER

Beim pSUS-Vektor handelt es sich um einen modifizierten pSUPER-Vektor. Im Gegensatz zu diesem nutzt der pSUS-Vektor zum Einklonieren von shRNA-DNA-Oligonukleotiden eine BglII- und SacI-Schnittstelle. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit mehrere shRNAs von einem einzigen pSUS-Vektor zu exprimieren. Dies wird durch die BstXI-Schnittstelle ermöglicht, die so konstruiert wurde, dass bei ihrem Schnitt ein SacI kompatibler Überhang entsteht. Die ganze Kasette mit dem H1-Promotor und der shRNA-Sequenz kann durch BstXI und SacI ausgeschnitten und in einen weiteren pSUS-Vektor überführt werden. Dies ermöglicht auch die Überführung in alle anderen Vektoren, die eine SacI-kompatible Schnittstelle besitzen wie zum Beispiel der Sleeping Beauty Donor Vektor pT2/SVNeo NB mit seiner analog aufgebauten BstXI-Schnittstelle.

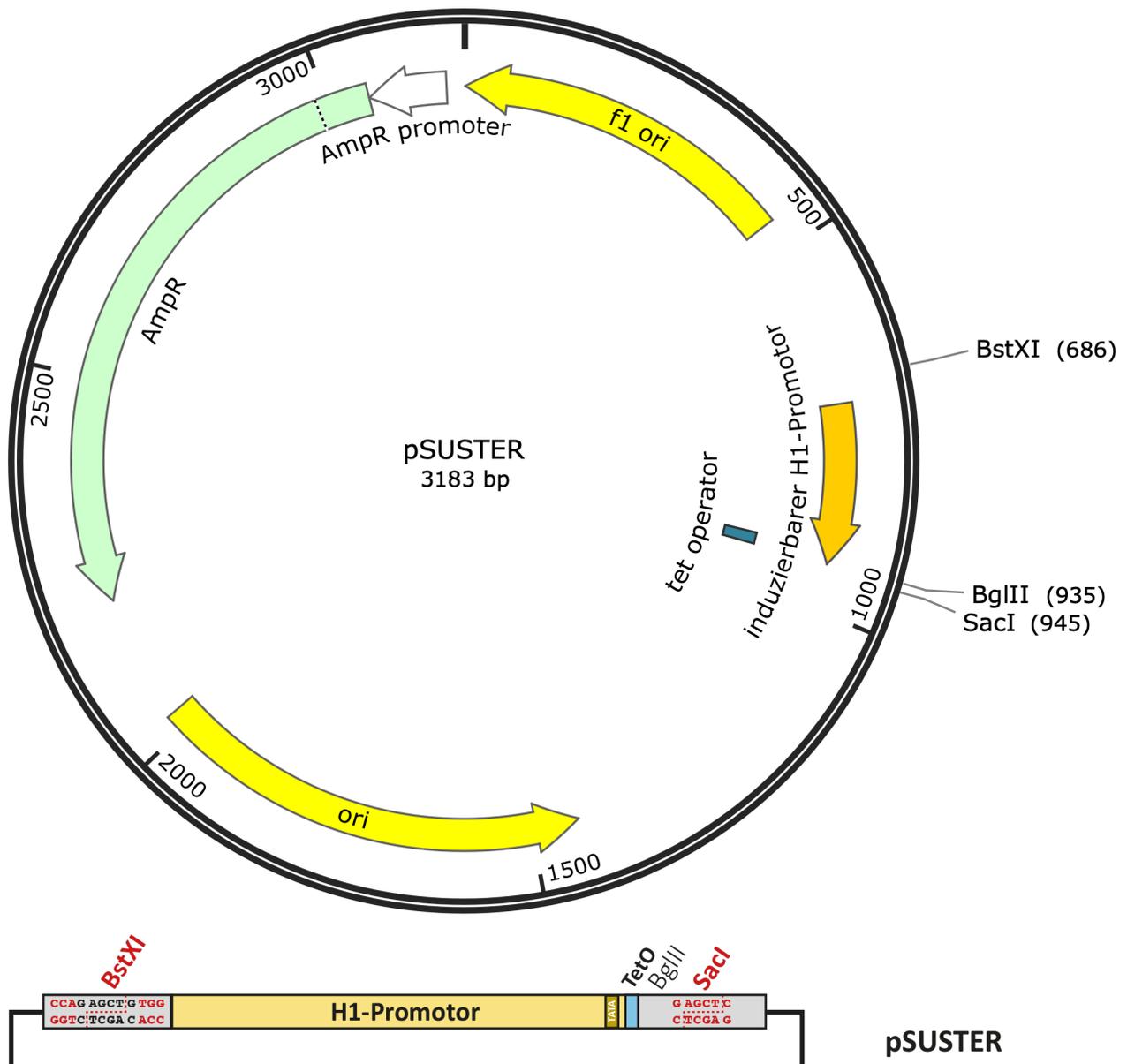
pSUS



Plasmid 2: pSUS

Beim pSUS-Vektor handelt es sich um einen modifizierten pSUPER-Vektor. Im Gegensatz zu diesem nutzt der pSUS-Vektor zum Einklonieren von shRNA-DNA-Oligonukleotiden eine BglII- und SacI-Schnittstelle. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit mehrere shRNAs von einem einzigen pSUS-Vektor zu exprimieren. Dies wird durch die BstXI-Schnittstelle ermöglicht, die so konstruiert wurde, dass bei ihrem Schnitt ein SacI kompatibler Überhang entsteht. Die ganze Kassetten mit dem H1-Promotor und der shRNA-Sequenz kann durch BstXI und SacI ausgeschnitten und in einen weiteren pSUS-Vektor überführt werden. Dies ermöglicht auch die Überführung in alle anderen Vektoren, die eine SacI-kompatible Schnittstelle besitzen wie zum Beispiel der Sleeping Beauty Donor Vektor pT2/SVNeo NB mit seiner analog aufgebauten BstXI-Schnittstelle.

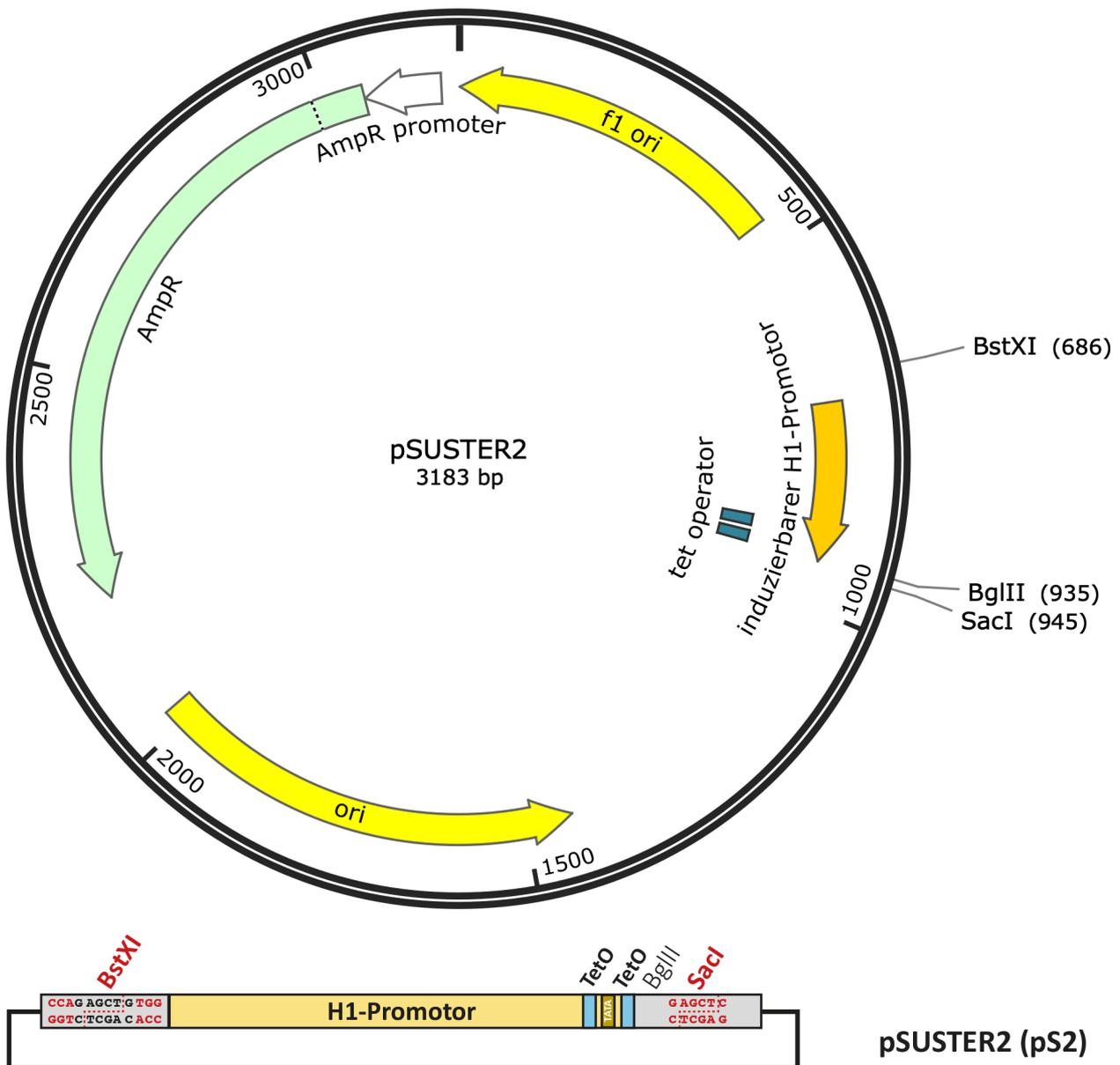
pSUSTER



Plasmid 3: pSUSTER

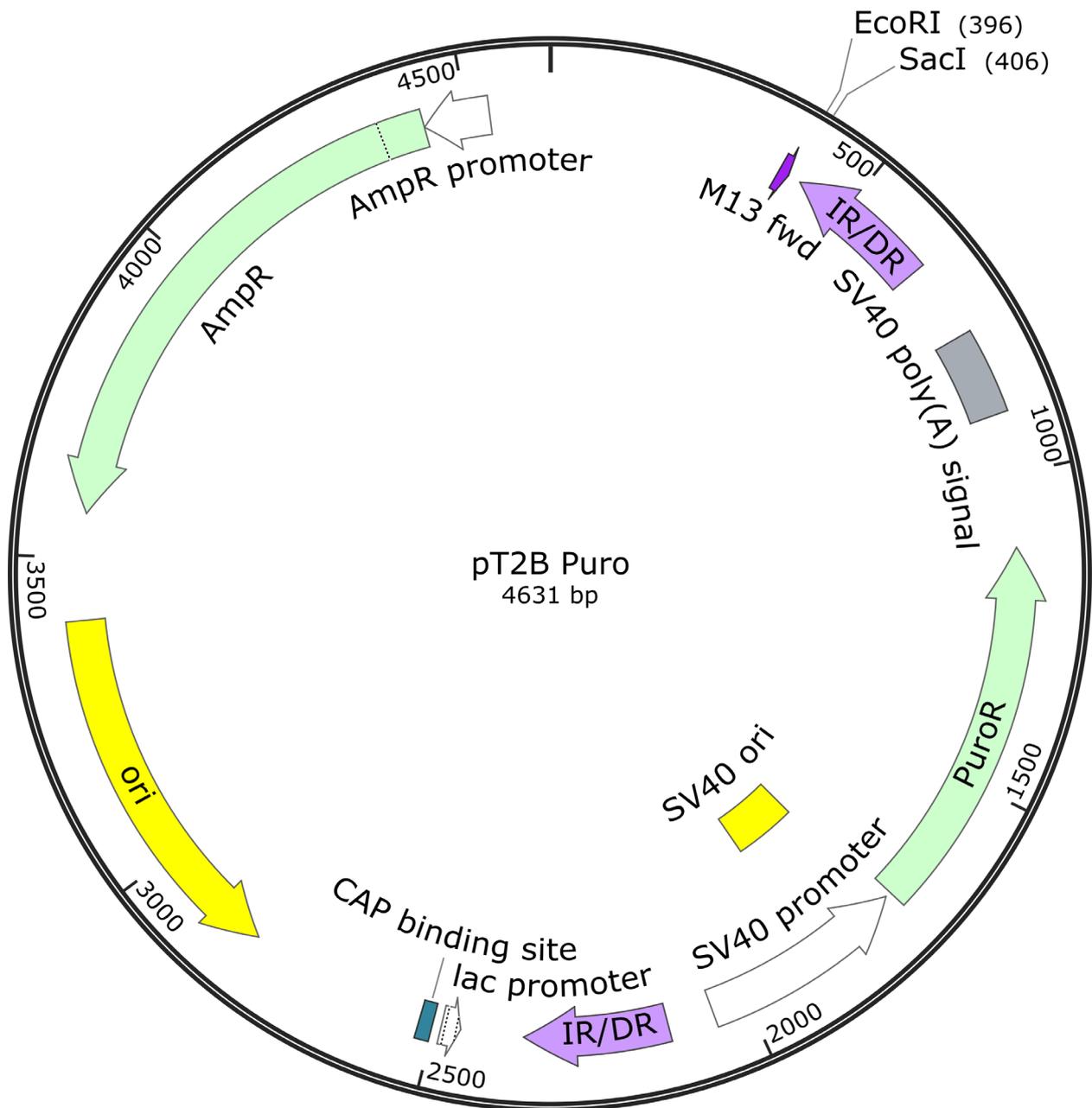
Der Vektor pSUSTER leitet sich vom pSUS-Vektor ab und besitzt im Gegensatz zu diesem einen induzierbaren H1-Promotor mit einer TetO-Sequenz nach der TATA-Box (van de Wetering et al., 2003). Transient kann der Vektor äquivalent zum pSUS-Vektor zum Knock-down von einem oder mehreren Zielprotein(en) genutzt werden. Durch stabile Transfektion kann auch die induzierbare Wirkung in einem Tet-On-System genutzt werden. Hierfür muss in den untersuchten Zellen bereits TetR produziert werden. Durch die Zugabe eines Tetrazyklins wird die Bindung des TetR an die TetO aufgehoben und die Produktion der shRNA beginnt und somit auch der Knock-down.

pSUSTER2 (=pS2)



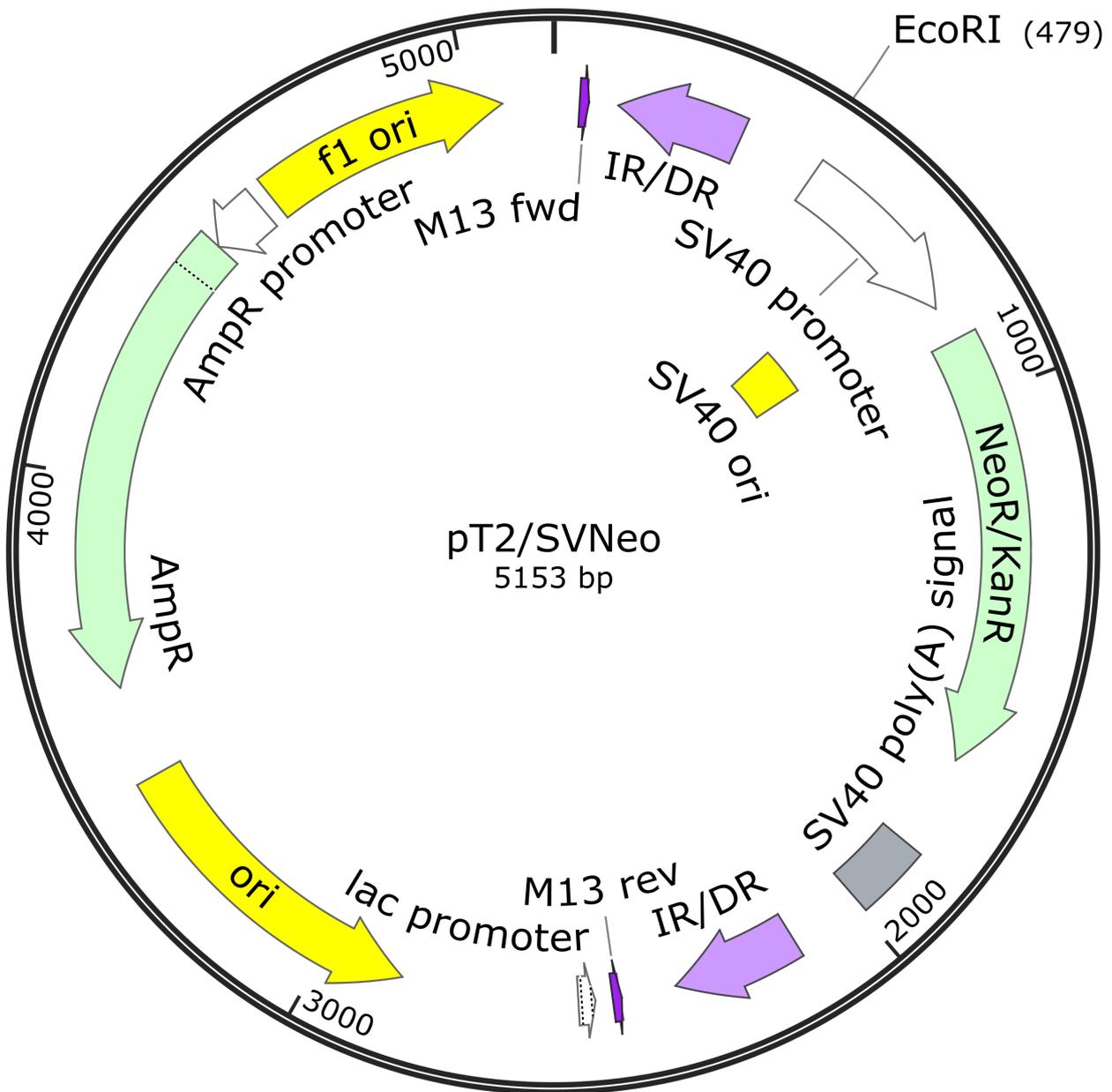
Plasmid 4: pSUSTER2 (=pS2)

Der pSUSTER2-Vektor unterscheidet sich vom pSUSTER-Vektor nur durch eine weitere TetO-Sequenz vor der TATA-Box. Die zusätzliche TetO-Sequenz verhindert gemäß Erkenntnissen von Henriksen et al. (2007) eine unerwünschte „Leakiness“ im nicht-induzierten Zustand. Dieser Vektor besitzt ebenso wie die Vektoren pSUS und pSUSTER die Möglichkeit mehrere Kassetten hintereinander zu klonieren und/oder alle Kassetten in einen anderen Vektor mit einer SacI-kompatiblen Schnittstelle zu überführen. Durch stabile Transfektion kann auch die induzierbare Wirkung in einem Tet-On-System genutzt werden. Hierfür muss in den untersuchten Zellen bereits TetR produziert werden. Durch die Zugabe eines Tetrazyklins wird die Bindung des TetR an die TetO aufgehoben und die Produktion der shRNA beginnt und somit auch der Knock-down.



Plasmid 5: pT2B/Puro

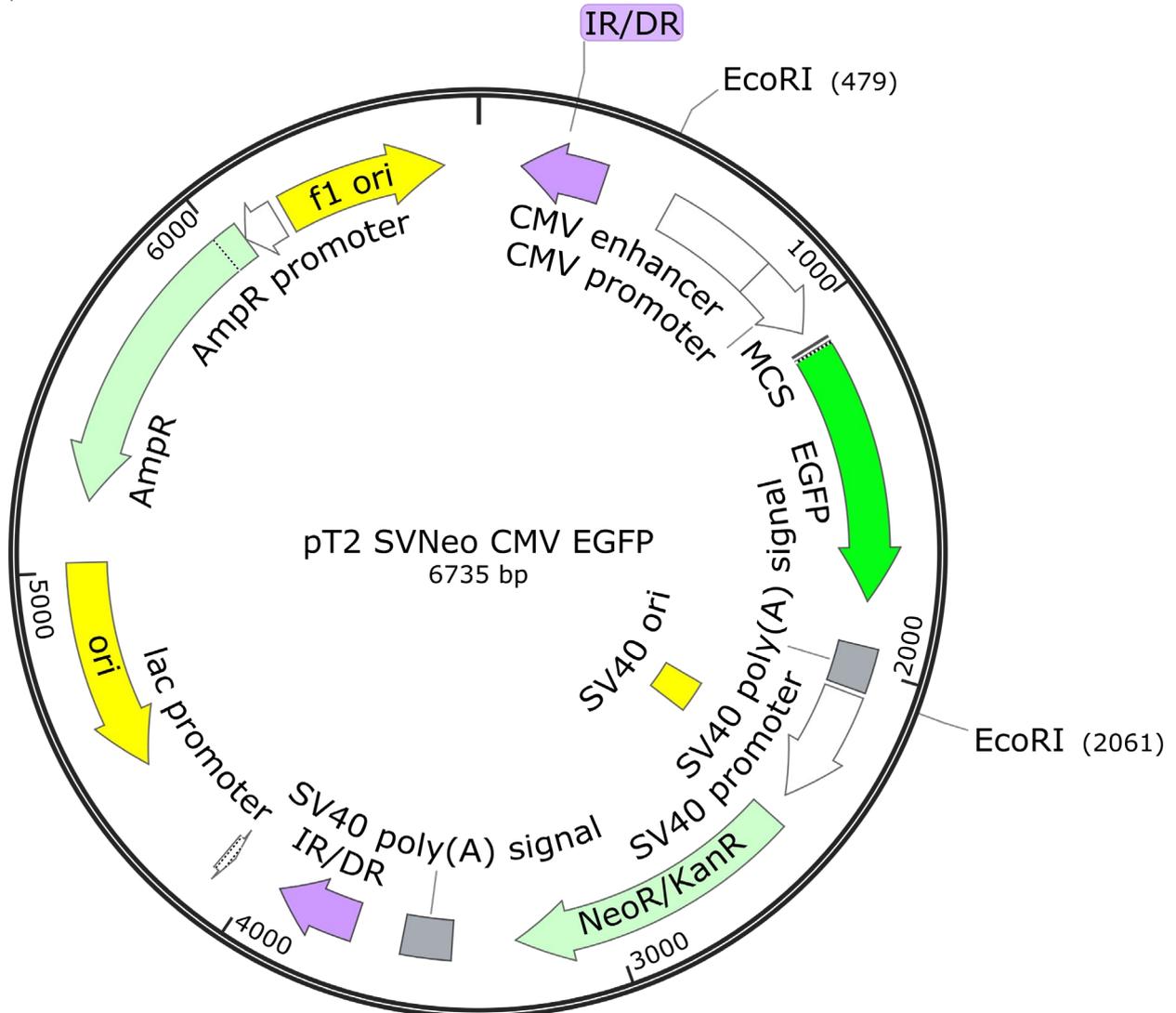
Hierbei handelt es sich um einen Sleeping Beauty Donor Vektor, der eine Puromycin-Resistenz in den transfizierten Zellen vermittelt. Dieser wurde freundlicherweise von Zsuzsanna Izsvák (Berlin) zur Verfügung gestellt. Die beiden Restriktionsschnittstellen EcoRI und SacI liegen außerhalb der beiden Erkennungssequenz IR/DR der Sleeping Beauty Transposase. Aus diesem Grund werden in diese Schnittstellen einklonierte Inserts nicht stabil in die transfizierten Zellen integriert. Weitere Restriktionsschnittstellen stehen in dieser Version des Vektors nicht zu Verfügung. Im Kontrast zum Vektor pT2/SVNeo sind die IR/DR auf beiden Seiten identisch.



Plasmid 6: pT2/SVNeo

Der Vektor pT2/SVNeo (Cui et al., 2002) ist ein Sleeping Beauty Donor Vektor und vermittelt nach Transfektion eine Aminoglykosid-Resistenz. Als Klonierungsschnittstelle steht EcoRI zur Verfügung. Nach Transfektion mit der Sleeping Beauty Transposase wird der DNA-Abschnitt zwischen den beiden Erkennungssequenzen IR/DR stabil ins Genom integriert. Hierbei besitzen die Erkennungssequenzen zum Teil voneinander abweichende Sequenzen.

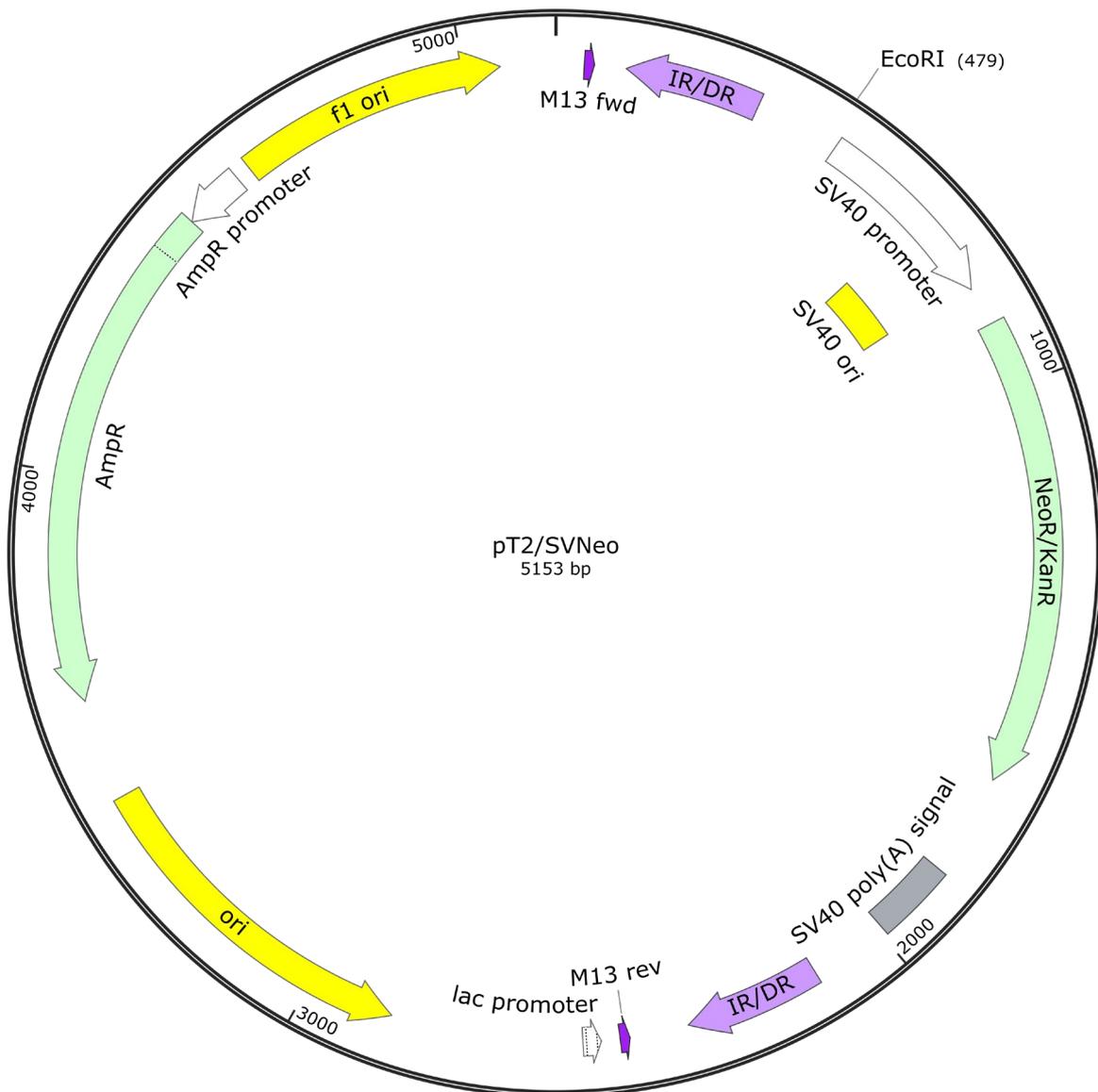
pT2/SVNeo CMV EGFP



Plasmid 7: pT2/SVNeo CMV EGFP

Dieser Sleeping Beauty Donor Vektor basiert auf dem Vektor pT2/SVNeo und vermittelt nach Transfektion eine Aminoglykosid-Resistenz. Zur Expression von EGFP wurde die CMV-EGFP-Kassette aus dem Vektor pEGFP-N3-mod über zwei flankierenden EcoRI-Schnittstellen ausgeschnitten und in den Vektor pT2/SVNeo inkloniert. Hierdurch wird nach erfolgter Selektion in transfizierten Zellen eine stabile Expression von EGFP vermittelt. Dieser Vektor ermöglicht die Beurteilung des Erfolgs der Transfektion und Selektion durch die einfache Messbarkeit der grünen Fluoreszenz mittels FACS. Daher ist dieses Plasmid insbesondere für die Etablierung des Sleeping Beauty Transposon System in neuen Zelllinien geeignet.

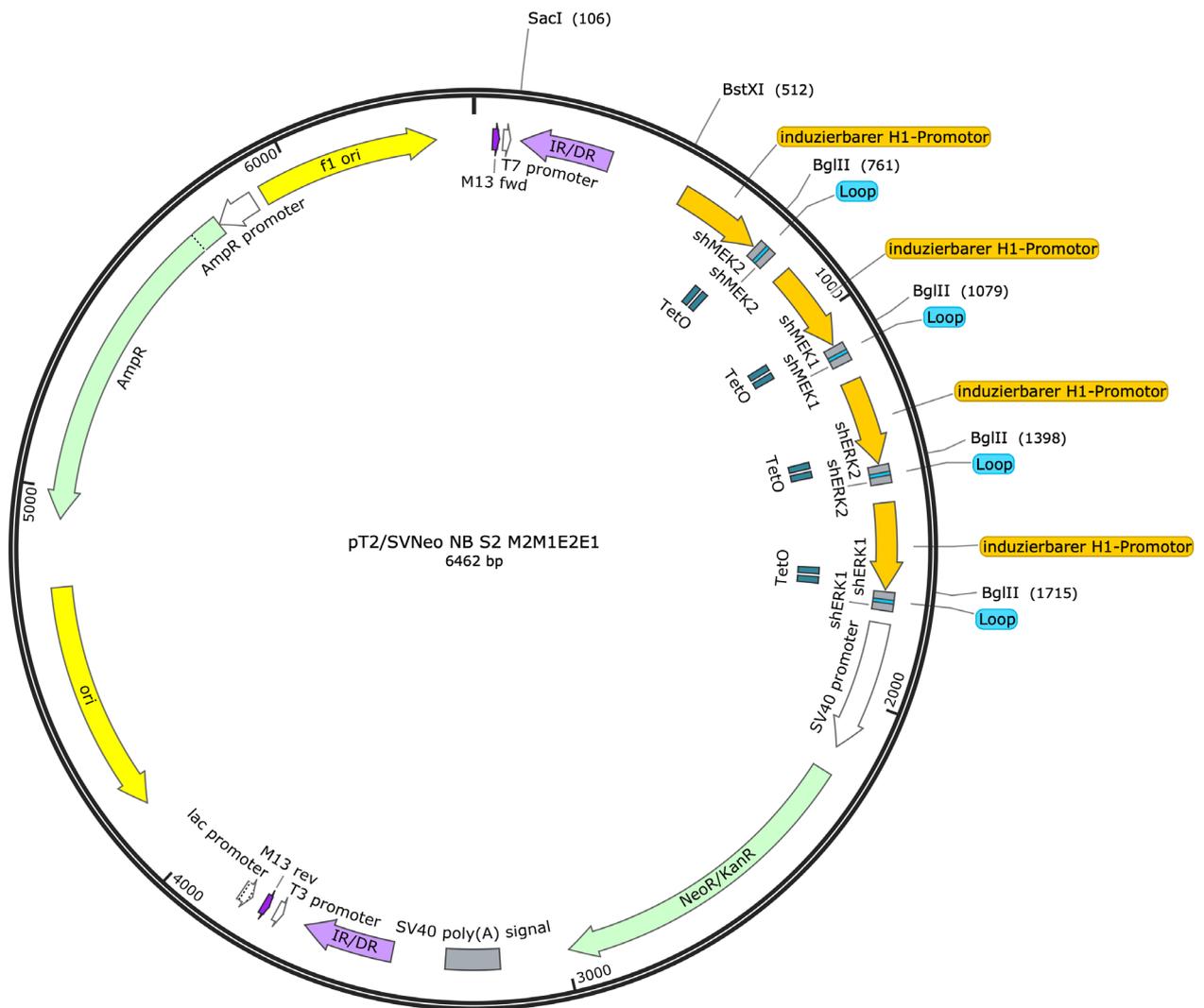
pT2/SVNeo NB



Plasmid 8: pT2/SVNeo NB

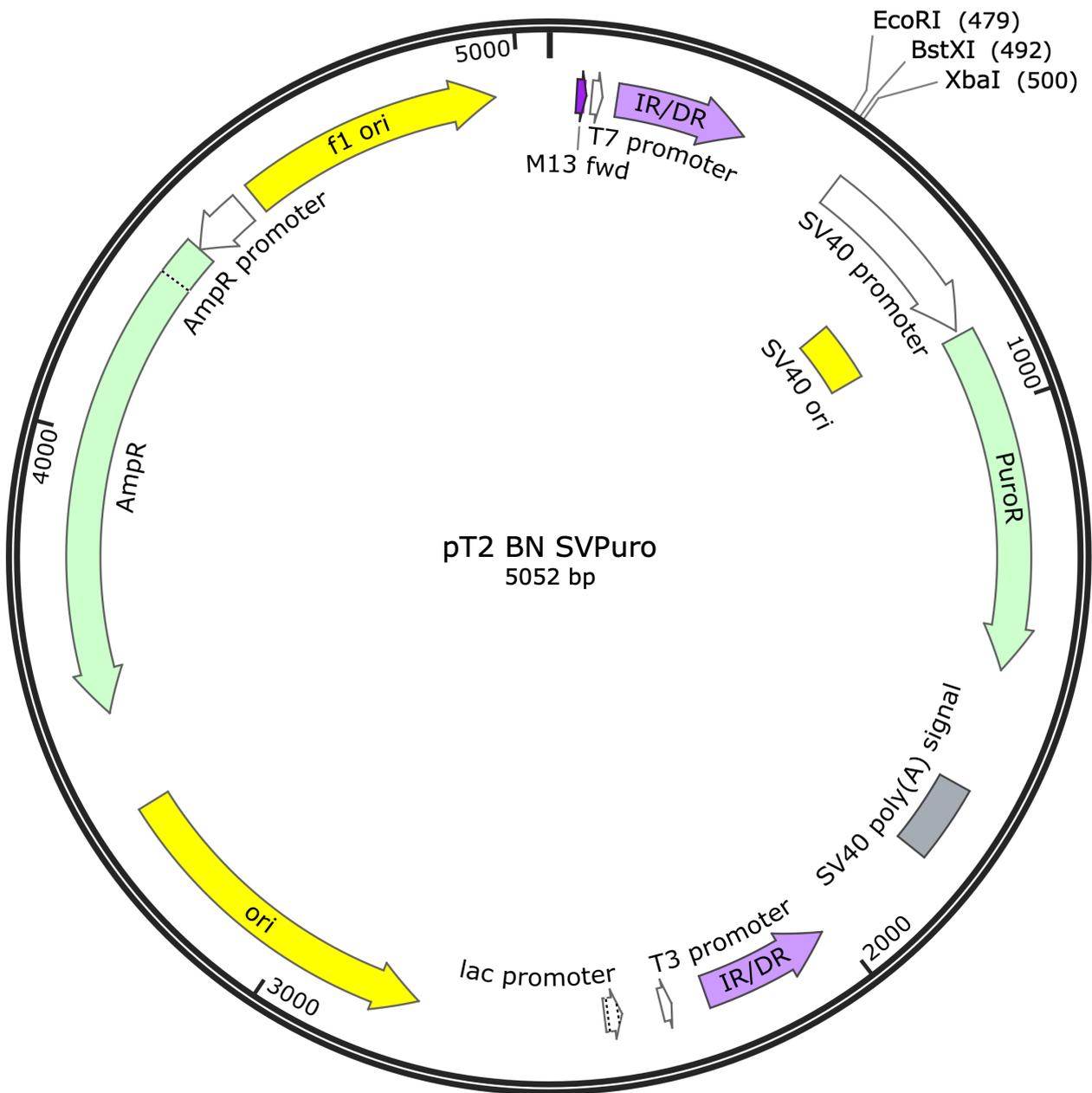
Dieser Sleeping Beauty Donor Vektor basiert auf dem Vektor pT2/SVNeo und vermittelt nach Transfektion eine Aminoglykosid-Resistenz. Durch Modifikation des Ausgangsvektors wurden zusätzliche Restriktionsschnittstellen hinzugefügt. Der Vektor pT2/SVNeo NB besitzt dadurch Schnittstellen für NotI, XbaI, EcoRI und eine BstXI-Schnittstelle, welche SacI-kompatibel ist und somit die H1-Promotor-Kassetten aus pSUS, pSUSTER beziehungsweise pSUSTER2 aufnehmen kann. Die beiden Erkennungssequenzen IR/DR für die Sleeping Beauty Transposase besitzen voneinander zum Teil abweichende Sequenzen.

pT2/SVNeo NB S2 M2M1E2E1



Plasmid 9: pT2/SVNeo NB S2 M2M1E2E1

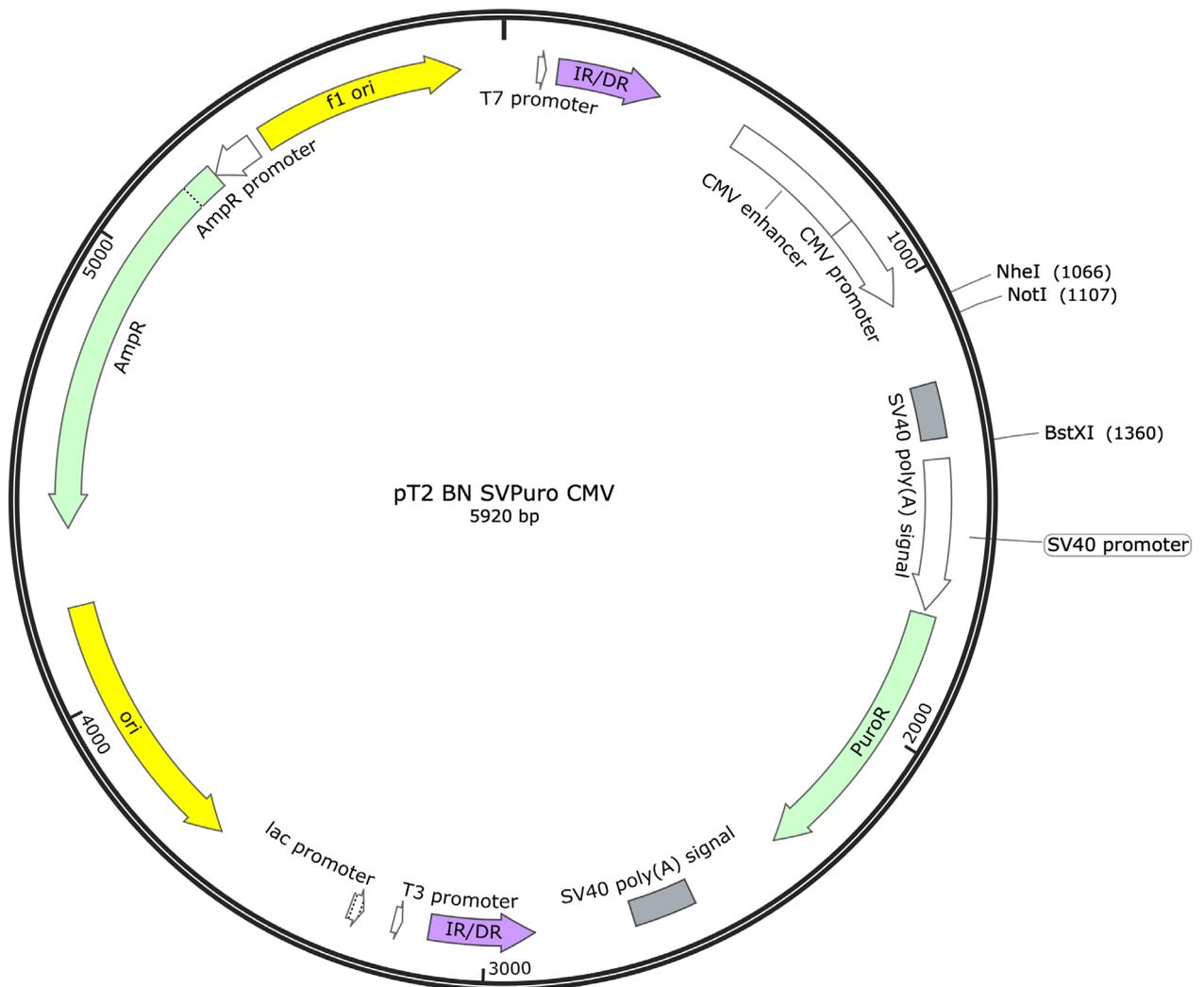
Beim Vektor pT2/SVNeo NB S2 M2M1E2E1 handelt es sich um den Vektor pT2/SVNeo NB, in welchen die vier H1-Promotorkassetten aus pSUSTER2 M2M1E2E1 inkloniert wurden. Dieser Vektor vermittelt einen Knock-down von vier Komponenten (ERK1/2 und MEK1/2) des MAPK-Wegs. Durch die Verwendung des H1-Promotors mit zwei TetO-Sequenzen ist bei stabiler Transfektion in Zellen, welche TetR bilden, eine Induktion des Knock-downs mit einem Tetrazyklin möglich.



Plasmid 10: pT2 BN SVPuro

Da im Vektor pT2B/Puro nutzbare Restriktionsschnittstellen fehlten, wurde ein Sleeping Beauty Donor Vektor mit Puromycin-Resistenz auf Grundlage des Vektors pT2/SVNeo konstruiert. Dieser Vektor besitzt daher auch eine BstXI-Schnittstelle, welche kompatibel mit den H1-Promotor-Kassetten aus pSUS, pSUSTER beziehungsweise pSUSTER2 ist. Zudem ist eine EcoRI-Schnittstelle vorhanden, welche das Einklonieren von Protein-Expressionskassetten ermöglicht, welche schon in pT2/SVNeo oder pT2B/Puro genutzt worden waren. Die Erkennungssequenzen IR/DR für die Sleeping Beauty Transposase besitzen daher ebenfalls voneinander zum Teil abweichende Sequenzen und entsprechen denen aus pT2/SVNeo.

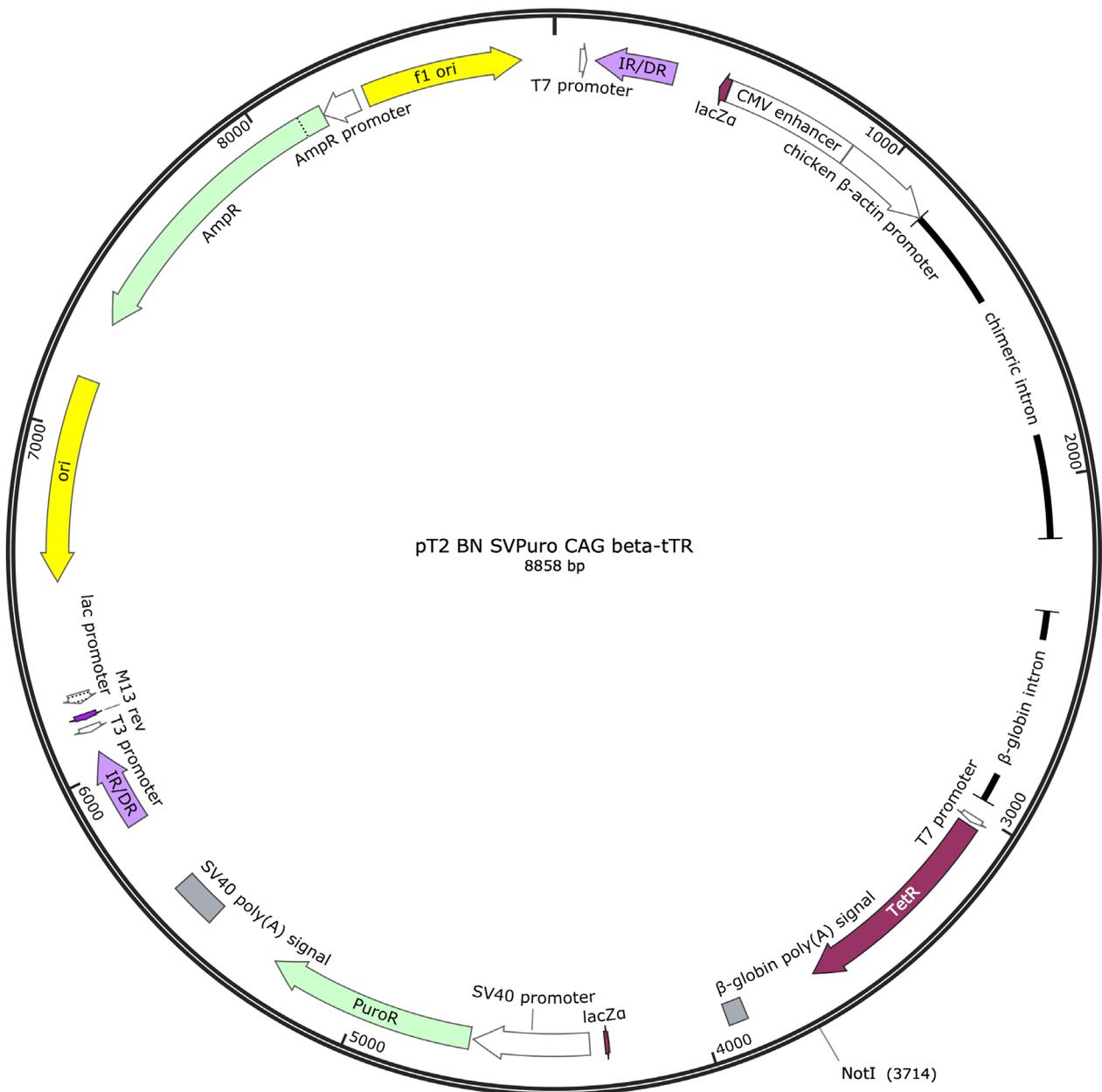
pT2 BN SVPuro CMV



Plasmid 11: pT2 BN SVPuro CMV

Der Sleeping Beauty Donor Vektor pT2 BN SVPuro CMV ist durch die Einklonierung einer CMV-Promotor-Expressionskassette in den Vektor pT2 BN SVPuro entstanden. Durch die Möglichkeit transfizierte Zellen mit Puromycin schneller und auch günstiger als mit Geneticin zu selektieren, hat sich dieser Vektor zu einem beliebten Vektor zur Protein-Expression entwickelt. Er wurde für diesen Zweck schon in verschiedenen Forschungsgruppen eingesetzt.

pT2 BN SVPuro CAG beta-tTR



Plasmid 12: pT2 BN SVPuro CAG beta-tTR

Der Sleeping Beauty Donor Vektor pT2 BN SVPuro CAG beta-tTR zur Expression des TetR in MM Zellen ist durch die Einklonierung einer CAG-Promotor-Expressionskassette in den Vektor pT2 BN SVPuro entstanden. Anschließend wurde das beta-TetR-Gen in diese Expressionskassette einkloniert. Dieser Vektor liefert eine verlässliche stabile Expression von TetR in transfizierten Zellen. Hierbei ist das Expressionslevel ausreichend um eine Repression induzierbarer H1-Promotoren zu erzielen. Auch ein Nachweis des produzierten TetR gelingt bei Expression mit dem CAG-Promotor. Im Gegensatz dazu waren alle Versuche mit dem CMV-Promotor — inklusive verschiedener Ansätze um dessen Expression zu steigern — nur mit geringem oder gar keinem Erfolg verbunden.

14 Literatur

- Abramson, H. N. (2016). **Kinase inhibitors as potential agents in the treatment of multiple myeloma.** *Oncotarget* 7, 81926-81968, doi: 10.18632/oncotarget.10745.
- Altschmied, L., Baumeister, R., Pfeleiderer, K. und Hillen, W. (1988). **A threonine to alanine exchange at position 40 of Tet repressor alters the recognition of the sixth base pair of tet operator from GC to AT.** *The EMBO Journal* 7, 4011-4017, doi: 10.1002/j.1460-2075.1988.tb03290.x.
- Anderson, J. und Akkina, R. (2005). **HIV-1 resistance conferred by siRNA cosuppression of CXCR4 and CCR5 coreceptors by a bispecific lentiviral vector.** *AIDS Research and Therapy* 2, 1, doi: 10.1186/1742-6405-2-1.
- Anderson, K., Lutz, C., van Delft, F. W., Bateman, C. M., Guo, Y., Colman, S. M., Kempinski, H., Moorman, A. V., Titley, I., Swansbury, J., Kearney, L., Enver, T. und Greaves, M. (2011). **Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia.** *Nature* 469, 356-361, doi: 10.1038/nature09650.
- Anderson, K. C. (2012). **The 39th David A. Karnofsky Lecture: bench-to-bedside translation of targeted therapies in multiple myeloma.** *J Clin Oncol* 30, 445-452, doi: 10.1200/jco.2011.37.8919.
- Ansell, S. M., Kyle, R. A., Reeder, C. B., Fonseca, R., Mikhael, J. R., Morice, W. G., Bergsagel, P. L., Buadi, F. K., Colgan, J. P., Dingli, D., Dispenzieri, A., Greipp, P. R., Habermann, T. M., Hayman, S. R., Inwards, D. J., Johnston, P. B., Kumar, S. K., Lacy, M. Q., Lust, J. A., Markovic, S. N., Micallef, I. N. M., Nowakowski, G. S., Porrata, L. F., Roy, V., Russell, S. J., Short, K. E. D., Stewart, A. K., Thompson, C. A., Witzig, T. E., Zeldenrust, S. R., Dalton, R. J., Rajkumar, S. V. und Gertz, M. A. (2010). **Diagnosis and Management of Waldenström Macroglobulinemia: Mayo Stratification of Macroglobulinemia and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Guidelines.** *Mayo Clinic Proceedings* 85, 824-833, doi: 10.4065/mcp.2010.0304.
- Aoidi, R., Maltais, A. und Charron, J. (2016). **Functional redundancy of the kinases MEK1 and MEK2: Rescue of the Mek1 mutant phenotype by Mek2 knock-in reveals a protein threshold effect.** *Science Signaling* 9, ra9, doi: 10.1126/scisignal.aad5658.
- Arkin, M. R. und Whitty, A. (2009). **The road less traveled: modulating signal transduction enzymes by inhibiting their protein-protein interactions.** *Curr Opin Chem Biol* 13, 284-290, doi: 10.1016/j.cbpa.2009.05.125.
- Aronovich, E. L., McIvor, R. S. und Hackett, P. B. (2011). **The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy.** *Hum Mol Genet* 20, R14-20, doi: 10.1093/hmg/ddr140.
- ATCC (2018). **MM.1S.** URL: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2974.aspx> [Stand:09.12.2018].
- Attal, M., Lauwers-Cances, V., Hulin, C., Leleu, X., Caillot, D., Escoffre, M., Arnulf, B., Macro, M., Belhadj, K., Garderet, L., Roussel, M., Payen, C., Mathiot, C., Femand, J. P.,

- Meuleman, N., Rollet, S., Maglio, M. E., Zeytoonjian, A. A., Weller, E. A., Munshi, N., Anderson, K. C., Richardson, P. G., Facon, T., Avet-Loiseau, H., Harousseau, J.-L. and Moreau, P. (2017). **Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma**. *New England Journal of Medicine* 376, 1311-1320, doi: 10.1056/NEJMoa1611750.
- Auner, H. W., Szydlo, R., van Biezen, A., Iacobelli, S., Gahrton, G., Milpied, N., Volin, L., Janssen, J., Nguyen Quoc, S., Michallet, M., Schoemans, H., El Cheikh, J., Petersen, E., Guilhot, F., Schonland, S., Ahlberg, L., Morris, C., Garderet, L., de Witte, T. und Kroger, N. (2013). **Reduced intensity-conditioned allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma relapsing or progressing after autologous transplantation: a study by the European Group for Blood and Marrow Transplantation**. *Bone Marrow Transplant* 48, 1395-1400, doi: 10.1038/bmt.2013.73.
- Avet-Loiseau, H., Attal, M., Moreau, P., Charbonnel, C., Garban, F., Hulin, C., Leyvraz, S., Michallet, M., Yakoub-Agha, I., Garderet, L., Marit, G., Michaux, L., Voillat, L., Renaud, M., Grosbois, B., Guillermin, G., Benboubker, L., Monconduit, M., Thieblemont, C., Casassus, P., Caillot, D., Stoppa, A.-M., Sotto, J.-J., Wetterwald, M., Dumontet, C., Fuzibet, J.-G., Azais, I., Dorvaux, V., Zandecki, M., Bataille, R., Minvielle, S., Harousseau, J.-L., Facon, T. und Mathiot, C. (2007). **Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome**. *Blood* 109, 3489-3495, doi: 10.1182/blood-2006-08-040410 %J Blood.
- Avet-Loiseau, H., Li, C., Magrangeas, F., Gouraud, W., Charbonnel, C., Harousseau, J.-L., Attal, M., Marit, G., Mathiot, C., Facon, T., Moreau, P., Anderson, K. C., Campion, L., Munshi, N. C. und Minvielle, S. (2009). **Prognostic Significance of Copy-Number Alterations in Multiple Myeloma**. *J Clin Oncol* 27, 4585-4590, doi: 10.1200/jco.2008.20.6136.
- Balasubramanian, S., Rajendra, Y., Baldi, L., Hacker, D. L. und Wurm, F. M. (2016). **Comparison of three transposons for the generation of highly productive recombinant CHO cell pools and cell lines**. *Biotechnol Bioeng* 113, 1234-1243, doi: 10.1002/bit.25888.
- Banerjee, A., Li, M.-J., Remling, L., Rossi, J. und Akkina, R. (2004). **Lentiviral transduction of Tar Decoy and CCR5 ribozyme into CD34+ progenitor cells and derivation of HIV-1 resistant T cells and macrophages**. *AIDS Research and Therapy* 1, 2, doi: 10.1186/1742-6405-1-2.
- Barrio, S., DaVia, M., Bruins, L., Stühmer, T., Steinbrunn, T., Bittrich, M., Einsele, H., Stewart, A. K., Braggio, E. und Kortum, K. M. (2018). **Protocol for M(3)P: A Comprehensive and Clinical Oriented Targeted Sequencing Panel for Routine Molecular Analysis in Multiple Myeloma**. *Methods Mol Biol* 1792, 117-128, doi: 10.1007/978-1-4939-7865-6_8.
- Barrio, S., Stühmer, T., Da-Via, M., Barrio-Garcia, C., Lehnert, N., Besse, A., Cuenca, I., Garitano-Trojaola, A., Fink, S., Leich, E., Chatterjee, M., Driessen, C., Martinez-Lopez, J., Rosenwald, A., Beckmann, R., Bargou, R. C., Braggio, E., Stewart, A. K., Raab, M. S., Einsele, H. und Kortum, K. M. (2019). **Spectrum and functional validation of PSMB5 mutations in multiple myeloma**. *Leukemia* 33, 447-456, doi: 10.1038/s41375-018-0216-8.

- Berdeja, J. G., Lin, Y., Raje, N., Munshi, N., Siegel, D., Liedtke, M., Jagannath, S., Maus, M. V., Turka, A., Lam, L. P., Hege, K., Morgan, R. A., Quigley, M. T. und Kochenderfer, J. N. (2017). **Durable Clinical Responses in Heavily Pretreated Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Updated Results from a Multicenter Study of bb2121 Anti-Bcma CAR T Cell Therapy.** *Blood* 130, 740-740.
- Bergsagel, P. L. und Kuehl, W. M. (2005). **Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma.** *J Clin Oncol* 23, 6333-6338, doi: 10.1200/jco.2005.05.021.
- Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M., Zhan, F., Sawyer, J., Barlogie, B. und Shaughnessy, J. (2005). **Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma.** *Blood* 106, 296, doi: 10.1182/blood-2005-01-0034.
- Birmingham, A., Anderson, E. M., Reynolds, A., Ilsley-Tyree, D., Leake, D., Fedorov, Y., Baskerville, S., Maksimova, E., Robinson, K., Karpilow, J., Marshall, W. S. und Khvorova, A. (2006). **3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets.** *Nature Methods* 3, 199, doi: 10.1038/nmeth854
<https://www.nature.com/articles/nmeth854>.
- Bisht, K., Grill, S., Graniel, J. und Nandakumar, J. (2017). **A lentivirus-free inducible CRISPR-Cas9 system for efficient targeting of human genes.** *Anal Biochem* 530, 40-49, doi: 10.1016/j.ab.2017.05.001.
- Bjorkstrand, B., Iacobelli, S., Hegenbart, U., Gruber, A., Greinix, H., Volin, L., Narni, F., Musto, P., Beksac, M., Bosi, A., Milone, G., Corradini, P., Goldschmidt, H., de Witte, T., Morris, C., Niederwieser, D. und Gahrton, G. (2011). **Tandem autologous/reduced-intensity conditioning allogeneic stem-cell transplantation versus autologous transplantation in myeloma: long-term follow-up.** *J Clin Oncol* 29, 3016-3022, doi: 10.1200/jco.2010.32.7312.
- Blokhin, N., Larionov, L., Perevodchikova, N., Chebotareva, L. und Merkulova, N. (1958). **Clinical experiences with sarcolysin in neoplastic diseases.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 68, 1128-1132, doi: 10.1111/j.1749-6632.1958.tb42675.x.
- Bødker, J. S., Brøndum, R. F., Schmitz, A., Schönherz, A. A., Jespersen, D. S., Sønderkær, M., Vesteghem, C., Due, H., Nørgaard, C. H., Perez-Andres, M., Samur, M. K., Davies, F., Walker, B., Pawlyn, C., Kaiser, M., Johnson, D., Bertsch, U., Broyl, A., van Duin, M., Shah, R., Johansen, P., Nørgaard, M. A., Samworth, R. J., Sonneveld, P., Goldschmidt, H., Morgan, G. J., Orfao, A., Munshi, N., Johnson, H. E., El-Galaly, T., Dybkær, K. und Bøgsted, M. (2018). **A multiple myeloma classification system that associates normal B-cell subset phenotypes with prognosis.** 2, 2400-2411, doi: 10.1182/bloodadvances.2018018564 %J Blood Advances.
- Boese, Q., Leake, D., Reynolds, A., Read, S., Scaringe, S. A., Marshall, W. S. und Khvorova, A. (2005). **Mechanistic Insights Aid Computational Short Interfering RNA Design.** In: *Methods in Enzymology*, Academic Press, S. 73-96.
- Boettcher, M. und McManus, M. T. (2015). **Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR.** *Mol Cell* 58, 575-585, doi: 10.1016/j.molcel.2015.04.028.

- Bolli, N., Avet-Loiseau, H., Wedge, D. C., Van Loo, P., Alexandrov, L. B., Martincorena, I., Dawson, K. J., Iorio, F., Nik-Zainal, S., Bignell, G. R., Hinton, J. W., Li, Y., Tubio, J. M., McLaren, S., S, O. M., Butler, A. P., Teague, J. W., Mudie, L., Anderson, E., Rashid, N., Tai, Y. T., Shamma, M. A., Sperling, A. S., Fulciniti, M., Richardson, P. G., Parmigiani, G., Magrangeas, F., Minvielle, S., Moreau, P., Attal, M., Facon, T., Futreal, P. A., Anderson, K. C., Campbell, P. J. und Munshi, N. C. (2014). **Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma**. *Nat Commun* 5, 2997, doi: 10.1038/ncomms3997.
- Bouabe, H., Fassler, R. und Heesemann, J. (2008). **Improvement of reporter activity by IRES-mediated polycistronic reporter system**. *Nucleic Acids Res* 36, e28, doi: 10.1093/nar/gkm1119.
- Broad Institute (2015). **TARGET database**. URL: https://software.broadinstitute.org/cancer/cga/sites/default/files/data/tools/target/TARGET_db_v3_02142015.xlsx [Stand].
- Brocke-Heidrich, K., Kretzschmar, A. K., Pfeifer, G., Henze, C., Loffler, D., Koczan, D., Thiesen, H. J., Burger, R., Gramatzki, M. und Horn, F. (2004). **Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation**. *Blood* 103, 242-251, doi: 10.1182/blood-2003-04-1048.
- Broyl, A., Hose, D., Lokhorst, H., de Knecht, Y., Peeters, J., Jauch, A., Bertsch, U., Buijs, A., Stevens-Kroef, M., Beverloo, H. B., Vellenga, E., Zweegman, S., Kersten, M.-J., van der Holt, B., el Jarari, L., Mulligan, G., Goldschmidt, H., van Duin, M. und Sonneveld, P. (2010). **Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients**. *116*, 2543-2553, doi: 10.1182/blood-2009-12-261032 %J Blood.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R. und Agami, R. (2002). **A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells**. *Science* 296, 550-553, doi: 10.1126/science.1068999.
- Bruno, B. (2016). **Allogeneic transplantation for multiple myeloma: yes, no or maybe?** *Bone Marrow Transplant* 51, 506-507, doi: 10.1038/bmt.2016.12.
- Bruno, B., Rotta, M., Patriarca, F., Mordini, N., Allione, B., Carnevale-Schianca, F., Giaccone, L., Sorasio, R., Omede, P., Baldi, I., Bringhen, S., Massaia, M., Aglietta, M., Levis, A., Gallamini, A., Fanin, R., Palumbo, A., Storb, R., Ciccone, G. und Boccadoro, M. (2007). **A comparison of allografting with autografting for newly diagnosed myeloma**. *N Engl J Med* 356, 1110-1120, doi: 10.1056/NEJMoa065464.
- Burger, R., Guenther, A., Bakker, F., Schmalzing, M., Bernand, S., Baum, W., Duerr, B., Hocke, G. M., Steininger, H., Gebhart, E. und Gramatzki, M. (2001). **Gp130 and ras mediated signaling in human plasma cell line INA-6: a cytokine-regulated tumor model for plasmacytoma**. *Hematol J* 2, 42-53, doi: 10.1038/sj/thj/6200075.

- Burger, R., Wendler, J., Antoni, K., Helm, G., Kalden, J. R. und Gramatzki, M. (1994). **Interleukin-6 production in B-cell neoplasias and Castleman's disease: evidence for an additional paracrine loop.** *Ann Hematol* 69, 25-31.
- Cao, J., Wu, L., Zhang, S. M., Lu, M., Cheung, W. K., Cai, W., Gale, M., Xu, Q. und Yan, Q. (2016). **An easy and efficient inducible CRISPR/Cas9 platform with improved specificity for multiple gene targeting.** *Nucleic Acids Res* 44, e149, doi: 10.1093/nar/gkw660.
- Carew, J. S., Nawrocki, S. T., Krupnik, Y. V., Dunner, K., Jr., McConkey, D. J., Keating, M. J. und Huang, P. (2006). **Targeting endoplasmic reticulum protein transport: a novel strategy to kill malignant B cells and overcome fludarabine resistance in CLL.** *Blood* 107, 222-231, doi: 10.1182/blood-2005-05-1923.
- Castanotto, D., Sakurai, K., Lingeman, R., Li, H., Shively, L., Aagaard, L., Soifer, H., Gatignol, A., Riggs, A. und Rossi, J. J. (2007). **Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC.** *Nucleic Acids Res* 35, 5154-5164, doi: 10.1093/nar/gkm543.
- Celgene Corporation (2017). **Celgene Corporation and bluebird bio Announce bb2121 Anti-BCMA CAR-T Cell Therapy Has Been Granted Breakthrough Therapy Designation from FDA and Prime Eligibility from EMA for Relapsed and Refractory Multiple Myeloma (**
- Chapman, M. A., Lawrence, M. S., Keats, J. J., Cibulskis, K., Sougnez, C., Schinzel, A. C., Harview, C. L., Brunet, J. P., Ahmann, G. J., Adli, M., Anderson, K. C., Ardlie, K. G., Auclair, D., Baker, A., Bergsagel, P. L., Bernstein, B. E., Drier, Y., Fonseca, R., Gabriel, S. B., Hofmeister, C. C., Jagannath, S., Jakubowski, A. J., Krishnan, A., Levy, J., Liefeld, T., Lonial, S., Mahan, S., Mfuko, B., Monti, S., Perkins, L. M., Onofrio, R., Pugh, T. J., Rajkumar, S. V., Ramos, A. H., Siegel, D. S., Sivachenko, A., Stewart, A. K., Trudel, S., Vij, R., Voet, D., Winckler, W., Zimmerman, T., Carpten, J., Trent, J., Hahn, W. C., Garraway, L. A., Meyerson, M., Lander, E. S., Getz, G. und Golub, T. R. (2011). **Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma.** *Nature* 471, 467-472, doi: 10.1038/nature09837.
- Chatterjee, M., Stuhmer, T., Herrmann, P., Bommert, K., Dorken, B. und Bargou, R. C. (2004). **Combined disruption of both the MEK/ERK and the IL-6R/STAT3 pathways is required to induce apoptosis of multiple myeloma cells in the presence of bone marrow stromal cells.** *Blood* 104, 3712-3721, doi: 10.1182/blood-2004-04-1670.
- Chen, Z. J., Kren, B. T., Wong, P. Y. P., Low, W. C. und Steer, C. J. (2005). **Sleeping Beauty-mediated down-regulation of huntingtin expression by RNA interference.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 329, 646-652, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.02.024.
- Chesi, M. und Bergsagel, P. L. (2011). **Many multiple myelomas: making more of the molecular mayhem.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011, 344-353, doi: 10.1182/asheducation-2011.1.344.

- Chesi, M. und Bergsagel, P. L. (2015). **Advances in the pathogenesis and diagnosis of multiple myeloma**. *Int J Lab Hematol* 37 *Suppl 1*, 108-114, doi: 10.1111/ijlh.12360.
- Chesi, M., Matthews, G. M., Garbitt, V. M., Palmer, S. E., Shortt, J., Lefebure, M., Stewart, A. K., Johnstone, R. W. und Bergsagel, P. L. (2012). **Drug response in a genetically engineered mouse model of multiple myeloma is predictive of clinical efficacy**. *Blood* 120, 376-385, doi: 10.1182/blood-2012-02-412783.
- Chiu, Y. L. und Rana, T. M. (2003). **siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis**. *RNA* 9, 1034-1048.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction**. *Anal Biochem* 162, 156-159, doi: 10.1006/abio.1987.9999.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (2006). **The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on**. *Nat Protoc* 1, 581-585, doi: 10.1038/nprot.2006.83.
- Cohen, A. D. (2018). **CAR T Cells and Other Cellular Therapies for Multiple Myeloma: 2018 Update**. American Society of Clinical Oncology Educational Book, e6-e15, doi: 10.1200/EDBK_200889.
- Cohen, R. N., van der Aa, M. A., Macaraeg, N., Lee, A. P. und Szoka, F. C., Jr. (2009). **Quantification of plasmid DNA copies in the nucleus after lipoplex and polyplex transfection**. *J Control Release* 135, 166-174, doi: 10.1016/j.jconrel.2008.12.016.
- Cojocari, D. (2010). **Lentiviral delivery of shRNA expression construct for stable integration and expresion of shRNA. ShRNA processing and inhibitory mechanisms**. URL: https://de.wikipedia.org/wiki/Small_hairpin_RNA#/media/File:ShRNA_Lentivirus.svg [Stand:29.03.2019].
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A. und Zhang, F. (2013). **Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems**. *Science* 339, 819, doi: 10.1126/science.1231143.
- Coonrod, A., Li, F. Q. und Horwitz, M. (1997). **On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses**. *Gene Therapy* 4, 1313, doi: 10.1038/sj.gt.3300536.
- Corre, J., Munshi, N. und Avet-Loiseau, H. (2015). **Genetics of multiple myeloma: another heterogeneity level?** *Blood* 125, 1870-1876, doi: 10.1182/blood-2014-10-567370.
- Cox, A. D., Fesik, S. W., Kimmelman, A. C., Luo, J. und Der, C. J. (2014). **Drugging the undruggable Ras: mission possible?** *Nat Rev Drug Discov* 13, 828-851, doi: 10.1038/nrd4389.
- Crawley, C., Iacobelli, S., Bjorkstrand, B., Apperley, J. F., Niederwieser, D. und Gahrton, G. (2007). **Reduced-intensity conditioning for myeloma: lower nonrelapse mortality but**

- higher relapse rates compared with myeloablative conditioning.** *Blood* 109, 3588-3594, doi: 10.1182/blood-2006-07-036848.
- Crawley, C., Lalancette, M., Szydlo, R., Gilleece, M., Peggs, K., Mackinnon, S., Juliusson, G., Ahlberg, L., Nagler, A., Shimoni, A., Sureda, A., Boiron, J.-M., Einsele, H., Chopra, R., Carella, A., Cavenagh, J., Gratwohl, A., Garban, F., Zander, A., Björkstrand, B., Niederwieser, D., Gahrton, G. und Apperley, J. F. (2005). **Outcomes for reduced-intensity allogeneic transplantation for multiple myeloma: an analysis of prognostic factors from the Chronic Leukaemia Working Party of the EBMT.** *Blood* 105, 4532-4539, doi: 10.1182/blood-2004-06-2387.
- Cui, Z., Geurts, A. M., Liu, G., Kaufman, C. D. und Hackett, P. B. (2002). **Structure–Function Analysis of the Inverted Terminal Repeats of the Sleeping Beauty Transposon.** *Journal of Molecular Biology* 318, 1221-1235, doi: 10.1016/s0022-2836(02)00237-1.
- Cullen, B. R. (2005). **Induction of stable RNA interference in mammalian cells.** *Gene Therapy* 13, 503, doi: 10.1038/sj.gt.3302656.
- Cullen, B. R. (2006). **Enhancing and confirming the specificity of RNAi experiments.** *Nature Methods* 3, 677, doi: 10.1038/nmeth913.
- Damdindorj, L., Karnan, S., Ota, A., Hossain, E., Konishi, Y., Hosokawa, Y. und Konishi, H. (2014). **A comparative analysis of constitutive promoters located in adeno-associated viral vectors.** *PLoS One* 9, e106472, doi: 10.1371/journal.pone.0106472.
- Davies, F. E. (2017). **Is molecular remission the goal of multiple myeloma therapy?** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2017, 205-211, doi: 10.1182/asheducation-2017.1.205.
- de Koning, A. P. J., Gu, W., Castoe, T. A., Batzer, M. A. und Pollock, D. D. (2011). **Repetitive Elements May Comprise Over Two-Thirds of the Human Genome.** *PLOS Genetics* 7, e1002384, doi: 10.1371/journal.pgen.1002384.
- de Silva, S., Lotta, L. T., Burris, C. A. und Bowers, W. J. (2010). **Virion-Associated Cofactor High-Mobility Group DNA-Binding Protein-1 Facilitates Transposition from the Herpes Simplex Virus/Sleeping Beauty Amplicon Vector Platform.** *Human Gene Therapy* 21, 1615-1622, doi: 10.1089/hum.2010.022.
- Deng, S., Li, G., Yu, K., Tian, X., Wang, F., Li, W., Jiang, W., Ji, P., Han, H., Fu, J., Zhang, X., Zhang, J., Liu, Y., Lian, Z. und Liu, G. (2017). **RNAi combining Sleeping Beauty transposon system inhibits ex vivo expression of foot-and-mouth disease virus VP1 in transgenic sheep cells.** *Scientific Reports* 7, 10065, doi: 10.1038/s41598-017-09302-1.
- Dhakal, B., Vesole, D. H. und Hari, P. N. (2016). **Allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma: is there a future?** *Bone Marrow Transplant* 51, 492-500, doi: 10.1038/bmt.2015.325.
- Dhodapkar, M. V. (2016). **MGUS to myeloma: a mysterious gammopathy of underexplored significance.** *Blood* 128, 2599-2606, doi: 10.1182/blood-2016-09-692954.

- Dhodapkar, M. V., Sexton, R., Waheed, S., Usmani, S., Papanikolaou, X., Nair, B., Petty, N., Shaughnessy, J. D., Hoering, A., Crowley, J., Orłowski, R. Z. und Barlogie, B. (2014). **Clinical, genomic, and imaging predictors of myeloma progression from asymptomatic monoclonal gammopathies (SWOG S0120)**. *123*, 78-85, doi: 10.1182/blood-2013-07-515239 %J Blood.
- Diehl, V., Schaadt, M., Kirchner, H., Hellriegel, K. P., Gudat, F., Fonatsch, C., Laskewitz, E. und Guggenheim, R. (1978). **Long-term cultivation of plasma cell leukemia cells and autologous lymphoblasts (LCL) in vitro: a comparative study**. *Blut 36*, 331-338.
- Dimopoulos, M. A., Moulopoulos, L. A., Maniatis, A. und Alexanian, R. (2000). **Solitary plasmacytoma of bone and asymptomatic multiple myeloma**. *Blood 96*, 2037-2044.
- Dimopoulos, M. A., Oriol, A., Nahi, H., San-Miguel, J., Bahlis, N. J., Usmani, S. Z., Rabin, N., Orłowski, R. Z., Komarnicki, M., Suzuki, K., Plesner, T., Yoon, S. S., Ben Yehuda, D., Richardson, P. G., Goldschmidt, H., Reece, D., Lisby, S., Khokhar, N. Z., O'Rourke, L., Chiu, C., Qin, X., Guckert, M., Ahmadi, T. und Moreau, P. (2016). **Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma**. *N Engl J Med 375*, 1319-1331, doi: 10.1056/NEJMoa1607751.
- Ding, S., Wu, X., Li, G., Han, M., Zhuang, Y. und Xu, T. (2005). **Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice**. *Cell 122*, 473-483, doi: 10.1016/j.cell.2005.07.013.
- Dispenzieri, A., Katzmann, J. A., Kyle, R. A., Larson, D. R., Melton, L. J., 3rd, Colby, C. L., Therneau, T. M., Clark, R., Kumar, S. K., Bradwell, A., Fonseca, R., Jelinek, D. F. und Rajkumar, S. V. (2010). **Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study**. *Lancet 375*, 1721-1728, doi: 10.1016/s0140-6736(10)60482-5.
- Doench, J. G. und Sharp, P. A. (2004). **Specificity of microRNA target selection in translational repression**. *Genes Dev 18*, 504-511, doi: 10.1101/gad.1184404.
- Dombroski, B. A., Feng, Q., Mathias, S. L., Sassaman, D. M., Scott, A. F., Kazazian, H. H. und Boeke, J. D. (1994). **An in vivo assay for the reverse transcriptase of human retrotransposon L1 in *Saccharomyces cerevisiae***. *Molecular and Cellular Biology 14*, 4485, doi: 10.1128/MCB.14.7.4485.
- Drayson, M., Tang, L. X., Drew, R., Mead, G. P., Carr-Smith, H. und Bradwell, A. R. (2001). **Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma**. *Blood 97*, 2900-2902, doi: 10.1182/blood.V97.9.2900.
- Drexler, H. G. und Matsuo, Y. (2000). **Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of multiple myeloma and plasma cell leukemia**. *Leuk Res 24*, 681-703.
- Drexler, H. G. und Uphoff, C. C. J. C. (2002). **Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention**. *39*, 75-90, doi: 10.1023/a:1022913015916.

- DSMZ (2018a). **AMO-1**. URL: <https://www.dsmz.de/de/kataloge/catalogue/culture/ACC-538.html> [Stand:09.12.2018].
- DSMZ (2018b). **JJN-3**. URL: <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-541> [Stand:09.12.2018].
- DSMZ (2018c). **L-363**. URL: <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-49.html> [Stand:09.12.2018].
- Durie, B. G., Harousseau, J. L., Miguel, J. S., Blade, J., Barlogie, B., Anderson, K., Gertz, M., Dimopoulos, M., Westin, J., Sonneveld, P., Ludwig, H., Gahrton, G., Beksac, M., Crowley, J., Belch, A., Boccadaro, M., Cavo, M., Turesson, I., Joshua, D., Vesole, D., Kyle, R., Alexanian, R., Tricot, G., Attal, M., Merlini, G., Powles, R., Richardson, P., Shimizu, K., Tosi, P., Morgan, G. und Rajkumar, S. V. (2006). **International uniform response criteria for multiple myeloma**. *Leukemia* 20, 1467-1473, doi: 10.1038/sj.leu.2404284.
- Durie, B. G. und Salmon, S. E. (1975). **A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival**. *Cancer* 36, 842-854.
- Echeverri, C. J., Beachy, P. A., Baum, B., Boutros, M., Buchholz, F., Chanda, S. K., Downward, J., Ellenberg, J., Fraser, A. G., Hacohen, N., Hahn, W. C., Jackson, A. L., Kiger, A., Linsley, P. S., Lum, L., Ma, Y., Mathey-Prévôt, B., Root, D. E., Sabatini, D. M., Taipale, J., Perrimon, N. und Bernards, R. (2006). **Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens**. *Nature Methods* 3, 777, doi: 10.1038/nmeth1006-777.
- Egan, J. B., Shi, C. X., Tembe, W., Christoforides, A., Kurdoglu, A., Sinari, S., Middha, S., Asmann, Y., Schmidt, J., Braggio, E., Keats, J. J., Fonseca, R., Bergsagel, P. L., Craig, D. W., Carpten, J. D. und Stewart, A. K. (2012). **Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides**. *Blood* 120, 1060-1066, doi: 10.1182/blood-2012-01-405977.
- Eisele, L., Durig, J., Huttmann, A., Duhrsen, U., Assert, R., Bokhof, B., Erbel, R., Mann, K., Jockel, K. H. und Moebus, S. (2012). **Prevalence and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance and light-chain MGUS in Germany**. *Ann Hematol* 91, 243-248, doi: 10.1007/s00277-011-1293-1.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. und Tuschl, T. (2001). **Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells**. *Nature* 411, 494-498, doi: 10.1038/35078107.
- Engreitz, J. M., Haines, J. E., Perez, E. M., Munson, G., Chen, J., Kane, M., McDonel, P. E., Guttman, M. und Lander, E. S. (2016). **Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing**. *Nature* 539, 452-455, doi: 10.1038/nature20149.
- Evers, B., Jastrzebski, K., Heijmans, J. P., Grenrum, W., Beijersbergen, R. L. und Bernards, R. (2016). **CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes**. *Nat Biotechnol* 34, 631-633, doi: 10.1038/nbt.3536.

- Fakhr, E., Zare, F. und Teimoori-Toolabi, L. (2016). **Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing.** *Cancer Gene Therapy* 23, 73-82, doi: 10.1038/cgt.2016.4.
- Farh, K. K., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B. P., Johnston, W. K., Lim, L. P., Burge, C. B. und Bartel, D. P. (2005). **The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution.** *Science* 310, 1817-1821, doi: 10.1126/science.1121158.
- Fedorov, Y., Anderson, E. M., Birmingham, A., Reynolds, A., Karpilow, J., Robinson, K., Leake, D., Marshall, W. S. und Khvorova, A. (2006). **Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype.** *Rna* 12, 1188-1196, doi: 10.1261/rna.28106.
- Field, A.-C., Vink, C., Gabriel, R., Al-Subki, R., Schmidt, M., Goulden, N., Stauss, H., Thrasher, A., Morris, E. und Qasim, W. (2013). **Comparison of lentiviral and sleeping beauty mediated $\alpha\beta$ T cell receptor gene transfer.** *PloS one* 8, e68201-e68201, doi: 10.1371/journal.pone.0068201.
- Field, J., Nikawa, J., Broek, D., MacDonald, B., Rodgers, L., Wilson, I. A., Lerner, R. A. und Wigler, M. (1988). **Purification of a RAS-responsive adenyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method.** *Molecular and Cellular Biology* 8, 2159, doi: 10.1128/MCB.8.5.2159.
- Fink, S., Zugelder, L., Roth, B., Brandt, E., Meloche, S., Izsvak, Z., Bargou, R. C. und Stuhmer, T. (2018). **A simple approach for multi-targeted shRNA-mediated inducible knockdowns using Sleeping Beauty vectors.** *Plos One* 13, doi: ARTN e0205585 10.1371/journal.pone.0205585.
- Franssen, L. E., Raymakers, R. A., Buijs, A., Schmitz, M. F., van Dorp, S., Mutis, T., Lokhorst, H. M. und van de Donk, N. W. (2016). **Outcome of allogeneic transplantation in newly diagnosed and relapsed/refractory multiple myeloma: long-term follow-up in a single institution.** *Eur J Haematol*, doi: 10.1111/ejh.12758.
- Fulco, C. P., Munschauer, M., Anyoha, R., Munson, G., Grossman, S. R., Perez, E. M., Kane, M., Cleary, B., Lander, E. S. und Engreitz, J. M. (2016). **Systematic mapping of functional enhancer-promoter connections with CRISPR interference.** *Science* 354, 769-773, doi: 10.1126/science.aag2445.
- Galson, D. L., Silbermann, R. und Roodman, G. D. (2012). **Mechanisms of multiple myeloma bone disease.** *Bonekey Rep* 1, 135, doi: 10.1038/bonekey.2012.135.
- Gao, Z., Herrera-Carrillo, E. und Berkhout, B. (2018). **RNA Polymerase II Activity of Type 3 Pol III Promoters.** *Mol Ther Nucleic Acids* 12, 135-145, doi: 10.1016/j.omtn.2018.05.001.
- Garnett, M. J. und Marais, R. (2004). **Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene.** *Cancer Cell* 6, 313-319, doi: 10.1016/j.ccr.2004.09.022.
- Gemeinsamer Bundesausschuss (2016a). **Elotuzumab.** URL: <https://www.dgho.de/publikationen/stellungnahmen/fruehe->

nutzenbewertung/elotuzumab/elotuzumab-dgho-stellungnahme-20160922.pdf
[Stand:21.03.2019].

Gemeinsamer Bundesausschuss (2016b). **Panobinostat.** URL:
<https://www.dgho.de/publikationen/stellungnahmen/fruehe-nutzenbewertung/panobinostat/panobinostat-dgho-stellungnahme-20160125.pdf> [Stand].

Gemeinsamer Bundesausschuss (2017a). **Daratumumab (neue Indikationen, Neubewertung nach Überschreiten der Umsatzgrenze).** URL:
<https://www.dgho.de/publikationen/stellungnahmen/fruehe-nutzenbewertung/daratumumab/daratumumab-dgho-stellungnahme-20171206.pdf> [Stand].

Gemeinsamer Bundesausschuss (2017b). **Stammzelltransplantation bei Multiplem Myelom.** URL:
https://www.g-ba.de/downloads/40-268-4165/2017-01-19_Erp-RL_SZT_MM_Multiples-Myelom_ZD.pdf [Stand].

Giaccone, L., Storer, B., Patriarca, F., Rotta, M., Sorasio, R., Allione, B., Carnevale-Schianca, F., Festuccia, M., Brunello, L., Omedè, P., Bringhen, S., Aglietta, M., Levis, A., Mordini, N., Gallamini, A., Fanin, R., Massaia, M., Palumbo, A., Ciccone, G., Storb, R., Gooley, T. A., Boccadoro, M. und Bruno, B. (2011). **Long-term follow-up of a comparison of nonmyeloablative allografting with autografting for newly diagnosed myeloma.** *Blood* *117*, 6721-6727, doi: 10.1182/blood-2011-03-339945.

Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S. und Qi, L. S. (2013). **CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes.** *Cell* *154*, 442-451, doi: 10.1016/j.cell.2013.06.044.

Giuliani, N., Rizzoli, V. und Roodman, G. D. (2006). **Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition.** *Blood* *108*, 3992-3996, doi: 10.1182/blood-2006-05-026112.

Goldman-Leikin, R. E., Salwen, H. R., Herst, C. V., Variakojis, D., Bian, M. L., Le Beau, M. M., Selvanayagan, P., Marder, R., Anderson, R., Weitzman, S. und et al. (1989). **Characterization of a novel myeloma cell line, MM.1.** *J Lab Clin Med* *113*, 335-345.

Gomez-Jaramillo, L., Delgado-Perez, L., Reales, E., Mora-Lopez, F., Mateos, R. M., Garcia-Poley, A., Brieva, J. A. und Campos-Caro, A. (2014). **Syntaxin-4 is implicated in the secretion of antibodies by human plasma cells.** *J Leukoc Biol* *95*, 305-312, doi: 10.1189/jlb.0113031.

Gonzalez, S., Castanotto, D., Li, H., Olivares, S., Jensen, M. C., Forman, S. J., Rossi, J. J. und Cooper, L. J. (2005). **Amplification of RNAi--targeting HLA mRNAs.** *Mol Ther* *11*, 811-818, doi: 10.1016/j.ymthe.2004.12.023.

Gossen, M. und Bujard, H. (1992). **Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters.** *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 5547-5551.

- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. und Bujard, H. (1995). **Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells.** *Science* 268, 1766-1769.
- Goyal, A., Myacheva, K., Gross, M., Klingenberg, M., Duran Arque, B. und Diederichs, S. (2017). **Challenges of CRISPR/Cas9 applications for long non-coding RNA genes.** *Nucleic Acids Res* 45, e12, doi: 10.1093/nar/gkw883.
- Grabundzija, I., Irgang, M., Mates, L., Belay, E., Matrai, J., Gogol-Doring, A., Kawakami, K., Chen, W., Ruiz, P., Chuah, M. K., VandenDriessche, T., Izsvak, Z. und Ivics, Z. (2010). **Comparative analysis of transposable element vector systems in human cells.** *Mol Ther* 18, 1200-1209, doi: 10.1038/mt.2010.47.
- Graham, J. M. (2002). **OptiPrep density gradient solutions for mammalian organelles.** *ScientificWorldJournal* 2, 1440-1443, doi: 10.1100/tsw.2002.840.
- Greaves, M. (2015). **Evolutionary Determinants of Cancer.** *Cancer Discovery* 5, 806-820, doi: 10.1158/2159-8290.Cd-15-0439.
- Green, M. R. und Sambrook, J. (2012). **Molecular cloning : a laboratory manual,** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Greenstein, S., Krett, N. L., Kurosawa, Y., Ma, C., Chauhan, D., Hideshima, T., Anderson, K. C. und Rosen, S. T. (2003). **Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines.** *Experimental Hematology* 31, 271-282, doi: 10.1016/s0301-472x(03)00023-7.
- Greipp, P. R., San Miguel, J., Durie, B. G., Crowley, J. J., Barlogie, B., Blade, J., Boccadoro, M., Child, J. A., Avet-Loiseau, H., Kyle, R. A., Lahuerta, J. J., Ludwig, H., Morgan, G., Powles, R., Shimizu, K., Shustik, C., Sonneveld, P., Tosi, P., Turesson, I. und Westin, J. (2005). **International staging system for multiple myeloma.** *J Clin Oncol* 23, 3412-3420, doi: 10.1200/jco.2005.04.242.
- Grimm, D., Streetz, K. L., Jopling, C. L., Storm, T. A., Pandey, K., Davis, C. R., Marion, P., Salazar, F. und Kay, M. A. (2006). **Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways.** *Nature* 441, 537-541, doi: DOI 10.1038/nature04791.
- Gunsalus, K. C. und Piano, F. (2005). **RNAi as a tool to study cell biology: building the genome-phenome bridge.** *Curr Opin Cell Biol* 17, 3-8, doi: 10.1016/j.ceb.2004.12.008.
- Hackett, P. B., Largaespada, D. A. und Cooper, L. J. (2010). **A transposon and transposase system for human application.** *Mol Ther* 18, 674-683, doi: 10.1038/mt.2010.2.
- Haddad-Mashadrizeh, A., Zomorodipour, A., Izadpanah, M., Sam, M. R., Ataei, F., Sabouni, F. und Hosseini, S. J. (2009). **A systematic study of the function of the human beta-globin introns on the expression of the human coagulation factor IX in cultured Chinese hamster ovary cells.** *J Gene Med* 11, 941-950, doi: 10.1002/jgm.1367.

- Han, Y., He, F., Chen, Y., Liu, Y. und Yu, H. (2018). **SiRNA silencing efficacy prediction based on a deep architecture**. *BMC Genomics* 19, 669, doi: 10.1186/s12864-018-5028-8.
- Hanamura, I., Stewart, J. P., Huang, Y., Zhan, F., Santra, M., Sawyer, J. R., Hollmig, K., Zangari, M., Pineda-Roman, M., van Rhee, F., Cavallo, F., Burington, B., Crowley, J., Tricot, G., Barlogie, B. und Shaughnessy, J. D. (2006). **Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation**. *Blood* 108, 1724-1732, doi: 10.1182/blood-2006-03-009910 %J Blood.
- Hasegawa, Y., Mao, W., Saha, S., Gunner, G., Kolpakova, J., Martin, G. E. und Futai, K. (2017). **Luciferase shRNA Presents off-Target Effects on Voltage-Gated Ion Channels in Mouse Hippocampal Pyramidal Neurons**. *eNeuro* 4, ENEURO.0186-0117.2017, doi: 10.1523/ENEURO.0186-17.2017.
- Hausmann, S., Brandt, E., Kochel, C., Einsele, H., Bargou, R. C., Seggewiss-Bernhardt, R. und Stuhmer, T. (2015). **Loss of serum and glucocorticoid-regulated kinase 3 (SGK3) does not affect proliferation and survival of multiple myeloma cell lines**. *PLoS One* 10, e0122689, doi: 10.1371/journal.pone.0122689.
- He, J., Huang, L., Qiu, H., Li, J., Luo, L., Li, Y., Tian, S., Kang, K., Luo, J., Liu, L. und Gou, D. (2015). **A new design of a lentiviral shRNA vector with inducible co-expression of ARGONAUTE 2 for enhancing gene silencing efficiency**. *Cell & Bioscience* 5, 67, doi: 10.1186/s13578-015-0058-2.
- Healy, C. F., Murray, J. G., Eustace, S. J., Madewell, J., O'Gorman, P. J. und O'Sullivan, P. (2011). **Multiple Myeloma: A Review of Imaging Features and Radiological Techniques**. *Bone Marrow Research* 2011, 9, doi: 10.1155/2011/583439.
- Heggestad, A. D., Notterpek, L. und Fletcher, B. S. (2004). **Transposon-based RNAi delivery system for generating knockdown cell lines**. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 643-650, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.02.090.
- Heidenreich, M. und Zhang, F. (2016). **Applications of CRISPR-Cas systems in neuroscience**. *Nat Rev Neurosci* 17, 36-44, doi: 10.1038/nrn.2015.2.
- Hellerstein, M. K. (2008). **Exploiting complexity and the robustness of network architecture for drug discovery**. *J Pharmacol Exp Ther* 325, 1-9, doi: 10.1124/jpet.107.131276.
- Henriksen, J. R., Lokke, C., Hammero, M., Geerts, D., Versteeg, R., Flaegstad, T. und Einvik, C. (2007). **Comparison of RNAi efficiency mediated by tetracycline-responsive H1 and U6 promoter variants in mammalian cell lines**. *Nucleic Acids Res* 35, e67, doi: 10.1093/nar/gkm193.
- Heuck, C. J., Jethava, Y., Khan, R., van Rhee, F., Zangari, M., Chavan, S., Robbins, K., Miller, S. E., Matin, A., Mohan, M., Ali, S. M., Stephens, P. J., Ross, J. S., Miller, V. A., Davies, F., Barlogie, B. und Morgan, G. (2015). **Inhibiting MEK in MAPK pathway-activated myeloma**. *Leukemia* 30, 976, doi: 10.1038/leu.2015.208
<https://www.nature.com/articles/leu2015208>.

- Hillen, W. und Berens, C. (1994). **MECHANISMS UNDERLYING EXPRESSION OF TN10 ENCODED TETRACYCLINE RESISTANCE**. *Annual Review of Microbiology* 48, 345-369, doi: 10.1146/annurev.mi.48.100194.002021.
- Hillengass, J., Moulopoulos, L. A., Delorme, S., Koutoulidis, V., Mosebach, J., Hielscher, T., Drake, M., Rajkumar, S. V., Oestergaard, B., Abildgaard, N., Hinge, M., Plesner, T., Suehara, Y., Matsue, K., Withofs, N., Caers, J., Waage, A., Goldschmidt, H., Dimopoulos, M. A., Lentzsch, S., Durie, B. und Terpos, E. (2017). **Whole-body computed tomography versus conventional skeletal survey in patients with multiple myeloma: a study of the International Myeloma Working Group**. *Blood Cancer J* 7, e599, doi: 10.1038/bcj.2017.78.
- Hitoshi, N., Ken-ichi, Y. und Jun-ichi, M. (1991). **Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector**. *Gene* 108, 193-199, doi: 10.1016/0378-1119(91)90434-d.
- Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M. T., Babaie, E. und Prydz, H. (2002). **Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor**. *Nucleic acids research* 30, 1757-1766.
- Holen, T., Moe, S. E., Sorbo, J. G., Meza, T. J., Ottersen, O. P. und Klungland, A. (2005). **Tolerated wobble mutations in siRNAs decrease specificity, but can enhance activity in vivo**. *Nucleic Acids Res* 33, 4704-4710, doi: 10.1093/nar/gki785.
- Hudecek, M., Izsvák, Z., Johnen, S., Renner, M., Thumann, G. und Ivics, Z. (2017). **Going non-viral: the Sleeping Beauty transposon system breaks on through to the clinical side**. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 52, 355-380, doi: 10.1080/10409238.2017.1304354.
- Humphreys, S. C., Thayer, M. B., Campbell, J., Chen, W. L. K., Adams, D., Lade, J. M. und Rock, B. M. (2020). **Emerging siRNA Design Principles and Consequences for Biotransformation and Disposition in Drug Development**. *Journal of Medicinal Chemistry*, doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01839.
- Ivics, Z., Hackett, P. B., Plasterk, R. H. und Izsvak, Z. (1997). **Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells**. *Cell* 91, 501-510.
- Ivics, Z. und Izsvák, Z. (2010). **The expanding universe of transposon technologies for gene and cell engineering**. *Mobile DNA* 1, 25, doi: 10.1186/1759-8753-1-25.
- Ivics, Z. und Izsvák, Z. (2011). **Nonviral Gene Delivery with the Sleeping Beauty Transposon System**. *Human Gene Therapy* 22, 1043-1051, doi: 10.1089/hum.2011.143.
- Izsvak, Z., Hackett, P. B., Cooper, L. J. und Ivics, Z. (2010). **Translating Sleeping Beauty transposition into cellular therapies: victories and challenges**. *Bioessays* 32, 756-767, doi: 10.1002/bies.201000027.

- Izsvak, Z., Ivics, Z. und Plasterk, R. H. (2000). **Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates.** *J Mol Biol* 302, 93-102, doi: 10.1006/jmbi.2000.4047.
- Izsvak, Z., Khare, D., Behlke, J., Heinemann, U., Plasterk, R. H. und Ivics, Z. (2002). **Involvement of a bifunctional, paired-like DNA-binding domain and a transpositional enhancer in Sleeping Beauty transposition.** *J Biol Chem* 277, 34581-34588, doi: 10.1074/jbc.M204001200.
- Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G. und Linsley, P. S. (2003). **Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi.** *Nature Biotechnology* 21, 635-637, doi: 10.1038/nbt831.
- Jackson, A. L., Burchard, J., Leake, D., Reynolds, A., Schelter, J., Guo, J., Johnson, J. M., Lim, L., Karpilow, J., Nichols, K., Marshall, W., Khvorova, A. und Linsley, P. S. (2006). **Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing.** *RNA* 12, 1197-1205, doi: 10.1261/rna.30706.
- Jackson, A. L. und Linsley, P. S. (2010). **Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application.** *Nat Rev Drug Discov* 9, 57-67, doi: 10.1038/nrd3010.
- Jackson, N., Lowe, J., Ball, J., Bromidge, E., Ling, N. R., Larkins, S., Griffith, M. J. und Franklin, I. M. (1989). **Two new IgA1-kappa plasma cell leukaemia cell lines (JJN-1 & JJN-2) which proliferate in response to B cell stimulatory factor 2.** *Clin Exp Immunol* 75, 93-99.
- James, M. B. und Giorgio, T. D. (2000). **Nuclear-Associated Plasmid, but Not Cell-Associated Plasmid, Is Correlated with Transgene Expression in Cultured Mammalian Cells.** *Molecular Therapy* 1, 339-346, doi: 10.1006/mthe.2000.0054.
- Ji, J., Wernli, M., Klimkait, T. und Erb, P. (2003). **Enhanced gene silencing by the application of multiple specific small interfering RNAs.** *FEBS Letters* 552, 247-252, doi: 10.1016/S0014-5793(03)00893-7.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. und Charpentier, E. (2012). **A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity.** *Science* 337, 816, doi: 10.1126/science.1225829.
- Jones, H. B. (1851). **On a new substance occurring in the urine of a patient with mollities ossium.** *Abstracts of the Papers Communicated to the Royal Society of London* 5, 673, doi: 10.1098/rspl.1843.0119.
- Judge, A. D., Sood, V., Shaw, J. R., Fang, D., McClintock, K. und MacLachlan, I. (2005). **Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA.** *Nat Biotechnol* 23, 457-462, doi: 10.1038/nbt1081.
- Jun-ichi, M., Satoshi, T., Kimi, A., Fumi, T., Akira, T., Kiyoshi, T. und Ken-ichi, Y. (1989). **Expression vector system based on the chicken β -actin promoter directs efficient production of interleukin-5.** *Gene* 79, 269-277, doi: 10.1016/0378-1119(89)90209-6.

- Kahana, R., Kuznetzova, L., Rogel, A., Shemesh, M., Hai, D., Yadin, H. und Stram, Y. (2004). **Inhibition of foot-and-mouth disease virus replication by small interfering RNA.** *85*, 3213-3217, doi: doi:10.1099/vir.0.80133-0.
- Kanasty, R. L., Whitehead, K. A., Vegas, A. J. und Anderson, D. G. (2012). **Action and Reaction: The Biological Response to siRNA and Its Delivery Vehicles.** *Molecular Therapy* *20*, 513-524, doi: 10.1038/mt.2011.294.
- Kappel, S., Matthes, Y., Kaufmann, M. und Strebhardt, K. (2007). **Silencing of mammalian genes by tetracycline-inducible shRNA expression.** *Nat Protoc* *2*, 3257-3269, doi: 10.1038/nprot.2007.458.
- Kappel, S., Matthes, Y., Zimmer, B., Kaufmann, M. und Strebhardt, K. (2006). **Tumor inhibition by genomically integrated inducible RNAi-cassettes.** *Nucleic Acids Res* *34*, 4527-4536, doi: 10.1093/nar/gkl628.
- Katalinic, A. und Pritzkeleit, R. (2013). **Hochrechnung des institut für Krebs epidemiologie e.V., Lübeck für icd10: C90 auf Basis der Daten der Krebsregister BY, BR, HB, HH, MV, NI, NW (Reg.Beiz. Münster) SL, SN, SH (2005-2009).** URL: <http://www.GEKID.de> [Stand:06.06.2016].
- Khan, A. A., Betel, D., Miller, M. L., Sander, C., Leslie, C. S. und Marks, D. S. (2009). **Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs.** *Nature Biotechnology* *27*, 549, doi: 10.1038/nbt.1543 <https://www.nature.com/articles/nbt.1543>.
- Kim, T. K. und Eberwine, J. H. (2010). **Mammalian cell transfection: the present and the future.** *Anal Bioanal Chem* *397*, 3173-3178, doi: 10.1007/s00216-010-3821-6.
- Kinch, M. S. (2015). **An overview of FDA-approved biologics medicines.** *Drug Discov Today* *20*, 393-398, doi: 10.1016/j.drudis.2014.09.003.
- Kittler, R., Surendranath, V., Heninger, A.-K., Slabicki, M., Theis, M., Putz, G., Franke, K., Caldarelli, A., Grabner, H., Kozak, K., Wagner, J., Rees, E., Korn, B., Frenzel, C., Sachse, C., Sönnichsen, B., Guo, J., Schelter, J., Burchard, J., Linsley, P. S., Jackson, A. L., Habermann, B. und Buchholz, F. (2007). **Genome-wide resources of endoribonuclease-prepared short interfering RNAs for specific loss-of-function studies.** *Nature Methods* *4*, 337, doi: 10.1038/nmeth1025 <https://www.nature.com/articles/nmeth1025>.
- Kjeldsen, E. (2016). **Identification of Prognostically Relevant Chromosomal Abnormalities in Routine Diagnostics of Multiple Myeloma Using Genomic Profiling.** *Cancer Genomics Proteomics* *13*, 91-127.
- Koch-Institut, R. und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (2015). **Krebs in Deutschland 2011/2012**, 10. Ausg., Berlin. URL: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/krebs_in_deutschland_2015.pdf?__blob=publicationFile [Stand: 08.06.2016], doi: 10.17886/rkipubl-2015-004.

- Koch-Institut, R. und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (2017). **Krebs in Deutschland 2013/2014**, 10. Ausg., Berlin. URL: http://gekid.de/Doc/Krebs_in_Deutschland_2013-2014_Web.pdf [Stand: 08.08.2018], doi: 10.17886/rkipubl-2015-004.
- Koga, A., Suzuki, M., Inagaki, H., Bessho, Y. und Hori, H. (1996). **Transposable element in fish**. *Nature* 383, 30, doi: 10.1038/383030a0.
- Koller, E., Propp, S., Murray, H., Lima, W., Bhat, B., Prakash, T. P., Allerson, C. R., Swayze, E. E., Marcusson, E. G. und Dean, N. M. (2006). **Competition for RISC binding predicts in vitro potency of siRNA**. *Nucleic Acids Research* 34, 4467-4476, doi: 10.1093/nar/gkl589.
- Kornienko, A. E., Guenzl, P. M., Barlow, D. P. und Pauler, F. M. (2013). **Gene regulation by the act of long non-coding RNA transcription**. *BMC Biol* 11, 59, doi: 10.1186/1741-7007-11-59.
- Korzilius, H. (2019). **Leistungsorientierte Vergütung: Hohe Preise nur für gute Qualität**. *Dtsch Arztebl International* 116, A-240-A-240.
- Krek, A., Grun, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K. C., Stoffel, M. und Rajewsky, N. (2005). **Combinatorial microRNA target predictions**. *Nat Genet* 37, 495-500, doi: 10.1038/ng1536.
- Krishnan, A., Vij, R., Keller, J., Dhakal, B. und Hari, P. (2016). **Moving Beyond Autologous Transplantation in Multiple Myeloma: Consolidation, Maintenance, Allogeneic Transplant, and Immune Therapy**. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 35, 210-221, doi: 10.14694/EDBK_159016.
- Kristinsson, S. Y., Bjorkholm, M., Andersson, T. M., Eloranta, S., Dickman, P. W., Goldin, L. R., Blimark, C., Mellqvist, U. H., Wahlin, A., Turesson, I. und Landgren, O. (2009). **Patterns of survival and causes of death following a diagnosis of monoclonal gammopathy of undetermined significance: a population-based study**. *Haematologica* 94, 1714-1720, doi: 10.3324/haematol.2009.010066.
- Kroger, N., Zabelina, T., Klyuchnikov, E., Kropff, M., Pfluger, K. H., Burchert, A., Stubig, T., Wolschke, C., Ayuk, F., Hildebrandt, Y., Bacher, U., Badbaran, A., Schilling, G., Hansen, T., Atanackovic, D. und Zander, A. R. (2013). **Toxicity-reduced, myeloablative allograft followed by lenalidomide maintenance as salvage therapy for refractory/relapsed myeloma patients**. *Bone Marrow Transplant* 48, 403-407, doi: 10.1038/bmt.2012.142.
- Kuiper, R., Broyl, A., de Knegt, Y., van Vliet, M. H., van Beers, E. H., van der Holt, B., el Jarari, L., Mulligan, G., Gregory, W., Morgan, G., Goldschmidt, H., Lokhorst, H. M., van Duin, M. und Sonneveld, P. (2012). **A gene expression signature for high-risk multiple myeloma**. *Leukemia* 26, 2406, doi: 10.1038/leu.2012.127
<https://www.nature.com/articles/leu2012127>.
- Kumar, S., Paiva, B., Anderson, K. C., Durie, B., Landgren, O., Moreau, P., Munshi, N., Lonial, S., Blade, J., Mateos, M. V., Dimopoulos, M., Kastritis, E., Boccadoro, M., Orłowski, R.,

- Goldschmidt, H., Spencer, A., Hou, J., Chng, W. J., Usmani, S. Z., Zamagni, E., Shimizu, K., Jagannath, S., Johnsen, H. E., Terpos, E., Reiman, A., Kyle, R. A., Sonneveld, P., Richardson, P. G., McCarthy, P., Ludwig, H., Chen, W., Cavo, M., Harousseau, J. L., Lentzsch, S., Hillengass, J., Palumbo, A., Orfao, A., Rajkumar, S. V., Miguel, J. S. und Avet-Loiseau, H. (2016). **International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma**. *Lancet Oncol* 17, e328-e346, doi: 10.1016/s1470-2045(16)30206-6.
- Kumar, S. K., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Gertz, M. A., Buadi, F. K., Pandey, S., Kapoor, P., Dingli, D., Hayman, S. R., Leung, N., Lust, J., McCurdy, A., Russell, S. J., Zeldenrust, S. R., Kyle, R. A. und Rajkumar, S. V. (2014). **Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients**. *Leukemia* 28, 1122-1128, doi: 10.1038/leu.2013.313.
- Kuscu, C., Arslan, S., Singh, R., Thorpe, J. und Adli, M. (2014). **Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease**. *Nature Biotechnology* 32, 677, doi: 10.1038/nbt.2916
<https://www.nature.com/articles/nbt.2916>.
- Kuzmin, D., Gogvadze, E., Kholodenko, R., Grzela, D. P., Mityaev, M., Vinogradova, T., Kopantzev, E., Malakhova, G., Suntsova, M., Sokov, D., Ivics, Z. und Buzdin, A. (2010). **Novel strong tissue specific promoter for gene expression in human germ cells**. *BMC Biotechnol* 10, 58, doi: 10.1186/1472-6750-10-58.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). **Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose**. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 10, 203-209, doi: 10.1016/0165-022X(84)90040-X.
- Kyle, R. A. (1975). **Multiple myeloma: review of 869 cases**. *Mayo Clin Proc* 50, 29-40.
- Kyle, R. A., Gertz, M. A., Witzig, T. E., Lust, J. A., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Fonseca, R., Rajkumar, S. V., Offord, J. R., Larson, D. R., Plevak, M. E., Therneau, T. M. und Greipp, P. R. (2003). **Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma**. *Mayo Clin Proc* 78, 21-33, doi: 10.4065/78.1.21.
- Kyle, R. A. und Rajkumar, S. V. (1999). **Monoclonal gammopathies of undetermined significance**. *Hematol Oncol Clin North Am* 13, 1181-1202.
- Kyle, R. A. und Rajkumar, S. V. (2002). **Monoclonal gammopathies of undetermined significance**. *Rev Clin Exp Hematol* 6, 225-252.
- Kyle, R. A. und Rajkumar, S. V. (2008). **Multiple myeloma**. *Blood* 111, 2962-2972, doi: 10.1182/blood-2007-10-078022.
- Laemmli, U. K. (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature* 227, 680-685.
- Laganà, A., Perumal, D., Melnekoff, D., Readhead, B., Kidd, B. A., Leshchenko, V., Kuo, P. Y., Keats, J., DeRome, M., Yesil, J., Auclair, D., Lonial, S., Chari, A., Cho, H. J., Barlogie,

- B., Jagannath, S., Dudley, J. T. und Parekh, S. (2017). **Integrative network analysis identifies novel drivers of pathogenesis and progression in newly diagnosed multiple myeloma.** *Leukemia* 32, 120, doi: 10.1038/leu.2017.197
<https://www.nature.com/articles/leu2017197>.
- Lambeth, L. S., Van Hateren, N. J., Wilson, S. A. und Nair, V. (2010). **A direct comparison of strategies for combinatorial RNA interference.** *BMC Molecular Biology* 11, 77, doi: 10.1186/1471-2199-11-77.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczký, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, Y., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R. A., Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck, J. B., Sodergren, E. J., Worley, K. C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Naylor, S. L., Kucherlapati, R. S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D. R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H. M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R. W., Federspiel, N. A., Abola, A. P., Proctor, M. J., Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D. R., Olson, M. V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W. R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglu, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G., Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H. C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R., Doerks, T., Eddy, S. R., Eichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W. J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A. F., Stupka, E., Szustakowki, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe, K. H., Yang, S. P., Yeh, R. F., Collins, F., Guyer, M. S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Patrinos, A., Morgan, M. J., de Jong, P., Catanese, J. J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y. J., Szustakowki, J. und International Human Genome Sequencing, C. (2001). **Initial sequencing and analysis of the human genome.** *Nature* 409, 860-921, doi: 10.1038/35057062.

- Landgren, O., Kyle, R. A., Pfeiffer, R. M., Katzmann, J. A., Caporaso, N. E., Hayes, R. B., Dispenzieri, A., Kumar, S., Clark, R. J., Baris, D., Hoover, R. und Rajkumar, S. V. (2009). **Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study.** *Blood* 113, 5412-5417, doi: 10.1182/blood-2008-12-194241.
- Landgren, O., Linet, M. S., McMaster, M. L., Gridley, G., Hemminki, K. und Goldin, L. R. (2006). **Familial characteristics of autoimmune and hematologic disorders in 8,406 multiple myeloma patients: A population-based case-control study.** *International Journal of Cancer* 118, 3095-3098, doi: 10.1002/ijc.21745.
- Langkjaer, N., Pasternak, A. und Wengel, J. (2009). **UNA (unlocked nucleic acid): a flexible RNA mimic that allows engineering of nucleic acid duplex stability.** *Bioorg Med Chem* 17, 5420-5425, doi: 10.1016/j.bmc.2009.06.045.
- Larsen, J. T., Kumar, S. K., Dispenzieri, A., Kyle, R. A., Katzmann, J. A. und Rajkumar, S. V. (2013). **Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma.** *Leukemia* 27, 941-946, doi: 10.1038/leu.2012.296.
- Larson, M. H., Gilbert, L. A., Wang, X., Lim, W. A., Weissman, J. S. und Qi, L. S. (2013). **CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression.** *Nat Protoc* 8, 2180-2196, doi: 10.1038/nprot.2013.132.
- Laursen, M. B., Pakula, M. M., Gao, S., Fluiter, K., Mook, O. R., Baas, F., Langkjaer, N., Wengel, S. L., Wengel, J., Kjems, J. und Bramsen, J. B. (2010). **Utilization of unlocked nucleic acid (UNA) to enhance siRNA performance in vitro and in vivo.** *Mol Biosyst* 6, 862-870, doi: 10.1039/b918869j.
- Lazo, J. S. und Sharlow, E. R. (2016). **Drugging Undruggable Molecular Cancer Targets.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 56, 23-40, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010715-103440.
- Lee, B. J., Sahakian, G., Clarkson, B. D. und Krakoff, I. H. (1974). **Combination chemotherapy of multiple myeloma with Alkeran, Cytosan, vincristine, prednisone, and BCNU.** *Cancer* 33, 533-538, doi: 10.1002/1097-0142(197402)33:2<533::AID-CNCR2820330231>3.0.CO;2-Z.
- Lennox, K. A. und Behlke, M. A. (2016). **Cellular localization of long non-coding RNAs affects silencing by RNAi more than by antisense oligonucleotides.** *Nucleic Acids Research* 44, 863-877, doi: 10.1093/nar/gkv1206.
- Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. und Burge, C. B. (2003). **Prediction of mammalian microRNA targets.** *Cell* 115, 787-798, doi: 10.1016/S0092-8674(03)01018-3.
- Li, D. und Wang, M. (2012). **Construction of a bicistronic vector for the co-expression of two genes in *Caenorhabditis elegans* using a newly identified IRES.** *Biotechniques* 52, 173-176, doi: 10.2144/000113821.

- Li, M.-J., Kim, J., Li, S., Zaia, J., Yee, J.-K., Anderson, J., Akkina, R. und Rossi, J. J. (2005). **Long-Term Inhibition of HIV-1 Infection in Primary Hematopoietic Cells by Lentiviral Vector Delivery of a Triple Combination of Anti-HIV shRNA, Anti-CCR5 Ribozyme, and a Nucleolar-Localizing TAR Decoy.** *Molecular Therapy* 12, 900-909, doi: 10.1016/j.ymthe.2005.07.524.
- Li, S., Fu, J., Schechter, J. M., Lu, C., Mapara, M. Y. und Lentzsch, S. (2013). **Inducible Silencing Of eIF4E Using a Tet-On System Results In Myeloma Growth In Vivo That Correlates With eIF4E Expression.** *Blood* 122, 3164-3164, doi: 10.1182/blood.V122.21.3164.3164.
- Li, W.-H., Gu, Z., Wang, H. und Nekrutenko, A. (2001). **Evolutionary analyses of the human genome.** *Nature* 409, 847, doi: 10.1038/35057039
<https://www.nature.com/articles/35057039>.
- Lieber, M. R., Yu, K. und Raghavan, S. C. (2006). **Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations.** *DNA Repair* 5, 1234-1245, doi: 10.1016/j.dnarep.2006.05.013.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S. und Johnson, J. M. (2005). **Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs.** *Nature* 433, 769-773, doi: 10.1038/nature03315.
- Lippman, S. M. und El-Naggar, A. K. (2012). **Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy AU - Santarpia, Libero.** *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 16, 103-119, doi: 10.1517/14728222.2011.645805.
- Liu, S. J., Horlbeck, M. A., Cho, S. W., Birk, H. S., Malatesta, M., He, D., Attenello, F. J., Villalta, J. E., Cho, M. Y., Chen, Y., Mandegar, M. A., Olvera, M. P., Gilbert, L. A., Conklin, B. R., Chang, H. Y., Weissman, J. S. und Lim, D. A. (2017). **CRISPRi-based genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells.** *Science* 355, eaah7111, doi: 10.1126/science.aah7111.
- Lo, D. C. (2011). **The quest for the cure: The science and stories behind the next generation of medicines.** *The Journal of Clinical Investigation* 121, 4209-4209, doi: 10.1172/JCI59328.
- Logue, S. E., Elgendy, M. und Martin, S. J. (2009). **Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells.** *Nat Protoc* 4, 1383-1395, doi: 10.1038/nprot.2009.143.
- Lokhorst, H. M., Schattenberg, A., Cornelissen, J. J., Thomas, L. L. M. und Verdonck, L. F. (1997). **Donor Leukocyte Infusions Are Effective in Relapsed Multiple Myeloma After Allogeneic Bone Marrow Transplantation.** *Blood* 90, 4206-4211.
- Lonial, S., Dimopoulos, M., Palumbo, A., White, D., Grosicki, S., Spicka, I., Walter-Croneck, A., Moreau, P., Mateos, M.-V., Magen, H., Belch, A., Reece, D., Beksac, M., Spencer, A., Oakervee, H., Orłowski, R. Z., Taniwaki, M., Röllig, C., Einsele, H., Wu, K. L., Singhal, A., San-Miguel, J., Matsumoto, M., Katz, J., Bleickardt, E., Poulart, V., Anderson, K. C.

- und Richardson, P. (2015). **Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma**. *New England Journal of Medicine* 373, 621-631, doi: 10.1056/NEJMoa1505654.
- Managing Myeloma (2016). **Updated Criteria for the Diagnosis of Multiple Myeloma**. URL: <http://www.managingmyeloma.com/tools/updated-criteria-for-diagnosis?task=download.file&format=raw&dclid=1011>.
- Margolin, J. F., Friedman, J. R., Meyer, W. K., Vissing, H., Thiesen, H. J. und Rauscher, F. J., 3rd (1994). **Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4509-4513.
- Markusic, D., Oude-Elferink, R., Das, A. T., Berkhout, B. und Seppen, J. (2005). **Comparison of single regulated lentiviral vectors with rtTA expression driven by an autoregulatory loop or a constitutive promoter**. *Nucleic Acids Res* 33, e63, doi: 10.1093/nar/gni062.
- Mass, R. E. (1962). **A comparison of the effect of prednisone and a placebo in the treatment of multiple myeloma**. *Cancer Chemother Rep* 16, 257-259.
- Mates, L., Chuah, M. K., Belay, E., Jerchow, B., Manoj, N., Acosta-Sanchez, A., Grzela, D. P., Schmitt, A., Becker, K., Matrai, J., Ma, L., Samara-Kuko, E., Gysemans, C., Pryputniewicz, D., Miskey, C., Fletcher, B., VandenDriessche, T., Ivics, Z. und Izsvak, Z. (2009). **Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates**. *Nat Genet* 41, 753-761, doi: 10.1038/ng.343.
- McClintock, B. (1946). **Maize genetics**. *Year B Carnegie Inst Wash* 45, 176-186.
- McClintock, B. (1950). **The origin and behavior of mutable loci in maize**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 36, 344-355.
- McElwain, T. J. und Powles, R. L. (1983). **HIGH-DOSE INTRAVENOUS MELPHALAN FOR PLASMA-CELL LEUKAEMIA AND MYELOMA**. *The Lancet* 322, 822-824, doi: 10.1016/S0140-6736(83)90739-0.
- McGranahan, N. und Swanton, C. (2017). **Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future**. *Cell* 168, 613-628, doi: 10.1016/j.cell.2017.01.018.
- McIntyre, G. J., Arndt, A. J., Gillespie, K. M., Mak, W. M. und Fanning, G. C. (2011). **A comparison of multiple shRNA expression methods for combinatorial RNAi**. *Genetic Vaccines and Therapy* 9, 9, doi: 10.1186/1479-0556-9-9.
- McManus, M. T., Haines, B. B., Dillon, C. P., Whitehurst, C. E., van Parijs, L., Chen, J. und Sharp, P. A. (2002). **Small Interfering RNA-Mediated Gene Silencing in T Lymphocytes**. *The Journal of Immunology* 169, 5754, doi: 10.4049/jimmunol.169.10.5754.
- Mehta, J., Tricot, G., Jagannath, S., Ayers, D., Singhal, S., Siegel, D., Desikan, K., Munshi, N., Fassas, A., Mattox, S., Vesole, D., Crowley, J. und Barlogie, B. (1998). **Salvage autologous or allogeneic transplantation for multiple myeloma refractory to or**

- relapsing after a first-line autograft?** *Bone Marrow Transplant* 21, 887-892, doi: 10.1038/sj.bmt.1701208.
- Miguel, J. S., Weisel, K., Moreau, P., Lacy, M., Song, K., Delforge, M., Karlin, L., Goldschmidt, H., Banos, A., Oriol, A., Alegre, A., Chen, C., Cavo, M., Garderet, L., Ivanova, V., Martinez-Lopez, J., Belch, A., Palumbo, A., Schey, S., Sonneveld, P., Yu, X., Sternas, L., Jacques, C., Zaki, M. und Dimopoulos, M. (2013). **Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial.** *The Lancet Oncology* 14, 1055-1066, doi: 10.1016/S1470-2045(13)70380-2.
- Miskey, C., Izsvák, Z., Plasterk, R. H. und Ivics, Z. (2003). **The Frog Prince: a reconstructed transposon from *Rana pipiens* with high transpositional activity in vertebrate cells.** *Nucleic acids research* 31, 6873-6881, doi: 10.1093/nar/gkg910.
- Mitchell, J. S., Li, N., Weinhold, N., Forsti, A., Ali, M., van Duin, M., Thorleifsson, G., Johnson, D. C., Chen, B., Halvarsson, B. M., Gudbjartsson, D. F., Kuiper, R., Stephens, O. W., Bertsch, U., Broderick, P., Campo, C., Einsele, H., Gregory, W. A., Gullberg, U., Henrion, M., Hillengass, J., Hoffmann, P., Jackson, G. H., Johnsson, E., Joud, M., Kristinsson, S. Y., Lenhoff, S., Lenive, O., Mellqvist, U. H., Migliorini, G., Nahi, H., Nelander, S., Nickel, J., Nothen, M. M., Rafnar, T., Ross, F. M., da Silva Filho, M. I., Swaminathan, B., Thomsen, H., Turesson, I., Vangsted, A., Vogel, U., Waage, A., Walker, B. A., Wihlborg, A. K., Broyl, A., Davies, F. E., Thorsteinsdottir, U., Langer, C., Hansson, M., Kaiser, M., Sonneveld, P., Stefansson, K., Morgan, G. J., Goldschmidt, H., Hemminki, K., Nilsson, B. und Houlston, R. S. (2016). **Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for multiple myeloma.** *Nat Commun* 7, 12050, doi: 10.1038/ncomms12050.
- Mizuguchi, H., Xu, Z., Ishii-Watabe, A., Uchida, E. und Hayakawa, T. (2000). **IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector.** *Mol Ther* 1, 376-382, doi: 10.1006/mthe.2000.0050.
- Mocellin, S. und Provenzano, M. (2004). **RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology.** *J Transl Med* 2, 39, doi: 10.1186/1479-5876-2-39.
- Moldt, B., Miskey, C., Staunstrup, N. H., Gogol-Döring, A., Bak, R. O., Sharma, N., Mátés, L., Izsvák, Z., Chen, W., Ivics, Z. und Mikkelsen, J. G. (2011). **Comparative Genomic Integration Profiling of Sleeping Beauty Transposons Mobilized With High Efficacy From Integrase-defective Lentiviral Vectors in Primary Human Cells.** *Molecular Therapy* 19, 1499-1510, doi: 10.1038/mt.2011.47.
- Molina, J. R. und Adjei, A. A. (2006). **The Ras/Raf/MAPK Pathway.** *Journal of Thoracic Oncology* 1, 7-9, doi: 10.1016/S1556-0864(15)31506-9.
- Moreau, P., San Miguel, J., Sonneveld, P., Mateos, M. V., Zamagni, E., Avet-Loiseau, H., Hajek, R., Dimopoulos, M. A., Ludwig, H., Einsele, H., Zweegman, S., Facon, T., Cavo, M., Terpos, E., Goldschmidt, H., Attal, M. und Buske, C. (2017). **Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.** *Ann Oncol* 28, iv52-iv61, doi: 10.1093/annonc/mdx096.

- Morgan, G. J., Walker, B. A. und Davies, F. E. (2012). **The genetic architecture of multiple myeloma**. *Nat Rev Cancer* 12, 335-348, doi: 10.1038/nrc3257.
- Morris, K. V. und Rossi, J. J. (2006). **Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy**. *Gene Therapy* 13, 553, doi: 10.1038/sj.gt.3302688.
- Morrissey, D. V., Lockridge, J. A., Shaw, L., Blanchard, K., Jensen, K., Breen, W., Hartsough, K., Macherer, L., Radka, S., Jadhav, V., Vaish, N., Zinnen, S., Vargeese, C., Bowman, K., Shaffer, C. S., Jeffs, L. B., Judge, A., MacLachlan, I. und Polisky, B. (2005). **Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs**. *Nat Biotechnol* 23, 1002-1007, doi: 10.1038/nbt1122.
- Mostoslavsky, R., Alt, F. W. und Rajewsky, K. (2004). **The Lingering Enigma of the Allelic Exclusion Mechanism**. *Cell* 118, 539-544, doi: 10.1016/j.cell.2004.08.023.
- Munawar, U., Roth, M., Barrio, S., Wajant, H., Siegmund, D., Bargou, R. C., Kortum, K. M. und Stühmer, T. (2019). **Assessment of TP53 lesions for p53 system functionality and drug resistance in multiple myeloma using an isogenic cell line model**. *Sci Rep* 9, 18062, doi: 10.1038/s41598-019-54407-4.
- Munshi, N. C., Avet-Loiseau, H., Rawstron, A. C., Owen, R. G., Child, J. A., Thakurta, A., Sherrington, P., Samur, M. K., Georgieva, A., Anderson, K. C. und Gregory, W. M. (2017). **Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma: A Meta-analysis**. *JAMA Oncol* 3, 28-35, doi: 10.1001/jamaoncol.2016.3160.
- Murphy, K. und Weaver, C. (2018). **Janeway Immunologie**, Springer Berlin Heidelberg.
- Nagao, A., Zhao, X., Takegami, T., Nakagawa, H., Matsui, S., Matsunaga, T. und Ishigaki, Y. (2008). **Multiple shRNA expressions in a single plasmid vector improve RNAi against the XPA gene**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 370, 301-305, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.03.078.
- Nagy, A., Imre, G. und Mátés, L. (2015). **Transposon-based gene delivery vectors for gene therapy**. *Acta Biologica Szegediensis* 59, 247-260.
- Nahi, H., Liwing, J., Aldrin, A., Andreasson, J., Blimark, C., Carlson, K., Enestig, J., Flogegård, M., Forsberg, K., Gruber, A., Johansson, P., Kviele, H., Lauri, B., Mellqvist, U.-H., Näsman, P., Swedin, A., Svensson, M., Uttervall, K. und Aschan, J. (2012). **Is Multiple Myeloma a Chronic Disease? A Population Based Study Comparing 1843 Patients to a Matched Swedish Population**. *Blood* 120, 2970-2970.
- Naito, Y., Yoshimura, J., Morishita, S. und Ui-Tei, K. (2009). **siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect**. *BMC Bioinformatics* 10, 392, doi: 10.1186/1471-2105-10-392.
- Novina, C. D. und Sharp, P. A. (2004). **The RNAi revolution**. *Nature* 430, 161-164, doi: 10.1038/430161a.

- Ocio, E. M., Richardson, P. G., Rajkumar, S. V., Palumbo, A., Mateos, M. V., Orłowski, R., Kumar, S., Usmani, S., Roodman, D., Niesvizky, R., Einsele, H., Anderson, K. C., Dimopoulos, M. A., Avet-Loiseau, H., Mellqvist, U. H., Turesson, I., Merlini, G., Schots, R., McCarthy, P., Bergsagel, L., Chim, C. S., Lahuerta, J. J., Shah, J., Reiman, A., Mikhael, J., Zweegman, S., Lonial, S., Comenzo, R., Chng, W. J., Moreau, P., Sonneveld, P., Ludwig, H., Durie, B. G. und Miguel, J. F. (2014). **New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG)**. *Leukemia* 28, 525-542, doi: 10.1038/leu.2013.350.
- Ohkawa, J. und Taira, K. (2000). **Control of the Functional Activity of an Antisense RNA by a Tetracycline-Responsive Derivative of the Human U6 snRNA Promoter**. *Human Gene Therapy* 11, 577-585, doi: 10.1089/10430340050015761.
- Ohno, S. (1972). **So much "junk" DNA in our genome**. *Brookhaven Symp Biol* 23, 366-370.
- Orgel, L. E., Crick, F. H. und Sapienza, C. (1980). **Selfish DNA**. *Nature* 288, 645-646.
- Orom, U. A., Derrien, T., Beringer, M., Gumireddy, K., Gardini, A., Bussotti, G., Lai, F., Zytnicki, M., Notredame, C., Huang, Q., Guigo, R. und Shiekhattar, R. (2010). **Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells**. *Cell* 143, 46-58, doi: 10.1016/j.cell.2010.09.001.
- Page, B., Page, M. und Noel, C. (1993). **A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro**. *Int J Oncol* 3, 473-476.
- Palumbo, A., Avet-Loiseau, H., Oliva, S., Lokhorst, H. M., Goldschmidt, H., Rosinol, L., Richardson, P., Caltagirone, S., Lahuerta, J. J., Facon, T., Bringhen, S., Gay, F., Attal, M., Passera, R., Spencer, A., Offidani, M., Kumar, S., Musto, P., Lonial, S., Petrucci, M. T., Orłowski, R. Z., Zamagni, E., Morgan, G., Dimopoulos, M. A., Durie, B. G., Anderson, K. C., Sonneveld, P., San Miguel, J., Cavo, M., Rajkumar, S. V. und Moreau, P. (2015). **Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group**. *J Clin Oncol* 33, 2863-2869, doi: 10.1200/jco.2015.61.2267.
- Palumbo, A., Chanan-Khan, A., Weisel, K., Nooka, A. K., Masszi, T., Beksac, M., Spicka, I., Hungria, V., Munder, M., Mateos, M. V., Mark, T. M., Qi, M., Schechter, J., Amin, H., Qin, X., Deraedt, W., Ahmadi, T., Spencer, A. und Sonneveld, P. (2016). **Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma**. *N Engl J Med* 375, 754-766, doi: 10.1056/NEJMoa1606038.
- Paralkar, V. R., Tabora, C. C., Huang, P., Yao, Y., Kossenkov, A. V., Prasad, R., Luan, J., Davies, J. O., Hughes, J. R., Hardison, R. C., Blobel, G. A. und Weiss, M. J. (2016). **Unlinking an lncRNA from Its Associated cis Element**. *Mol Cell* 62, 104-110, doi: 10.1016/j.molcel.2016.02.029.
- Patriarca, F., Einsele, H., Spina, F., Bruno, B., Isola, M., Nozzoli, C., Nozza, A., Sperotto, A., Morabito, F., Stuhler, G., Festuccia, M., Bosi, A., Fanin, R. und Corradini, P. (2012). **Allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma relapsed after autograft: a multicenter retrospective study based on donor availability**. *Biol Blood Marrow Transplant* 18, 617-626, doi: 10.1016/j.bbmt.2011.07.026.

- Paulsson, K., Harrison, C. J., Andersen, M. K., Chilton, L., Nordgren, A., Moorman, A. V. und Johansson, B. (2013). **Distinct patterns of gained chromosomes in high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)(q23;p13), t(9;22)(q34;q22) or MLL rearrangements.** *Leukemia* 27, 974-977, doi: 10.1038/leu.2012.263.
- Pei, Y. und Tuschl, T. (2006). **On the art of identifying effective and specific siRNAs.** *Nat Methods* 3, 670-676, doi: 10.1038/nmeth911.
- Porter, D., Frey, N., Wood, P. A., Weng, Y. und Grupp, S. A. (2018). **Grading of cytokine release syndrome associated with the CAR T cell therapy tisagenlecleucel.** *Journal of Hematology & Oncology* 11, 35, doi: 10.1186/s13045-018-0571-y.
- Postle, K., Nguyen, T. T. und Bertrand, K. P. (1984). **Nucleotide sequence of the repressor gene of the TN10 tetracycline resistance determinant.** *Nucleic Acids Res* 12, 4849-4863.
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P. und Lim, W. A. (2013). **Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression.** *Cell* 152, 1173-1183, doi: 10.1016/j.cell.2013.02.022.
- Qin, J. Y., Zhang, L., Clift, K. L., Hular, I., Xiang, A. P., Ren, B. Z. und Lahn, B. T. (2010). **Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter.** *PLoS One* 5, e10611, doi: 10.1371/journal.pone.0010611.
- Radice, A. D., Bugaj, B., Fitch, D. H. und Emmons, S. W. (1994). **Widespread occurrence of the Tc1 transposon family: Tc1-like transposons from teleost fish.** *Mol Gen Genet* 244, 606-612.
- Rahman, A., Decourcey, J., Larbi, N. B., Loughran, S. T., Walls, D. und Loscher, C. E. (2013). **Syntaxin-4 is essential for IgE secretion by plasma cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 440, 163-167, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.058.
- Rajan, A. M. und Rajkumar, S. V. (2015). **Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice.** *Blood Cancer Journal* 5, e365, doi: 10.1038/bcj.2015.92.
- Raje, N. S., Berdeja, J. G., Lin, Y., Munshi, N. C., Siegel, D. S. D., Liedtke, M., Jagannath, S., Madduri, D., Rosenblatt, J., Maus, M. V., Turka, A., Lam, L. P., Morgan, R. A., Quigley, T., Massaro, M., Hege, K., Petrocca, F. und Kochenderfer, J. (2018). **bb2121 anti-BCMA CAR T-cell therapy in patients with relapsed/refractory multiple myeloma: Updated results from a multicenter phase I study.** In *J Clin Oncol* (
- Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M.-V., Kumar, S., Hillengass, J., Kastritis, E., Richardson, P., Landgren, O., Paiva, B., Dispenzieri, A., Weiss, B., LeLeu, X., Zweegman, S., Lonial, S., Rosinol, L., Zamagni, E., Jagannath, S., Sezer, O., Kristinsson, S. Y., Caers, J., Usmani, S. Z., Lahuerta, J. J., Johnsen, H. E., Beksac, M., Cavo, M., Goldschmidt, H., Terpos, E., Kyle, R. A., Anderson, K. C., Durie, B. G. M. und Miguel, J. F. S. (2014). **International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma.** *The Lancet Oncology* 15, e538-e548, doi: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5.

- Rasche, L., Chavan, S. S., Stephens, O. W., Patel, P. H., Tytarenko, R., Ashby, C., Bauer, M., Stein, C., Deshpande, S., Wardell, C., Buzder, T., Molnar, G., Zangari, M., van Rhee, F., Thanendrarajan, S., Schinke, C., Epstein, J., Davies, F. E., Walker, B. A., Meissner, T., Barlogie, B., Morgan, G. J. und Weinhold, N. (2017). **Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing.** *Nature Communications* 8, 268, doi: 10.1038/s41467-017-00296-y.
- Ravi, P., Kumar, S. K., Cerhan, J. R., Maurer, M. J., Dingli, D., Ansell, S. M. und Rajkumar, S. V. (2018). **Defining cure in multiple myeloma: a comparative study of outcomes of young individuals with myeloma and curable hematologic malignancies.** *Blood Cancer Journal* 8, 26, doi: 10.1038/s41408-018-0065-8.
- Reijmers, R. M., Groen, R. W. J., Rozemuller, H., Kuil, A., de Haan-Kramer, A., Csikós, T., Martens, A. C. M., Spaargaren, M. und Pals, S. T. (2010). **Targeting EXT1 reveals a crucial role for heparan sulfate in the growth of multiple myeloma.** *Blood* 115, 601-604, doi: 10.1182/blood-2009-02-204396.
- Richardson, C. und Jasin, M. (2000). **Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks.** *Nature* 405, 697, doi: 10.1038/35015097.
- Rinn, J. L. und Chang, H. Y. (2012). **Genome regulation by long noncoding RNAs.** *Annu Rev Biochem* 81, 145-166, doi: 10.1146/annurev-biochem-051410-092902.
- Rodgers, K. R. und Chou, R. C. (2016). **Therapeutic monoclonal antibodies and derivatives: Historical perspectives and future directions.** *Biotechnol Adv* 34, 1149-1158, doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.07.004.
- Rondon-Lagos, M., Verdun Di Cantogno, L., Marchio, C., Rangel, N., Payan-Gomez, C., Gugliotta, P., Botta, C., Bussolati, G., Ramirez-Clavijo, S. R., Pasini, B. und Sapino, A. (2014). **Differences and homologies of chromosomal alterations within and between breast cancer cell lines: a clustering analysis.** *Mol Cytogenet* 7, 8, doi: 10.1186/1755-8166-7-8.
- Rosazza, C., Buntz, A., Rieß, T., Wöll, D., Zumbusch, A. und Rols, M.-P. (2013). **Intracellular Tracking of Single-plasmid DNA Particles After Delivery by Electroporation.** *Molecular Therapy* 21, 2217-2226, doi: 10.1038/mt.2013.182.
- Rosenbluh, J., Xu, H., Harrington, W., Gill, S., Wang, X., Vazquez, F., Root, D. E., Tsherniak, A. und Hahn, W. C. (2017). **Complementary information derived from CRISPR Cas9 mediated gene deletion and suppression.** *Nat Commun* 8, 15403, doi: 10.1038/ncomms15403.
- Ruella, M., Xu, J., Barrett, D. M., Fraietta, J. A., Reich, T. J., Ambrose, D. E., Klichinsky, M., Shestova, O., Patel, P. R., Kulikovskaya, I., Nazimuddin, F., Bhoj, V. G., Orlando, E. J., Fry, T. J., Bitter, H., Maude, S. L., Levine, B. L., Nobles, C. L., Bushman, F. D., Young, R. M., Scholler, J., Gill, S. I., June, C. H., Grupp, S. A., Lacey, S. F. und Melenhorst, J. J. (2018). **Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell.** *Nature Medicine* 24, 1499-1503, doi: 10.1038/s41591-018-0201-9.

- Sahebi, F., Shen, Y., Thomas, S. H., Rincon, A., Murata-Collins, J., Palmer, J., Krishnan, A. Y., Karanes, C., Htut, M., Somlo, G. und Forman, S. J. (2013). **Late relapses following reduced intensity allogeneic transplantation in patients with multiple myeloma: a long-term follow-up study.** *Br J Haematol* *160*, 199-206, doi: 10.1111/bjh.12123.
- Sahin, Ö., Löbke, C., Korf, U., Appelhans, H., Sültmann, H., Poustka, A., Wiemann, S. und Arlt, D. (2007). **Combinatorial RNAi for quantitative protein network analysis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 6579, doi: 10.1073/pnas.0606827104.
- San-Miguel, J. F., Hungria, V. T. M., Yoon, S.-S., Beksac, M., Dimopoulos, M. A., Elghandour, A., Jedrzejczak, W. W., Günther, A., Nakorn, T. N., Siritanaratkul, N., Schlossman, R. L., Hou, J., Moreau, P., Lonial, S., Lee, J. H., Einsele, H., Sopala, M., Bengoudifa, B.-R., Binlich, F. und Richardson, P. G. (2016). **Overall survival of patients with relapsed multiple myeloma treated with panobinostat or placebo plus bortezomib and dexamethasone (the PANORAMA 1 trial): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial.** *The Lancet Haematology* *3*, e506-e515, doi: 10.1016/S2352-3026(16)30147-8.
- San-Miguel, J. F. und Mateos, M.-V. (2011). **Can multiple myeloma become a curable disease?** *Haematologica* *96*, 1246-1248, doi: 10.3324/haematol.2011.051169.
- Sanson, K. R., Hanna, R. E., Hegde, M., Donovan, K. F., Strand, C., Sullender, M. E., Vaimberg, E. W., Goodale, A., Root, D. E., Piccioni, F. und Doench, J. G. (2018). **Optimized libraries for CRISPR-Cas9 genetic screens with multiple modalities.** *Nat Commun* *9*, 5416, doi: 10.1038/s41467-018-07901-8.
- Schuck, S., Manninen, A., Honsho, M., Füllekrug, J. und Simons, K. (2004). **Generation of single and double knockdowns in polarized epithelial cells by retrovirus-mediated RNA interference.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 4912, doi: 10.1073/pnas.0401285101.
- Semizarov, D., Frost, L., Sarthy, A., Kroeger, P., Halbert, D. N. und Fesik, S. W. (2003). **Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures.** *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 6347-6352, doi: 10.1073/pnas.1131959100.
- Seo, H. W., Kim, T. M., Choi, J. W., Han, B. K., Song, G. und Han, J. Y. (2010). **Evaluation of combinatorial cis-regulatory elements for stable gene expression in chicken cells.** *BMC Biotechnology* *10*, 69, doi: 10.1186/1472-6750-10-69.
- Shimizu, S., Takiguchi, T., Fukutoku, M., Yoshioka, R., Hirose, Y., Fukuhara, S., Ohno, H., Isobe, Y. und Konda, S. (1993). **Establishment of a CD4-positive plasmacytoma cell line (AMO1).** *Leukemia* *7*, 274-280.
- Short, K. D., Rajkumar, S. V., Larson, D., Buadi, F., Hayman, S., Dispenzieri, A., Gertz, M., Kumar, S., Mikhael, J., Roy, V., Kyle, R. A. und Lacy, M. Q. (2011). **Incidence of extramedullary disease in patients with multiple myeloma in the era of novel therapy, and the activity of pomalidomide on extramedullary myeloma.** *Leukemia* *25*, 906-908, doi: 10.1038/leu.2011.29.
- Smith, I., Greenside, P. G., Natoli, T., Lahr, D. L., Wadden, D., Tirosh, I., Narayan, R., Root, D. E., Golub, T. R., Subramanian, A. und Doench, J. G. (2017). **Evaluation of RNAi and**

CRISPR technologies by large-scale gene expression profiling in the Connectivity Map. PLoS Biol 15, e2003213, doi: 10.1371/journal.pbio.2003213.

- Smith, J. D., Suresh, S., Schlecht, U., Wu, M., Wagih, O., Peltz, G., Davis, R. W., Steinmetz, L. M., Parts, L. und St Onge, R. P. (2016). **Quantitative CRISPR interference screens in yeast identify chemical-genetic interactions and new rules for guide RNA design.** Genome Biol 17, 45, doi: 10.1186/s13059-016-0900-9.
- Snøve, O., Jr. und Rossi, J. J. (2006). **Toxicity in mice expressing short hairpin RNAs gives new insight into RNAi.** Genome Biol 7, 231, doi: 10.1186/gb-2006-7-8-231.
- Sohal, D. S., Nghiem, M., Crackower, M. A., Witt, S. A., Kimball, T. R., Tymitz, K. M., Penninger, J. M. und Molkenin, J. D. (2001). **Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein.** Circ Res 89, 20-25.
- Sonneveld, P., Schmidt-Wolf, I. G., van der Holt, B., El Jarari, L., Bertsch, U., Salwender, H., Zweegman, S., Vellenga, E., Broyl, A., Blau, I. W., Weisel, K. C., Wittebol, S., Bos, G. M., Stevens-Kroef, M., Scheid, C., Pfreundschuh, M., Hose, D., Jauch, A., van der Velde, H., Raymakers, R., Schaafsma, M. R., Kersten, M. J., van Marwijk-Kooy, M., Duehrsen, U., Lindemann, W., Wijermans, P. W., Lokhorst, H. M. und Goldschmidt, H. M. (2012). **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 30, 2946-2955, doi: 10.1200/jco.2011.39.6820.
- Stavnezer, J., Jeroen E.J. Guikema und Schrader, C. E. (2008). **Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination.** Annu Rev Immunol 26, 261-292, doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090248.
- Steinbrunn, T., Chatterjee, M., Bargou, R. C. und Stuhmer, T. (2014). **Efficient transient transfection of human multiple myeloma cells by electroporation--an appraisal.** PLoS One 9, e97443, doi: 10.1371/journal.pone.0097443.
- Steinbrunn, T., Stühmer, T., Gattenlohner, S., Rosenwald, A., Mottok, A., Unzicker, C., Einsele, H., Chatterjee, M. und Bargou, R. C. (2011). **Mutated RAS and constitutively activated Akt delineate distinct oncogenic pathways, which independently contribute to multiple myeloma cell survival.** Blood 117, 1998-2004, doi: 10.1182/blood-2010-05-284422.
- Stojic, L., Lun, A. T. L., Mangei, J., Mascalchi, P., Quarantotti, V., Barr, A. R., Bakal, C., Marioni, J. C., Gergely, F. und Odom, D. T. (2018). **Specificity of RNAi, LNA and CRISPRi as loss-of-function methods in transcriptional analysis.** Nucleic Acids Res 46, 5950-5966, doi: 10.1093/nar/gky437.
- Stratagene (2004). **XL1-Blue Competent Cells.** URL: <http://www.chemagilent.com/pdf/strata/200249.pdf> [Stand:21.11.2018].
- Stühmer, T., Anderson, S. A., Ekker, M. und Rubenstein, J. L. (2002). **Ectopic expression of the Dlx genes induces glutamic acid decarboxylase and Dlx expression.** Development 129, 245-252.

- Szulc, J., Wiznerowicz, M., Sauvain, M.-O., Trono, D. und Aebischer, P. (2006). **A versatile tool for conditional gene expression and knockdown.** *Nature Methods* 3, 109, doi: 10.1038/nmeth846
<https://www.nature.com/articles/nmeth846>.
- Terpos, E., Kleber, M., Engelhardt, M., Zweegman, S., Gay, F., Kastiris, E., van de Donk, N. W., Bruno, B., Sezer, O., Broijl, A., Bringhen, S., Beksac, M., Larocca, A., Hajek, R., Musto, P., Johnsen, H. E., Morabito, F., Ludwig, H., Cavo, M., Einsele, H., Sonneveld, P., Dimopoulos, M. A. und Palumbo, A. (2015). **European Myeloma Network guidelines for the management of multiple myeloma-related complications.** *Haematologica* 100, 1254-1266, doi: 10.3324/haematol.2014.117176.
- Terpos, E., Roodman, G. D. und Dimopoulos, M. A. (2013). **Optimal use of bisphosphonates in patients with multiple myeloma.** *Blood* 121, 3325-3328, doi: 10.1182/blood-2012-10-435750.
- Thakore, P. I., D'Ippolito, A. M., Song, L., Safi, A., Shivakumar, N. K., Kabadi, A. M., Reddy, T. E., Crawford, G. E. und Gersbach, C. A. (2015). **Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements.** *Nature Methods* 12, 1143, doi: 10.1038/nmeth.3630
<https://www.nature.com/articles/nmeth.3630>.
- Tipanee, J., Chai, Y. C., VandenDriessche, T. und Chuah, M. K. (2017). **Preclinical and clinical advances in transposon-based gene therapy.** *Biosci Rep* 37, doi: 10.1042/bsr20160614.
- Tonegawa, S. (1983). **Somatic generation of antibody diversity.** *Nature* 302, 575, doi: 10.1038/302575a0.
- Tseng, W.-C., Haselton, F. R. und Giorgio, T. D. (1997). **Transfection by Cationic Liposomes Using Simultaneous Single Cell Measurements of Plasmid Delivery and Transgene Expression.** *Journal of Biological Chemistry* 272, 25641-25647.
- Uphoff, C. C. und Drexler, H. G. (2004). **Detecting Mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction.** *Methods Mol Med* 88, 319-326.
- Uphoff, C. C. und Drexler, H. G. (2011). **Detecting mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction.** *Methods Mol Biol* 731, 93-103, doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_8.
- Ussar, S. und Voss, T. (2004). **MEK1 and MEK2, different regulators of the G1/S transition.** *J Biol Chem* 279, 43861-43869, doi: 10.1074/jbc.M406240200.
- van de Wetering, M., Oving, I., Muncan, V., Pon Fong, M. T., Brantjes, H., van Leenen, D., Holstege, F. C., Brummelkamp, T. R., Agami, R. und Clevers, H. (2003). **Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector.** *EMBO Rep* 4, 609-615, doi: 10.1038/sj.embor.embor865.
- van Gaal, E. V. B., Oosting, R. S., van Eijk, R., Bakowska, M., Feyen, D., Kok, R. J., Hennink, W. E., Crommelin, D. J. A. und Mastrobattista, E. (2011). **DNA Nuclear Targeting**

- Sequences for Non-Viral Gene Delivery.** *Pharmaceutical Research* 28, 1707-1722, doi: 10.1007/s11095-011-0407-8.
- Vekemans, M. C., Michaux, L., Van Den Neste, E. und Ferrant, A. (2014). **Long-term survival after allogeneic stem cell transplantation for advanced stage multiple myeloma.** *Br J Haematol* 166, 616-618, doi: 10.1111/bjh.12881.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. und Reutelingsperger, C. (1995). **A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.** *J Immunol Methods* 184, 39-51.
- Vickers, T. A., Lima, W. F., Nichols, J. G. und Crooke, S. T. (2007). **Reduced levels of Ago2 expression result in increased siRNA competition in mammalian cells.** *Nucleic Acids Research* 35, 6598-6610, doi: 10.1093/nar/gkm663.
- Vincent Rajkumar, S. (2014). **Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management.** *Am J Hematol* 89, 999-1009, doi: 10.1002/ajh.23810.
- Vink, C. A., Gaspar, H. B., Gabriel, R., Schmidt, M., McIvor, R. S., Thrasher, A. J. und Qasim, W. (2009). **Sleeping beauty transposition from nonintegrating lentivirus.** *Mol Ther* 17, 1197-1204, doi: 10.1038/mt.2009.94.
- Walker, B. A., Boyle, E. M., Wardell, C. P., Murison, A., Begum, D. B., Dahir, N. M., Proszek, P. Z., Johnson, D. C., Kaiser, M. F., Melchor, L., Aronson, L. I., Scales, M., Pawlyn, C., Mirabella, F., Jones, J. R., Brioli, A., Mikulasova, A., Cairns, D. A., Gregory, W. M., Quartilho, A., Drayson, M. T., Russell, N., Cook, G., Jackson, G. H., Leleu, X., Davies, F. E. und Morgan, G. J. (2015). **Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma.** *J Clin Oncol* 33, 3911-3920, doi: 10.1200/JCO.2014.59.1503.
- Walker, B. A., Mavrommatis, K., Wardell, C. P., Ashby, T. C., Bauer, M., Davies, F. E., Rosenthal, A., Wang, H., Qu, P., Hoering, A., Samur, M., Towfic, F., Ortiz, M., Flynt, E., Yu, Z., Yang, Z., Rozelle, D., Obenauer, J., Trotter, M., Auclair, D., Keats, J., Bolli, N., Fulciniti, M., Szalat, R., Moreau, P., Durie, B., Stewart, A. K., Goldschmidt, H., Raab, M. S., Einsele, H., Sonneveld, P., San Miguel, J., Lonial, S., Jackson, G. H., Anderson, K. C., Avet-Loiseau, H., Munshi, N., Thakurta, A. und Morgan, G. J. (2018). **Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma.** *Blood* 132, 587-597, doi: 10.1182/blood-2018-03-840132.
- Walker, B. A., Samur, M. K., Mavrommatis, K., Ashby, C., Wardell, C. P., Ortiz, M., Towfic, F., Stein, C. K., Bauer, M. A., Amatangelo, M., Parmigiani, G., Yu, Z., Trotter, M., Avet-Loiseau, H., Jackson, G. H., Anderson, K. C., Thakurta, A., Munshi, N. C. und Morgan, G. J. (2016). **The Multiple Myeloma Genome Project: Development of a Molecular Segmentation Strategy for the Clinical Classification of Multiple Myeloma.** *Blood* 128, 196-196.
- Walker, B. A., Wardell, C. P., Johnson, D. C., Kaiser, M. F., Begum, D. B., Dahir, N. B., Ross, F. M., Davies, F. E., Gonzalez, D. und Morgan, G. J. (2013). **Characterization of IGH locus breakpoints in multiple myeloma indicates a subset of translocations appear to occur**

in pregerminal center B cells. *Blood* 121, 3413-3419, doi: 10.1182/blood-2012-12-471888 %J Blood.

- Walker, B. A., Wardell, C. P., Melchor, L., Brioli, A., Johnson, D. C., Kaiser, M. F., Mirabella, F., Lopez-Corral, L., Humphray, S., Murray, L., Ross, M., Bentley, D., Gutierrez, N. C., Garcia-Sanz, R., San Miguel, J., Davies, F. E., Gonzalez, D. und Morgan, G. J. (2014). **Intraclonal heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms.** *Leukemia* 28, 384-390, doi: 10.1038/leu.2013.199.
- Walker, B. A., Wardell, C. P., Melchor, L., Hulkki, S., Potter, N. E., Johnson, D. C., Fenwick, K., Kozarewa, I., Gonzalez, D., Lord, C. J., Ashworth, A., Davies, F. E. und Morgan, G. J. (2012). **Intraclonal heterogeneity and distinct molecular mechanisms characterize the development of t(4;14) and t(11;14) myeloma.** *Blood* 120, 1077-1086, doi: 10.1182/blood-2012-03-412981.
- Wallin, A. und Larsson, S. C. (2011). **Body mass index and risk of multiple myeloma: a meta-analysis of prospective studies.** *Eur J Cancer* 47, 1606-1615, doi: 10.1016/j.ejca.2011.01.020.
- Wang, Z., Rao, D. D., Senzer, N. und Nemunaitis, J. (2011). **RNA interference and cancer therapy.** *Pharm Res* 28, 2983-2995, doi: 10.1007/s11095-011-0604-5.
- Weaver, C. J. und Tariman, J. D. (2017). **Multiple Myeloma Genomics: A Systematic Review.** *Seminars in Oncology Nursing* 33, 237-253, doi: 10.1016/j.soncn.2017.05.001.
- Weber, D. M. (2005). **Solitary bone and extramedullary plasmacytoma.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 373-376, doi: 10.1182/asheducation-2005.1.373.
- Weiss, B. M., Abadie, J., Verma, P., Howard, R. S. und Kuehl, W. M. (2009). **A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients.** *Blood* 113, 5418-5422, doi: 10.1182/blood-2008-12-195008.
- Weissbach, S., Heredia-Guerrero, S. C., Barnsteiner, S., Grosshans, L., Bodem, J., Starz, H., Langer, C., Appenzeller, S., Knop, S., Steinbrunn, T., Rost, S., Einsele, H., Bargou, R. C., Rosenwald, A., Stühmer, T. und Leich, E. (2020). **Exon-4 Mutations in KRAS Affect MEK/ERK and PI3K/AKT Signaling in Human Multiple Myeloma Cell Lines.** *Cancers (Basel)* 12, doi: 10.3390/cancers12020455.
- Welsch, M. E., Kaplan, A., Chambers, J. M., Stokes, M. E., Bos, P. H., Zask, A., Zhang, Y., Sanchez-Martin, M., Badgley, M. A., Huang, C. S., Tran, T. H., Akkiraju, H., Brown, L. M., Nandakumar, R., Cremers, S., Yang, W. S., Tong, L., Olive, K. P., Ferrando, A. und Stockwell, B. R. (2017). **Multivalent Small-Molecule Pan-RAS Inhibitors.** *Cell* 168, 878-889.e829, doi: 10.1016/j.cell.2017.02.006.
- Weston-Bell, N., Gibson, J., John, M., Ennis, S., Pfeifer, S., Cezard, T., Ludwig, H., Collins, A., Zojer, N. und Sahota, S. S. (2012). **Exome sequencing in tracking clonal evolution in multiple myeloma following therapy.** *Leukemia* 27, 1188, doi: 10.1038/leu.2012.287 <https://www.nature.com/articles/leu2012287>.

- Wong, E. T., Ngoi, S. M. und Lee, C. G. (2002). **Improved co-expression of multiple genes in vectors containing internal ribosome entry sites (IRESes) from human genes.** *Gene Ther* 9, 337-344, doi: 10.1038/sj.gt.3301667.
- Wörmann, B., Driessen, C., Einsele, H., Hartmut Goldschmidt, Gunsilius, E., Kortüm, M., Kröger, N., Ludwig, H., Mügge, L.-O., Naumann, R., Pritzkeleit, R., Röllig, C., Scheid, C., Taverna, C., Weisel, K. und Weißinger, F. (2018). **Leitlinie Multiples Myelom.** In *Onkopedia* (DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.).
- Wu, L., Fan, J. und Belasco, J. G. (2006). **MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4034-4039, doi: 10.1073/pnas.0510928103.
- Wu, X., Feng, J., Komori, A., Kim, E. C., Zan, H. und Casali, P. (2003). **Immunoglobulin somatic hypermutation: double-strand DNA breaks, AID and error-prone DNA repair.** *J Clin Immunol* 23, 235-246.
- Wu, X., Scott, D. A., Kriz, A. J., Chiu, A. C., Hsu, P. D., Dadon, D. B., Cheng, A. W., Trevino, A. E., Konermann, S., Chen, S., Jaenisch, R., Zhang, F. und Sharp, P. A. (2014). **Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells.** *Nature Biotechnology* 32, 670, doi: 10.1038/nbt.2889
<https://www.nature.com/articles/nbt.2889>.
- Xie, X. H., Lu, J., Kulbokas, E. J., Golub, T. R., Mootha, V., Lindblad-Toh, K., Lander, E. S. und Kellis, M. (2005). **Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals.** *Nature* 434, 338-345, doi: 10.1038/nature03441.
- Xu, B.-e., Robinson, F., Pearson, G., Berman, K., Karandikar, M., Beers Gibson, T. und Cobb, M. H. (2001). **Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions***. *Endocrine Reviews* 22, 153-183, doi: 10.1210/edrv.22.2.0428.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R. A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C. und Lowe, S. W. (2007). **Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas.** *Nature* 445, 656-660, doi: 10.1038/nature05529.
- Yamagishi, M., Ishida, T., Miyake, A., Cooper, D. A., Kelleher, A. D., Suzuki, K. und Watanabe, T. (2009). **Retroviral delivery of promoter-targeted shRNA induces long-term silencing of HIV-1 transcription.** *Microbes and Infection* 11, 500-508, doi: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.02.003>.
- Yao, F., Svensjo, T., Winkler, T., Lu, M., Eriksson, C. und Eriksson, E. (1998). **Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells.** *Hum Gene Ther* 9, 1939-1950, doi: 10.1089/hum.1998.9.13-1939.
- Yeo, N. C., Chavez, A., Lance-Byrne, A., Chan, Y., Menn, D., Milanova, D., Kuo, C.-C., Guo, X., Sharma, S., Tung, A., Cecchi, R. J., Tuttle, M., Pradhan, S., Lim, E. T., Davidsohn, N., Ebrahimkhani, M. R., Collins, J. J., Lewis, N. E., Kiani, S. und Church, G. M. (2018). **An**

- enhanced CRISPR repressor for targeted mammalian gene regulation.** *Nature Methods* 15, 611-616, doi: 10.1038/s41592-018-0048-5.
- Yi, R., Doehle, B. P., Qin, Y., Macara, I. G. und Cullen, B. R. (2005). **Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs.** *RNA* (New York, N.Y.) 11, 220-226, doi: 10.1261/rna.7233305.
- Yin, Y., Yan, P., Lu, J., Song, G., Zhu, Y., Li, Z., Zhao, Y., Shen, B., Huang, X., Zhu, H., Orkin, S. H. und Shen, X. (2015). **Opposing Roles for the lncRNA Haunt and Its Genomic Locus in Regulating HOXA Gene Activation during Embryonic Stem Cell Differentiation.** *Cell Stem Cell* 16, 504-516, doi: 10.1016/j.stem.2015.03.007.
- Yu, J.-Y., Taylor, J., DeRuiter, S. L., Vojtek, A. B. und Turner, D. L. (2003). **Simultaneous inhibition of GSK3 α and GSK3 β using hairpin siRNA expression vectors.** *Molecular Therapy* 7, 228-236, doi: 10.1016/S1525-0016(02)00037-0.
- Zeugin, J. und Hartley, J. (1985). **Ethanol Precipitation of DNA.** *FOCUS* 7.
- Zhan, F., Huang, Y., Colla, S., Stewart, J. P., Hanamura, I., Gupta, S., Epstein, J., Yaccoby, S., Sawyer, J., Burington, B., Anaissie, E., Hollmig, K., Pineda-Roman, M., Tricot, G., van Rhee, F., Walker, R., Zangari, M., Crowley, J., Barlogie, B. und Shaughnessy, J. D. (2006). **The molecular classification of multiple myeloma.** *108*, 2020-2028, doi: 10.1182/blood-2005-11-013458 %J Blood.
- Zhang, B. und Fenton, R. G. (2002). **Proliferation of IL-6-independent multiple myeloma does not require the activity of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2).** *193*, 42-54, doi: 10.1002/jcp.10148.
- Zhang, J., Wang, C., Ke, N., Bliesath, J., Chionis, J., He, Q. S., Li, Q. X., Chatterton, J. E., Wong-Staal, F. und Zhou, D. (2007). **A more efficient RNAi inducible system for tight regulation of gene expression in mammalian cells and xenograft animals.** *RNA* 13, 1375-1383, doi: 10.1261/rna.520707.
- Zheng, Q., Cai, X., Tan, M. H., Schaffert, S., Arnold, C. P., Gong, X., Chen, C. Z. und Huang, S. (2014). **Precise gene deletion and replacement using the CRISPR/Cas9 system in human cells.** *Biotechniques* 57, 115-124, doi: 10.2144/000114196.
- Zhou, F., Chen, R.-t., Lu, Y., Liang, S., Wang, M.-x. und Miao, Y.-g. (2014). **piggyBac transposon-derived targeting shRNA interference against the Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV).** *Molecular Biology Reports* 41, 8247-8254, doi: 10.1007/s11033-014-3726-0.
- Zhou, H., Huang, C. und Xia, X. G. (2008). **A tightly regulated Pol III promoter for synthesis of miRNA genes in tandem.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1779, 773-779, doi: 10.1016/j.bbagr.2008.03.011.
- Zingone, A. und Kuehl, W. M. (2011). **Pathogenesis of monoclonal gammopathy of undetermined significance and progression to multiple myeloma.** *Semin Hematol* 48, 4-12, doi: 10.1053/j.seminhematol.2010.11.003.

Zugelder, L. (2019) **Etablierung eines stabilen induzierbaren Multikassetten-Systems für shRNA-Knockdown- Konstrukte in Myelom Zelllinien und Anwendung zur Analyse des NFκB Signalwegs.** Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

15 Abkürzungen

AID	aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase
ALT	Alanin-Aminotransferase
APE1	apurinische/apyrimidinische Endonuclease 1
BCMA	B-Zell-Reife-Antigen
bp	Basenpaar
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CGH	komparative genomische Hybridisierung
CML	chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CNV	Kopienzahlvariation
CRISPRi	CRISPR-Interferenz
CRISPRko	CRISPR/Cas Knock-out
CRS	Zytokin-Freisetzungssyndrom
CSR	class switch recombination
CT	Computertomographie
dCas9	inaktive Version von Cas9
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie
DSB	Doppelstrangbruch
dsRNA	doppelsträngige RNA
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein, Enhanced green fluorescent protein
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
EPO	Erythropoietin
ER	Estrogenrezeptor
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Forward Scatter
G-BA	Gemeinsamer Bundesausschuss
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HDAC	Histon-Deacetylase
HDAC-Hemmer	Histon-Deacetylase-Hemmer
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

HLA	Histokompatibilitätsantigen
HSZT.....	Stammzelltransplantation
ICD	International Classification of Diseases
iFISH.....	interphase Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
Ig.....	Immunglobulin
IgH	Immunglobulin Schwereketten
IgL	Immunglobulin Leichtketten
IL-6.....	Interleukin-6
IMWG	International Myeloma Working Group
IR/DR	repetitive Erkennungssequenzen für die SB Transposase
ISS.....	International Staging System
KM	Kontrastmittel
KRAB.....	Krüppel-associated box
LDH	Laktatdehydrogenase
lncRNA.....	lange nicht-kodierende RNA
MAPK.....	mitogenaktivierte Protein-Kinase
MGUS	monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MM	Multiples Myelom
MMRF.....	Multiple Myeloma Research Foundation
MPC	Myeloma Propagating Cell
MRD.....	minimale residuelle Resterkrankung
mRNA.....	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NMEs	recombinant-protein-based new molecular entities
oaCGH.....	Oligonukleotid-Array-basierte komparative genomische Hybridisierung
OS	Gesamtüberleben
PAM.....	Protospacer adjacent Motif
PB	piggyBac
PBS.....	phosphate buffered saline
PET.....	Positronen-Emissions-Tomographie
PFS.....	progressionsfreies Überleben
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
RAG.....	Recombination-Activating Gen
R-ISS.....	Revised International Staging System
RNAi.....	RNA-Interferenz
rtTA.....	reverser Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator
SB	Sleeping Beauty
SBTS.....	Sleeping Beauty Transposon System
sgRNA	single guide RNA
SHM.....	somatische Hypermutation
shRNA.....	short hairpin RNA

siRNA	small interfering RNA
SMM	Smoldering (Schwelendes) Myelom
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SSC	Side Scatter
TetR	Tet Repressor Protein
Tet-System	Tetrazyklin-kontrollierte Transkriptionsaktivierung
TRM	therapiebedingte Mortalität
tTA	Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator
tTR	= <i>TetR</i>
UAMS	University of Arkansas for Medical Sciences
UNG	Uracil-DNA-Glykosylase
WES	Whole-Exome-Sequenzierung
WGS	Whole-Genome-Sequenzierung
WHO	Weltgesundheitsorganisation
β_2 M	β_2 -Mikroglobulin

16 Veröffentlichungen

Fink, S., Zugelder, L., Roth, B., Brandt, E., Meloche, S., Izsvák, Z., Bargou, R. und Stühmer, T. **A simple approach for multi-targeted shRNA-mediated inducible knockdowns using Sleeping Beauty vectors.** PLOS ONE 13 (2018). doi: 10.1371/journal.pone.0205585

Barrio, S., Stühmer, T., Da-Via, M., Barrio-Garcia, C., Lehnert, N., Besse, A., Cuenca, I., Garitano-Trojaola, A., **Fink, S.**, Leich, E., Chatterjee, M., Driessen, C., Martinez-Lopez, J., Rosenwald, A., Beckmann, R., Bargou, R. C., Braggio, E., Stewart, A. K., Raab, M. S., Einsele, H. und Kortüm, K. M. **Spectrum and functional validation of PSMB5 mutations in multiple myeloma.** Leukemia 33, 447–456 (2019). doi: 10.1038/s41375-018-0216-8.

17 Danksagung

Besonders danken möchte ich Dr. Thorsten Stühmer für die außerordentlich gute Betreuung sowohl beim praktischen als auch schriftlichen Teil dieser Arbeit. Er vermittelte mir die Fähigkeit wissenschaftlich zu arbeiten und durch viele anregende Diskussionen mit ihm konnte ich mich nicht nur fachlich weiterentwickeln. Zudem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Ralf Bargou für die Bereitstellung des Forschungsthemas und die Übernahme des Erstgutachtens sowie Herrn Prof. Dr. Jürgen Löffler für die Übernahme des Zweitgutachtens. Diesen beiden sowie Prof. Dr. Martin Eilers und Prof. Dr. Dr. Andreas Beilhack danke ich für die Betreuung im Rahmen des Promotionskomitees der Graduate School of Life Sciences (GSLS) der Universität Würzburg. Der GSLS und ihren Mitarbeitern danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit durch wissenschaftliche Weiterbildung und Gewährung eines Stipendiums.

Mein allergrößter Dank gilt meiner Familie und Freunden, deren wertvoller Beitrag in verschiedenster Form diese Arbeit so möglich gemacht hat.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Entwicklung eines Sleeping Beauty Transposon-Systems zum simultanen und induzierbaren shRNA-Knock-down verschiedener Zielstrukturen in Zelllinien des Multiplen Myeloms“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Development of a system for multi-targeted inducible shRNA-knock-downs with the Sleeping Beauty transposon system and establishment in Multiple Myeloma cell lines” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

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

Place, Date

Signature