Universität Ulm

Institut für Physiologische Chemie

Direktor: Prof. Dr. Thomas Wirth

Die Rolle von MEN1 im onkogenen Programm des Multiplen Myeloms

Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Tatjana Magdalena Wolffhardt
Geboren in Landsberg am Lech

Vorgelegt 2024

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Wirth

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Marienfeld

Tag der Promotion: 06.06.2025

Die Inhalte der Seite wurden aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Teile dieser Dissertation sind bereits erschienen in:

Wolffhardt TM, Ketzer F, Telese S, Wirth T, Ushmorov A (2023) Dependency of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia and Multiple Myeloma Cell Lines on MEN1 Extends beyond MEN1–KMT2A Interaction. Int J Mol Sci 24:16472. doi: 10.3390/IJMS242216472, lizenziert unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis i

Liste der Abkürzungen iii

1. Einleitung 1

1.1. Multiples Myelom 1

1.2. Das multiple endocrine neoplasia 1 (MEN1) Menin Protein 5

1.3. Probleme der loss of function Untersuchung von Proteinen 8

1.4. Epigenetische Beeinflussung 9

1.5. Proteasomaler Abbau als pharmakologischer Ansatz 11

1.6. Ziele dieser Arbeit 13

2. Materialien und Methoden 14

2.1. Materialien 14

2.2. Methoden 25

3. Ergebnisse 41

3.1. Abhängigkeit des Multiplen Myeloms von MEN1 41

3.2. Inhibition von MLL1 und MEN1 Interaktionen zeigt keinen Effekt in MM-Zellen 52

3.3. Korrelation der MEN1-Expression mit anderen Genen 54

3.4. Vorarbeiten für die Entwicklung eines MEN1 Degraders 60

4. Diskussion 64

4.1. Multiple Myelom-Zellen sind unabhängig von mutiertem KMT2A funktionell mit MEN1 verknüpft 64

4.2. KD und KO-Experimente bestätigen MEN1-Abhängigkeit im Multiplen Myelom 65

4.3. Mögliche Vermittler der MEN1-Abhängigkeit 67

4.4. Interaktion der MEN1 Abhängigkeit von KMT2A und anderen assoziierten Genen 71

4.5. MBD2 als Onkogen im Multiplen Myelom 73

4.6. Simultanes Targeting von MBD2 und MEN1 75

4.7. Degradationsmarkierung als nützliches Instrument zur Untersuchung der Machbarkeit des Proteinabbaus 76

5. Zusammenfassung 78

6. Literaturverzeichnis 80

7. Danksagung 95

8. Lebenslauf 96

Liste der Abkürzungen

A/a	Adenin
AF9	MLLT3 super elongation complex subunit
AK	Antikörper
AKT	Protein kinase B/ AKT serine/threonine kinase 1
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Acute myeloische Leukämie
AmpR	*Ampicillin*-Resistenz Gen
APC	Allophycocyanin
APRIL/TNFSF13	A proliferation-inducing ligand / tumour necrosis factor ligand superfamily member 13
BCMA/TNFRSF17	B-Cell Maturation Agent / tumour necrosis factor receptor superfamily member 17
BCR	B-Zell Rezeptor
β-catenin/CTNNB1	Catenin beta 1
C/c	Cytosin
CAP	Catabolite activator protein
CBX1	Chromobox 1
CD	Cluster of Differentiation
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DKK1	Dickkopf 1
DMEM	Dulbeco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Deoxyribonucleosid-triphosphate
dsDNA	Doppelsträngige DNA
dTAG	Degradations TAG
E. coli	Escherichia coli
E/GFP	Enhanced/Green fluorescent protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHMT2	Euchromatic histone lysine methyltransferase 2
FACS	Durchflusszytometrie

FANCD2	FA complementation group D2
FBS	Fetal bovine serum
FINGERS	Fingers Domäne
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
frg	Fragment
fwd	Forward
FWR	Framework Region
G/g	Guanin
HA	Humanes Influenza Hämagglutinin
HDR	Homologe DNA-Reparatur
HLXB9	Motor neuron and pancreas homeobox 1
HOX	Homöobox
HRP	Meerrettichperoxidase
ICE	Interference of CRISPR edits
Ig	Immunoglobulin
IGH	Immunoglobulin heavy locus
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbeco's Medium
IMiDs	Immunomodulatory imide drugs
JADE	Jade family PHD finger 2
JunD	JunD protooncogene
K	Lysin
KI	Knock-in
KMT2A/MLL1	Lysine methyltransferase 2A
KO	Knock-out
lac	Laktose
LEDGF	PC4 and SRSF1 interacting protein 1
LPS	Lipopolysaccharid
m	Methylierung
M13	M13 Bakteriophage
MBD	methyl binding-CpG-domain
MBD2	methyl-CpG binding domain protein 2
MBP	methyl-CpG-binding protein
MDS	Myelodysplastisches Syndrom

MEN1	multiple endocrine neoplasia 1/menin 1
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MM	Multiples Myelom
MTG	Monothioglycerol
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
MYC	MYC proto-oncogene / Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NAT10	N-acetyltransferase 10
NEB	New England Biolabs
NES1/2	Nuclear exit sequence 1/2
NF-κB	Nuclear factor kappa-B
NLS	Nuclear localization sequence
NTD	N-terminale Domäne
Oligo	Oligonukleotid
OPG/ TNFRSF11B	Osteoprotegerin / Tumour necrosis factor receptor superfamily member 11b
OPTI-MEM	Optimized minimal essential Medium
ori	Origin of replication
P2A	2A Peptid
PALM	Palm Domäne
PAM	Protospacer adjacent Motif
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD(L)1	Programmed cell death (ligand) 1
Pen	Penicillin
PI	Propidiumiodid
POI	Protein of interest
PROTAC	Proteolysis targeting chimera
Q	Glutamin
RANKL/ TNFSF11	TNF superfamily member 11
rev	Reverse
RFP	Rot fluroreszierendes Protein

RNA	Ribonukleinsäure
RPA2	Replication protein A2
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RT	Raumtemperatur
S	Serin
scr	scrambled, non-targeting
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SET	SET Domäne
shRNA	Small hairpin RNA
SIN3A	SIN3 transcription regulatory family member A
SIRT1	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin 1
SMAD3	SMAD family member 3
SPRI	Solid phase reversible immobilisation
ss	Einzelstrang
ssHDRT	Single-stranded homology directed repair template
Strep	Streptomycin
T/t	Thymin
TAQ Polymerase	Thermophilus aquaticus Polymerase
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline polysorbate 20
TC	Zellkultur
TCR	T-Zell Rezeptor
THUMB	Thumb Domäne
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNNI3	Troponin I3
TPR motif	Tetracopeptide motif
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethane
TUBB	Tubulin beta class 1
UTR	Untranslatierte Region
VEGF/R	Vascular endothelin growth factor/receptor

1. Einleitung

1.1. Multiples Myelom

Das Multiple Myelom (MM), ist ein Neoplasma, das aus Plasmablasten oder Plasmazellen entsteht, und ist abhängig von dem Proliferations- und Überlebens-Programm seines zellulären Vorläufers. Es tritt bevorzugt bei Patienten ab dem 70. Lebensjahr auf. Mit einer Inzidenz von etwa 6500 Neuerkrankungen 2017 in Deutschland und einer Fünfjahres-Überlebensrate von unter 50%[115] gehört es auch international zu den drei häufigsten hämatoonkologischen Erkrankungen laut American Cancer Society 2021.[116]

1.1.1. Funktion und Entwicklung normaler Plasmazellen

Plasmazellen repräsentieren die terminale Phase der B-Zell Differenzierung im Immunsystem sind sie darauf ausgelegt, hochspezifische Antikörper (AK) zu produzieren. Im Prozess der Plasmazell-Differenzierung durchlaufen diese mehrere Entwicklungsschritte, die mit einer Veränderung des Genoms einhergehen. Hierbei sind die wichtigsten Stadien pro-B-Zelle, Prä-B-Zelle, unreife B-Zelle und die reife B-Zelle, letztere trägt Immunglobulin (Ig) -M und IgD-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und wird nun über Interaktion mit einer T-Zelle aktiviert.

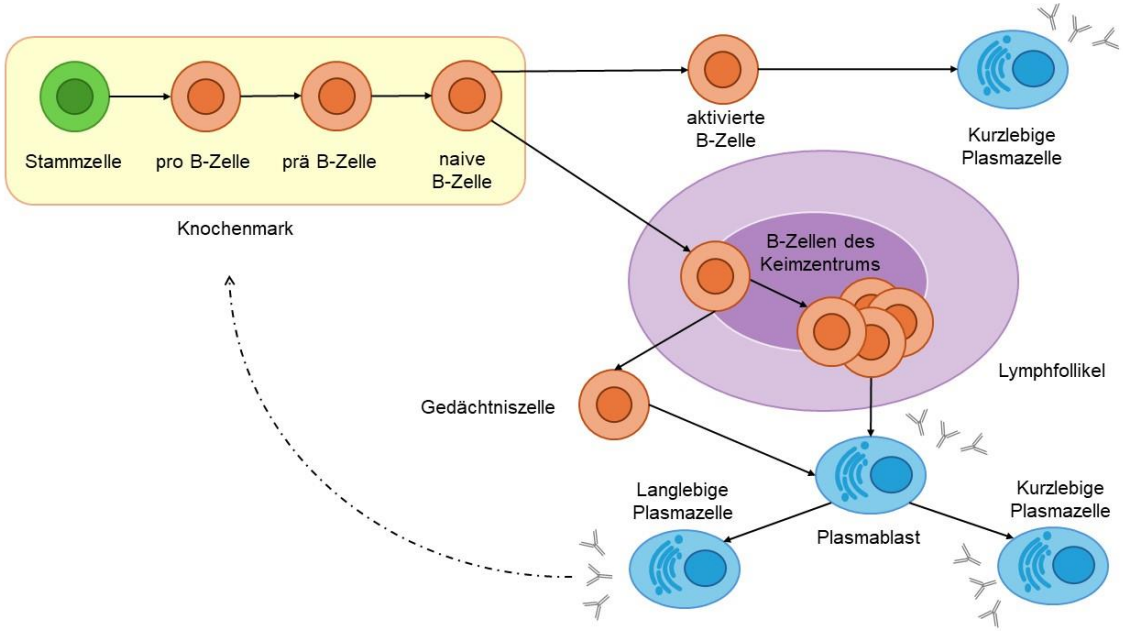


Abbildung 1: Schematische Darstellung der B-Zell Entwicklung bis zur Plasmazelle. Im Knochenmark (gelb) entwickeln sich die B-Zellen (orange) über mehrere Schritte aus hämatopoetischen Stammzellen (grün). Nach Aktivierung können sie als kurzlebige Plasmazellen (blau) natürliche Antikörper herstellen oder nach Antigen Kontakt in Lymphfollikeln (lila) expandieren. Plasmablasten produzieren nun hochspezifische Antikörper und können als langlebige Plasmazellen in Knochenmark zurückkehren. Gedächtnis B-Zellen können reaktiviert werden und Antikörper gegen ein bekanntes Antigen herstellen [82, 84].

Durch die Präsentation eines internalisierten Antigens mithilfe des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-II-Komplexes gegenüber einer Cluster of Differentiation (CD) -4+ T-Helfer-Zelle aktiviert diese die B-Zelle zur AK-Produktion. In der Folge werden die antigenspezifischen AK von der B-Zelle produziert und deren Spezifität durch somatische Hypermutation weiter erhöht. In diesem Prozess wird die Zelle genetisch verändert, um durch Punktmutation und anschließende Selektion die gesteigerte Spezifität zu generieren. Zuletzt kommt es zum Klassenwechsel des produzierten AKs, anstelle der gering spezifischen IgM-AK produziert die Zelle nun auch hochspezifische IgG- und sekretorische IgA-AK. Während die T-Zell Interaktion im Keimzentrum der Lymphknoten stattfindet, kommt es auch zur T-Zell unabhängigen B-Zell Aktivierung. Lipopolysaccharid, das beim Zerfall gramnegativer Bakterien freigesetzt wird, kann so eine B-Zell Aktivierung und folgende Sezernierung von spezifischen AK ohne T-Zell Interaktion hervorrufen [1]. Einzelne AK produzierende Zellen können als Plasmazellen nach der Infektion im Knochenmark (KM) persistieren, um eine beschleunigte Immunantwort bei erneuter Infektion zu gewährleisten.

Voll entwickelte Plasmazellen sind dennoch ~~ein~~ eine diverse Zellpopulation, sie unterscheiden sich sowohl in den bevorzugt gebildeten AK-Klassen, deren Lokalisation und den exprimierten Antigenen [51]. Auch die Lebensdauer unterscheidet sich deutlich zwischen den Subgruppen, beispielsweise sind Plasmazellen, die für die IgA-Sekretion im entzündeten Gewebe verantwortlich sind, kurzlebig. Die langlebigen Plasmazellen wiederum kehren zunächst an ihren Ursprung im KM zurück. Diese Zellen exprimieren im Gegensatz zu anderen peripheren Plasmazellen CD138 und können in spezialisierten Nischen durch Interaktion mit vor allem Stromazellen, die u.a. Stromal derived factor 1, Interleukin (IL) -6 und andere Botenstoffe sezernieren, lang persistierende Gedächtnis-AK-Titer generieren [70].

1.1.2. Pathogenese des MM

Das MM entwickelt sich aus Plasmablasten oder reifen Plasmazellen [2]. Von der Diagnose eines MM können mehrere Vorstufen abgegrenzt werden, so kann z.B. beobachtet werden, dass eine monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) mit einem Risiko von 1% pro Jahr in ein MM übergeht [52]. Weiter abgegrenzt wird das schwelende MM, das mit einer Wahrscheinlichkeit von 5% pro

Jahr in ein MM übergeht. Die Diagnose und Einteilung wird durch den Einbezug unterschiedlicher klinischer und Laborkriterien gestellt, relevant ist zunächst vor allem der Nachweis monoklonaler Immunglobuline [11]. Zur Abgrenzung von einem MGUS oder Smouldering Myelom zu einem manifesten MM ist die Entwicklung der sogenannten CRAB-Symptome (Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz, Anämie und Knochenläsionen) relevant. Aber auch zusätzliche Kriterien wie die Menge der Plasmazellen im KM, das Verhältnis von leichten zu schweren Ketten und die Anzahl der fokalen Läsionen ohne Osteolyse. Von den bisher genannten Ausprägungen müssen das unilokulär auftretenden Plasmozytom und die Plasmazellleukämie abgegrenzt werden. Die Klassifizierung wird benötigt, um die Wahrscheinlichkeit des Fortschreitens der Krankheit zu bestimmen und damit auch die Therapieindikation [77, 117].

Die genetischen Ereignisse, die zur Entwicklung eines MM führen, sind noch nicht alle bekannt, häufig beobachtete Veränderungen sind aber Hyperdiploidie, d.h. das Vorhandensein von mehr als zwei Chromosomen pro Paar, und Immunglobulin heavy locus (IGH) -Translokationen. Analysen des genetischen Materials vieler verschiedener Patienten haben gezeigt, dass über 40% aller Patienten Translokationen im Bereich des IGH-Gens aufweisen. Es ist auch davon auszugehen, dass im Verlauf der Chemotherapie weitere signifikante Mutationen auftreten, die häufig dazu führen, dass die MM-Zellen unterschiedliche Resistenzen entwickeln [2, 63].

Ein wichtiges klinisches Symptom ist die verstärkte Osteolyse bei MM-Patienten, die zu starken Schmerzen, Knochenbrüchen und sogar in Folge des angestiegenen Kalziumspiegels im Blut zu Nierenversagen führen kann [11]. Dies geschieht durch eine relative Verschiebung des Auf- und Abbaus von Knochen zugunsten des Abbaus. Die gesunden Plasmazellen sind auf eine enge Wechselwirkung mit dem KM angewiesen, denn nur so können sie ihre relativ lange Lebensdauer erreichen. Dazu interagieren sie mit spezialisierten Stromazellen, aber auch mit dem für den Knochenab- und -aufbau wichtigen System zwischen Osteoblasten und Osteoklasten. Im Gegensatz zu ihren physiologischen Pendants greifen MM-Zellen hier oft entscheidend ein, indem sie das Gleichgewicht auf die Seite des Knochenabbaus verschieben. Dies geschieht durch eine Veränderung der Botenstoffen, die bei der parakrinen und autokrinen Stimulation im Knochen eine

Rolle spielen. Dies kann unter anderem zur Rekrutierung verschiedener Matrix-Metallo-Proteasen führen, aber auch durch Beeinflussung der Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11 (RANKL/TNFSF11) Expression über den nuclear factor kappa-B (NF-κB) die Osteoklasten in ihrer Differenzierung stark beeinflussen. Diese signifikant erhöhte TNFSF11-Expression konnte vor allem in MM-Patienten mit Osteolysen auf den MM-Zellen selbst, aber auch auf umgebenden Stromazellen nachgewiesen werden [40]. Auch in den Osteoblasten führt das veränderte Biom durch die MM-Zellen maßgeblich zu Veränderungen im für ihre Funktion wichtigen wnt/Catenin beta 1 (CTNNB1) Signalweg [38]. Andererseits inhibieren die MM-Zellen über die Expression von Dickkopf 1 (DKK1) die für die wnt-Rezeptoraktivierung essenziellen Liganden Low-density lipoprotein receptor-related proteins 5 und 6, so dass nun kein CTNNB1 in den Osteoblasten akkumulieren und zur Aktivierung von Genen für die Osteoblasten-Entwicklung führen kann [102]. Relevant ist auch die Bindung von CD138 an TNF receptor superfamily member 11b / Osteoprotegerin (TNFRSF11b), so dass eine Internalisierung und ein lysosomaler Abbau folgen [92].

1.1.3. Therapie und Resistenz

Die primäre Behandlungsleitlinie beim MM beschränkt sich auf eine Hochdosis-Chemotherapie bei jungen Patienten (<70. Lebensjahr) ohne wesentliche Vorerkrankungen, gefolgt von einer autologen Stammzelltherapie. Da das mediane Erkrankungsalter bei etwa 64 Jahren liegt [73], gibt es ein großes Patientenkollektiv, das für diese primäre Behandlungsleitlinie nicht in Frage kommt. In beiden Fällen werden Mehrfachkombinationen zur Therapie bevorzugt [65]. Dexamethason ist fester Bestandteil der Therapie und wird mit Proteasom-Inhibitoren wie Bortezomib, CD38-AK wie Daratumumb und Immunmodulatoren wie Lenalidomid kombiniert [117].

MM-Zellen entwickeln im Laufe der Behandlung fast immer Resistenzen, die dann häufig zu einem terminalen Krankheitsverlauf führen. Der Grund hierfür liegt in einer genetischen Heterogenität, die nach Chemotherapie-Exposition noch deutlich zunimmt und zur Selektion rezessiver Subklone führt. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass die KM-Mikroumgebung es den MM-Zellen erleichtert, der Wirkung von Chemotherapeutika zu entgehen. Dies ist besonders problematisch für

die häufig älteren Patienten, die für eine autologe Stammzelltherapie nicht in Frage kommen [79].

1.2. Das multiple endocrine neoplasia 1 (MEN1) Menin Protein

Das gleichnamige Multiple Endokrine Neoplasie-Syndrom ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die zu Tumoren des Hypophysenvorderlappens, der Pankreasinselzellen und der Nebenschilddrüsen führt. Das auf Chromosom 11q13 lokalisierte Gen wirkt dabei als Tumorsuppressor und ist im Krankheitsfall von einer loss of function Mutation betroffen. Das kodierende Gen besteht aus 10 Exons mit 1830 kodierenden Basenpaaren und das resultierende Protein aus 610 Aminosäuren [99]. In Mausversuchen erwies sich ein homozygoter knock-out (KO) als letal in der elften Entwicklungswoche. Mäuse mit heterozygotem KO sind überlebensfähig, neigen aber stark zur Entwicklung von Neoplasien vor allem der endokrinen Organe [7]. Es sind mehrere Isoformen, alternative Splicevarianten und Transkriptionsvarianten bekannt. Die erste Isoform kann auf die 3179 Basenpaare lange Transkriptionsvariante e1E zurückgeführt werden [74]. Das Protein kommt in allen Geweben und zellulären Kompartimenten vor, ist aber im nukleären Kompartiment aufgrund seiner Interaktion mit dem Genom von besonderer Bedeutung [35]. Um die nukleäre Lokalisation zu sichern, ist das Protein mit mindestens zwei bekannten nuclear localization sequences ausgestattet [6]. Die Struktur von MEN1 ist bisher einzigartig und besitzt keine enzymatische Aktivität, jedoch konnten bereits die Interaktionsseiten mehrerer Proteine definiert werden.

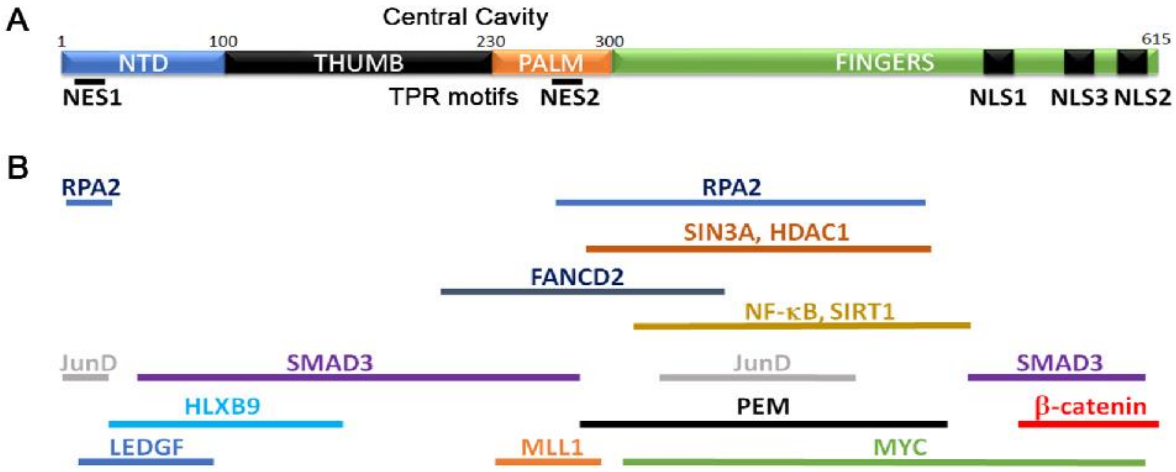


Abbildung 2: Aufbau und Interaktionspartner von MEN1. Die Abbildung zeigt unter A eine schematische Darstellung von Menin mit farbig markierten Domänen und funktionellen Regionen. In B sind unter den unterschiedlichen Regionen von A die sich jeweils damit assoziierenden Gene. Abkürzungen: NTD = N-terminale Domäne; THUMB = thumb Domäne; PALM = palm Domäne; FINGERS = fingers Domäne; NES1/2 = nuclear exit sequence 1/2; TPR motif = tetracopeptide motif; NLS1/2/3 = nuclear localization sequences 1/2/3; RPA2 = replication protein A2; SIN3A = SIN3 transcription regulatory family member A; HDAC1 = histone deacetylase 1; FANCD2 = FA complementation group D2; NF-κB = nuclear factor kappa-B; SIRT1 = sirtuin 1; JunD = JunD proto-oncogene ; SMAD3 = SMAD family member 3; HLXB9 = motor neuron and pancreas homeobox 1; PEM = Pem (Mouse); β-catenin = beta catenine; LEDGF = PC4 and SRSF1 interacting protein 1; MLL1 = Lysine methyltransferase 2A; MYC = MYC proto-oncogene. Die Abbildung ist übernommen von Nelakurti et al. 2020; Veröffentlicht unter der Creative Commons Attribution 4.0 (CC BY 4.0) license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

MEN1 ist über seine zahlreichen Interaktionspartner an mehreren für die Zelle entscheidenden Signalwegen und Mechanismen beteiligt. So ist eine Beteiligung an den wnt/ β -catenin-, NFκB-, transforming growth factor β und knochenmarkmorphogenetischen Protein - Signalwegen gesichert [74]. MEN1 bindet an das nukleäre CTNNB1und entfernt es durch eine Shuttle-Funktion, so dass CTNNB1 nicht mehr an die DNA binden kann [10]. MEN1 interagiert auch mit dem pro-onkogenen Protein Proteinkinase B (AKT), so kann MEN1 an inaktives AKT binden und so die Expression an der Zellmembran hemmen [101]. Mit den Proteinen p50, p65 und p52 aus der NFκB-Familie kann MEN1 direkt interagieren und sie so in ihrer Funktion hemmen. MEN1 ist auch an der Telomerverlängerung und an Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Reparaturmechanismen beteiligt. Generell wirkt MEN1 in den meisten Gewebetypen als Tumorsuppressor durch seine Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und die Hochregulation von cyclin-dependent kinases-Inhibitoren. In der Hämatoonkologie scheint sich diese Rolle des Tumorsuppressors jedoch umzukehren, so dass MEN1 hier essenziell für die Leukämogenese ist [61]. Dies geschieht durch die Interaktion mit der lysine methyltransferase 2A (KMT2A), PC4 and SRSF1 interacting protein 1 (LEDGF) und

MYB proto-onkogen, die über die Histon Methylierung Einfluss auf homeobox A9 (HOXA9) und Meis homeobox 1 (MEIS1) haben [43]. Zudem hat MEN1 auch im nicht pathologisch verändertem Gewebe eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Leukopoese und der Osteoblasten Differenzierung [6].

1.2.1. Interaktion mit KMT2A

KMT2A auch MLL1 genannt, ist ein Proto-Onkogen, das bei der akuten myeloischen Leukämie (AML), akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und dem myelodysplastischen Syndroms (MDS) häufig ein chromosomales Rearrangement 11q23 aufweist [80]. Durch den Bruch fusioniert KMT2A mit verschiedenen Partnern, das Fusionsprodukt kann zur Hochregulation von Genen führen, die für die Aufrechterhaltung leukämischer Zellprogramme essenziell sind, wie z.B. MEIS1 oder HOXA9 [109, 110]. Für die Aktivierung dieser Gene ist eine Interaktion mit MEN1 wichtig, der Effekt der Translokation ist also zu großem Teil abhängig von MEN1 [13].

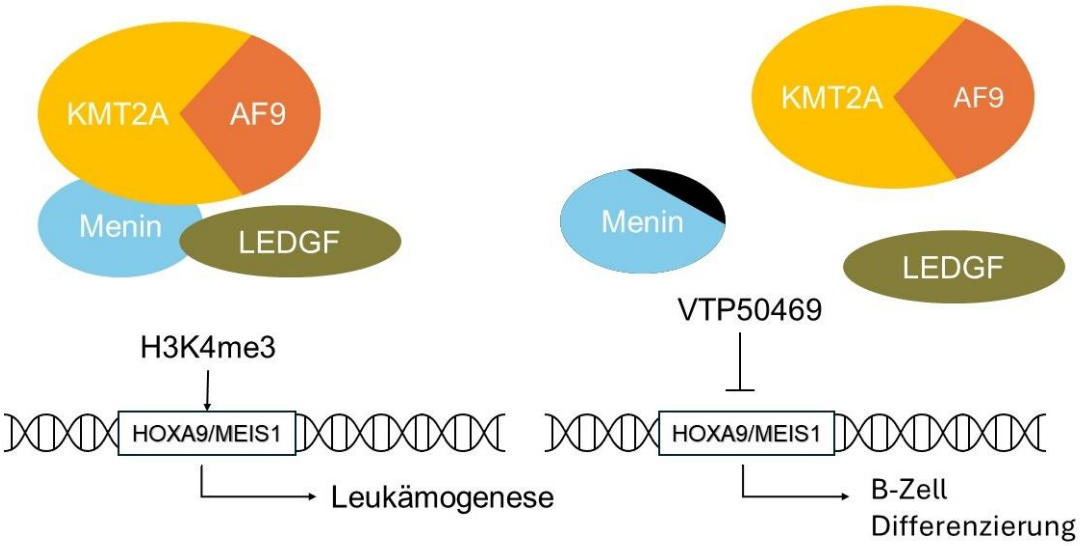


Abbildung 3: Interaktion von mutiertem KMT2A und MEN1. Die Abbildung zeigt die Beteiligung von Menin (blau) an der dreifach Methylierung von H3K4, über die Bindung mit dem KMT2A-Fusionsprotein (KMT2A in gelb und der Fusionspartner AF9 in orange) und LEDGF (grün). Diese epigenetischen Modifikationen führen über eine gesteigerte Expression der HOX-Gene und MEIS1 zu Leukämogenese. Durch Inhibition von Menin mit VTP50469 wird die Interaktion mit KMT2A verhindert, somit kommt es nicht zur Leukämogenese, sondern B-Zell Differenzierung [49, 61]. Abkürzungen: LEDGF = PC4 and SRSF1 interacting protein 1; AF9 = MLLT3 super elongation complex subunit; m = Methylierung; H3K4 = Histon 3 Lysin 4; HOX = Homöobox.

Es wurden bereits mehrere Inhibitoren dieser Interaktion entwickelt, deren Anwendung in AML-Zellen zu myeloider Differenzierung der Zellen und Apoptose führt [50]. Die Inhibitoren SNDX-5613 (NCT04065399) und KO-539 (NCT04067336) befinden sich in klinischen Studien und zeigen bereits vielversprechende

Ergebnisse [31]. VTP50649, ein Analogon von SNDX-5613, wurde ex vivo und in patient derived xenograft Mäusen untersucht. Der Inhibitor scheint nur in Zellen mit KMT2A Rearrangement wirksam zu sein [49]. Für MM-Zellen sind KMT2A Rearrangements sehr untypisch, obwohl ihr Auftreten im Rezidiv nach aggressiver Chemotherapie nicht völlig ausgeschlossen, ansonsten ist es meist auf Patienten im Kleinkind- oder Säuglingsalter beschränkt [75]. MM-Patienten sind in der Regel deutlich älter, so entfallen 85% der Erkrankungsfälle in den USA auf Patienten, die älter als 65 Jahre sind [67]. Dennoch haben klinische Studien gezeigt, dass die Wirksamkeit von KMT2A-MEN1-Inhibitoren nicht auf MLLr-Formen hämatoonkologischer Erkrankungen beschränkt sein muss, zunächst wird ein breiteres Wirkspektrum vor allem bei AML-Patienten vermutet [31]. Der für die H3K4me3 verantwortliche MLL-Komplex beinhaltet nicht nur die Methyltransferase KMT2A, sondern auch das WD repeat Protein 5 (WDR5). Dieses bindet dabei das Histon 3 und ermöglicht so erst die Methylierung [89]. Die Funktion des $MLLr^{+}$ Chimär-Proteins und somit das Aufrechthalten der Leukämie durch MEIS1 und HOXA9 Expression, kann durch die Verwendung eines Inhibitors der KMT2A-WDR5 Interaktion verhindert werden [45].

1.3. Probleme der loss of function Untersuchung von Proteinen

Die Verwendung von shRNAs zur Erforschung der Eigenschaften von Proteinen weist trotz ihrer weiten Verbreitung einige Nachteile auf. Dazu zählen allgemeine zytotoxische Effekte, beispielsweise durch die virale Applikation des Vektors, sowie spezielle Off-Target-Effekte der RNA-Interferenz [88]. Im Kontext des viralen Kontakts kann es zu einer Interferon-Antwort in der Zelle kommen, die wiederum die Zelle beeinflusst und als möglicher Störfaktor in der Untersuchung des Proteins agieren kann [26, 93]. Auch über andere Mechanismen wie die Überlastung des shRNA- bzw. micro-RNA-Zellkern-Export-Systems und die veränderte Expression unterschiedlicher Gene ist bekannt [32]. Um die Einflüsse solcher möglichen Störfaktoren zu limitieren, existieren alternative Ansätze, um die bekannten Probleme zu umgehen. Die Verwendung von CRISPR/Cas9 Knockout erlaubt die Durchführung von Untersuchungen, die den Verlust der Funktion eines Gens zum Ziel haben. Hierbei handelt es sich um einen direkt das Gen betreffenden Ansatz [60]. Als besonders nebenwirkungsarm hat sich die Verwendung eines Systems erwiesen, das keinen lentiviralen Vektor erfordert, der in der Zelle verbleibt. Ein

solches Vorgehen reduziert die Off-target-Effekte sowie die Immunantwort auf das Cas-Protein, welches ansonsten als potenzieller Störfaktor auftreten kann [59].

1.4. Epigenetische Beeinflussung

Epigenetische Informationen beziehen sich nicht auf die Sequenz der Nukleotide in der DNA, sondern können über andere Mechanismen besonders die Expression unterschiedlicher Gene des Genoms verändern. Dies ermöglich eine temporär und lokal variable Expression bei gleichbleibender Qualität und Quantität der DNA. Diese Modifikationen finden u.a. über eine Methylierung von Cytosin, besonders an Cytosinen die auf Guanine folgen (CpG) und über Histon Acetylierungen und Methylierungen statt. Die Proteine, die für die Regulation dieser Veränderungen entscheidend sind, können in sogenannte „writer“, „reader“ und „eraser“ der epigenetischen Informationen eingeteilt werden. Die von „writer“ wie DNA-Methyltransferasen und Histonacetyl- oder Histonmethyltransferasen, angebrachten Modifikationen können von „erasern“ wie Histondeacetylasen oder Histondemethylasen wieder entfernt werden. „Reader“ hingegen sind eine komplexe Gruppe von unterschiedlichen Proteinen die u.a. Bromodomänen oder Methyl-CpG-Bindungsdomänen (MBD) besitzen. Sie können nach Bindung an Histone oder methylierte DNA andere Proteine rekrutieren und somit unterschiedlichste Wirkungen auf die Transkription erzielen [9, 18].

Die epigenetische Betrachtung von Tumoren wurde lange Zeit vernachlässigt, aber es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass dies ein essentieller Baustein für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze ist [25]. Denn sie kann als wichtiger Faktor in der Tumorgenese vieler Krebserkrankungen eine Rolle spielen, teilweise sogar so entscheidend, das Veränderungen der epigenetischen Modifikation als „driver mutations“ angesehen werden können [68].

Das vor allem in B-ALL und AML-Zellen veränderte und pathogenetisch für das neoplastische Überleben entscheidende KMT2A ist als Methyltransferase den „writern“ zuzuordnen, hier sind also pathologische Veränderung des Epigenoms entscheidend [33]. Auch auf Level der DNA Methylierung gibt es für mehrere Neoplasmen pathognomische Veränderungen. Es gibt im Genom CpG reiche Regionen, z.B Promotoren diese sind physiologisch nicht oder wenig methyliert, während das restliche Genom tendenziell hypermethyliert ist. Das Genom von Krebszellen ist nun nicht nur generell hypomethyliert, was Instabilität und damit

weitere Mutationen begünstigt, sondern besitzt auch viele hypermethylierte CpG-reiche Regionen. Diese liegen nun häufig in der Promotorregion von Tumorsuppressor-Regionen [68]. Antiproliferative Gene können so stummgeschaltet und proproliferative Gene, Protoonkogene, aktiviert werden. [25]

An die methylierten CpGs können nun Methyl-CpG Bindungsproteine (MBPs) z.B. aus der MBD-Protein Familie binden, die für die Verbindung dieser beiden Ebenen grundlegend sind, indem sie die DNA-Methylierung in ein Chromosomen-Remodelling übersetzen [19]. Dies geschieht über die Rekrutierung von Nukleosom-Remodellierungs- und Deacytilasekomplexen wie NurD [53], Methyl-CpG binding Protein 2, ein Vertreter der MBPs, kann über dieses epigenetische Stummschalten unter anderem die Expression von IL4 in der Entwicklung von T-Helferzellen unterdrücken [47]. Im Gegensatz zu anderen MBPs ist MBD2 für die Embryonalentwicklung nicht zwingend notwendig, so dass MBD2-/- Mäuse keine gravierenden Einschränkungen aufweisen. Dennoch ist MBD2 z.B. bei verschiedenen Krebserkrankungen als tumorunterstützendes Protein bekannt, da MBD2 teilweise die aberrante Promoter-Methylierung unterstützt. Dies macht es als potenzielles Ziel für epigenetische Therapien sehr attraktiv [113]. Mehrere epigenetisch aktive Pharmaka sind bereits in der klinischen Anwendung zur Behandlung hämatoonkologischer Erkrankungen, darunter Medikamente wie Panobinostat und Belinostat [68], beides Histondeacetylase-Inhibitoren, die in der Behandlung des MM eingesetzt werden. Die Gabe dieser Inhibitoren führt zur Apoptose der Zellen durch erhöhte Histonmethylierung [55, 118]. Es gibt aber auch Medikamente, die nicht zu einer Hypermethylierung, sondern zu einer Hypomethylierung führen und so die Krebszellen beeinflussen können. Decitabin ist ein Cytosin-Analogon, das nach Einbau in das Genom die Methyltransferasen hemmt und durch die Hemmung der Methylierung ein funktioneller Inhibitor von DNA-Methyltransferase 1 ist. Das Medikament wird hauptsächlich bei myelodysplastischen Syndromen eingesetzt, besitzt aber auch allgemein antiproliferative Eigenschaften [44]. Dieser Inhibitor ist daher vor allem in niedrigen Konzentrationen geeignet, da er in hohen Dosen als Chemotherapeutikum Apoptose induziert, um die Effekte durch und die Abhängigkeit von epigenetischen Regulatoren auf das Genom zu untersuchen [58].

Damit KMT2A eine H3K4me3 induzieren kann, ist die Interaktion mit MEN1 wichtig, MEN1 rekrutiert dabei KMT2A zu der Bindungsstelle eines Transkriptionsfaktors, wo durch KMT2A eine Histonmethylierung in der Promotor-Region des entsprechenden Gens stattfinden kann. KMT2A ist nicht das einzige Protein, das eine solche Methylierung induzieren kann, es gibt andere Proteine, die die notwendige SET-Domäne besitzen, aber ihre Funktionen scheinen nicht redundant zu sein, da homozygote Deletionen eines dieser Gene nicht lebensfähig sind. Im Allgemeinen wird H3K4me3 als transkriptionsaktivierende Mutation verstanden, die auch für die DNA-Reparatur wichtig ist, insbesondere für die Korrektur von Doppelstrangbrüchen in der Meiose [41].

1.5. Proteasomaler Abbau als pharmakologischer Ansatz

Degradation statt enzymatischer Inhibition von Proteinen mit therapeutischer Relevanz, über das körpereigene Abbausystem durch Polyubiquitinilierung und darauffolgenden kompletten proteasomalen Abbau, ist ein neuer pharmakologischer Ansatz. Aufgrund der Vielzahl an Nachteilen der etablierten Methoden ist die Entwicklung alternativer Ansätze zur Ausschaltung von Proteinen von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung zukünftiger Therapien. Inhibitoren, die zumeist zur Ausschaltung der Funktion eines Proteins eingesetzt werden, sind stark von der Stärke und Dauer ihrer Bindung an die zu hemmende Region des betreffenden Proteins abhängig, Degradatoren hingegen müssen nur kurz binden, um das Protein dem Proteasom hinzuführen. Zudem besteht bei der Hemmung von Proteinen mit mehreren Domänen das Problem, dass meist nur eine dieser durch einen spezifischen Inhibitor beeinflusst werden kann. Noch gravierender sind die Einschränkungen bei der Inhibition von Proteinen, die als Transkriptionsfaktoren wirken und zum Teil wie MEN1 kein aktives Zentrum einer enzymatischen Funktion besitzen. Bei der Verwendung eines Degradatoren ist dies irrelevant, da die Bindung wahllos erfolgen kann und das Protein in seiner gesamten Form und Funktion entfernt wird, so kann MEN1 komplett degradiert werden und alle Interaktionen mit dem Protein ausgeschaltet werden. Die Möglichkeit, Proteine nicht nur abzuschalten, sondern auch abzubauen, eröffnet demnach viele neue Perspektiven [103]. Auch für die Untersuchung von akuten Proteinverlusten stellt diese Technik aufgrund der hohen Abbaugeschwindigkeit und der Notwendigkeit der Neusynthese des Proteins einen großen Vorteil dar.

PROTAC (Proteolysis targeting chimera) sind aufgebaut aus einem Liganden an dem Protein von Interesse (POI) einem Liganden einer E3 Ligase, z.B. Immmunomodulatory imide drugs (IMiDs) und einem Bindeglied, „Linker“, das diese beiden verbindet. IMiDs die heutzutage in der MM Therapie Anwendung finden, sind Thalidomid Derivate, die Cereblon aktivieren können, einen Rezeptor der Cullin-ring 4 ubiquitin-ligase Komplexes. Dieser kann über seine E3 Ligase Funktion das über Linker und Liganden verbundene POI ubiquitnylieren und so für die Degradation im Proteasom markieren.[16, 17]

Da für diese Methode zwar allgemein das gleiche Effektor System verwendet wird, der auch als *Warhead* bezeichnete Ligand aber noch spezifisch auf das POI zugeschnitten werden muss, ist hier ein gewisser Aufwand in der Entwicklung notwendig [56].

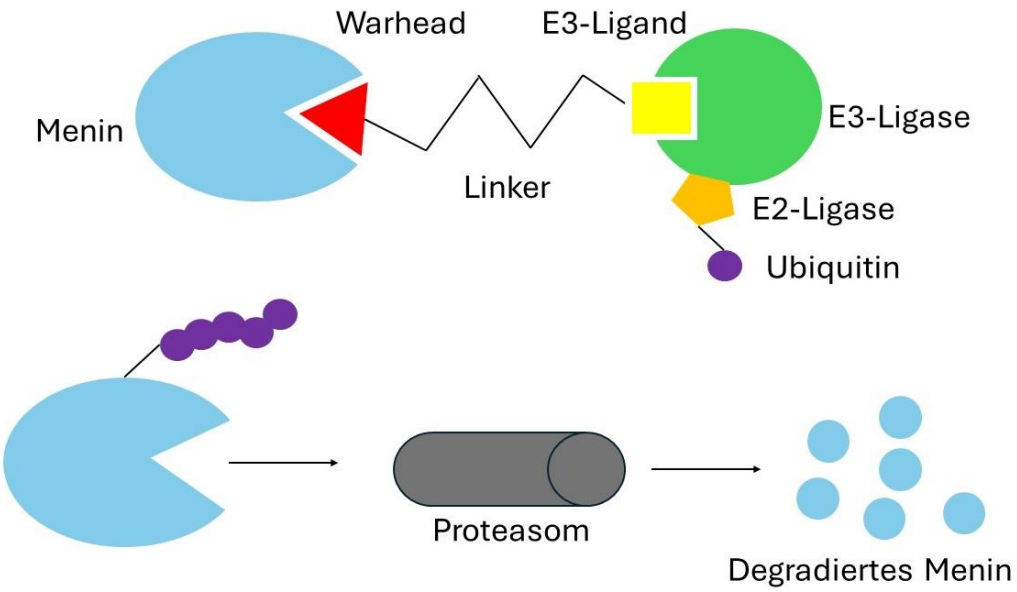


Abbildung 4: Schematische Darstellung von Aufbau und Funktionsweise einer PROTAC. Der sogenannte „Warhead“ bindet hierbei an das Zielprotein und vermittelt über an einen Linker gebunden Liganden die Aktivität einer E3 Ligase. Es kommt zur Polyubquitinilierung und das Zielprotein wird im Proteasom abgebaut, wobei sich die PROTAC löst und weiter zur Anwendung kommt [17, 34, 95]. Abkürzungen: POI = protein of interest; Ub = ubiquitine; PROTAC = proteolysis targeting chiemera.

1.6. Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll zuerst die Rolle von MEN1 in Multiplen Myelom-Zellen näher erforscht werden. Dafür sollen unterschiedliche Herangehensweisen evaluiert werden, um eine möglichst methodenunabhängige, valide Schlussfolgerung über die Relevanz des Gens in MM-Zellen ziehen zu können. Zu diesem Zweck werden bioinformatische Analysen von Online-Datenbanken, shRNA-KD-Experimente und CRISPR/Cas9-Genediting durchgeführt. Darüber hinaus sollen potenziell abhängige Gene identifiziert und im Kontext des Multiplen Myeloms weiter erforscht werden. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang die epigenetisch relevanten Gene KMT2A und MBD2, da sie potenziell von MEN1 abhängig sind. Des Weiteren soll die Möglichkeit der Nutzung einer gezielten MEN1-Degradation als therapeutische Strategie untersucht werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemische Reagenzien

Sämtliche gebräuchlichen Chemikalien und Reagenzien wurden erworben von Applichem (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) oder Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) gekauft. Alle Primer und Oligonukleotide wurden bei Biomeres (Ulm, Deutschland) bestellt.

2.1.1.1. Puffer

Tabelle 1: Liste der verwendeten Puffer einschließlich der Konzentrationen der enthaltenen Substanzen. Abkürzungen: FITC = Flurescein isothyocynanate; APC = Allophycocyanin; PI = Propidiumiodid; TRIS = Trishydroxymethylaminomethan; EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure; SDS = Sodiumdodecylsulfate; SDS-PAGE = sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis; MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid; PBS = Phosphatgepufferte Salzlösung; TBS = TRIS-bufferd saline; TBST = tris-bufferd saline polysorbate 20.

Puffer	**Bestandteile**
Annealing buffer (10X)	10 mM CH_3CO_2K 30 mM HEPES-KOH (pH=7.4) 2 mM $Mg(CH_3COO)_2$
Annexin-V binding buffer	0,1 M HEPES (pH 7.4) 1,4 M NaCl 25 mM $CaCl_2$
Apoptosis staining solution	1X Annexin-V binding buffer Annexin-V-FITC/APC 1:15 2 µg/ml PI
Binding & Wash Buffer 2X	10mM Tris-HCl (pH 7.5) 1mM EDTA 100 g/L NaCl
Cell Cycle (PI) staining solution	1X PBS 100 µg/ml RNAse A 40 µg/ml PI
Immunoblot transfer buffer	0,02 M Tris 0,2 M Glycin 20 % Methanol
Lysogeny broth (LB)	10 g/L Pepton 10 g/L NaCl 5 g/L Hefe Extrakt
Melting Solution	125 mM NaOH

MTT-assay lysis buffer	20 % SDS 2 % Eisessig 100% 50 % Dimethylformamid 0,15 mM HCl (pH=4.7)
Neutralizing Solution	60 mM Natriumacetat 98 % TE-Buffer
PBS (10X, pH=6.9)	1,5 M NaCl 0,03 M KCl 0,08 M Na_2HPO_4 0,02 M NaH_2PO_4
SDS lysis buffer	62.5 mM Tris-HCl (pH=6.8) 50 mM DTT 10 % Glycerol 2 % SDS 0,01 % Bromphenol blau 1 komplette Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablette /10 ml
SDS-PAGE 10X running buffer	0,2 M Tris 2 M Glycin 0,04 M SDS
TBS (10X, pH=7.6)	0,2 M Tris 1,5 M NaCl
TBST 0,1%	TBS 0,1% Tween
TE buffer	10 mM Tris (pH 8) 1 mM EDTA (pH 8)

2.1.1.2. Reagenzien der Zellkultur

Tabelle 2: Liste der in der Zellkultur vewendeten Reagenzien, alphabetisch geordnet, einschließlich Herstellerdaten, mit allgemein geläufigen postalischen Abkürzungen für die amerikanischen Bundesstaaten. Abkürzungen: MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid; RPMI = Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium.

Reagenz	**Zulieferer**
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's modified essential medium (DMEM)	Gibco, Waltham, MA, USA
Fetal bovine serum	Gibco, Waltham, MA, USA
Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)	PAN-Biotech, Aidenbach, Germany
L-Glutamin	Gibco, Waltham, MA, USA
MTT	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Opti-MEM Reduced Serum Medium	Gibco, Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Waltham, MA, USA
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Puromycin	Merck, Darmstadt, Germany
RPMI Medium 1640	Gibco, Waltham, MA, USA
Trypan blue 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin (0,05/0,25 %)	Gibco, Waltham, MA, USA

2.1.1.3. Kits

Tabelle 3: Liste der Kit Systeme, deren mitgelieferte Inhaltsstoffe und offiziellen Protokolle verwendet wurden, alphabetisch geordnet, einschließlich Herstellerdaten, mit allgemein geläufigen postalischen Abkürzungen für die amerikanischen Bundesstaaten. Abkürzungen: DNA = Desoxyribonukleinsäure; PCR = Polymerase Kettenreaktion.

Kit	**Firma**
Cell line 4D nuleofector kit X	Lonza, Basel, Schweiz
DNeasy Blood and Tissue kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
High pure DNA isolation kit	Roche, Penzberg, Deutschland
Kappa HiFi Kit DNA polymerase	Roche, Penzberg, Deutschland
PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit	Invitrogen, Waltham, MA, USA
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Penzberg, Germany

2.1.1.4. Weitere Materialien für molekular-biologische Methoden

Tabelle 4: Liste weiterer Materialien die im Rahmen von molekular-biologischen Methoden verwendet worden sind. Die hier verwendeten Abkürzungen für die Ortsangabe der Hersteller der Reagenzien in den USA sind die allgemein verwendeten postalischen Kürzel der amerikanischen Bundesstaaten. Abkürzungen: DNA = Desoxyribonukleinsäure.

Reagenz	**Hersteller**
1 kb DNA ladder	Invitrogen, Waltham, MA, USA
Annexin V- FITC, 1:15n V- F	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt, Germany
AMPure XP SPRI Reagent	Beckman Coulter, IN, USA
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Penzberg, Germany
Decitabin	Selleckchem, Houston, TX, USA
Dynabead MyOne Streptavidin C1	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
GIBSON Assembly Master Mix (2X)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
GoTaq DNA Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
GreenMasterMix (2X) High ROX	Genaxxon, Ulm, Germany
Green GoTaq Buffer (2X)	Promega, Madison, WI, USA
MM-102	Selleckchem, Houston, TX, USA
M-MLV reverse transcriptase	Promega, Madison, WI, USA
NEB 10-beta/stable outgrwoth medium	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Nitrocellulose blotting membrane 0,45 µm	Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
VTP50469	Selleckchem, Houston, TX, USA
West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA

2.1.2. Technische Mittel

2.1.2.1. Plastikware

Tabelle 5: Liste der verwendeten Plastikgefäße mit Hersteller Angabe. Die hier verwendeten Abkürzungen für die Ortsangabe der Hersteller der Reagenzien in den USA sind die allgemein verwendeten postalischen Kürzel der amerikanischen Bundesstaaten. Abkürzungen: PCR = Polymerase Kettenreaktion; TC = Zellkultur.

Produkt	**Hersteller**
Cellstar Cell Culture Dishes	Greiner Bio-One, Kemsmünster, Austria
Cellstar Cell Culture Flasks, 25 cm2/75 cm2	Greiner Bio-One, Kemsmünster, Austria
Cellstar Cell Culture Plate 6-/12-/48-Well	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Conical Centrifuge Tubes, 15 ml/50 ml	Falcon, San Diego, CA, USA
Eppendorf Tubes, Safe-Lock, 1,5 ml/2 m	Eppendorf, Hamburg, Germany
Non tissue culture treated plate 6-/12-/24-/48-well plates	Falcon, San Diego, CA, USA
PCR-Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Reagent Reservoir	Corning, New York, USA
Round bottom tube, 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Round bottom tube with cell strainer lid	Falcon, San Diego, CA, USA
Syringe Filter, 0,2 µm/0,45 µm	Whatman, Maidstone, UK
Syringe, 10 ml/20 ml	Braun, Melsungen, Germany
TC-Platte 96 Well standard/suspension F./R.	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.2.2. Geräte

Tabelle 6: Liste der verwendeten Geräte mit Herstellern. Die hier verwendeten Abkürzungen für die Ortsangabe der Hersteller der Reagenzien in den USA sind die allgemein verwendeten postalischen Kürzel der amerikanischen Bundesstaaten. Abkürzungen: FACS = Durchflusszytometrie.

Gerätbezeichnung	**Hersteller**
4D-Nucleofector	Lonza Group Ltd., Basel, Switzerland
Cell culture incubator Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Chemidoc MP	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
FACS Canto II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
GenoSmart	VWR, Ulm, Germany
Heraeus megafuge 40R Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus pico 17 centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Laminar flow sterile bank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
LightCycler 480	Roche Applied Science, Penzberg, Germany
Multitron Incubator Shaker	Infors HT, Basel, Schweiz
Nanodrop 1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Primus 94 Plus Thermal Cycler	MWG Biotech, Ebersberg, Germany
S3e Cell Sorter	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
SpectraMax 250 Microplate Reader	Molecular Devices, San Jose, CA, USA
ViCell-XR Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter, Brea, CA, USA

2.1.2.3. Programme

Tabelle 7: Liste der verwendeten Programme mit Angabe der Version und Websiten mit Links. Abkürzungen: FACS = Durchflusszytometrie: CRISPR = Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; RNA = Ribonukleinsäure; NEB = Newengland Biolabs; ICE = Interference of CRISPR edits.

Software	**Hersteller/Website**	**Version**
BD FACS Diva	Beckton Dickinson	1.13
Broad Institute GPP Web Portal	https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/	N/A
Cellosaurus	www.web.expasy.org/cellosaurus/	39
Custom Alt-R® CRISPR-Cas9 guide RNA	https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM	N/A
DepMap	DepMap: The Cancer Dependency Map Project at Broad Institute	N/A
Eurofins primer design tool	PCR Primer Design Tool (eurofinsgenomics.eu)	N/A
FlowJo	Beckton Dickinson	10.8.1
Gene Palette	University of California	2.1.1
Genenvestigator	Nebion	9.0.0
GenSmart Design	GenScript Pcr Primer Design	N/A
ImageJ	NIH, USA	1.53k
LightCycler Software	Roche	1.5.0
Microsoft Office 2019	Microsoft	16.16
NEB Builder Assembly tool	https://nebuilder.neb.com/#!/	N/A
Primer-BLAST	www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/	N/A
PRISM	GraphPad	9.0.2
ProsSortSoftware	Bio-Rad	1.6
Snapgene	GSL Biotech LLC	5.3.2
Synthego ICE Analysis	Synthego	V3

2.1.3. Biologische Materialien

2.1.3.1. Vektoren

shRNA-Knockdown

Für die Herstellung aller shRNAs wurde der Vektor pRSI12-U6-sh-UbiC-TagRFP (Addgene, Watertown, MA, USA) verwendet. Für die Auswahl der Sequenzen wurde die Datenbank des Broad Institute GPP verwendet. Die On/Off-Target-Aktivität wurde mit Primer-BLAST überprüft. Für die MBD2-shRNA1 wurde eine bereits getestete Sequenz verwendet [29].

Tabelle 8: Liste der für die Erstellung des die shRNA enthaltenden Vektors verwendeten Nukleotid-Sequenzen. Abkürzungen: shRNA = small hairpin ribonucleic acid; MEN1 = Multiple endocrine neoplasia 1; MBD2 = methyl binding domain 2; fwd = forward; rev = reverse; a = Adenin; c = Cytosin; g = Guanin; t = Thymin.

shRNA	**Sequenz von 5‘ zu 3‘**
MEN1-shRNA5	fwd: accggccgagtacagtctgtatcaaagttaatattcatagctttgatacagactgtactcggttttttg
	rev: aattcaaaaaaccgagtacagtctgtatcaaagctatgaatattaactttgatacagactgtactcggc
MEN1-shRNA6	fwd: accgggctgtacctgaaaggatcatagttaatattcatagctatgatcctttcaggtacagctttttg
	rev: aattcaaaaaagctgtacctgaaaggatcatagctatgaatattaactatgatcctttcaggtacagcc
MBD2-shRNA1	fwd: accgggggtaaaccagacttgaagttaatattcatagcttcaagtctggtttaccctttttg
	rev: aattcaaaaaagggtaaaccagacttgaagctatgaatattaacttcaagtctggtttacccc
MBD2-shRNA3	fwd: accgggtagcaatgatgagacccttttgttaatattcatagcaaagggtctcatcattgctacttttttg
	rev: aattcaaaaaagtagcaatgatgagacccttttgctatgaatattaacaaagggtctcatcattgctacc
Non targeting	fwd: accggcctaaggttaagtcgccctcggttaatattcatagccgagggcgacttaaccttaggttttttg
	rev: aattcaaaaaacctaaggttaagtcgccctcggctatgaatattaaccgagggcgacttaaccttaggc

FKBP^{F36V}-KI-Vektor

Zur Herstellung des FKBP^{F36V}-KI-Plasmides wurde der Vektor pAW62_YY1._KKBP._knockin_BFP und als Rückgrat die FKBL-V-P2A-mTAGBFP2 Kassete verwendet.

2.1.3.2. CRISPR/ Cas9 abhängige DNA-Editing Materialien

Alle crRNAs, Trans-activating crRNA (tracrRNA) (einschließlich Nuclease Free duplex buffer) und Cas9 Enzyme wurden von IDT (Coralville, Iowa, USA) hergestellt.

Tabelle 9: Liste der verwendeten crRNA Sequenzen. Abkürzungen: crRNA = Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats ribonucleic acid; MEN1 = Multiple endocrine neoplasia 1; TNNI3 = Troponin I; KO = knock-out; dTAG = degradation TAG; fwd = forward; rev = reverse; a = Adenin; c = Cytosin; g = Guanin; t = Thymin.

crRNA	**Sequenz von 5‘ zu 3‘**	**Target**
crRNA_MEN1_KO_1	atgatagacaggtcggccac	MEN1 Exon1
crRNA_MEN1_KO_3	gaacgttggtagggatgacg	
crRNA_TNNI3_control_1	ctatccctaagcaagtccga	TNNI3
crRNA_TNNI3_control_2	acgtgggcccaaatctggac	
crRNA_MEN1_dTAG_3	caaaggcctctgaactactg	MEN1 Exon 9

Exon 9 für dTAG Entwicklung Exon 1 für CRISPR KO Experiment

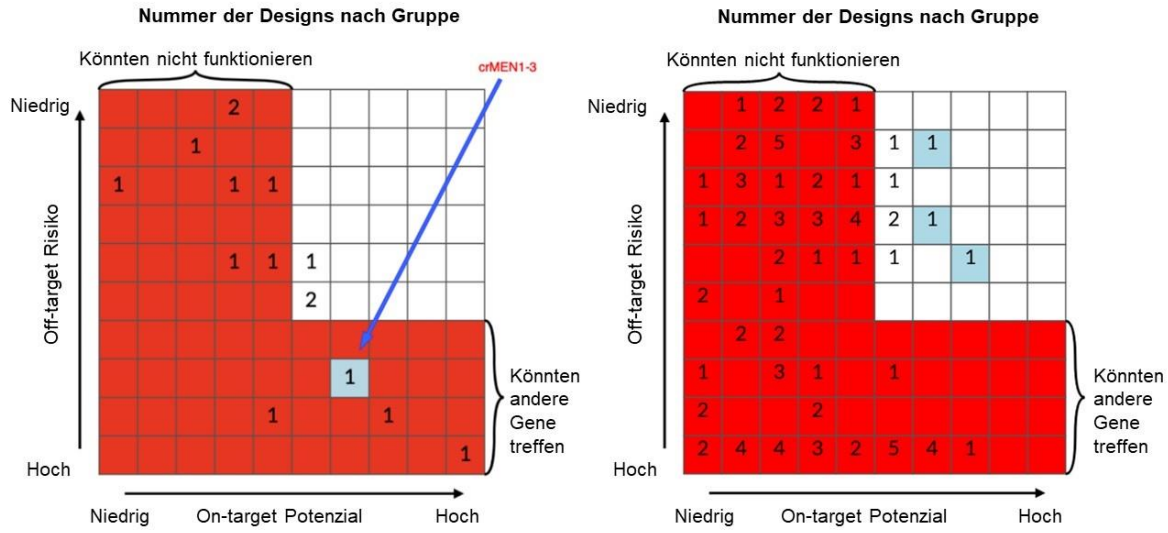


Abbildung 5: Mögliche crRNA Sequenzen sortiert nach ihrem off target risk und on target potetial werden gezeigt. Die Graphik wurde in Vorarbeiten zur Entwicklung der crRNA für die dTAG Experiment mithilfe der Website von IDT(Coralville, Iowa, USA) erstellt. Die Sequenz für die dTAG Entwicklung liegt hier in Exon 9 , es musste eine Sequenz mit leicht erhöhtem Off-target Risiko verwendet werden. Die für die CRISPR-KO Exprimente verwendete Sequenzen liegen alle in dem Bereich mit niedrigem Off Target Risiko und hohem On Target Potential., (https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM); Abkürzungen: dTAG = degradation TAG; CRISPR = Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; KO = knock-out; MEN1 = multiple endocrine neoplasia 1.

Die für die dTAG-Entwicklung verwendete Sequenz liegt in Exon 9. Um eine möglichst hohe Effizienz der KI zu erreichen, musste eine Sequenz mit leicht erhöhtem Off-target-Risiko verwendet werden, die am Ende der Sequenz des letzten kodierenden Exons liegt. Die für die CRISPR-KO-Expression verwendeten Sequenzen liegen alle in dem Bereich mit niedrigem Off-target-Risiko und hohem On-target-Potential. Die Wahl des ersten Exons erfolgte mit dem Ziel, die Sequenz des MEN1-Gens möglichst früh und umfassend zu schädigen, um einen Knock-out zu erzielen.

2.1.3.3. Primer

Alle Primer wurden bei Biomeres (Ulm, Deutschland) bestellt. Für das Primerdesign wurden Online Primer Design Tools von Genscript und Eurofins verwendet.

Tabelle 10: Liste der verwendeten Primer. Mit Stern markierte Sequenzen wurden auch als Sequenzierungsprimer verwendet. Abkürzungen: fwd = forward; rev = reverse; TNNI3 = Troponin I; MEN1 = multiple endocrine neoplasia 1; dTAG = degradation TAG; frg = Fragment; UTR = Untranslatierte Region; GFP = green fluorescent protein; ss = singlestrand; a = Adenin; t = Thymin; g = guanosine; c = Cytosin.

Primer	**Sequenzen von 5‘ zu 3‘**
TNNI3_fwd: *	tctgcccttctaaaccctc
TNNI3_rev:	tccaactaccgcgcttatg
MEN1_NUCL_fwd:	accgacaaaagaggggaag
MEN1_NUCL_rev:	ggtgaggttgatgatttggag
MEN1_dTAG_frg1_fwd:	gtttttccttgacagtgcacattcgaaggctgcgggaagctgcagtgtcaggaccccc
MEN1_dTAG_frg3_rev:	ggcttcccgggtcgagaaggtcttctctcttcttttttaataggctcttgtcacccactcc
MEN1_dTAG_GFP_frg1_rev:	agctcctcgcccttgctcaccggtccaggatt
MEN1_dTAG_GFP_frg2_fwd:	tcgaagagaatcctggaccggtgagcaagggc
MEN1_dTAG_GFP_frg2_rev:	aagcggtccgaagtccccagtcacttgtacagctcgtccatgcc
MEN1_dTAG_GFP_frg3_fwd:	tggacgagctgtacaagtgactggggacttcggacc
5’homology_MEN1_fwd: *	ccctagtgactacactctgtc
3’homology_UTR_rev:	tagggtttgggtagaggtgag
ssdTAG_Primer_fwd_biotin (biotinilyrter Primer)	ataaagttcagaggcctttggggtgcagtgtcaggacccccccc
ssdTAG_Primer_rev	ataaagttcagaggcctttggggaggctcttgtcacccactcc

2.1.3.4. Oligonukleotide zur singlestrand degradation TAG (ssdTAG) Erstellung

Tabelle 11: Liste der verwendeten Oligonukleotide. Abkürzungen: ssdTAG = singlestrand degradation TAG; Oligo = Oligonukleotid; a = Adenin; t = Thymin; g = guanosine; c = Cytosin.

Oligonukleotid	**Sequenzen von 5‘ zu 3‘**
ssdTAG_Oligo1	ataaagttcagaggcctttggggtgcagtgtcaggacccccccc
ssdTAG_Oligo2	ggagtgggtgacaagagcctccccaaaggcctctgaactttat

2.1.3.5. Primär Antikörper

Tabelle 12: Liste der verwendeten primär Antikörper einschließlich Angabe der Spezies, der Verdünnung in der Verwendung für den Immunoblot, Hersteller und die Produkt ID. Abkürzungen: TUBB = tubulin beta class 1; MEN1 = multiple endocrine neoplasia 1; MBD2 = methyl binding domain protein 2; c-myc = MYC binding protein.

Antigen	**Spezies**	**Verdünnung Immunoblot**	**Hersteller**	**Produkt ID**
TUBB	Rabbit	1:400.000	abcam	ab6046
MEN1	Rabbit	1:1000	Cell Signaling technology	#6891
MBD2	Rabbit	1:500	abcam	ab188474
c-Myc	rabbit	1:500	Santa cruz	Sc-764

2.1.3.6. Sekundäre Antikörper

Tabelle 13: Der verwendete sekundär Antikörper mit Angabe der Spezies, der Verdünnung in der Verwendung für den Immunoblot, Hersteller und die Produkt ID. Abkürzungen: HRP = Meerrettichperoxidase.

Spezies	**Verdünnung Immunoblot**	**Hersteller**	**Produkt ID**
Goat anti rabbit HRP	1:10.000	Thermo Fischer Scientific	#31460

2.1.3.7. Organismen

Humane Zelllinien

Tabelle 14: Liste der verwendeten humanen Zelllinien (Eignenamen) unter Angabe des Ursprungsgewebes.

Ursprungsgewebe	**Zelllinie**
Multiples Myelom	U266
	L363
	LP1
	OPM2
	MM1.s
	KMS-12-BM
B-Akute lymphatische Leukämie	KOPN8
Epithelzellen	HEK293T

Bakterienstamm

Tabelle 15: Der verwendete Bakterienstamm unter Angabe des Eigennamens und des Herstellers. Abkürzungen: NEB = new england biolabs; E. coli = Escherichia coli.

Bezeichnung	**Hersteller**
NEB stable competent E. coli	New England Biolabs

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung der Zelllinien

Die Zelllinien werden im jeweiligen Medium in ca. 20 ml kultiviert und entsprechend dem Wachstum alle 2-3 Tage halbiert. Die semi-adhäsiv wachsenden Zellen (U266, MM1.s) werden in 20 ml-Petrischalen für adhärente Zellen gehalten und vor der Passage mit Zellschabern vom Boden gelöst.

Tabelle 16: Auflistung der jeweiligen Zusammensetzung der Medien der unterschiedlichen Zelllinien (Eigennamen). Abkürzungen: RPMI = Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium; FBS = fetal bovine serum; Pen = Penicillin; Strep = Streptomycin; MTG = monothyioglycerol; IMDM = Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Opti-MEM = optimiertes Minimal Essential Medium; DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium.

Medium	**Zusammenstellung**	**Zelllinien**
RPMI 10% FBS	RPMI 500 ml + 55 ml FBS + 6 ml Glutamin + 6 ml Pen/ Strep + 0,6 ml MTG (50mM)	OPM2, U266, MM1.s, KOPN8, LS
RPMI 15% FBS	RPMI 500 ml + 90 ml FBS + 6 ml Glutamin + 6 ml Pen/ Strep +0,6 ml MTG (50mM)	L363
RPMI 20% FBS	RPMI 500 ml + 110 ml FBS + 6 ml Glutamin + 6 ml Pen/ Strep +0,6 ml MTG (50mM)	KMS-12-BM
IMDM 20% FBS	400ml IMDM +100 ml RPMI + 110 ml FBS + 6 ml Glutamin + 6 ml Pen/ Strep	LP1
Opti-MEM	OPTI MEM 500ml	HEK 293T
DMEM	DMEM 500 ml + 55 ml FBS + 6 ml Glutamin + 6 ml Pen/ Strep	HEK 293T

2.2.2. Immunoblot

Die Zellen werden nach der Lysis in 1x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) in Sodiumdodecylsulfate (SDS)-Probenpuffer gelöst. Für die Lysis werden 100 µl SDS-Lysepuffer für jeweils eine Million Zellen verwendet und für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Die Proteine werden durch SDS - Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) mit 10 %igem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Auftrennung zum Nachweis von KMT2A erfolgt mithilfe eines 6 %-Gels unter Zugabe von 6 M Urea, um eine bessere

Auflösung von schweren Proteinen zu gewährleisten. Die Membran wird für einen Zeitraum von 15 Minuten bei 37 °C in einer 5 %igen Lösung aus fettfreier Trockenmilch/ Tris-buffered saline (TBS) blockiert. Im Anschluss erfolgt eine Inkubation der Membran mit primären Antikörpern über Nacht bei 4 °C. Zunächst werden zwei Waschschritte in TBS-T und anschließend ein Waschschritt in TBS durchgeführt (jeweils 5 Minuten). Eine Stunde lang wird die Membran bei RT mit Sekundärantikörpern in 5 % fettfreier Trockenmilch/ Tris-buffered saline polysorbate 20 (TBST) oder nur TBS inkubiert. Im Anschluss erfolgt eine erneute Reinigung der Membran, wobei die Proteinbanden durch Zugabe von SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate sichtbar gemacht werden.

2.2.3. Herstellung der Viren

Die Lentiviren, die für die Einführung des Plasmides pRSI12-U6-sh-UbiC-TagRFP und damit der small hairpin Ribonukleinsäure (shRNA) benötigt werden, werden durch Inkubation in HEK 293T Zellen gewonnen. Die Zellen werden ca. 3 Tage zuvor im Verhältnis 1:5 geteilt, so dass sie am Tag vor der Infektion in ausreichender Menge angewachsen sind. Am Tag vor der Infektion werden 9 Mio. Zellen in 1 ml DMEM-Medium resuspendiert und in eine 10 ml Petrischale mit 9 ml Medium gegeben.

Tabelle 17: Zusamensetzung des Master-Mix zu Lentivirusherstellung in HEK293T Zellen für die shRNA Infektion. Abkürzungen: MEN1 = multiple endocrine neoplasia 1; shRNA = small hairpin ribonucleic acid; Opti-MEM = optimiertes Minimal Essential Medium.

	Konzentration	**Masse**	**Volumen**
MEN1 Vektor	2,505 mg/ml	2,8 µg	1,12 µl
Virus	2,175 mg/ml	4,3 µg	1,98 µl
Plasmid	shRNA# 5 = 2,354 mg/ml shRNA# 6 = 2,292 mg/ml	4,3 µg	shRNA# 5 = 1,83µl shRNA# 6 = 1,88µl
Vorgewärmtes Opti-MEM	-	-	500µl
Polyethylenimin	1mg/ml	45,6 µg	45,6 µl

Während der Master-Mix 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, wird das DMEM durch 7,5 ml Opti-MEM ersetzt wird. 0,5 ml des Master-Mixes (Tabelle 17) hinzugegeben und die Schalen bei 37 °C 6-8h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Medium durch 8 ml Opti-MEM ersetzt. Am zweiten und dritten Tag nach Transfektion können die Viren geerntet werden. Dafür wird das

Medium mithilfe von 50 ml Spritzen abgenommen und durch einen 0,45 µl Filter in 50 ml Flacons bei -80 °C eingefroren. Nach Zugabe von 8 ml Opti-MEM kann die Ernte am nächsten Tag wiederholt werden. Der gewonnene Virus kann auch vor Einfrierung gleich zur Transfektion der Zellen verwendet werden.

2.2.4. Transduktion der MM-Zelllinien

Die Transduktion mit Lentiviren zum Einschleusen der darin enthaltenen shRNAs führt über RNA-Interferenz zum Knockdown von MEN1. Für die Transduktion werden drei verschiedene Vektoren verwendet, von diesen exprimieren zwei unterschiedliche Versionen der gegen MEN1 gerichteten shRNA (sh#5; sh#6). Der dritte Vektor ist nicht zielgerichtet, sondern dient lediglich als Negativkontrolle, um auszuschließen, dass die Ergebnisse auf Nebeneffekte der shRNA und der viralen Transduktion zurückzuführen sind. Die Zellen befinden sich für die Transduktion in einem Wachstumszustand. 2 Millionen Zellen pro Vektor werden zentrifugiert und dann mit jeweils 1 ml Virus resuspendiert. Für die Transduktion werden die Zellen in 6-Well-Platten gegeben und für 2 Stunden bei 4 °C und 2900 U/min zentrifugiert. Nach Ablauf der Zeit wird der Überstand abgenommen, wobei das Virus gemäß Sicherheitsstufe 2 separat zu entsorgen ist, und 3 ml des jeweiligen Mediums zugegeben.

2.2.5. Apoptose-Messungen

Für die Berechnung der spezifischen Apoptose werden nur transduzierte Zellen benötigt. Diese werden mit dem Se3 Cellsorter anhand der Expression des Rot fluroreszierendes Proteins (RFP) erkannt und sortiert. Vor der Sortierung werden die Zellen zentrifugiert und in PBS mit 5 % BSA resuspendiert. Hier werden 2-2,5 ml der transduzierten Zellen in 1 ml phosphate buffered saline (PBS) -Puffer konzentriert. Die Hälfte der Zellen wird zur Messung der Proteinexpression verwendet, die andere Hälfte in 12-Well-Platten unter Zugabe von 0,5 ml Medium inkubiert. Die genauen Zellzahlen werden notiert, im Durchschnitt werden jeweils ca. 200.000 Zellen sortiert. Am 7. Tag nach der Transduktion wird die Apoptoserate der Zellen gemessen. Zunächst werden alle Zellen zentrifugiert und mit 500 µl 1x Annexin V Binding Buffer gewaschen.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Master-Mix zur Apoptosefärbung. Abkürzungen: FITC = Flurescein isothyocynanate; APC = Allophycocyanin.

Substanz	Menge für ein Sample
1x Annexin Binding Buffer	70 µl
Annexin-V-FITC/APC	5 µl
Propidiumiodid 1mg/ml	1,5 µl

76,5 µl Master-Mix werden zu jeder Probe gegeben und resuspendiert. Die Zellen werden 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert um anschließend die Durchflusszytometrie (FACS) -Messung durchzuführen.

$$100\ x \frac{Apoptosis_{experiment} - Apoptosis_{control}}{100 - Apoptosis_{control}}$$

2.2.6. Wachstumsdynamik Messungen

Zur Berechnung der Wachstumsdynamik werden die Zellen nach der Transduktion alle drei Tage im FACS-Gerät gemessen. Die Anzahl der transduzierten Zellen kann auch hier über die Proportion von RFP-positiven Zellen bestimmt werden. In der weiteren Auswertung wird dann der prozentuale Anteil der transduzierten Zellen im Vergleich zum Anteil am ersten Messtag berechnet.

2.2.7. shRNA Herstellung

Die shRNA binde Stellen wurden mithilfe des Broad Institute GPP Web Portals ausgewählt, ausgenommen shMBD2#1 hier wurde die Sequenz von Xie et al., 2021 übernommen. Möglichst spezifische Sequenzen werden mit den zum Vektor passenden überhängenden Enden versehen. Nach der Herstellung der Oligonukleotide durch die Firma Biomers beginnt die Transformation.

2.2.7.1. Klonierung der shRNA Konstrukte und Vorbereitung der shRNA Vektoren

Annealing der Nukleotide

Die Oligonukleotide werden in einer Konzentration von 3 µg/µl gelöst und mit je 1 µl komplementären Oligonukleotiden zu 48 µl Annealing Buffer für 3 min bei 95 °C und dann 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend werden die Eppendorf Tubes zunächst im Thermoblock bei RT und dann im Kühlraum bei 4 °C auf 10 °C abgekühlt.

Ligation

Hierfür wurde das DNA Ligation kit (Roche) verwendet. Die Oligonukleotide werden 1:8 mit Wasser verdünnt. 1 µl des gereinigten Vektors, 1 µl der verdünnten Oligonukleotide, 2 µl DNA-Dilution Buffer und 6 µl Wasser werden gemischt. Nach Zugabe von 10 µl Ligation Buffer und 1 µl Ligase wird der Mix 5 min bei RT inkubiert.

Transformierung

2 µl Ligation Mix werden mit NEB competent Escherichia coli für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgt der Hitze Schock für 30 s auf 42 °C, danach weitere 5 min Kühlung. 950 µl NEB 10-beta/ Stable Outgrowth Medium werden zugegeben und die Probe bei 30 °C und 250 rpm horizontal geschüttelt. Nach einer Stunde wird der Ansatz auf vorgewärmte LB Agerose Platten mit Ampicillin-Zugabe überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Aufreinigung und Vervielfältigung

Für die anschließenden Minipreps (QiaPrep Spin Miniprep Kit) und Maxipreps (PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep) sind die entsprechenden Protokolle zu befolgen. Vor Beginn des Maxiprep sollte durch eine Sequenzierung mit einem Primer, der den shRNA U6 Promotor bindet, bestätigt worden sein, dass die gewünschte Sequenz in das Plasmid integriert ist. Sanger-Sequenzierung bei Eurofins Genomics. Die Reinheit und Konzentration des Plasmides wird mithilfe von Nanodrop gemessen.

2.2.8. MTT-Assay

MTT-Assays dienen zur Bestimmung der metabolischen Aktivität durch Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) durch mitochondriale Reduktasen. Der Wert kann spektralanalytische gemessen werden und anhand von Kontrollen ausgewertet werden [71].

Für die Durchführung des MTT-Assays werden 96 Well-Platten mit 20.000 Zellen und zwei Negativkontrollen (Dimethylsulfoxid (DMSO)/unbehandelt) und einer Positivkontrolle (Puromycin 0,04 µg/µl) befüllt. Von jeder Konzentration werden drei Replikate hergestellt, wobei die höchste Konzentration in der Regel 20 µM beträgt und die DMSO-Kontrolle mit der gleichen Menge DMSO wie die höchste Inhibitor-Konzentration hergestellt wird. Nach 6 Tagen oder bei Erreichen eines konfluenten

Wachstumsmusters werden zunächst 25 µl MTT und 2 h später 100 µl Lysis Buffer zugegeben. Die Auswertung erfolgte mit dem SpectraMax 250 Microplate Reader und die Ergebnisse wurden mit Excel und Prism weiter analysiert.

2.2.9. Etablierung des knock-in Vektors

2.2.9.1. Plasmid-Entwicklung

Zur Entwicklung des Plasmids wird pAW63. YY1.FKBP.knock-in.BFP verwendet. Dieses wird zunächst mit den Restriktionsenzymen AfeI und PacI 1h bei 37 °C verdaut. Die Sequenz für die 5‘-Homologie für MEN1 und die 3‘-Homologie für die untranslatierte Region (UTR) stammen aus genomischer DNA der Zelllinie U266. Als Grundlage für die Erstellung des GFP haltigen Plasmides wurde ein zuvor in der Arbeitsgruppe hergestelltes Plasmid verwendet, welches ein anderes Fluorophor enthält. Das folgende PCR-Programm wurde verwendet. Die Regionen 5‘ und 3’ von der cutting site wurde mit Primern (5’homology_MEN1_fwd und 3’homology_UTR_rev) 351 und 728 Basenpaare (bp) von der cutting site gemessen mithilfe genomischer DNA amplifiziert.

Tabelle 19: PCR-Programm zur Plasmidherstellung. Mit X1 und X2 sind die Start Temperaturen bezeichnet welche mit dem NEB Builder Assembly Tool mit den spezifischen Primer Sequenzen berechnet worden sind. X1 wird hierbei pro Zyklus um 2 °C gesteigert um dann X2 zu erreichen. Abkürzungen: PCR = polymerase chainreaction.

Funktion	**Temperatur**	**Dauer**	**Wiederholungen**
Intitiale Denaturierung	95 °C	3min	-
Denaturierung	98 °C	20 sec	6
Annealing	X1+2 °C	15 sec	
Extension	72 °C	1,5 min	
Denaturation	98 °C	20 sec	29
Annealing	X2 °C	15 sec	
Extension	72 °C	1,5 min	
Finale Extension	72 °C	5 min	-

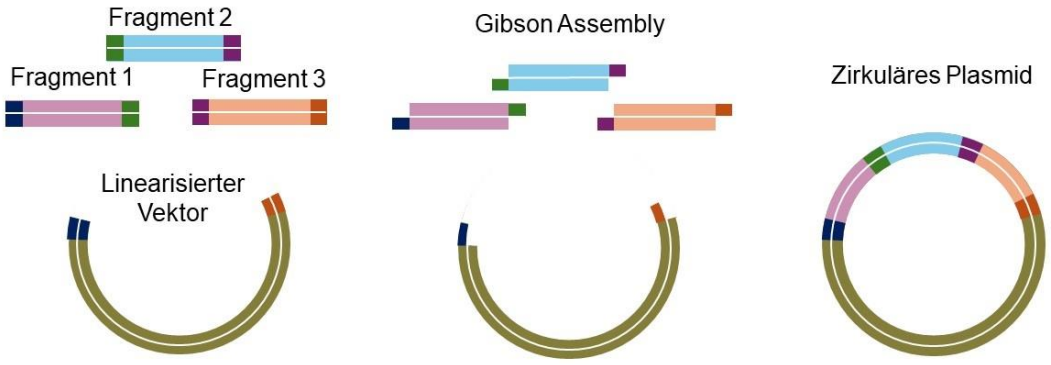


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Gibson Assemby, die unterschiedlichen Fragmente (in hellblau, rosa und orange) werden mithilfe sogenannter Sticky Ends (in dunkelblau, dunkelgrün, dunkellila und dunkelorange), also überlappender Seqeuenzen am Ende der Fragmente, aneinander und an den linear geschnittenen Vektor (olivgrün) fusioniert [28].

Die Primersequenzen sind unter Materialien aufgeführt. Das erste Fragment startet mit dem forward Primer (MEN1_dTAG_frg1_fwd) in der 5‘ Homologie Region und enthält die CRISPR cutting side, die Sequenz für das FKBP12^{F36V} HA Tags und P2A es endet mit dem reverse Primer (MEN1_dTAG_GFP_frg1_rev) am Beginn der GFP Sequenz. Hier beginnt das zweite Fragment mit dem forward Primer (MEN1_dTAG_GFP_frg2_fwd) und endet mit dem reverse Primer (MEN1_dTAG_GFP_frg2_rev) am Übergang zu der 3‘ UTR. In Fragment drei wird dies nun mit forward Primer (MEN1_dTAG_GFP_frg3_fwd) am GFP 3’UTR Übergang und reverse Primer (MEN1_dTAG_frg3_rev) am 3’UTR Plasmid Übergang, amplifiziert. Die mit X1 und X2 bezeichneten Temperaturen sind abhängig vom jeweiligen Primerpaar und wurden mit dem NEB Builder Assembly Tool berechnet. X1 ist 10 °C kälter als X2, da X1 pro Zyklus um 2 °C erhöht wird, bis X2 erreicht ist. Die Produkte werden auf einem 1 %-igen Agarosegel entwickelt und extrahiert. Die gereinigten PCR-Produkte und der verdaute Vektor können nun mit dem GIBSON Assembly Master-Mix (2X) bei 50 °C für 1 h in ein Plasmid transformiert werden. Anschließend erfolgt die Transformation in NEB5α kompetente E. coli nach dem von NEB zur Verfügung gestellten Protokoll. Die Plasmide werden nun mit einem MiniPrep isoliert und können sequenziert werden. Zeigt die Sequenzierung mithilfe der zur Amplifikation bereits genutzten Primer (5’homology_MEN1_fwd und 3’homology_UTR_rev) eine erfolgreiche Kombination der Sequenzen und des Vektors, kann nun ein Maxi-Prep durchgeführt werden. Die Plasmidkonzentration wird mit dem Nanodrop gemessen.

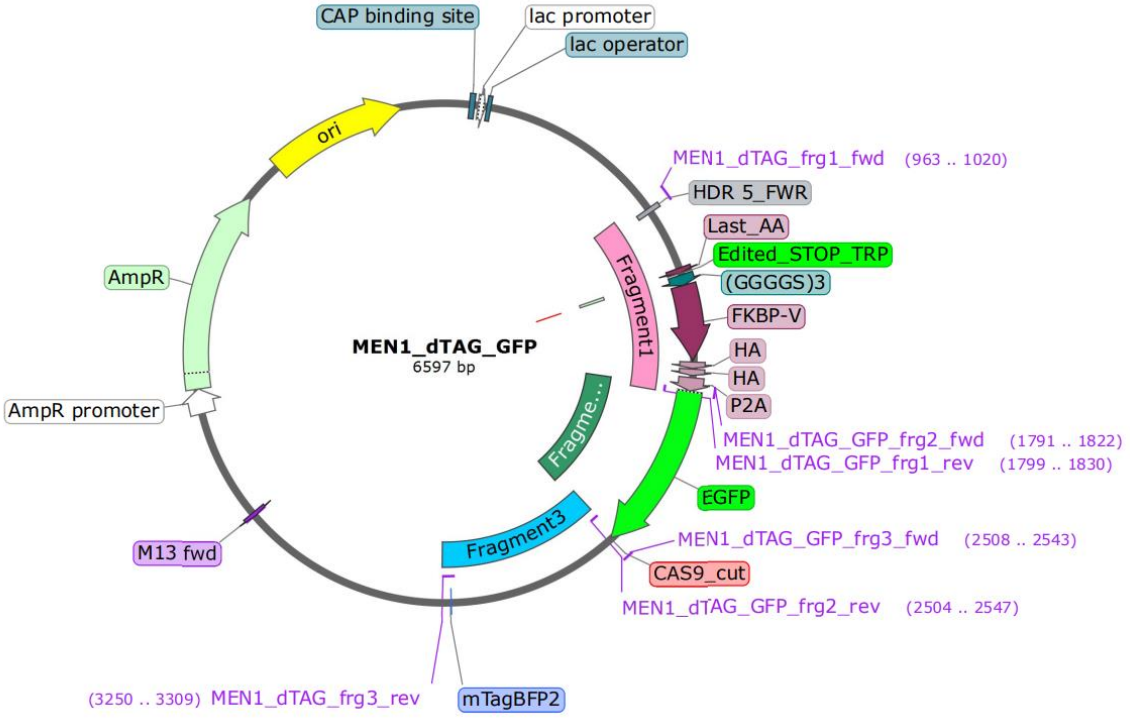


Abbildung 7: Die Abbildung zeigt das verwendete GFP-Plasmid mit farbig markierten funktionellen Abschnitten. Die in der PCR verwendeten Primer sind eingezeichnet und die entstehenden Fragmente nummeriert dargestellt. Dir CRISPR Ziel Sequenz und das PAM können aus Platzgründen zugunsten der Cas9 cutting site nicht dargestellt werden. (GGGGS)3 steht für die 15 Aminosäuren, die einen Adapter darstellen, um eine mögliche Funktionseinschränkung des MEN1 Proteins in dem neuen Chimärprotein einzuschränken. Abkürzungen: AA = amino acid; AmpR = Ampicillin resistence promoter; CAP = catabolite activator protein; CRISPR = Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; EGFP = enhanced green fluorescent protein; FKBP12^{F36V} = FK506 binding protein-VF36; fwd = forward; FWR: framework region; G = Glycin; HA = Human influenza hemagglutinin; HDR = Homologe DNA-Reparatur; lac = Laktose; M13 = M13 Bakteriophage; MEN1 = multiple endocrine neoplasia 1; ori = origin of replication; P2A = 2A Peptid; S = Serin. Das Plasmid-Design und somit auch diese Abbildung wurde mit der snapgene software von GSL Biotech LLC der Version 5.3.2. erstellt.

2.2.9.2. Erstellung des Single strand Homology directed repair template(ssHDRT)-dTAG-Vektors

Es wird eine weitere Methode zum Einbringen des Knock-ins verwendet die erstmals in [87] vorgestellt wurde: Anstatt ein Plasmid für die Transfektion zu verwenden, wurde ein Konstrukt aus einzelsträngiger DNA verwendet, da diese weniger toxisch für die Zelle ist als die doppelsträngige DNA des Plasmids. Außerdem hat dieses neue Konstrukt den Vorteil, dass es eine Bindungsstelle für die crRNA besitzt. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die crRNA und das HDRT an die richtige Stelle im Genom gelangen und der KI erfolgreich eingebaut werden kann. Der bereits gebundene crRNA-tracrRNA-Cas9-Komplex kann das ssHDRT an der crRNA-Bindungsstelle aufgrund eines bewusst eingebauten Mismatches in der Sequenz der Bindungsstelle nicht schneiden. Der Komplex wird

daher an die genomische Bindungsstelle im Zellkern der MM-Zelle gebracht, an die das ssHDRT gebunden ist.

2.2.9.2.1. Aufbau der PCR

Für die ssHDRT-Erstellung wurde den Angaben von Shy et al., 2023 gefolgt, die dieses Verfahren erstmals publizierten. Die Primersequenzen enthalten die folgenden farbig markierten Elemente. Sie wurden unter Verwendung der entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtssequenzen der crRNA und der Homologieregionen zusammengestellt. Um die für das ssHDRT verwendeten DNA-Einzelstränge herzustellen, wurde als Template das zuvor verwendetes dTAG Plasmid verwendet. Die verwendeten Primer starteten nun in der Homologie-Region des dTAG-Plasmides. Die endständigen Sequenzen müssen nun gegenläufig zu den unten beschriebenen Oligonukleotiden sein, welche das Anheften des RNP-Komplexes ermöglichen. Diese gegenläufigen Sequenzen sind im Beginn in der Primer Sequenz enthalten. Die folgenden Oligonukleotide wurden von Biomeres gekauft.

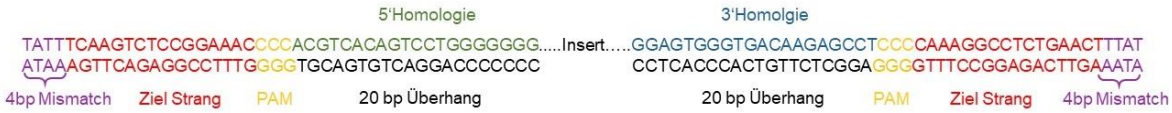


Abbildung 8: Die Abbildung zeigt den Aufbau der ssHDRTS, In Anlehnung an Shy et al. 2023. Die Farben kennzeichnen: Lila = 4bp mismatch; rot = 16bp Target Sequenz; gelb = PAM; grün = 5'Homologie; blau = 3'Homologie. Abkürzungen: bp = base pair; PAM = Protospacer adjacent Motif; ssHDRT = single strand Homology directed repair template.

Tabelle 20: Primer Sequenzen mit farbmarkierten Sequenzen. Farben: Lila = 4bp mismatch; rot = 16bp Target Sequenz; gelb = PAM; grün = 5'Homologie; blau = 3'Homologie. Abkürzungen: ssdTAG = singlestrand degradation TAG; PAM = Protospacer adjacent Motif; Oligo = Oligonukleotid; fwd = forward; rev = reverse; A = Adenin; T = Thymin; G = guanosine; C = Cytosin.

Bezeichnung	**Sequenz von 5' zu 3'**
ssdTAG_Primer_fwd_biotin	ATAAAGTTCAGAGGCCTTTGGGGTGCAGTGTCAGGACCCCCCC
ssdTAG_Primer_rev	ATAAAGTTCAGAGGCCTTTGGGGAGGCTCTTGTCACCCACTCC
ssdTAG_Oligo1	ATAAAGTTCAGAGGCCTTTGGGGTGCAGTGTCAGGACCCCCCC
ssdTAG_Oligo2	GGAGTGGGTGACAAGAGCCTCCCCAAAGGCCTCTGAACTTTAT

2.2.9.2.2. Produktion von biotinylierten ssHDTR

Die Kappa-Hifi-PCR wurde mit den folgenden Konzentrationen durchgeführt, wobei die Mischung mehrfach angesetzt wurde, um eine höhere Endausbeute zu erzielen.

Tabelle 21: Zusammensetzung der PCR zur ssDTAG Erstellung. Abkürzungen: DNA = Desoxyribonukleinsäure; ssdTAG = singlestrand degradation TAG; fwd = forward; rev = reverse; GFP = green fluorescent protein; PCR = polymerase chainreaction.

Substanz	**Menge für 1 Sample**
Destilliertes DNA freies Wasser	34,3 µl
5x KAPPA HiFi buffer	10 µl
dNTPs 10mM	1,5 µl
ssdTAG_Primer_fwd_biotin	1 µl
ssdTAG_Primer_rev	1 µl
KAPA HiFi DNA Polymerase	1,2 µl
DNA (dTAG-MEN1 GFP) 100nM	1 µl

Tabelle 22: PCR-Programm zur ssDTAG Erstellung. Abkürzungen: ssdTAG = singlestrand degradation TAG; PCR = polymerase chainreaction.

Temperatur in °C	**Dauer**	**Anzahl Zyklen**
95	3 min	1
98	20 sec	6
56 pro Zyklus +2	15 sec	
72	2 min 45 sec	
98	20 sec	39
66	15 sec	
72	2 min 45 sec	
72	5 min	1

2.2.9.2.3. Solid Phase Reversible Immobilisation (SPRI)-Aufreinigung der biotinylierten ssHDRT mit Ampure XP-Beads

Das Amplicon muss vor der Verwendung nicht nur gereinigt, sondern auch die Einzelstrang-DNA von der Doppelstrang-DNA (dsDNA) mithilfe von Solid Phase Reversible Immobilisation (SPRI) Beads getrennt werden. Die 1,8-fache Menge des PCR-Reaktionsvolumens wird zu den AMPure XP Beads gegeben. Die Mischung wird durch Pipettieren vermengt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend werden die Beads mit einem Magneten für 2 min von der klaren Lösung getrennt. Die geklärte Flüssigkeit wird bis zu einem Überstand von 5 µl abgesaugt. Anschließend wird die DNA mit Ethanol gereinigt, indem 700 µl 70%iges Ethanol, gelöst in destilliertem Wasser, zugegeben, 30 s bei RT inkubiert, vollständig abgesaugt und verworfen werden. Diese Prozedur wird einmal wiederholt. Anschließend werden die Eppendorf Tubes vom Magneten genommen und mit 70

µl H2O durch Pipettieren gemischt. Danach werden die Eppendorf Tubes für eine Minute auf dem Magneten fixiert, um die Beads von der Lösung zu trennen. Das Eluat wird in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt.

2.2.9.2.4. Einzelstrang Isolation

Für den nächsten Schritt, die Spaltung der dsDNA in ssDNA, wurde das Protokoll von Wakimoto et al., 2014 adaptiert. Zuerst müssen die dafür verwendeten Dynabeads vorbereitet werden, indem sie vortexturiert werden und 20 µl MyOne Streptavidin C1 Beads (Thermo Fischer) pro 1mol DNA in ein 1,5 ml Non Stick Tube gegeben werden. Der Überstand wird abgenommen und dreimal mit 1 ml 1X Binding Buffer gewaschen. Die gereinigte dsDNA wird zugegeben und das Volumen mit 1X B & W Puffer auf 1 ml aufgefüllt. Das Gemisch wird resuspendiert und für 30 min bei RT in einen Rotator gegeben. Nach Ablauf der Zeit werden die Beads für 1min bei maximaler Geschwindigkeit abgeschleudert. Anschließend werden sie für 5 min auf den Magneten gestellt und der Überstand wird abpipettiert. Die nun an die Streptaviridin-beschichteten Beads gebundene DNA (hier ist nur der biotinylierte Strang gebunden) wird nun in ssDNA aufgetrennt. 50 µl der frisch hergestellten Schmelzlösung werden mit den Beads mittels einer Winkelpipette resuspendiert und für 5 min auf den Magneten gelegt. Der Überstand enthält nun die gelösten ssDNA Fragmente und wird in 500 µl Neutralisationslösung gegeben. Die Zugabe der Melting Solution und die weiteren Schritte werden nun wiederholt und in die erste Neutralisationslösung gegeben.

Anschließend wird die Aufreinigung der DNA-Fragmente mit AMPure XP-Beads wie oben beschrieben wiederholt, um überschüssige biotinylierte Primer zu entfernen, wobei anstelle von 700 µl 70% Ethanol 1680 µl der gleichen Konzentration zum Waschen verwendet werden. Die DNA kann durch Zugabe von Isopropanol auf die für die Nukleofektion erforderliche Konzentration gebracht werden. Schließlich muss die ssDNA in Annealing Buffer gelöst werden, um mit den Oligonukleotiden zum fertigen HDRT umgesetzt zu werden. Die Konzentration wird mit dem Nanodrop gemessen die erreichte Konzentration liegt zwischen 400 und 500 ng/µl.

2.2.10. Nukleofektion

Um die RNP und RNP/DNA Komplexe in die Zellen einzubringen, wird die Nukleofektion genutzt. Die Vorbereitung beginnt mit dem Vorwärmen von 3 ml Zellmedium in 6 Well Plates und dem Auszählen von 5 Millionen Zellen.

Herstellung der RNP-Komplexe

Mit der Kombination von crRNA und tracrRNA, die jeweils in einer Konzentration von 200 µM bei -20 °C gelagert werden, wird begonnen. Ein 1:1 Gemisch (2 µl pro Experiment) mit der gleichen Menge Nuclease Free Duplex Buffer wird hergestellt und für 2 Minuten auf 95 °C erhitzt. Sobald der Mix abgekühlt ist, können 6 µl entnommen und mit 2,42 µl Cas9 pro Experiment gemischt werden. Der RNA-Protein-Mix wird für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit können jeweils 5 µl Zellen abzentrifugiert und in PBS gewaschen werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden 3 µg Plasmid zugegeben und anschließend mit den in 100 µl SF-Buffer gelösten Zellen gemischt. Es ist wichtig, dass die Resuspension ohne Blasenbildung erfolgt, da diese den Nukleofektionsprozess stören. Die fertige Mischung kann nun in die vorbereiteten Reaktionsküvetten gegeben und mit dem entsprechenden Programm im 4D nucleofector transfiziert werden. Anschließend werden die Zellen mit 750 µl des vorgewärmten Mediums gespült und dann mit Einmalpipette in die Platten gegeben. Die Zellen wurden noch am selben Tag in ein größeres Gefäß überführt, um optimale um maximales Wachstum zu gewährleisten.

Tabelle 23: Liste der Zelllinien (Eigennamen) und des zugehörigen Nukleofektions Codes. Wobei es für die Zelllinie U266 einen geeigneten Code bereits in den Einstellungen des Amaxa 4D Nucleofectors gibt.

Zelllinie	**Nukleofektions Code**
L363	EH-100
U266	DY100

MEN1 tandem gRNA Knock-out

Durch die Verwendung von zwei verschiedenen crRNAs, deren Zielbereiche etwa 100 Basenpaare voneinander entfernt sind, konnte eine Steigerung der Knockout-Effizienz erreicht werden.

Für die CRISPR/Cas9 KO Experimente wurden andere Volumina verwendet, um so eine höhere Konzentration von RNA zu Cas9 zu erreichen. So werden 3 µl jeder RNA pro Experiment verwendet und der Nuclease free Duplex Buffer wird mit 6 µl angepasst, aber die Cas9 Menge wird nicht verändert. Dies geschieht, um eine höhere RNA-zu-Protein-Konzentration zu erhalten. Es wurden zwei verschiedene crRNAs verwendet, um eine höhere KO-Effizienz zu gewährleisten [83]. Das jeweilige Volumen beträgt dementsprechend 1,5 µl, die Annealing der

verschiedenen crRNAs mit der tracrRNA erfolgt in getrennten Reaktionsgefäßen, die zur Bildung des RNP-Komplexes im Verhältnis 1:1 gemischt werden.

Um ausschließen zu können, dass Effekte auf die Methode selbst zurückzuführen sind, wurde als Kontrolle ein KO in der TNNI3-Genregion erzeugt. TNNI3 ist der Isotyp des Muskelproteins Troponin I, der ausschließlich im Herzen exprimiert wird und hier als geeigneter Vergleich dient, da eine Veränderung des Gens keine bekannten Auswirkungen auf hämatologische Zellen hat[86].

2.2.11. Amplifikation von zellulärer DNA

DNA-Extraktion

Die DNA Extraktion wurde gemäß den Anweisungen des verwendeten DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen) durchgeführt. Wenn möglich, wurden 1 Million Zellen verwendet. Diese Methode wurde als Vorbereitung für die Vermehrung und anschließende Sequenzierung der nukleofizierten Zellen verwendet.

Amplifikation der bearbeiteten DNA-Stellen: Die editierten DNA-Teile wurden mit Primerpaaren amplifiziert, die sich 3' und 5' von den Stellen befanden, auf die die erste bzw. zweite tandems crRNAs abzielten. Tabelle 24: Zusammensetzung des Master-Mix zur PCR von zellulärer DNA. Abkürzungen: DNA = Desoxyribonukleinsäure; PCR = polymerase chainreaction; fwd = forward; rev = reverse; dNTPs = desoxyribonukleosid-triphosphates; TAQ Polymerase = Taq-Polymerase; g = Guanin; c = Cytosin; DMSO = Dimethylsulfoxid.

Substanz	**Menge für 1X**
Destilliertes DNA freies Wasser	16.8 µl
5x green	5 µl
10mM dNTPs	0,5 µl
Primer fwd 25 µM MEN1_NUCL_fwd / TNNI3_fwd	0,25 µl
Primer rev 25 µM MEN1_NUCL_rev / TNNI3_rev	0,25 µl
TAQ Polymerase	0,2 µl
DMSO (für hohe GC Konzentration)	1,25 µl

3 µl des Mixes werden in die PCR-Gefäße gegeben und jeweils 100 ng DNA zugegeben. In den meisten Fällen beträgt das Volumen der im Elution Buffer gelösten DNA 1-2 µl.

Tabelle 25: PCR-Programm zur Amplifikation zellulärer DNA. Abkürzungen: PCR = Polymerase Kettenreaktion; DNA = Desoxyribonukleinsäure; DMSO = Dimethylsulfoxid.

Temperatur	**Zeit**	**Wiederholungen**
94 °C	2min	-
94 °C	15 sec	35
51 °C (wenn DMSO zugegeben wird nur 48 °C)	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	2 min	-

Das Amplicon wurde auf einem 1% Agarose Gel getrennt, ausgeschnitten und dann aus dem Gel wieder eluiert und gereinigt (QIAquick Gel Extraktion kit). Die anschließenden Sanger-Sequenzierungen wurden von Eurofins durchgeführt.

2.2.12. Determinierung der KO-Effizienz

Die KO-Effizienz wurde mithilfe der Sanger Sequenzierungsdaten über das Online-Tool Synthego ICE Analysis tool (https://ice.synthego.com/#/) berechnet. Durch Verwendung einer Kontroll-Sequenz können die veränderten Sequenzen quantifiziert und in ihrer Qualität untersucht werden. So lassen sich frame-shift Mutationen und große Deletionen über 21 bp, die für die Funktion des Gens entscheidend sind, von kleinen funktionell unbedeutenden unterscheiden. Der Anteil nicht-modifizierter Sequenzen kann auch exakt ermittelt werden [14]. Die Werte wurde über Excel und Prism im Verlauf weiter analysiert.

1.1.1. Verwendung von öffentlich zugänglichen Datenbanken

Online-Datenbanken von KO-Experimenten oder der Analyse von Patienten Gewebe zeigen die Relevanz von Genen im Kontext unterschiedlicher onkologischer Entitäten oder anderer Gene. Genevesitgator (Nebion, Version 9.0.0) ist eine öffentlich zugängliche Datenbank, die die Genexpression in verschiedenen onkologischen Patientenproben mit Microarray-Untersuchungen zeigt. So kann u.a. Interaktionen von unterschiedlichen Genen in diversen Hämatologien, aber auch gesundem Gewebe beurteilt werden [30].

Um die Rolle spezifischer Gene im onkogenen Programm des MM abzuschätzen, wurde die Dependency Map (DepMap-Datenbank: https://depmap.org/portal/) verwendet, die Daten aus genomweiten GRISPR/Cas9 loss-of-function Experimenten enthält. Hier wurden die Daten aller AML-, B-ALL- und MM-Zelllinien

genutzt, die auf der Datenbank verfügbar waren. DepMap berechnet "Gene-Effect-Scores", um die Auswirkungen des Ausschaltens eines Gens auf die Proliferation und das Überleben der jeweiligen Zelllinie mit Hilfe der Chronos-Algorithmen zu berechnen. Die Daten werden anhand von Daten allgemeiner essenzieller und nichtessenzieller Gene normalisiert, so dass ein Wert von 0 keine Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit signalisiert und ein Wert von -1 dem mittleren Effekt bekannter allgemeiner essenzieller Gene entspricht. Negative Werte stehen für Zelllinien, die am sehr stark von dem Gen abhängig sind.[66]

1.1.2. Statistische Analyse

Sämtliche statistischen Auswertung, wurden mithilfe von Graph Pad PRISM9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA; RRID:SCR_002798) und Excel (Microsoft Office 2019) ausgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Abhängigkeit des Multiplen Myeloms von MEN1

Obwohl MEN1 in neuro-endokrinen Tumoren als Tumorsuppressor wirkt, ist die Funktion des Gens in hämato-onkologischen Erkrankungen umgekehrt. Die Aufrechterhaltung der Expression ist essenziell für bekannte Leukämieerkrankungen und das Protein spielt eine wichtige Rolle in einer Vielzahl grundlegender zellulärer Prozesse. Im Weiteren werden die Auswirkungen einer MEN1-Depletion auf MM-Zelllinien erläutert.

3.1.1. Korrelation zwischen MLL-Translokationen und Menin Abhängigkeit in AML, B-ALL und MM

Zunächst wurde die öffentliche Online-Datenbank DepMap, die Daten von genomweiten CRISPR-KO-Studien in Zelllinien verschiedener onkologischer und physiologischer Gewebe zur Verfügung stellt, genutzt. Hier zeigte sich zunächst, dass von den acht zellulären Entitäten, die die stärkste Abhängigkeit von MEN1 besitzen, sieben eine hämatologische Herkunft aufweisen. So nimmt das Plasmazell-Myelom sogar den Vierten Platz in dem Ranking ein. Um zu erkennen, ob das Vorhandensein einer $MLLr^+$ für die hier beobachtete Abhängigkeit ausschlaggebend ist, wird das Auftreten und die Stärke einer MEN1 Abhängigkeit in AML und B-ALL Zelllinien verglichen. Die sehr stark MEN1 abhängigen AML-Zelllinien zeigen hier mit $p<0{,}001$ eine Korrelation zwischen dem Auftreten einer $MLLr^+$ und einer Sensitivität gegenüber dem MEN1 KO. Somit ist erkennbar, dass die Zelllinien, die sich als besonders sensitiv erweisen, $MLLr^+$ sind. Für die B-ALL Zelllinien gilt dies nicht mehr, hier sind die $MLLr^+$ zwar unter den Sensitiveren, aber es gibt keinen Hinweis auf eine strenge Korrelation. Schließlich zeigen die untersuchten MM-Zelllinien, von welchen keine ein Rearrangement aufweist, eine hohe Korrelation zu MEN1. So waren bei 5 von 21 MM-Zelllinien der „gene-effect“ kleiner als -1.

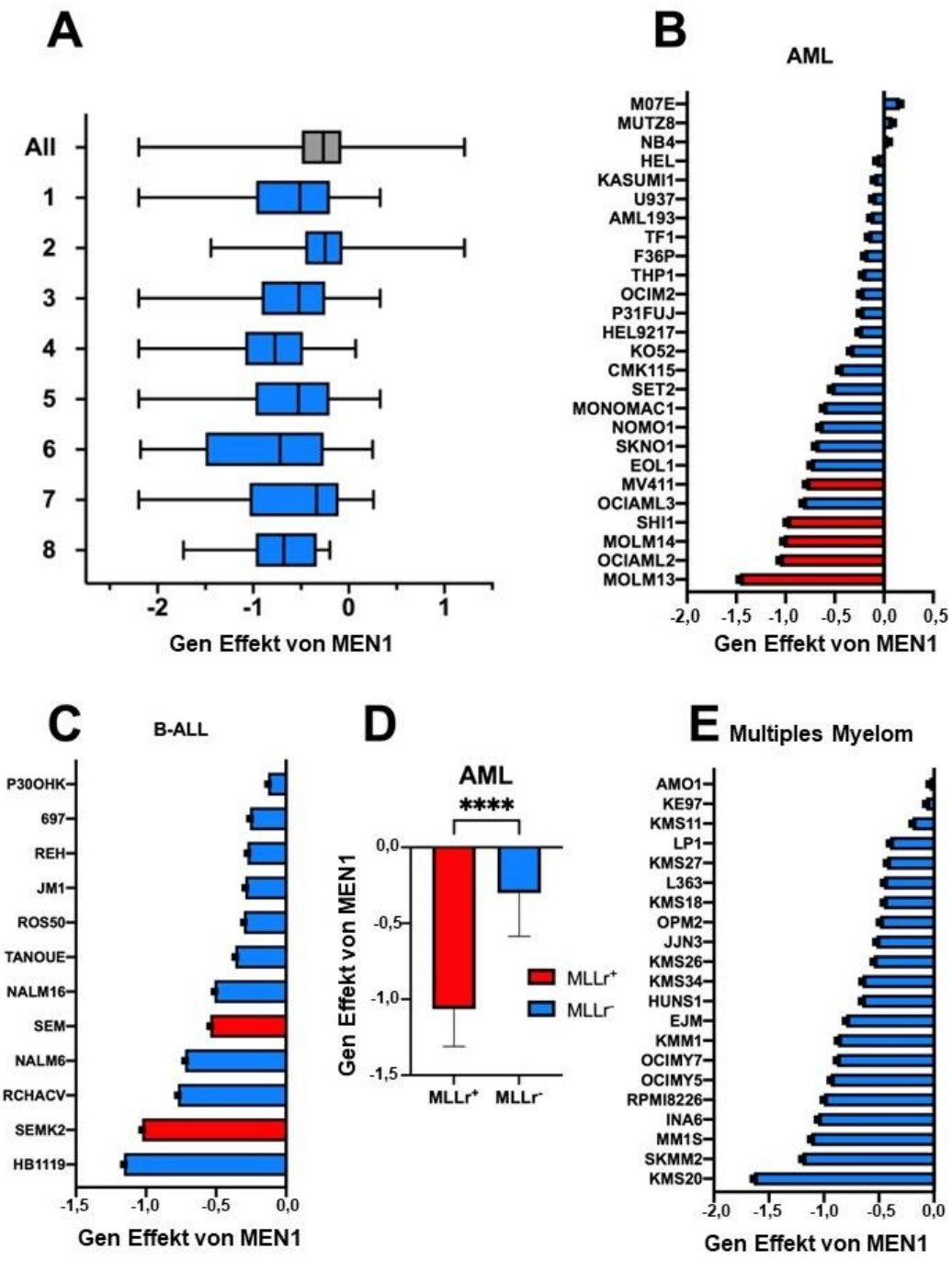


Abbildung 9: Daten aus der DepMap Datenbank (broad institute), die mittels CRISPR-KO-Screening gewonnen wurden, zeigen die unterschiedliche Abhängigkeit von Zelllinien, verschiedener hämato-onkologischer Entitäten, von MEN1. Der "Gen Effekt" gibt dabei an, ob das Gen für die jeweilige Zelllinie essenziell ist. Ein Wert von -1 signalisiert ein essenzielles Gen, bei 0 ist kein Effekt zu erwarten. In A sind die Zelllinien nach absteigender Effektstärke dargestellt, die eine erhöhte Abhängigkeit von MEN1 mit p<0,0005 zeigen: 1. hämatopoetische und lymphoide Zellen; 2. solides Gewebe; 3. lymphoide Zellen; 4. Plasmazell-Myelom; 5. Non-Hodgkin-Lymphom; 6. diffuses großes B-Zell-Lymphom; 7. myeloide Zellen; 8. B-Lymphoblastenzellen. In B-D sind die MLL+ Zelllinien in AML und B-ALL Zelllinien rot markiert. Blau in B-E kennzeichnet Zelllinien, die kein KMT2A-Rearrangement aufweisen. Der Mann-Whitney Test in (D) zwischen AML, MLL+ und nicht mutierten Zelllinien ist hoch signifikant mit p<0,001. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad PRISM 9.1. Der hier gezeigte Datensatz wurde erhalten durch: CRISPR (DepMap 22Q4, Chronos, https://depmap.org/portal/gene/MEN1?tab=overview, 28.02.2023). Die Abbildung wurde in abgeänderter Form bereits veröffentlicht: Wolffhardt et al. 2023, lizenziert unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. Abkürzungen: AML = Akute Myeloische Leukämie; B-ALL = B-Zell Akute Lymphatische Leukämie; MLLr+ = Zelllinien mit KMT2A rearrangement; Mllr- = Zelllinien ohne KMT2A rearrangement.

Dies weist auf eine starke Abhängigkeit der MM-Zellen auch ohne das Vorliegen einer KMT2A Mutation hin.

3.1.2. shRNA Knockdown bestätigt die Abhängigkeit von Menin in MM-Zelllinien

Um die Abhängigkeit von MEN1 in MM-Zelllinien zu bestätigen, wurden in Vorarbeiten konstruierte shRNA Vektoren verwendet. Die Ergebnisse wurden jeweils mit einer Non-Targeting-Kontrolle verglichen. Die Effizienz des Knockdowns wurde mittels Immunoblot bestätigt. Die Zellen wurden lentiviral transduziert und für die Proteinextraktion und Apoptose Messungen 4 Tage nach Transduktion mit dem Se3 Cellsorter sortiert. Dazu wurde die Expression des im Plasmid enthaltenen RFP genutzt. Die sortierte Population transduzierter Zellen wurde nach einer dreitägigen Kultivierung, um den zellulären Stress zu reduzieren, mit den Apoptosemarkern Annexin-V-FITC und PI behandelt und mittels FACS-Messungen ausgewertet. Die Apoptosewerte in der Versuchsgruppe wurden auf die Werte in der Kontrollgruppe normalisiert, um die spezifische Apoptose durch die Behandlung mit den MEN1 shRNAs nachzuweisen.

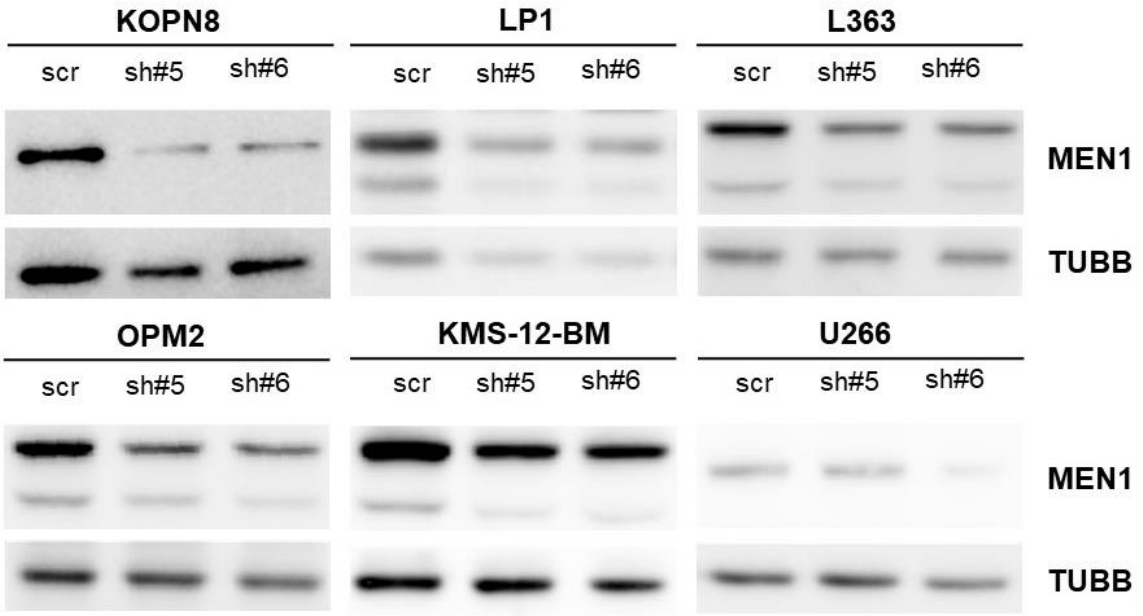


Abbildung 10: Immunoblot der mit gegen MEN1 gerichteten shRNAs behandelten MM-Zellen. Der Immunoblot wurde mit antiMEN1 und antiTUBB Antikörpern behandelt, um den KD auf Protein Ebne zu verifizieren. Alle Zellinien sind vom Multiplen Myelom ausgenommen KOPN8, eine B-ALL Zelllinie. Die MEN1 Banden liegen bei 68-70 kda, die TUBB Banden bei 50 kda. Hier wird ein Immunoblot stellvertretend für n = 3 Durchführungen gezeigt. Die Bilder wurden bereits veröffentlicht: Wolffhardt et al. 2023, lizenziert unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. Abkürzungen: scr = scrambled, non-targeted control; sh# = small hairpin ribonucleic acid; MEN1 = multiple endocrine neoplasia; TUBB = Tubulin beta class 1; B-ALL = b acute lymphoblastic leukemia; KD = knock-down; n = Anzahl.

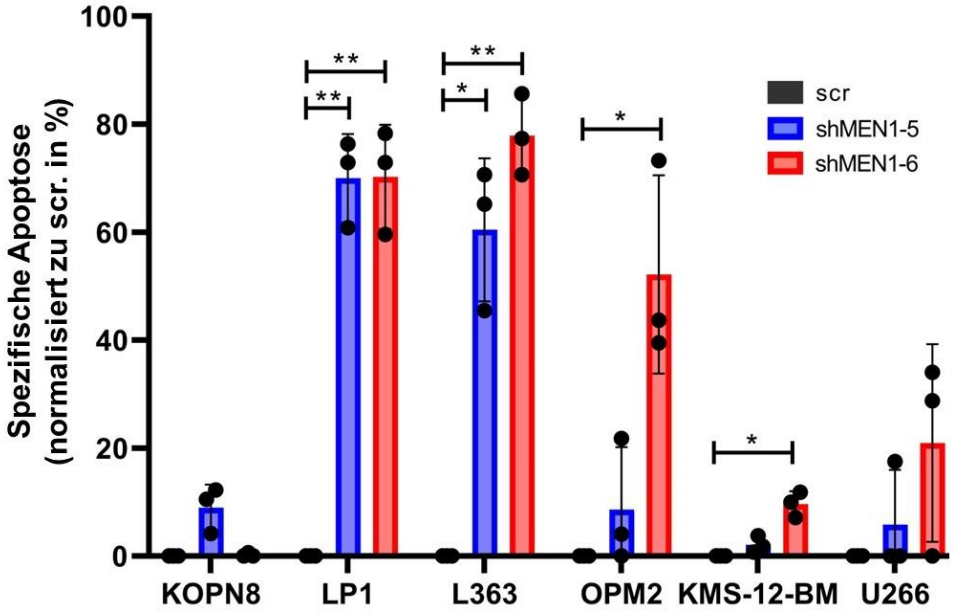


Abbildung 11: Spezifische Apopotose von MM Zelllinien nach Behandlung mit gegen MEN1 gerichteten shRNAs, n = 3. Nach der Transduktion mit der entsprechenden shRNA wurden die Zellen am vierten Tag mit dem S3e Cellsorter nach dem von ihnen exprimierten RFP sortiert. Drei Tage später wurden die Zellen mit PI und Annexin-V-FITC behandelt, deren Expression mittels FACS analysiert wurde. Anschließend wurden die unmarkierten und damit lebenden Zellen der jeweiligen Population identifiziert und mit der Kontrolle normalisiert. Die hier gezeigte spezifische Apoptoserate wurde mit der in 2.2.4 vorgestellten Formel berechnet. Die Sterne zeigen die Signifikanz im paired t-test: 1 Stern = p<0,05; 2 Sterne = p<0,01; 3 Sterne = p<0,005. Die Grafik wurde in abgeänderter Form bereits veröffentlicht Wolffhardt et al. 2023, lizenziert unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. Abkürzungen: sh = small hairpin; MEN1 = multiple endocrine neoplasia 1; RNA = Ribonukleinsäure; RFP = Rot fluroreszierendes Protein; PI = propidiumiodide; FACS = Durchflusszytometrie; n = Anzahl.

Die Apoptose-Messungen zeigten eine signifikant erhöhte Menge an spezifischer Apoptose nach Behandlung mit beiden der MEN1-spezifischen shRNAs, wobei ein tendenziell stärkerer Effekt mit shMEN1#6 beobachtet werden konnte. Der Effekt war am stärksten in den Zelllinien L363, LP1 und OPM2. Als positive Kontrolle diente die $MLLr^+$ B-ALL-Zelllinie KOPN8.

Die Grundpopulation der transduzierten Zellen wurde alle 3 Tage auf den Anteil RFP-exprimierender, d.h. Menin defizienter Zellen mittels FACS-Messungen untersucht. Die prozentualen Anteile wurden jeweils auf die erste Messung normiert,

so dass eine Dynamik im Verlauf des Wachstums der Zellpopulationen festgestellt werden konnte.

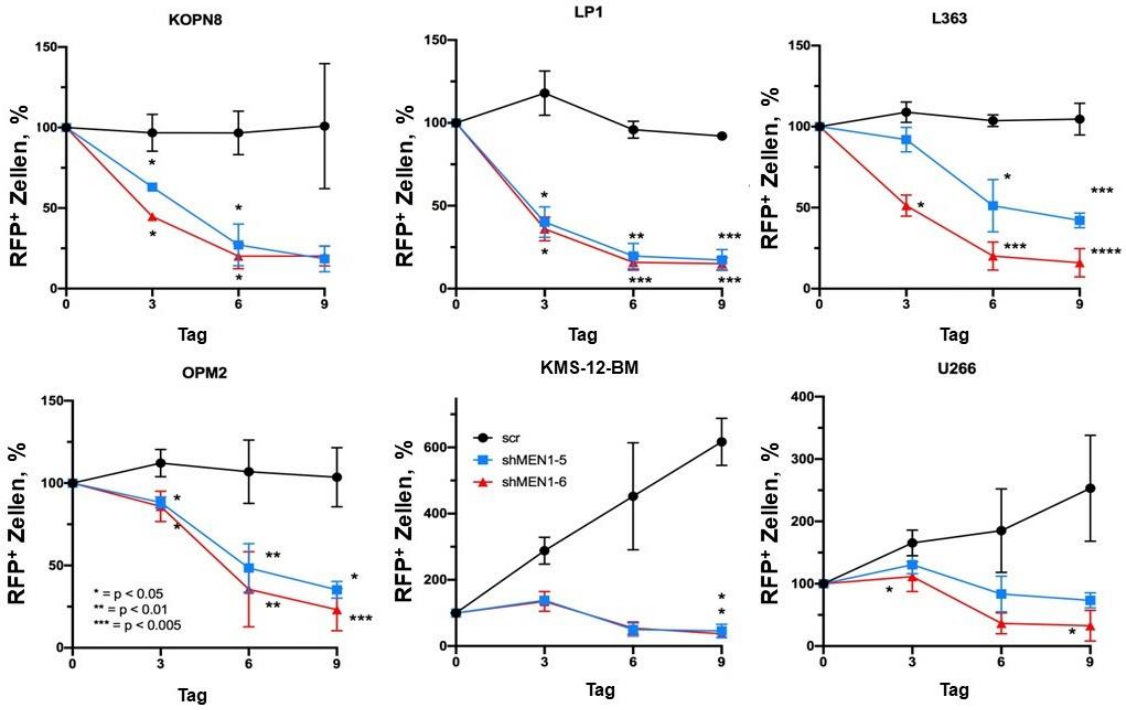


Abbildung 12: Kompetitive Wachstumsanalysen der mit gegen MEN1 gerichteten shRNAs behandelten MM Zellen, n = 3. Durch regelmäßige FACS-Messungen der relativen RFP positiven Zell Population wurde die Wachstumsdynamik der MEN1-KD-Population im Vergleich zur non-targeting Kontrolle gemessen. In rot ist die shMEN1#5 gezeigt und in blau die shMEN1#6. Die Sterne zeigen die Signifikanz im paired t-test: 1 Stern = p<0,05; 2 Sterne = p<0,01; 3 Sterne = p<0,005. Die Grafik wurde bereits veröffentlicht, Wolffhardt et al. 2023, lizenziert unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. Abkürzungen: sh = small hairpin; MEN1 = multiple endocrine neoplasia 1; RNA = Ribonukleinsäure; RFP = Rot fluroreszierendes Protein; FACS = Durchflusszytometrie; scr = scrambled, non-targeting control; KD = knock-down; n = Anzahl.

Um die Auswirkungen der MEN1-Depletion auf die Fitness von MM-Zellen zu untersuchen, wurde ein kompetitiver Wachstumstest durchgeführt. Der Anteil RFP⁺ Zellen in der Gruppe, die mit MEN1-spezifischen shRNAs transduziert wurden, nimmt in allen Zelllinien deutlich ab und zeigt eine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrolle. Auch hier ist der Effekt bei shMEN1#6 tendenziell signifikanter. In der B-ALL-Linie sind nun auch signifikante Einbrüche im kompetitiven Zellwachstum sichtbar. Sowohl die Zelllinie KMS-12-BM als auch in geringerem Maße U266 zeigen einen Anstieg der relativen RFP⁺ Zellpopulation in der Kontrolle. Dies ist überraschend, da durch die Verwendung der Kontroll-shRNA eigentlich keine Veränderung zu erwarten war, der Effekt jedoch in diesen Zelllinien

in allen Replikaten vergleichsweise konstant auftrat. Am vielversprechendsten sind die Ergebnisse in LP1, L363 und OPM2.

3.1.3. CRISPR CAS9 Gen Editing zeigt MEN1 Abhängigkeit

Um die unerwarteten Daten, die die KD Experimente zeigten, mit Sicherheit bestätigen zu können, wurden zusätzlich zu den shRNA-KD CRISPR Cas9 Genmodifikationen verwendet. Dabei wurden zwei unterschiedliche crRNAs verwendet, deren Zielbereiche beide im ersten kodierenden Exon von MEN1 liegen.

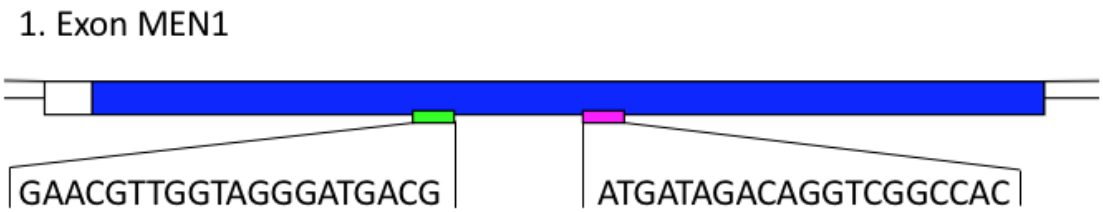


Abbildung 13: Darstellung des ersten Exons von MEN1 und der Sequenzen der beiden crRNAs, die für die CRISPR/Cas9 KO-Experimente verwendet wurden, erstellt mit Gene Palette (University of California, Version 2.1.1.). In blau das erste Exon von MEN1; in grün crRNA#3, in pink crRNA#1. Die Grafik wurde bereits veröffentlicht, Wolffhardt et al. 2023, lizenziert unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. Abkürzungen: MEN1 = multiple endocrine neoplasia 1; G = Guanin; A = Adenin; C = Cytosin; T = Thymin; crRNA = Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats ribonucleic acid.

Die Nukleofektion als Methode zur Einführung des RNP-Konstruktes musste zunächst für die verwendete Ziellinie optimiert werden. Hierfür steht ein geeignetes Protokoll des Herstellers des Nukleofektionszubehörs (Lonza) zur Verfügung. Die Zellen werden mit fluoreszenzmarkierten RNP-Konstrukten mit verschiedenen Versionen der Nukleofektionslösung und des Elektroporationsprogramms behandelt. Die Lebensfähigkeit der Zellen und die Effizienz der Insertion werden mit FACS-Messungen untersucht. Für die Zelllinie L363 erwies sich das Programm EH 100 mit SF-Solution als am besten geeignet.

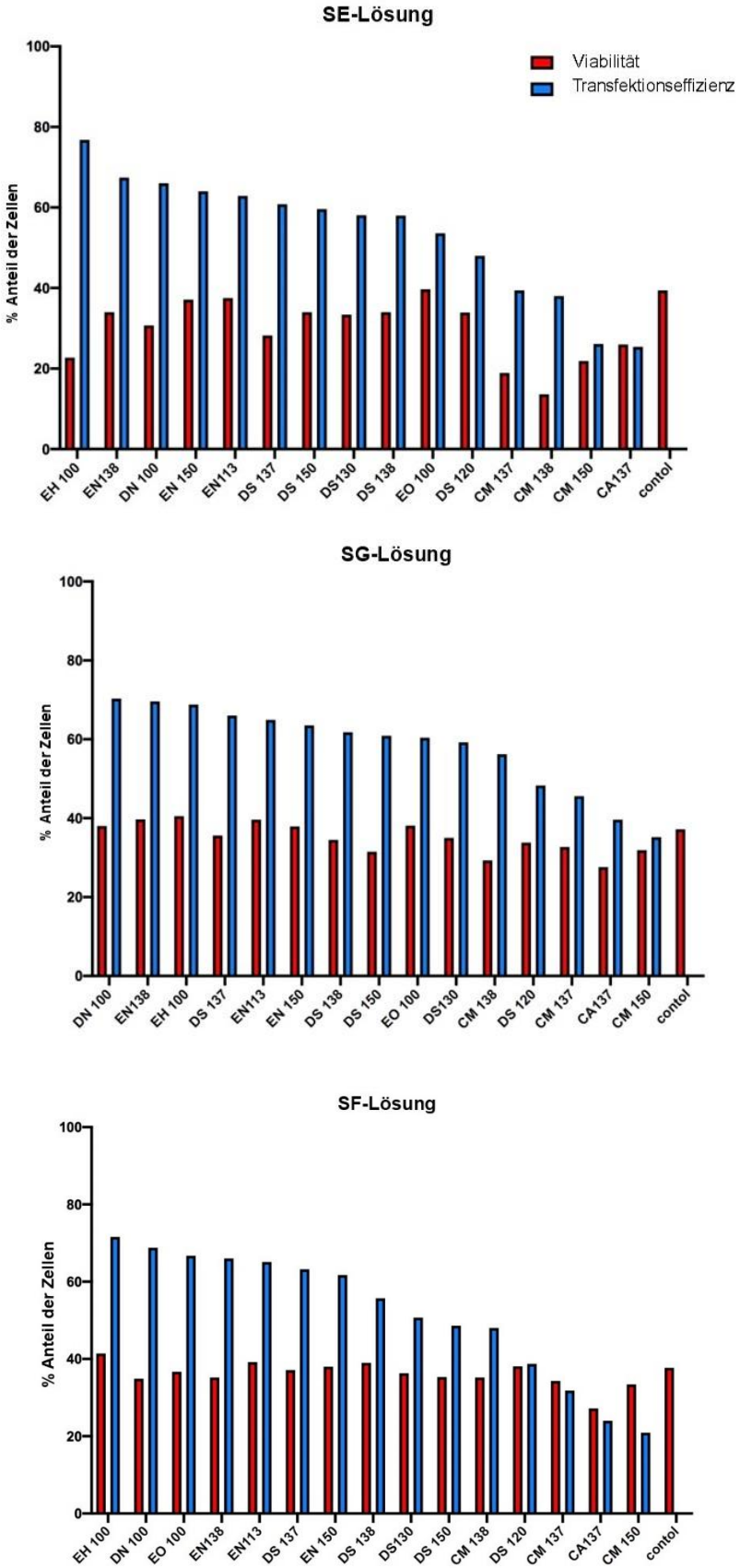


Abbildung 14: Darstellung der Nukleofektionscodes absteigend nach Transfektionseffizienz sortiert in den verschiedenen Lösungen bei der Transfektion der Multiplen Myelom-Zelllinie L363, n = 1. Die Zellen wurden mit ATTO 550 markierten RNP-Konstrukten transfiziert. Der EH100 Code mit der SF-Lösung zeigt die besten Werte in der Kombination von Zellviabilität und Nukleofektionseffizienz. In rot die prozentuale Viabilität; in blau die prozentuale Transfektionseffizienz. Abkürzungen: RNP = ribonucleoprotein; n = Anzahl.

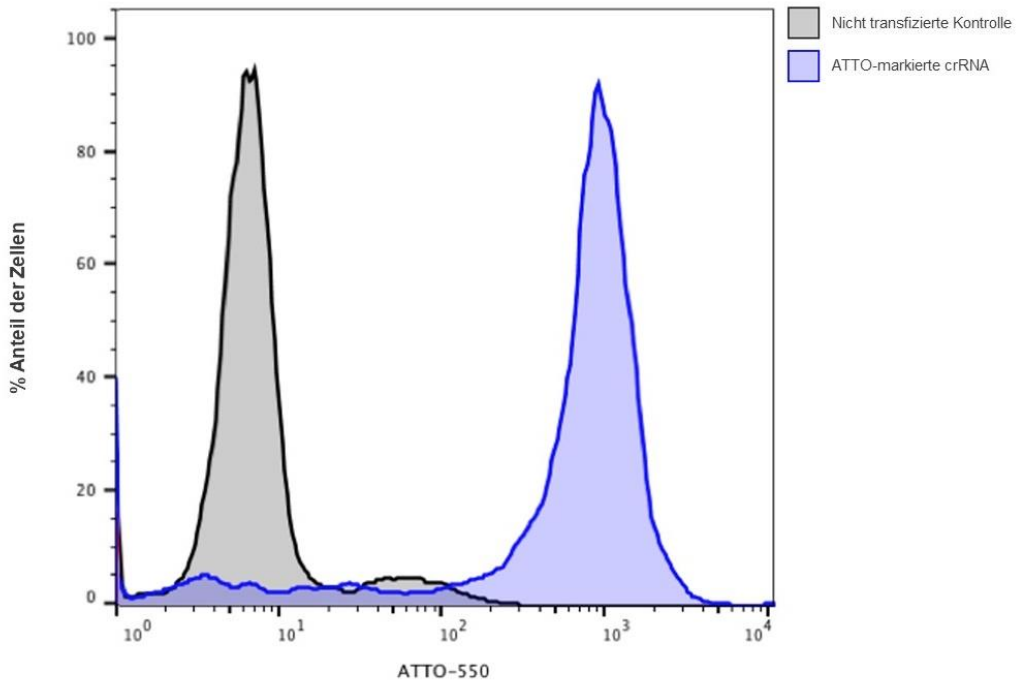


Abbildung 15: Fluoreszenz nach ATTO 550 Markierung, n = 1. Die unterschiedliche Expressionsstärke von ATTO 550 bestätigt die Effizienz der Nukleofektion mit den ATTO 550 markierten RNP-Konstrukten im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die hier gezeigten Zellen wurden zuvor über FSC und SSC gegated, die Auswertung erfolgete mit FlowJo (Beckton Dickinson, Version 10.8.1.). Das Bild wurde aus dem englischen übersetzt. Abkürzungen: FSC = forward-scatterd light; SSC = side-scatterd light; RNP = ribonucleoprotein; n = Anzahl.

Die Effizienz der Nukleofektion mit MEN1 spezifischen crRNAs wurde durch die Verwendung einer Fluoreszenz (ATTO-550) markierten tracrRNA ein weiteres Mal bestätigt. Die Wirkung der crRNA konnte auch auf Protein Ebne durch Immunoblot nachgewiesen werden, wobei aufgrund des in der Zellpopulation teilweise nur heterozygoten oder gar nicht erfolgten KO immer noch Protein erkennbar ist. Im Weiteren konnten unterschiedliche prozentuale Mengen von nukleofizierten Zellen erreicht werden, die jeweils über 60% bei dem MEN1 KO lagen.

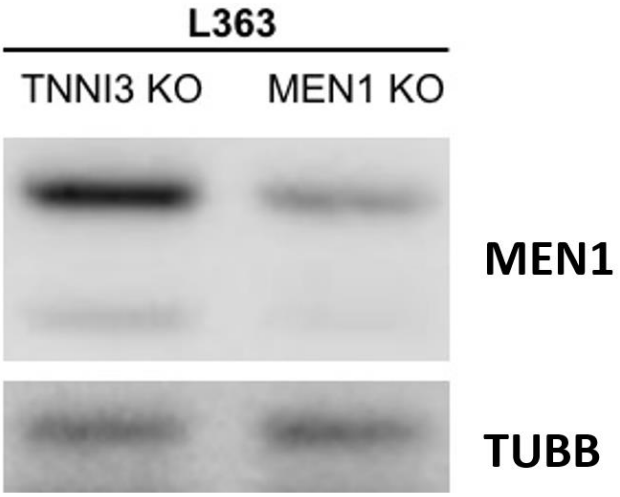


Abbildung 16: Immunoblot der KO und wildtyp Zellen der Zelllinie L363. Der Immunoblot wurde mit antiMEN1 und antiTUBB Antikörpern behandelt, um den KO auf Protein Ebene zu verifizieren. L363 ist eine Multiple Myelom Zelllinie. Die MEN1 Banden liegen bei 68-70 kda, die TUBB Banden bei 50 kda. Die Zellpopulation von der die hierfür verwendeten Proteine gewonnen wurden, bestand aus KO-Zellen und wildtyp-Zellen. Der Immunoblot steht stellvertretend für n = 3 durchgeführte Versuche. Die Grafik wurde bereits veröffentlicht, Wolffhardt et al. 2023, lizenziert unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. Abkürzungen: TNNI3 = Troponin I; MEN1 = multiple endocrine neoplasia; TUBB = Tubulin beta class 1; KO = knock-out; n = Anzahl.

Um den Prozentsatz der KO-Allele zu bestimmen, wurde DNA extrahiert, die betreffende Region amplifiziert und sequenziert. Die Sanger-Sequenzierungsdaten zeigen als Chromatogramm die überlappenden Mehrfachsequenzen der mutierten Versionen im Vergleich zur Sequenz der Wildtyp-Kontrolle.

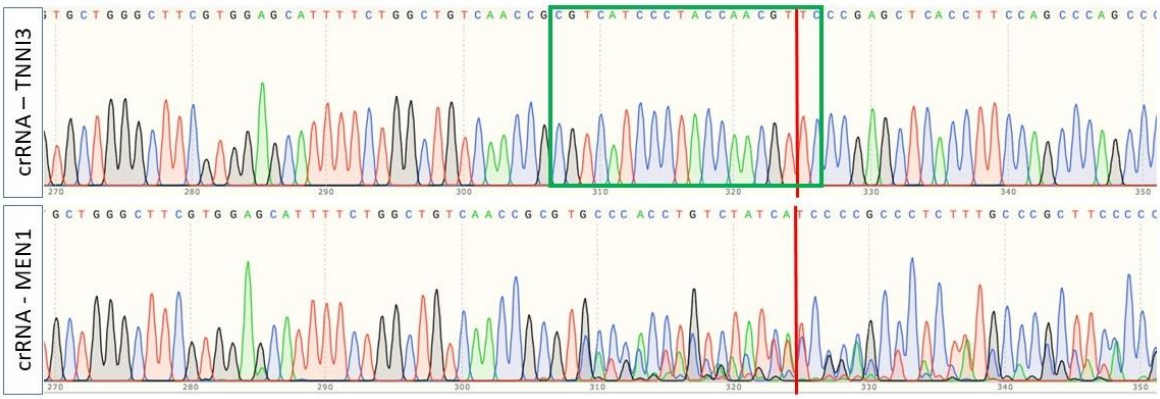


Abbildung 17: Sequenzierungsdaten als Chromatogramm; oben: Kontroll-Zellpopulation behandelt mit TNNI3-crRNAs, im grünen Kasten die Sequenz der crRNA und die rote Linie die cutting side der Cas9; unten: DNA aus der Versuchsgruppe, behandelt MEN1-crRNAs. Die dargestellte Sequenz entspricht dem Beginn des ersten kodierenden Exons von MEN1. Abkürzungen: crRNA = Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats ribonucleic acid; MEN1 = multiple endocrine neoplasia 1; TNNI3 = Troponin I.

Der Prozentsatz der CRISPR-modifizieren Zellen wurde über das Online-Tool Synthego ICE Analysis errechnet. Als modifiziert werden Mutationen die größer als 21 bp sind oder einen Frame-Shift induzieren, erkannt. Die Zelllinie L363 scheint wenige (<1%) bis keine Mutationen zu haben, die eine geringe Anzahl von Basenpaaren betreffen und keine Frame-Shift-Mutation darstellen, daher wurde im Folgenden die Anzahl der nicht mutierten Zellen verwendet.

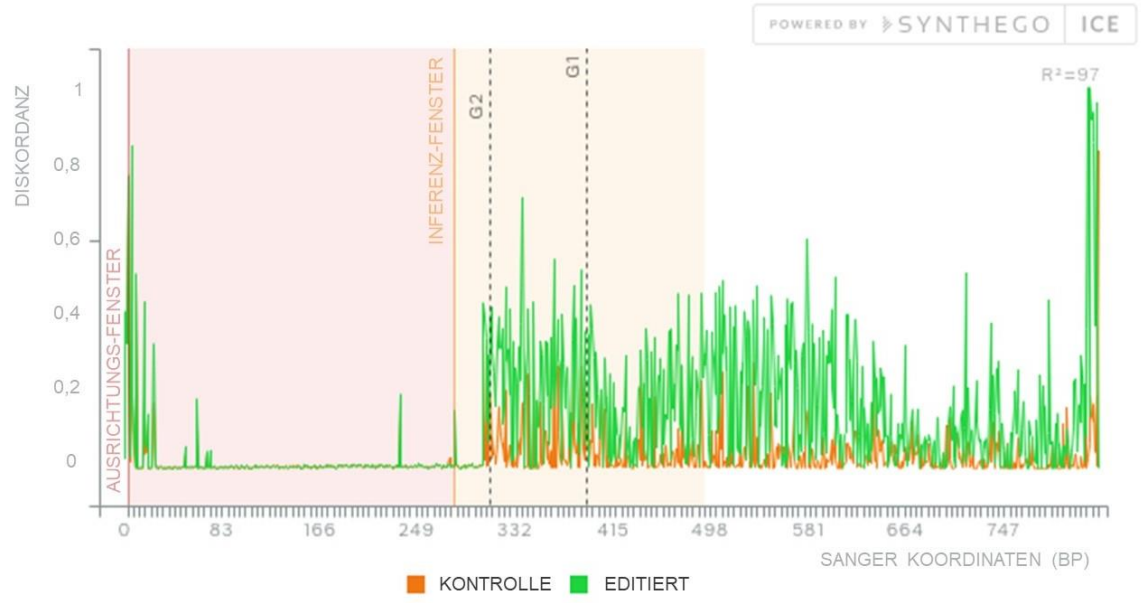


Abbildung 18: Diskordanz der Sanger Sequenzierungsdaten zueinander der Mischpopulation von KO und wildtyp Zellen der Zelllinie L363. Darstellung der Sequenzen von Kontrolle in orange und KO in grün, generiert von Synthego Performance Analysis, ICE Analysis. 2019. v3.0. Synthego; [14.07.22] Die Grafik wurde aus dem Englischen übersetzt. Die gestrichelte Linien gekennzeichnet mit G1 und G2 zeigen beide Cas9 cutting sides. Abkürzungen: ICE = interference of CRISPR Edits; BP = base pair; KO = knock-out; G1 = guide sequence 1; G2 = guide sequence 2.

Um nun den Effekt, den ein MEN1 KO auf die Zelle hat, genauer zu untersuchen, wurde ein kompetitiven Wachstumsansatz verwendet. Dabei wurden in regelmäßigen Abständen der Anteil der nicht mutierten und mutierten Zellen zuerst 3 Tage nach der Nukleofektion und dann jeweils 7 Tage nach der letzten Messung untersucht. Da beide Populationen unter den gleichen Bedingungen im gleichen Gefäß wuchsen, sollte die Population mit einem kompetitiven Wachstumsvorteil, z.B. durch geringere Apoptoseraten, stärker proliferieren. Es zeigt sich, dass im Falle von MEN1 KO die Zellen mit funktionierendem Gen ein signifikant stärkeres Wachstum aufweisen, während bei der Kontrolle nur gelegentlich inkonsistente Veränderungen der Populationen nachgewiesen werden können. Dies zeigt, dass die Anwesenheit von Menin für das onkogene Programm und damit für das Überleben der MM-Zellen essenziell ist.

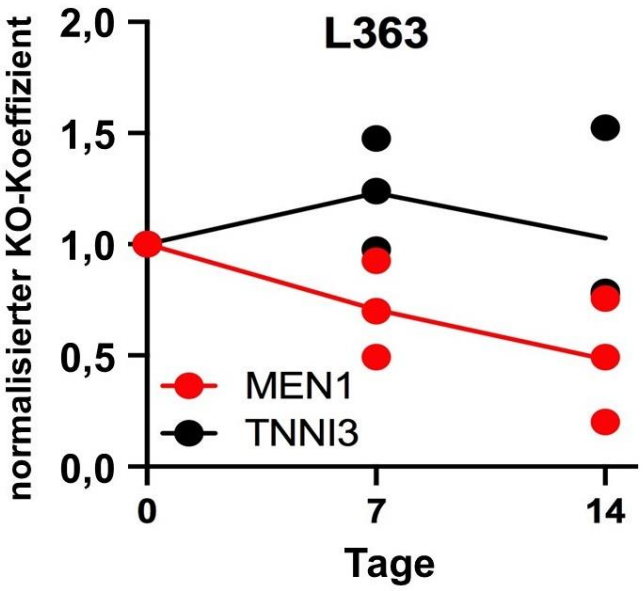


Abbildung 19: Normalisierter KO-Koeffizient der mit crRNAs gegen MEN1 und respektive TNNI3 behandelten Zellpopulation im zeitlichen Verlauf, n = 3. Die Anzahl der KO-Zellen in der jeweiligen Mischkultur mit wildtyp-Zellen wurde zu dem des Versuchsbeginns normalisiert. MEN1 hier in rot und TNNI3 in schwarz. Das Verhältnis der beiden normalisierten Messwerte zueinander gibt den relativen Wachstumsvorteil an. Die Grafik wurde bereits veröffentlicht, Wolffhardt et al. 2023, lizenziert unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. Abkürzungen: MEN1 = multiple endocrine neoplasia 1; TNNI3 = Troponin I; KO = knock-out; n = Anzahl.

3.2. Inhibition von MLL1 und MEN1 Interaktionen zeigt keinen Effekt in MM-Zellen

Da die Funktion des KMT2A-Fusionsprodukts von MEN1 abhängt, ist ein Hemmstoff, der spezifisch diese Interaktion verhindert, sehr vorteilhaft. Da das in einigen B-ALL-Linien vorkommende chimäre Protein in MM-Zellen jedoch nicht vorkommt, sondern nur die physiologische Variante von KMT2A, ist die Wirkung von VTP50469 auf den verwendeten MM-Zelllinien wahrscheinlich stark eingeschränkt. Um jedoch eine Wirkung des Inhibitors nicht auszuschließen - in diesem Fall wäre die Entwicklung von MEN1-spezifischen Inhibitoren/Degradatoren nicht notwendig - wurde im Folgenden die Wirkung bekannter Inhibitoren untersucht.

3.2.1. MEN1 MLL1 Interaktion Inhibitor VTP50469

Als Positivkontrolle wurden die Versuche auch mit der $MLLr^+$ B-ALL-Zelllinie KOPN8 wiederholt. Die Sensitivität wurde mit Hilfe von MTT-Assays bestimmt, die die Anzahl lebender Zellen, gemessen an ihrer metabolischen Aktivität durch Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes durch mitochondriale Reduktasen, in einen spektralanalytisch messbaren Wert umrechnen. Die B-ALL Zelllinie ist bei einem IC50 von 15nM sensitiv, alle MM-Zelllinien erwiesen sich mit einer IC50 von mehr als 10 µM als nicht oder klinisch nicht relevant sensitiv.

Tabelle 26: Berechnete IC50s der MM-Zelllinien und der B-ALL Zelllinie KOPN8 nach Behandlung mit dem KMT2A-MEN1 Interaktionsinhibitor VTP50469. Angegeben ist jeweils eine entscheidende genetische Aberration; die IC50 Werte wurden durch MTT-Assays gemessen und mithilfe von Excel und Graphpad Prism berechnet. Abkürzungen: B-ALL = b acute lymphoblastic leukemia; MM = Multiples Myelom; IC50 = half maximal inhibitory concentration; KMT2A = lysine methyltransferase 2A; MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid.

Zelllinie	Herkunft	KMT2A Mutation	**IC50 VTP50469**
KOPN8	B-ALL	ja	15 nM
OPM2	MM	nein	>10 µM
U266	MM	nein	>20 µM
LP1	MM	nein	>10 µM
L363	MM	nein	>20 µM
KMS-12-BM	MM	nein	>20 µM

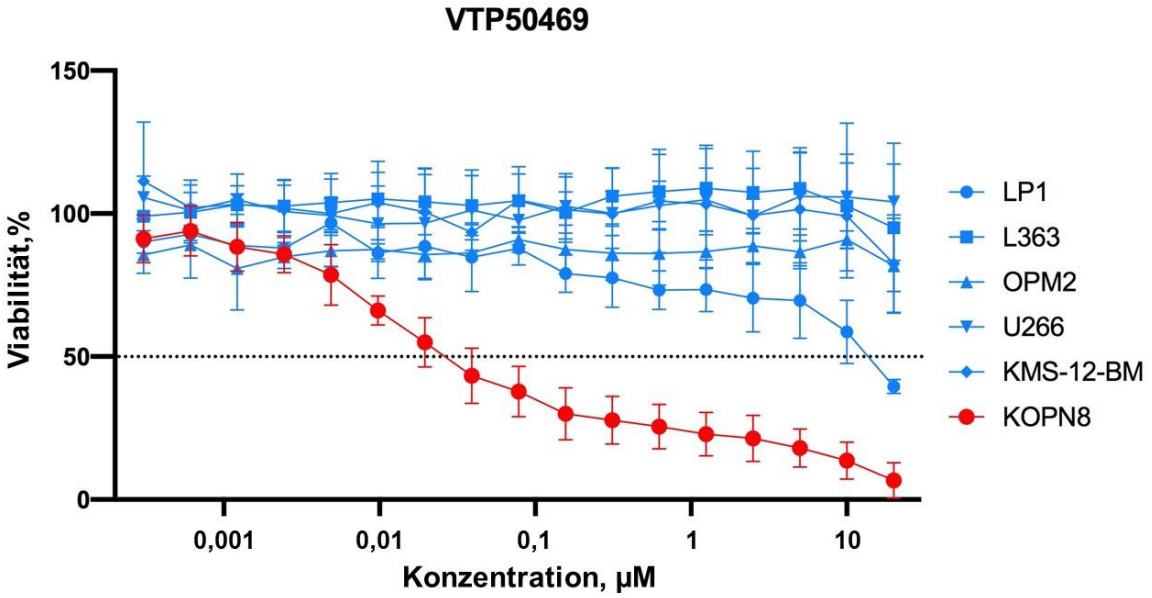


Abbildung 20: Sensitivität der MM-Zelllinien und einer B-ALL Zelllinie im MTT-Test mit VTP50469, n = 4. In blau die MM-Zelllinien und in rot die MLLr⁺ B-ALL Zelllinie KOPN8. Die gepunktete Linie markiert die IC50. Die Viabilität wurde mit MTT-Assays unter Zugabe des MEN1-KMT2A Interaktionsinhibitor VTP50469 in unterschiedlichen Konzentrationen (c_{max} = 20 µg) im Verhältnis zur DMSO behandelten Kontrolle berechnet. Die Grafik wurde bereits veröffentlicht, Wolffhardt et al. 2023, lizenziert unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. Abkürzungen: c_{max} = maximale Konzentration; MM = Multiples Myelom; MLLr⁺ = lysine methyltransferase 2A rearrangement; IC 50 = half maximal inhibitory concentration; B-ALL = b acute lymphoblastic leukemia; MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid; DMSO = dimethylsulfoxid; n = Anzahl.

Um nun die Rolle von KMT2A im MM weiter zu untersuchen, wurde MM-102 für eine MEN1 unabhängige Inhibition der H3K4me3 verwendet. Hier konnten bei einer maximalen Konzentration von 20 µM im MTT-Assay weder in der MLLr⁺ Zelllinie KOPN8 noch in der verwendeten Zelllinie OPM2 Effekte festgestellt werden. Die Prozentzahl von metabolisch aktiven Zellen, relativ zur Kontrolle, der KOPN8 Zelllinie nahm bei höherer Dosierung in allen drei Replikaten konstant leicht zu.

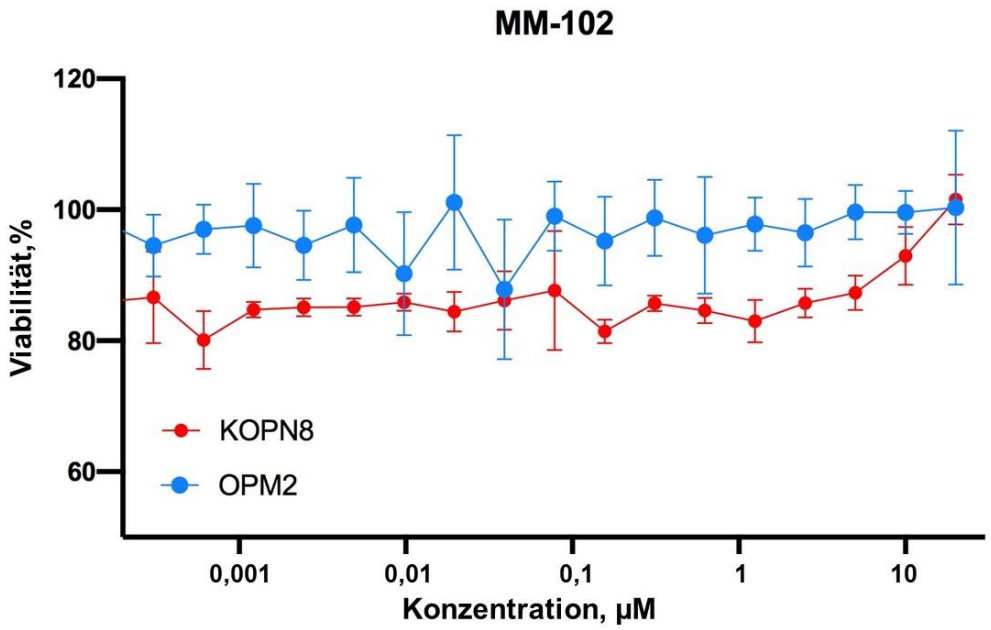


Abbildung 21: Sensitivität des WDR5-KMT2A Interaktions Inhibitor MM-102 in der BALL Zelllinie KOPN8 und der MM Zelllinie OPM2, n = 3. Sensitivität der MM-Zelllinie in blau und der MLLr⁺ B-ALL Zelllinie in rot. Die Viabilität wurde mit MTT-Assays unter Zugabe des WDR5-KMT2A Interaktions Inhibitor MM-102 in unterschiedlichen Konzentrationen (c_{max} = 20 µg) im Verhältnis zur DMSO behandelten Kontrolle berechnet. Abkürzungen: MM = Multiples Myelom; MLLr⁺ = lysine methyltransferase 2A rearrangement; B-ALL = b acute lymphoblastic leukemia; MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid; DMSO = dimethylsulfoxid; n = Anzahl; WDR5 = WD repeat-containing protein 5.

3.3. Korrelation der MEN1-Expression mit anderen Genen

Da MEN1 seine Wirkung vor allem im Kontext der Interaktion mit anderen Proteinen entfaltet, ist es interessant, welche dieser Proteine als Folge einer Herunterregulierung von MEN1 ein verändertes Expressionsniveau aufweisen. Des Weiteren wurden die Auswirkungen von KD auf benachbarte Gene analysiert.

3.3.1. Ko-Expression von MEN1 mit anderen Genen

Durch bioinformatische Analysen von Online-Datenbanken wurden Gene gefunden, deren Expression möglicherweise von der MEN1-Expression abhängen. In den Korrelationsanalysen der von Genevesitgator gewonnenen Daten zeigen die

euchromatic histone lysine methyltransferase 2 (EHMT2), N-acetyltransferase 10 (NAT10) und chromobox 1 (CBX1) als potenziell abhängige Gene.

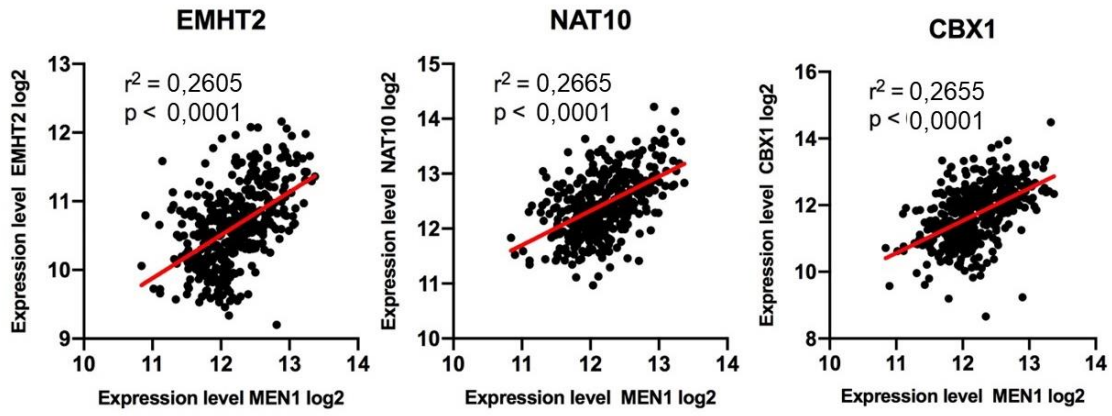


Abbildung 22: Positive Korrelation der Expression von MEN1 mit EHMT2, NAT10 und CBX1. Die lineare Korrelations-Analyse von Daten aus der online Datenbank Geneinvestigator von Patientendaten hier nur MM-Proben, zeigt in der linearen Korrelationsanalyse durch PRISM eine potentielle Abhängigkeit der Genexpression von MEN1 mit EHMT2, NAT10 und CBX1 an. (02.05.22). Abkürzungen: MM = Multiples Myelom; MEN1 = multiple endocrine neoplasia 1; EHMT2 = euchromatic histone lysine methyltransferase 2; NAT10 = N-acetyltransferase 10; CBX1 = chromobox 1.

Zusätzlich wurde die Datenbank DepMap verwendet, die Daten über die Abhängigkeit von Genen über CRISPR/Cas9 KO Analysen verschiedener Zelllinien sammelt. Hier zeigen die Analysen der öffentlich verfügbaren Daten MBD2 und KMT2A als Gene, die möglicherweise mit MEN1 korrelieren also Ko-Abhängig sind.

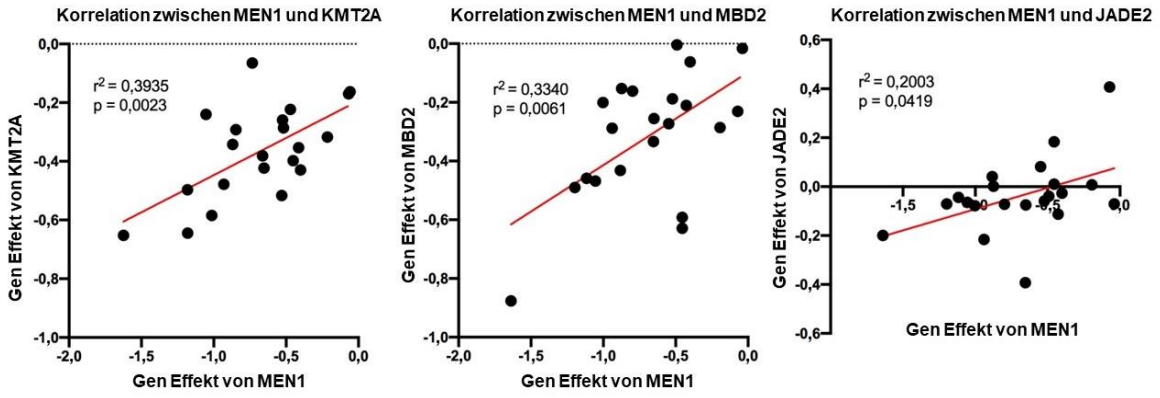


Abbildung 23: MEN1 KO-Abhängigkeiten mit KMT2A, MBD2 und JADE2. Die lineare Korrelations-Analyse von Daten aus der online Datenbank DepMap von KO Studien in MM Zelllinien, zeigt in der linearen Korrelationsanalyse mit PRISM eine potentielle Abhängigkeit der Genexpressioin von MEN1 mit KMT2A, MBD2 und JADE2 an. (04.05.22) Abkürzungen: MM = Multiples Myelom; MEN1 = multiple endocrine neoplasia 1; KMT2A = Histone-lysine N-methyltransferase 2A; MBD2 = methyl CpG-binding domain protein 2; JADE = jade family PHD finger 2; KO = knock-out.

3.3.2. Auswirkung der MEN1 Depletion auf KMT2A Expression

Um die Interaktion zwischen MEN1 und KMT2A weiter zu erforschen, wurde die Proteinexpression von KMT2A in den mit der spezifisch gegen MEN1 gerichteten shRNA behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle über Immunoblot gemessen. Die Zellen wurden zuvor wie für die Apoptose Messungen über Durchflusszytometrie sortiert. In der Zellline LP1 ist eine deutliche Reduktion der Expression von KMT2A nach MEN1-Depletions sichtbar, in der Zelllinie L363 kann dies weniger stark auch beobachtet werden. Hingegen zeigt sich in der Zelllinie OPM2 eine konstante Expression von KMT2A trotz KD von MEN1.

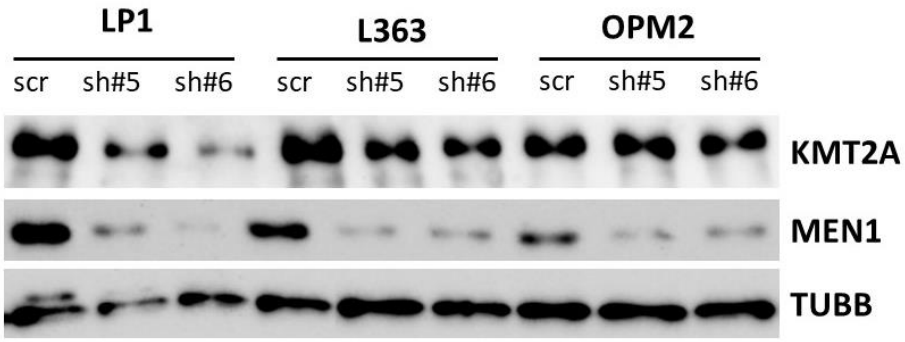


Abbildung 24: Variable KMT2A Expression der mit gegen MEN1 gerichtetetn shRNA behandelten Zellen. Der Immunoblot wurde mit antiKMT2A, antiMEN1 und antiTUBB Antikörpern behandelt, um den KD auf Protein Ebne zu verifizieren. Alle Zellinien sind vom Multiplem Myelom. Die Banden von MEN1 liegen bei 68-70 kda, die TUBB Banden bei 50 kda, die KMT2A Banden liegen bei 300 kda und zeigen das aminoterminale Ende. Hier wird ein Immunoblot stellvertretend für n = 3 Durchführungen gezeigt. Die Grafik wurde bereits veröffentlicht, Wolffhardt et al. 2023, lizenziert unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. Abkürzungen: RNA = Ribonukleinsäure; scr = scrambled, non-targeted control; sh = small hairpin ribonucleic acid; MEN1 = multiple endocrine neoplasia 1; TUBB = Tubulin beta class 1; KMT2A = histone lysine transferase 2A; KD = knock-down; n = Anzahl.

3.3.3. MBD2 als potenzieller Partner für synthetic lethality

Obwohl MBD2 nicht als direkt abhängiges Protein nachgewiesen werden konnte, erschien eine weitere Untersuchung des Einflusses sinnvoll, da einige Hinweise auf eine ähnliche Funktion und synergistische Wirkung bestehen.

3.3.3.1. Hohe Sensibilität der MM-Zelllinien auf Decitabin Behandlung

Zunächst wurde die Sensitivität der von mir verwendeten Zelllinien gegenüber 5-Aza-2'-desoxycytidin (Decitabin) untersucht, um eine generelle Reaktion auf diesen Methylierungsinhibitor abschätzen zu können. Um sowohl die Wirkung von niedrigen als auch von hohen Dosen des Wirkstoffs beurteilen zu können, wurde ein MTT-Assay verwendet. Es zeigte sich, dass fast alle verwendeten Zelllinien sehr sensitiv reagierten, mit Ausnahme der Zelllinie U266, bei der die IC50 erst bei

sehr hohen Dosen erreicht wurde.

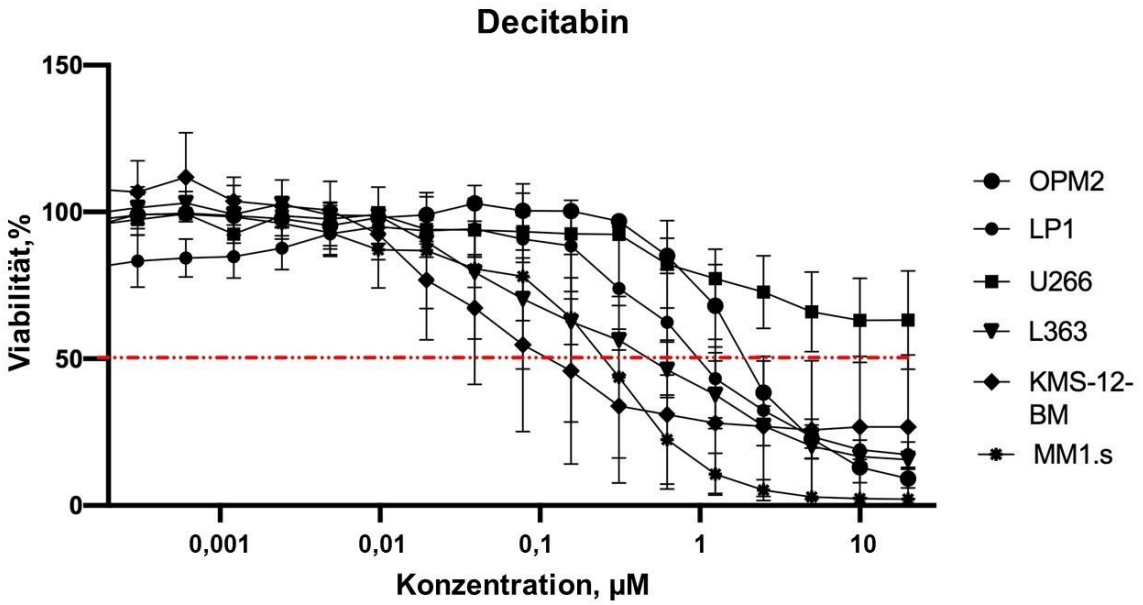


Abbildung 25: Sensitivität der MM-Zelllinien im MTT-Test mit Decitabine, n = 3.. Die Viabilität wurde mit MTT-Assays unter Zugabe des Methylierungsinhibitors Decitabin in unterschiedlichen Konzentrationen (c_{max} = 20 µg) im Verhältnis zur DMSO behandelten Kontrolle berechnet. Die gestrichelte rote Linie markiert die IC50. Abkürzungen: c_{max} = maximale Konzentration; MM = multiples Myelom; IC 50 = half maximal inhibitory concentration; MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid; DMSO = dimethylsulfoxid; n = Anzahl.

3.3.3.2. Toxische Wirkung der MBD2 spezifischen shRNA in MM-Zellen

Um allgemeine Effekte der lentiviralen Transduktion mit einer Kontrolle ausschließen zu können, wurden die Zellen nicht nur mit denen gegen MBD2 gerichteten shRNAs shMBD2#1 und shMBD2#3, sondern auch mit non-targeting shRNA transduziert. Nachdem der Effekt der siRNA-induzierten KD auf Proteinebene mittels Immunoblot bestätigt wurde, konnte der Effekt des KDs auf die Proliferation im kompetitiven Wachstumsassay und auf die Apoptoserate untersucht werden.

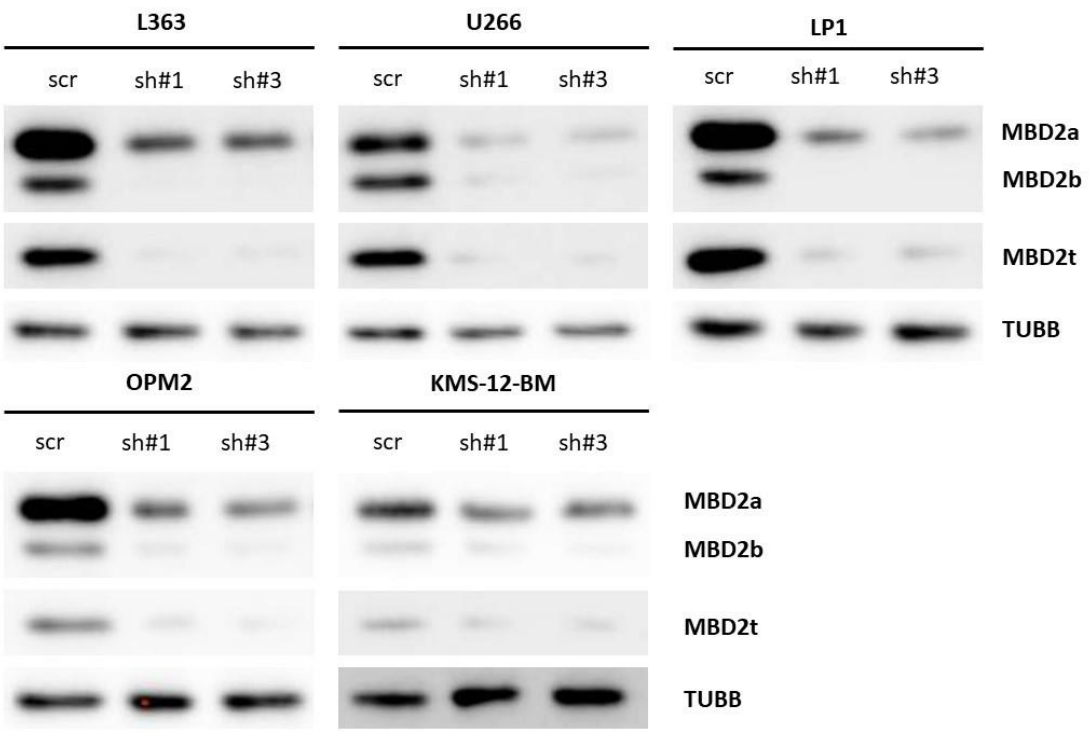


Abbildung 26: Immunoblot der mit gegen MBD2 gerichteten shRNAs behandelten MM Zellen. Der Immunoblot wurde mit antiMBD2 und antiTUBB Antikörpern behandelt, um den KD auf Protein Ebne zu verifizieren. Alle Zelllinien sind vom Multiple Myelom. Die Banden der MBD2 Isoformen liegen bei 43, 40 und 29 kda, die TUBB Banden bei 50 kda. Hier wird ein Immunoblot stellvertretend für n = 3 Durchführungen gezeigt. Abkürzungen: RNA = Ribonukleinsäure; scr = scrambled, non-targeted control; sh = small hairpin ribonucleic acid; MBD2 = methyl CpG binding domain 2; TUBB = Tubulin beta class 1; KD = knock-down; n = Anzahl.

Ein antiproliferativer Effekt ist in den erhaltenen Daten bei allen verwendeten Zelllinien sichtbar, generell wirkt die shRNA#1 besser und führt am 9. Tag sogar zu einer Reduktion der RFP positiven Zellen auf unter 20% der Gesamtpopulation bei allen verwendeten Zelllinien. Bei der U266 Zelllinie scheint die Behandlung mit shRNA#3 nur insofern einen signifikanten Unterschied zur Kontrollzelllinie zu haben, als dass hier die mit der non-targeting shRNA transduzierten Zellen prozentual besser proliferieren als ihre nicht transduzierten Äquivalente. Ansonsten

bleibt der Prozentsatz hier nahe 100%, d.h. es gibt hier keinen oder nur einen geringen Wettbewerbsvorteil für die Zellen ohne KD.

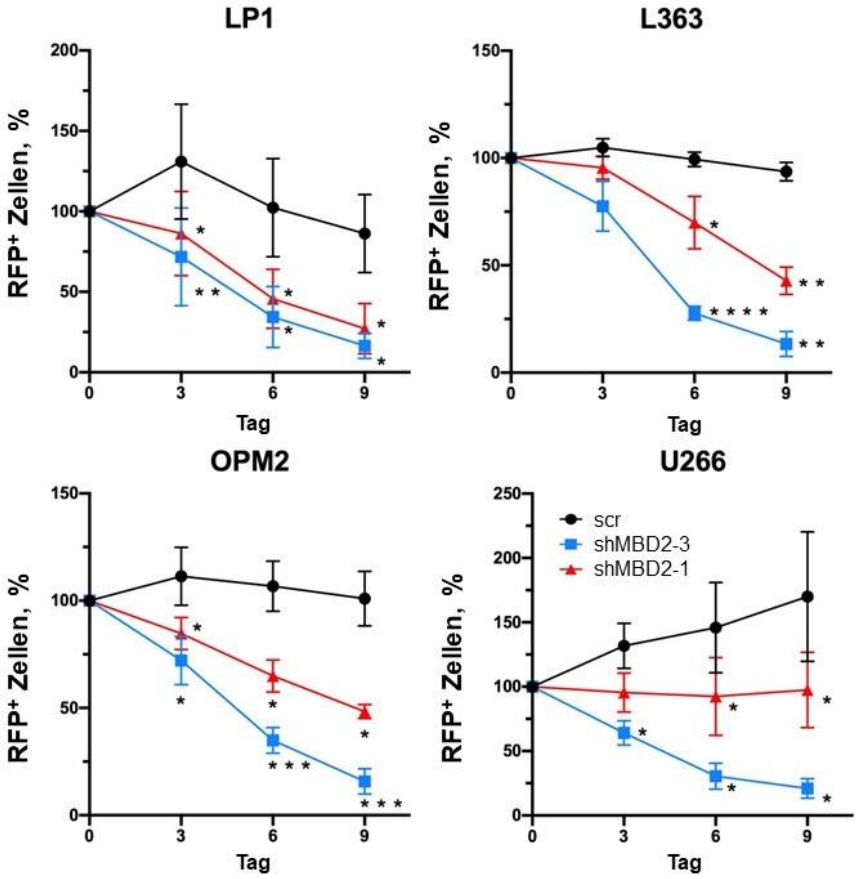


Abbildung 27:Kompetitive Wachstumsanalysen von mit gegen MBD2 gerichteten shRNAs behandelten MM Zellen zeigen Wachstumsvorteil der Kontrollzellen, n = 3. Durch regelmäßige FACS-Messungen der relativen RFP positiven Zell Population wurde die Wachstumsdynamik der MBD2-KD-Population im Vergleich zur non-targeting Kontrolle gemessen. In rot ist die shMBD2#1 gezeigt und in blau die shMBD2#3. Die Sterne zeigen die Signifikanz im paired t-test: 1 Stern = p<0,05; 2 Sterne = p<0,01; 3 Sterne = p<0,005. Abkürzungen: sh = small hairpin; MBD2 = methyl CpG binding domain 2; RNA = Ribonukleinsäure; RFP = Rot fluroreszierendes Protein; FACS = Durchflusszytometrie; scr = scrambled, non-targeting control; KD = knock-down; n = Anzahl.

Auch die Apoptose-Messungen zeigen einen deutlichen Anstieg der spezifischen Apoptose, die im Vergleich zu den Kontrollzellen normalisiert wurde. Lediglich bei der Zelllinie U266, die bereits bei den Inhibitor-Messungen eine geringe Sensitivität zeigte, scheint die Apoptose nach Behandlung mit shRNA#3 geringer zu sein als bei den anderen Zelllinien. Dies stimmt auch mit dem geringeren kompetitiven Nachteil überein, den die Behandlung mit dieser shRNA auf die Zellen hatte.

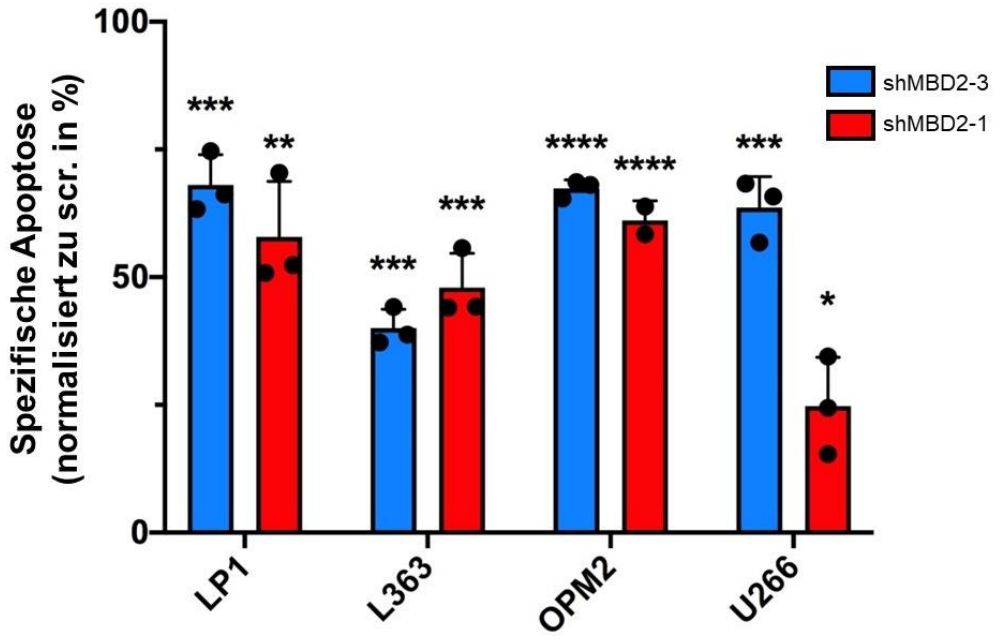


Abbildung 28: Spezifische Apoptose von MM-Zelllinien nach Behandlung mit gegen MBD2 gerichteten shRNAs, n = 3. Nach der Transduktion mit der entsprechenden shRNA wurden die Zellen am vierten Tag mit dem S3e Cellsorter nach dem von ihnen exprimierten RFP sortiert. Drei Tage später wurden die Zellen mit PI und Annexin-FITC behandelt, deren Expression mittels FACS analysiert wurde. Anschließend wurden die unmarkierten und damit lebenden Zellen der jeweiligen Population identifiziert und mit der Kontrolle normalisiert. Die hier gezeigte spezifische Apoptoserate wurde mit der in 2.2.4 vorgestellten Formel berechnet. In rot ist die shMBD2#1 gezeigt und in blau die shMBD2#3. Die Sterne zeigen die Signifikanz im paired t-test: 1 Stern = p<0,05; 2 Sterne = p<0,01; 3 Sterne = p<0,005; 4 Sterne = p<0,001. Abkürzungen: sh = small hairpin; RNA = Ribonukleinsäure; RFP = Rot fluroreszierendes Protein; PI = propidiumiodide; FACS = Durchflusszytometrie; n = Anzahl.

3.4. Vorarbeiten für die Entwicklung eines MEN1 Degraders

Durch die Entwicklung eines Degraders, kann die Abhängigkeit der MM-Zellen und potenziell anderen abhängigen Tumor Entitäten von MEN1 pharmakologisch genutzt werden, ohne dass die hier entscheidenden Nachteile der Inhibitoren, die Wirkung beeinflussen.

Um Zellen mit KI identifizieren zu können, wurden ein Reparatur Plasmid verwendet, welches für das Fluorophor GFP kodiert. Das Reparatur Plasmid besteht aus dem Vektor Rückgrat, einer 5'MEN1homology Region, die an der crRNA cutting Side endet und anschließend die Sequenz für $FKBP12^{F36V}$. Hierbei ist wichtig, dass die cutting Side in dem letzten kodierendem Exon liegt, kurz vor dem STOP Kodon, welches aus der Sequenz des Reparatur Plasmides gestrichen ist. Nach der $FKBP12^{F36V}$ Sequenz befinden sich P2A und HA-Tags, die Sequenz für das grün fluoreszierende Protein und schließlich die 3'UTR Homologie. Beide Homologie Regionen dienen dazu, dass die HDR der Zelle das Insert an der richtigen Stelle einbaut.

Da die Verwendung dieser bereits etablierten Methode nur bei einer sehr geringen Anzahl von Zellen erfolgreich ist, wurde ein neuer Ansatz verwendet. Bereits gebunden an ein Einzelstrang Konstrukte das als Template für die homologe Doppelstrang Reparatur dient, genannt Single-stranded homology directed repair template (ssHDRT), wird der Riboprotein Komplex in den Zellkern eingebracht. In den FACS Messungen zur Identifikation von erfolgreichen KI mit GFP Expression konnte eine Subpopulation mit gesteigerter Expression nachgewiesen werden.

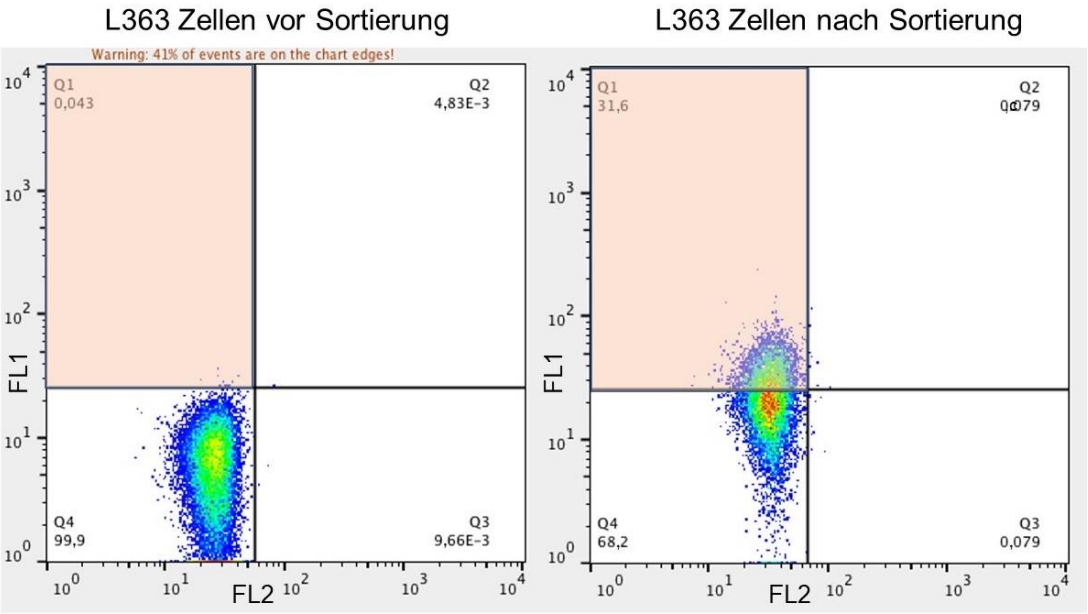


Abbildung 29: Gating der Durchflusszytometrie dTAG-transfizierter L363-Zellen. Der orange markierte Quadrant zeigt die Zellen, die im Vergleich zur nicht-transfizierten Zellpopulation als positiv interpretiert wurden. Links die Zellpopulation vor dem ersten Sortieren, rechts die endgültige Zellpopulation nach 3-4 Sortier- und Kultivierungszyklen. Die Y-Achse zeigt die mit dem FL1 Laser gemessene GFP Expression, die X-Achse den FL2 Laser der rote Farbstoffe erkennen könnte. Die Darstellung wurde mit dem S3e Cellsorter (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) erstellt. Abkürzungen: Q = Quadrant; dTAG = degradation-TAG; FL = Fluoreszenz.

Nach der Nukleofektion wurden die Zellen mit der höchsten GFP-Expression mittels Durchflusszytometrie mit dem S3e Cellsorter sortiert. Diese wurden dann kultiviert und erneut sortiert, wobei dieser Prozess so lange gesteigert wurde, bis eine signifikante Anzahl GFP-positiver Zellen in der Kultur nachgewiesen werden konnte. Anschließend wurde der KI des FKBP-Proteins über einen Immunoblot

kontrolliert, wo sich das Menin/FKBP-Chimärprotein nun signifikant schwerer abgezeichnet hat.

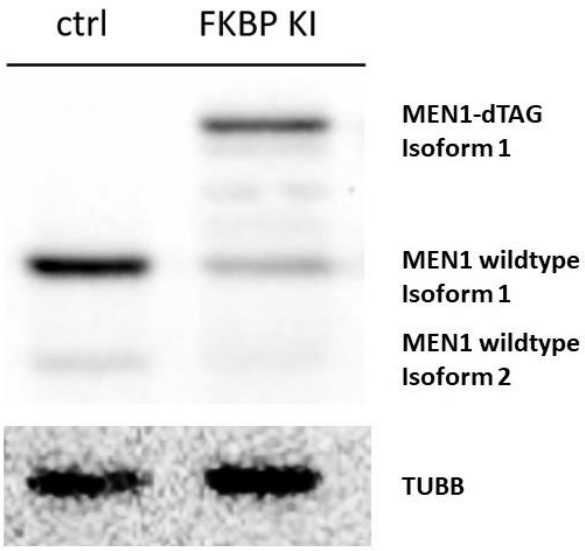


Abbildung 30: Immunoblot vom FKBP KI in der Zelllinie L363. Der Immunoblot wurde mit antiMEN1 und antiTUBB Antikörpern behandelt, um den KI auf Protein Ebne zu verifizieren. Die Banden der MEN1 Isoformen liegen beim wildtyp bei 70 kda, bei der MEN1-dTAG bei 100kda, die TUBB Banden bei 50 kda. Abkürzungen: ctrl = control; MEN1 = multiple endocrine neoplasia 1; TUBB = Tubulin beta class 1; KI = knock-in; dTAG = degradation TAG; FKBP-12 = FK506 binding protein.

Anschließend wurde die Funktionalität des FKBP-Tags untersucht, indem die Proben mit dTAG13 und DMSO als Kontrolle behandelt wurde. Dabei konnte beobachtet werden, dass die schwere MEN1 dTAG Bande bereits 2h nach Zugabe des dTAG fast vollständig verschwunden war, auch 24h nach Zugabe kehrte die Expression nicht zurück. Somit kann von einer funktionellen dTAG ausgegangen werden.

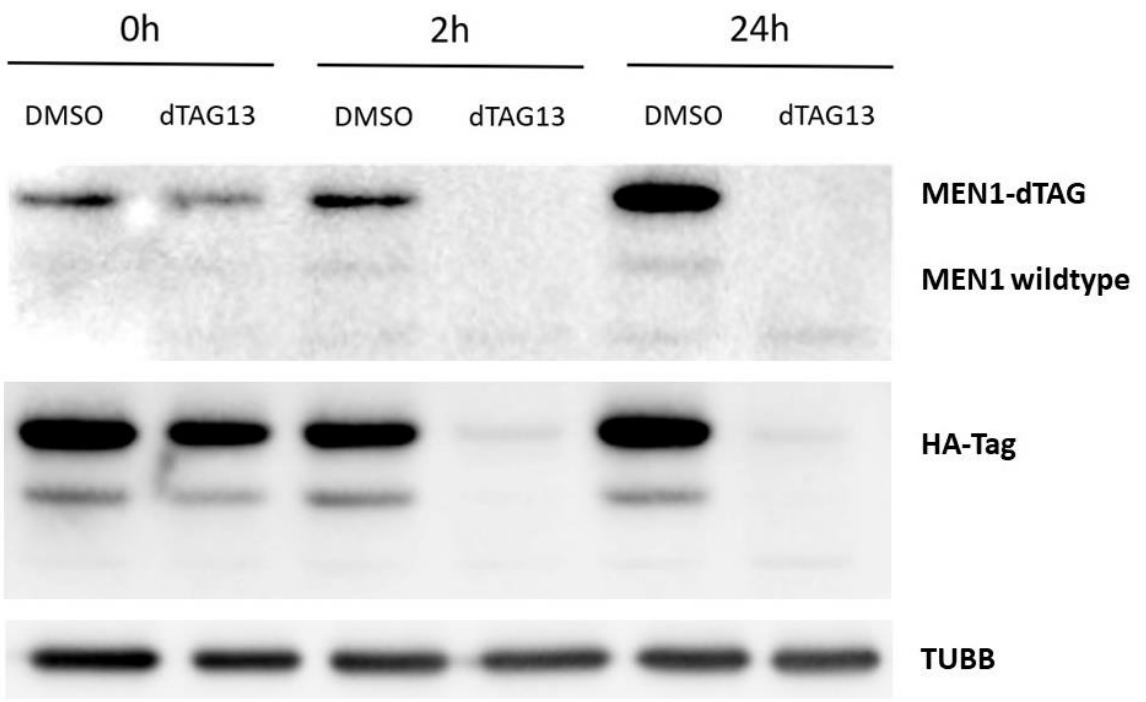


Abbildung 31: Die Zugabe von dTAG-13 induziert eine rasche Degradation des MEN1-dTAG Fusions Proteins in der Zelllinie L363. Der Immunoblot wurde mit antiMEN1, antiHA und antiTUBB Antikörpern behandelt, um den Abbau des MEN1-FKBP12 Proteins nach Behandlung mit dTAG13 nachzuweisen. Die Proteinlysate sind von der L363 Zelllinie gewonnen worden und die Kontrolle mit DMSO. Die Banden der MEN1 Isoformen liegen beim wildtyp bei 70 kda, bei der MEN1-dTAG /HA-Tag bei 100kda, die TUBB Banden bei 50 kda. Abkürzungen: DMSO = dimethylsufoxid; HA-Tag = Hämagglutinin Tag; MEN1 = multiple endocrine neoplasia 1; TUBB = Tubulin beta class 1; KI = knock-in; dTAG = degradation TAG; FKBP-12 = FK506 binding protein.

Hiermit konnte nachgewiesen werden das die MEN1 spezifische Degradation möglich ist.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der in MLLr$^+$ AML oder B-ALL bekannte Tumorsuppressor MEN1 auch in Zelllinien ohne KMT2A-Mutation relevant für die Aufrechterhaltung der Neoplasien ist. Hinweise aus der Analyse von Online-Datenbanken bestätigten sich bei der Behandlung von MM-Zellen mit MEN1-spezifischen shRNAs. Erhöhte Apoptoseraten und verminderte Wachstumsraten konnten im kompetitiven Ansatz nachgewiesen und mit Hilfe eines CRISPR/Cas9 KO bestätigt werden. Der Effekt konnte durch die Verwendung eines KMT2A-MEN1 Interaktionsinhibitors nicht reproduziert werden, was die Relevanz von MEN1 belegt. Als weiterer potenzieller Interaktionspartner wurde MBD2 identifiziert, dessen Depletion durch spezifische shRNA KD sich als toxisch für MM erwies. Um die beobachtete Abhängigkeit der MM-Zellen von MEN1 therapeutisch nutzen zu können, wurde ein dTAG entwickelt, der MEN1 spezifisch degradieren kann und damit eine Vorarbeit für die Entwicklung eines spezifischen PROTAC darstellt.

4.1. Multiple Myelom-Zellen sind unabhängig von mutiertem KMT2A funktionell mit MEN1 verknüpft

MEN1 ist als protoonkogen in MLLr$^+$ Leukämie Zellen bekannt. Dies basiert auf der Interaktion der beiden Proteine zur H3K4me3 und damit Hochregulation von proleukämischen Transkriptionsfaktoren wie MEIS1 und HOXA9 [49]. Bei der Analyse der genomweiten CRISPR/Cas9 loss of function Studien von MEN1 aus der DepMap Datenbank konnte aber feststellt werden, dass die im Zusammenhang mit MLLr$^+$ bekannte Abhängigkeit von Neoplasien des blutbildenden Systems nicht nur auf Zellen mit dieser Mutation beschränkt ist. Bisher fokussierten sich die Studien auf MLLr$^+$ AML-, und ALL-Zelllinien und boten keine entscheidenden Hinweise zur Sensibilität von anderen hämatoonkologischen Entitäten, erst [91] konnten in Stammzellen ohne MLLr$^+$ einen Effekt des MEN1 KO feststellen. In den hier durchgeführten Analysen zeigt sich zwar bei AML-Zellen eine starke Korrelation zwischen dem Auftreten von MLLr$^+$ und der berechneten Abhängigkeit von MEN1, diese ist aber bereits bei B-ALL-Zellen nicht mehr in dieser Ausprägung zu beobachten. Hier gibt es bereits einige Zelllinien, die eine starke Abhängigkeit von MEN1 zeigen, aber kein Rearrangement aufweisen, was nun die Annahme zulässt, dass die proonkogene Wirkung von MEN1 im blutbildenden System keineswegs wie zunächst angenommen auf Zellen mit spezifischen Mutationen beschränkt ist. Im

Gegenteil, die Analysen zeigten sogar eine besonders starke Abhängigkeit von MM-Zellen, die in keiner der untersuchten Zelllinien ein MLLr^{+} aufwiesen. Da gerade bei dieser malignen Neoplasie bereits reifer Plasmazellen viele unterschiedliche Mutationen vorliegen [63] aber KMT2A Rearrangements nicht regelhaft auftreten [75], wäre ein therapeutischer Ansatz wünschenswert, der nicht mutationsspezifisch ist, sondern einen generellen Vorteil bringt.

4.2. KD und KO-Experimente bestätigen MEN1-Abhängigkeit im Multiplen Myelom

In den shRNA-Experimenten konnte durch Durchflusszytometrie Untersuchungen von RFP ein kompetitiver Wachstumsnachteil und über Apoptose Färbungen erhöhte Apoptoseraten in den MEN1 KD Zellen nachgewiesen werden. Obwohl diese mit beiden verwendeten shRNAs in den Zelllinien dasselbe Ergebnis brachten, ließen sich doch unterschiedlich starke Reaktionen der MM-Zelllinien auf die Behandlung feststellen. Es ist bekannt, dass shRNAs, eingbracht über lentivirale Vektoren, einen zytotoxischen Effekt haben können und daher die Ergebnisse besonders sorgfältig betrachtet werden müssen [88]. Generell scheint die shRNA#6 einen stärkeren negativen Einfluss sowohl auf das Überleben der Zellen als auch auf das kompetitive Wachstum zu haben. Dies lässt vermuten, dass die shRNA#5 weniger spezifisch ist und der negative Effekt, der bei der Behandlung der MM-Zellen beobachtet werden konnte, möglicherweise durch Off-Target-Effekte [24] und eine damit einhergehende Veränderung der Zellviabilität verursacht wurde. Im Gegensatz dazu scheint shRNA #6 nicht zu solchen Effekten zu führen und die Ergebnisse sind daher möglicherweise als valider einzustufen. Die erhobenen Daten stimmen mit den Informationen über die Abhängigkeit der MM-Zellen von MEN1 aus der DepMap-Datenbank überein. Eine Korrelation zwischen der Höhe des in der DepMap-Datenbank erhobenen Gen-Effekt-Scores und der hier beobachteten Sensitivität gegenüber der shRNA konnte nicht festgestellt werden. Allerdings sind in der DepMap-Analyse nur die Zelllinien L363, LP1 und OPM2 vertreten, die mit gerundeten Werten von -0,73, -0,42 und -0,67 relativ nahe beieinander liegen. OPM2 ist jedoch sowohl bei den Apoptose- als auch bei den Wachstumsmessungen tendenziell weniger empfindlich als LP1. Diese marginalen Unterschiede können durch Unterschiede in der Datenerhebung und -berechnung erklärt werden [65]. Weiterhin könnte die Sensitivität von MM-Zelllinien verglichen

werden, die wie KMS20 einen besonders niedrigen Gen-Effekt-Score aufweisen, hier wäre eine quantitative Auswertung des shRNA-Effekts notwendig. Da sich die Daten jedoch nur in der Stärke des Effektes bezüglich der verschiedenen Zelllinien geringfügig widersprechen und hier keine quantitative Auswertung erfolgte, ist der Unterschied für die Interpretation der Ergebnisse höchstwahrscheinlich zu vernachlässigen.

Obwohl die Verwendung von shRNAs weit verbreitet und anerkannt ist, gibt es entscheidende Nachteile in der Verwendung. Die shRNA selbst kann durch fehlende Komplementarität oder andere unspezifische Mechansimen, die Zelle selbst beeinflussen [88]. Zudem kann auch die lentivirale Transduktion über die Veränderung der miRNA Expression und Expression von für die Apoptose relevanten Transkriptionsfaktoren, eine Verzerrung der Ergebnise bedingen [64]. Um die Unabhängigkeit der Ergebnisse und Schlussfolgerungen von etwaigen Nebeneffekten noch weiter zu erhöhen, wurde zusätzlich ein CRISPR/Cas9 KO Ansatz verwendet. Der kompetitiver Ansatz, bei dem sowohl veränderte als auch wild-type Zellpopulationen im selben Reagenz gehalten wurden, verhinderte, dass die Zellpopulationen einzeln untersucht werden konnten. Da aber von besonderem Interesse war, welche der Populationen unter exakt gleichen Wachstumsbedingungen mehr proliferieren kann, konnte mit diesem Ansatz die Daten aus den shRNA-Experimenten bestätigt werden. Somit konnte mit 2 Unterschiedlichen Versuchsansätzen nachgewiesen werden, dass MEN1 für MM-Zellen von für das Wachstum entscheidender Bedeutung ist. Obwohl der Anteil der KO-Zellen in den verschiedenen Versuchsansätzen ähnlich war, war die Kontrolle mit TNNI3 in dem Ansatz mit transduzierten Zellen geringfügig niedriger. Dies könnte durch einen Versuchsaufbau vermieden werden, der beispielsweise durch den Einbau eines Plasmids eine Puromycinresistenz in die transduzierten Zellen einbaut und diese somit sortierbar macht und somit als Einzelpopulationen getrennt betrachtet werden können. Darüber hinaus ist bekannt, dass CRISPR/Cas9 Genome Editing durch die induzierte DNA-Schädigung zu einer Aktivierung von p53 führen kann. Da diese Aktivierung die Apoptose fördert, werden Zellen mit nicht funktionsfähigem p53 selektiert, was zu verzerrten Resultaten führen kann [36]. Dennoch zeigen beide experimentellen Ansätze überzeugende Daten, die den Schluss zulassen, dass der Verlust von MEN1 bei den verwendeten MM-Zelllinien zu Apoptose und einem Wachstumsnachteil führt. Um die Aussagekraft der Daten

weiter zu stärken, könnten genetische Untersuchungen der transduzierten Zellen auf eine p53 Mutation und eine mögliche nachfolgende Selektion hilfreich sein. Eine Wiederholung der Versuche mit KMS-12-BM oder U266 wäre auch eine Möglichkeit, die Effekte der Selektion auf eine p53-Mutation zu umgehen, da diese Zelllinien von vornherein genetisch veränderte Versionen von p53 besitzen. KMS-12-BM Zellen besitzen nur eine p53 Kopie und U266 Zellen spezifische Mutationen [54].

Die in beiden Versuchsaufbauten beobachtete Abhängigkeit der MM-Zellen von MEN1 stimmt mit den Daten aus Inhibitor-Experimenten überein. Aktuell in einer Phase 1 ist der MEN1-Inhbitor BMF-219 in der Behandlung von unterschiedlichen B-Zell Neoplasien eingeschlossen das MM [78]. Nicht nur in hämatoonkologischen Zellen, sondern auch in anderen Geweben wie dem Ewing-Sarkom konnte eine Sensitivität gegen MEN1 Inhibitoren festgestellt werden [96].

4.3. Mögliche Vermittler der MEN1-Abhängigkeit

4.3.1. Rolle von MEN1 in der Mikroumgebung der Knochenmarksnische

Da in diesen Experimenten nur die Zelle selbst und nicht das komplexe Umfeld, in dem sie sich befindet, untersucht wurde, ist die Wirkung einer MEN1-Depletion auf MM-Zellen in vivo noch unerforscht. Bekannt ist, dass MM-Zellen vor allem in den frühen und schwellenden Vorstadien noch auf das physiologische Umfeld der Plasmazellvorläufer angewiesen sind. Dieses besteht aus spezialisierten Stromazellen, Adipozyten und Zellen des Knochenauf- und -abbaus, die durch ein komplexes Zusammenspiel von Stimulationsfaktoren im Gleichgewicht gehalten werden [38]. Diese Knochenmarksnische kann als begünstigender Faktor zur Aufrechterhaltung und Progression des Tumors beitragen. Adipozyten und Osteoklasten sezernieren verschiedene proonkogene Faktoren, wobei letztere u.a. den extrazellulären Kalziumspiegel erhöhen. Mesenchymale Stromazellen können die Anheftung der Tumorzellen unterstützen. Lediglich die Osteoblasten sezernieren zumindest partiell antiproliferative Faktoren [40]. Im weiteren Verlauf der Erkrankung verschiebt sich das Gleichgewicht jedoch immer mehr in Richtung knochenabbauender Zellen, wodurch die MM-Zellen weiter begünstigt werden. Die Patienten tragen somit auch die starken Nebenwirkungen des osteolytischen Krankheitsverlaufs mit [111]. Umso relevanter sind Therapiestrategien, die die MM-Zellen als Teil eines komplexeren Systems berücksichtigen.

Ein interessanter Ansatzpunkt für den therapeutischen Nutzen von MEN1-KD im KM-Nischensystem wäre zu untersuchen, ob MEN1-KD zu einer Prävention von Osteolysen führt. So interagiert MEN1 mit dem wnt/β-Catenin-Signalweg, indem es im Zellkern an CTNNB1 bindet, es aus dem Zellkern entfernt und dann den Abbau fördert, zusätzlich reguliert es die β-Catenin-Zielgene weiter herunter [46]. MEN1 führt somit zu einer effektiven Hemmung des Effektorproteins des kanonischen wnt-Signalwegs. Zu den Effektorproteinen gehören nicht nur proliferationsfördernde Proteine wie z.B. c-myc, sondern auch die Expression mehrerer Gene, die für die Entwicklung von Osteoklasten und Osteoblasten entscheidend sind. So führt die im MM häufig erhöhte Expression von wnt-Antagonisten wie DKK1 zu einer gesteigerten Expression von RANKL mit nachfolgender vermehrter Osteoklastendifferenzierung [76], während Osteoblasten durch eine verminderte Expression von TNFRSF11B (auch bekannt als OPG) eher in ihrer Proliferation gehemmt werden [21], MEN1 wirkt hier genau agonistisch, d.h. es fördert vermutlich durch eine stärkere Hemmung des wnt-Signalweges die vermehrte Differenzierung von Osteoklasten und die Hemmung von Osteoblasten, was zu Osteolyse führt. Durch eine KD von MEN1 nicht nur in MM-Zellen, sondern auch in deren Gegenspielern in der KM-Nische, den Osteoblasten, könnte so eine Veränderung des Knochenumbaus in eine weniger lytische Richtung erfolgen.

Ein wichtiger Botenstoff zwischen KM und MM-Zellen ist a proliferation inducing ligand (APRIL), der unter anderem an B-Cell Maturation Agent (BCMA) binden kann, ein spezifisches Oberflächenantigen, das für die Entwicklung von B-Zellen kurzzeitig benötigt wird. APRIL wird von Osteoklasten produziert und führt in MM-Zellen, die BCMA stark exprimieren, zunächst zu einer Krankheitsprogression [98]. Dies kann sich jedoch bei zu starker Aktivierung von BCMA in eine inhibierende Funktion umkehren. Diese Progression wird über die Induktion von AKT und NFκB gesteuert [97]. MEN1 als ubiquitär vorkommendes Protein spielt in beiden Signalkaskaden eine Rolle und ist in der Lage, sowohl inaktives als auch aktives AKT zu beeinflussen, z.B. durch Bindung und anschließende Hemmung der Expression[101]. MEN1 kann auch direkt an Mitglieder der NF-kB-Familie binden, was zu einer starken Hemmung der NF-kB-aktivierten Genexpression führt [39]. Diese Interaktion verdeutlicht die Relevanz von MEN1, nicht nur als solitärer Akteur im onkogenen Programm des MM, sondern vor allem als Mediator nicht nur in der Interaktion der an der Bildung der MM-Nische beteiligten Zellen, sondern auch als

Mediator der Interaktion verschiedener Signalwege, die dies auf molekularer Ebene umsetzen. Die Wirkung von APRIL ist also von vielen Faktoren abhängig und die Funktion von MEN1 scheint in diesem Zusammenhang relevant zu sein, können die Signale durch eine Unterbrechung oder Veränderung der Signalkaskade von NF-kB und AKT nicht weitergeleitet werden, so ist zu vermuten, dass der proliferative Effekt ausbleiben würde.

Interessant wäre ein Versuchsaufbau, der die Variable der umgebenden Zellen in die Wirkung von MEN1 miteinbezieht. So könnte beobachtet werden, ob der Effekt gleichbleibt oder ob die Interaktion der MM-Zellen mit den Nachbarzellen nach MEN1-KD signifikant beeinträchtigt ist. Dies könnte z.B. durch den Einsatz einer PROTAC erreicht werden.

4.3.2. CTNNB1 als potenzieller Vermittler der MEN1 Abhängigkeit im Multiplen Myelom

Die Interaktion von MEN1 mit dem wnt/β-catenin (CTNNB1) -Weg ist auch in den MM-Zellen selbst von Interesse. Die Überlegung, dass β-catenin, insbesondere aufgrund der häufigen aberranten Hochregulation von β-catenin, für die Pathogenese und die mit zunehmender Behandlungsdauer steigende Resistenz des MM relevant ist, ist nicht neu [8]. RNAi-Experimente mit CTNNB1 haben gezeigt, dass das Ausschalten von CTNNB1 einen signifikanten apoptotischen und resistenzsenkenden Effekt auf die MM-Zellen hat [4, 22]. Im Zusammenhang mit der Wirkung von MEN1 deutet dies eher auf eine proliferationshemmende Rolle von MEN1 hin, da CTNNB1 durch MEN1 in seiner Funktion gehemmt wird. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den von beobachteten Ergebnissen in den MEN1 KD/KO-Experimenten, da hier eine subsequenzielle Aktivierung von CTNNB1 durch die Entfernung eines inhibitorischen Faktors (MEN1) stattgefunden haben muss. Eine mögliche Erklärung für diese Inkongruenz könnte sein, dass der hier mutierte β-catenin/wnt Signalweg in MM-Zellen [3], so stark von seinem physiologischen Pendant abweicht, dass die Interaktion von MEN1 mit CTNNB1 nicht mehr relevant ist. Darüber hinaus darf nicht vernachlässigt werden, dass MEN1 durch seine Interaktion mit CTNNB1 nur die kannonische wnt-Signalkaskade beeinflussen kann, der nicht-kannonische wnt-Signalweg aber auch eine wichtige Rolle bei der Migration mutierter Zellen spielen kann [3]. Möglicherweise ist aber auch die Wirkung der wnt/β-Catenin-Signalkaskade auf MM-Zellen komplexer als bisher

angenommen. Lithiumchlorid, das glycogen synthetase kinase 3 (GSK3) hemmt und damit reaktiv zu einer Aktivierung der Signalkaskade führt, also die Menge an aktivem CTNNB1 erhöht, führt in MM-Zellen zu einem Arrest des Zellzyklus und zu erhöhten Apoptoseraten[108]. Neuere Untersuchungen geben Hinweise, dass der Abbau von Beta Catenin in B-Zellen abhängig von GSK3 ist. Die Verwendung von spezifischen Inhibitoren kann zu einer Akkumulation und folgenden Unterdrückung der MYC-Expression führen [15]. Diese unterschiedlichen Befunde lassen keine eindeutige Schlussfolgerung zu, aber es ist denkbar, dass in MM-Zellen die richtige Menge an aktivem CTNNB1 vorhanden sein muss und eine Dysregulation in irgendeine Richtung mit einem für die Zellen ungünstigen Ausgang verbunden ist und die Interaktion mit MEN1 hier von entscheidendem Interesse sein könnte.

4.3.3. IL6 als Effektor der MEN1 Abhängigkeit

Für Tumore, die ihre Vorläufer in Immunzellen haben, sind inflammatorische Signalwege von besonderem Interesse. So wurde IL6 schon früh als ein wichtiger Faktor für das Überleben von MM-Zellen identifiziert [69], weitere Experimente zeigten, dass IL6 tatsächlich nicht nur von verschiedenen Zellen der KM-Nische, sondern auch von MM-Zellen selbst sezerniert wird [62]. MEN1 wirkt indirekt über STAT3 auf die auto- und parakrine IL-6-Sekretion, indem es H3K9me3 epigenetisch modifiziert. In einigen endokrinen Zellen führten siRNA-Experimente, die auf MEN1 abzielten, zu einer erhöhten IL6-Expression, während in HCC-Zellen (hepatozelluläres Karzinom) die Behandlung zu einer verminderten IL6-Expression führte [90]. Diese Experimente unterstreichen erneut, dass MEN1 trotz seines ubiquitären Vorkommens eine sehr gewebespezifische Rolle spielt. Obwohl MEN1 in den Experimenten nicht in hämato-onkologischen Zellen getestet wurde, ist ein enger Zusammenhang mit den Resultaten in den HCC-Zellen zu erwarten, da MEN1 hier auch als proonkogener Spieler auftritt [106], während MEN1 in den endokrinen Zellen stets als Tumorsuppressor fungiert. Dies bleibt jedoch Spekulation, solange dies nicht in weiteren Experimenten untersucht wurde.

MEN1 ist ein geeignetes Protein, um MM-Zellen aus verschiedenen Blickwinkeln anzugreifen. Aufgrund seiner großen Bedeutung bei der Vermittlung von Informationen über Apoptose und Proliferation ist es ein entscheidendes Protein für maligne Zellen, dessen qualitative und quantitative Veränderung eine sinnvolle therapeutische Strategie darstellt.

4.4. Interaktion der MEN1 Abhängigkeit von KMT2A und anderen assoziierten Genen

4.4.1. Ko-Abhängigkeit von KMT2A und MEN1 im Multiplen Myelom

KMT2A kommt bei hämato-onkologischen Erkrankungen sowohl in der mutierten Version ($MLLr^+$) als auch in der Wildtyp-Variante (wt) vor. Die Forschung konzentrierte sich bisher auf die $MLLr^+$ -Versionen, da diese bei Vorliegen für das onkologische Programm der AML oder B-ALL entscheidend sind. In diesen Fällen konnte durch die Behandlung mit verschiedenen KMT2A-MEN1-Inhibitoren ein therapeutisches Potenzial erreicht werden [49]. Bisherige Untersuchungen dieser Inhibitoren in wtKMT2A-Zellen konnten keine Wirksamkeit zeigen, es sei denn, es lagen weitere entscheidende Mutationen in AML-Zelllinien im Meningeoma 1 oder Nucleophosmin 1 Gen vor [42, 109]. Die Analyse der Ko-Abhängigkeitsdaten aus der DepMap-Datenbank ergab jedoch einen Zusammenhang zwischen wtKMT2A und MEN1 in MM-Zellen. Die Behandlung mit VTP50469 konnte in den MM-Zelllinien keinen signifikanten Effekt hervorrufen, während in der $MLLr^+$ B-ALL Zelllinie KOPN8 eine Sensitivität gemessen werden konnte, die mit der Literatur übereinstimmt [49]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können möglicherweise durch eine Assoziation von KMT2A mit MEN1 erklärt werden, die sich nicht nur auf die direkte Interaktion der beiden Proteine beschränkt. Die KD von MEN1 führte in zwei der drei getesteten MM-Zelllinien zu einer signifikant geringeren Expression von KMT2A. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Effekt der MEN1-Depletion unter anderem über eine Herunterregulation der KMT2A-Expression erfolgt. wtKMT2A erwies sich auch als Mediator onkogener Programme durch die Aufrechterhaltung pathologischer Methylierungsmuster. Als Folge einer gain-of-function-Mutation von p53 konnte gezeigt werden, dass KMT2A einer der Effektoren dieser onkologisch relevanten Veränderung ist [114]. Aufgrund der Tatsache, dass die verminderte KMT2A-Expression infolge der MEN1-Depletion nicht konstant nachgewiesen werden kann, sind weitere Untersuchungen der Interaktion auch im Kontext von zelllinienspezifischen Eigenschaften wie beispielsweise bestimmten Mutationen von Interesse. Eine Analyse des globalen H3K4-Methylierungsstatus vor und nach MEN1-Depletion könnte weitere Informationen fördern.

Die Inhibierung der Funktion von KMT2A über die Interaktion mit WDR5 führt in den MM-Zellen zu keiner relevanten Einschränkung in der Stoffwechselaktivität. Da der

MM-102 Inhibitor aber auch in der KMT2A rearrangierten B-ALL Zelllinie KOPN8 keinen Effekt zeigen konnte, ist es möglich das die verwendete Inhibitor Konzentration nicht ausreichend ist. So wurde bei [45] die IC50 erst bei einer Konzentration von 25 µM erreicht die in der Folge auch zu einem signifikanten negativen Effekt in den MLLr$^+$ Zellen geführt hatte, während hier als höchste Konzentration 10 µM gewählt wurden. So können die Ergebnisse dieses Versuchs nicht abschließend interpretiert werden, da ein fehlerhafter Versuchsaufbau nicht ausgeschlossen werden kann, bzw. vermutet werden muss. Eine erneute Durchführung mit signifikant höheren Inhibitor Dosierungen bis zum Erreichen eines Effektes in der KMT2A rearrangierten Kontrollgruppe müsste durchgeführt werden [91] Es konnten für MM-Zellen keine KMT2A abhängige Funktion von MEN1 nachgewiesen werde, die möglicherweise für Neoplasien von Relevanz ist. Dennoch ist nicht auszuschließen das selbst KMT2A in seiner Interaktion mit MEN1 zwar nicht entscheidend für das Überleben der Zelle ist, aber über MEN1 unabhängige Methylierung, die Epigentik der Neoplasie substanziell beeinflusst.

4.4.2. Potenziell relevante Interaktionspartner

Die Daten aus dem Online-Tool Geneinvestigator wurden untersucht, um die mit der höchsten Wahrscheinlichkeit abhängigen Gene der Patientenproben zu erkennen. Die Co-Abhängigkeit mit KMT2A ist überraschend, da die Versuche bisher nahegelegt haben, dass die Interaktion von MEN1 mit KMT2A für die Wirkung der Depletion von MEN1 nicht entscheidend ist. Dennoch ist möglich das KMT2A auch über andere Funktionen von Relevanz ist, oder die Interaktion von MEN1 mit KMT2A zwar nicht alleinig ausschlaggebend aber dennoch einen Einfluss besitzt. MBD2 zeigt sich hier als vielversprechender Partner von MEN1 durch seine Bedeutung in der Interaktion von Histonmodifikationen und DNA-Methylierung. JADE2 unterstützt indirekt die Trimethylierung von H3K4 indem es zu einer proteasomalen Degradation der für die Deacetylierung entscheidenden LSD1 führt [37]. Obwohl es so MEN1 unterstützt, lassen die Daten vermuten das die KMT2A abhängige H3K4me3 nicht entscheidend für die Pathogenes im MM ist. Zudem wurden mit den Daten aus der DepMap Datenbank nach Genen gesucht, die mit hoher Signifikanz als coabhängig vermutet werden. Hier zeigten sich EHMT2, welches in mehreren soliden Tumoren mit einem aberranten Silencing von Promotoren in Verbindung gebracht werden kann [72]. NAT10 welches ebenfalls in soliden Tumoren eine Rolle spielt, durch Acetylierung von RNA und

Transkriptionsfaktoren [57]. Auch CBX1 ist durch seine Interaktion mit dem wnt/CTNNB1Signalwegs von besonderem Interesse [107] und sollte in der Verbindung zu MEN1 weiter erforscht werden.

4.5. MBD2 als Onkogen im Multiplen Myelom

Darüber hinaus besteht zumindest prinzipiell ein direkter Zusammenhang zwischen MBD2 als Methylierungsreader über die zwingende Interaktion von MEN1 in die Dreifachmethylierung von H3K4, die auf ersteres repressiv wirkt [23]. Die Möglichkeit, diese potentielle Interaktion mit geringem Aufwand weiter zu untersuchen, ist durch den Einsatz von Decitabin gegeben, das als funktioneller Inhibitor von MBD2 wirkt und in der MDS-Therapie wirksam ist [44].

MBD2 ist als Teil des NurD Komplexes ein wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung und Veränderung von epigenetischen Funktionen. Besonders die Verbindung von Histon-Methylierung zu DNA-Methylierung wird von MBD2 beeinflusst. MBD2 dient als Vermittler der epigenetischen Information durch die Verknüpfung von DNA-Methylierung und Histonmodifikationen. Dabei bindet das Protein mit hoher Affinität an methylierte DNA und kann über den NurD Komplex vielseitige epigenetische Effekte bewirken, die u.a. wichtig für die Differenzierung von Zellen sind [81]. Zudem konnten Stirzaker et al. 2016 zeigen, dass MBD2 für das Aufrechterhalten und die de novo Bildung von Methylierungen an CpG reichen Promotoren zur Pathogenese des Prostata-CAs beiträgt. Da MEN1 übers seiner vielen Interaktionen an der epigenetischen Regulation von Histonen beteiligt ist, u. a. H3K4me3 ist eine Verbindung zwischen MEN1 und MBD2 wie bereits die Analyse der DepMap Daten suggeriert, wahrscheinlich.

4.5.1. Decitabin inhibiert Multiple Myelom Zellen

Um die Funktion und Relevanz von dem epigenetischem Reader MBD2 in den MM-Zellen überschlagen zu können, wurde zunächst die Wirkung des Methylierungs-inhibitor 5-Aza-2‘-desoxycytidin auf MM-Zellen untersucht. Durch die Verwendung Decitabin kann die Methylierung genomweit unspezifisch gehemmt werden und somit die Funktion von MBD2 antagonisiert werden. Decitabin ist ein in der Therapie des MDS verwendetes Cytosin-Analogon, das in niedriger Dosierung durch Hemmung der Methyltransferase wirkt und in höherer Dosierung durch Einbau in die RNA zytotoxisch ist. Es konnte bereits an mehreren Zelllinien gezeigt werden, dass Decitabin eine antineoplastische Wirkung besitzt, in niedrigen Dosen scheint

auch die schädigende Wirkung auf nicht entartete Zellen gering zu sein [119]. In den MTT-Assays konnten eine Sensitivität für fast alle MM-Zelllinien mit Ausnahme von U266 festgestellt werden. U266 zeigte bereits bei der Behandlung mit Decitabin nur eine geringe Sensitivität bzw. erst bei höheren Dosen einen signifikanten Abfall der Überlebensrate, was aber auch durch die generell apoptotische Wirkung des Hypomethylierungsagens bei höheren Dosen erklärt werden kann. Es ist zu beachten, dass die Wirkung von Decitabin deutlich weniger spezifisch ist als die Funktion von MBD2 allein, da dieses auch über die Rekrutierung des NuRD-Komplexes und damit DNA-Methylierung und Deacetylierung des Nukleosoms bewirken kann [20]. Insofern hemmt Decitabin die Wirkung von MBD2 nur summarisch auf funktioneller Ebene und nicht alle Aspekte der Funktion des Proteins. Dennoch weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Methylierung als epigenetisches Werkzeug eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung onkogener Prozesse in MM-Zellen spielt. Folglich wurde gezielt die Wirkung von MBD2 untersucht.

4.5.2. Multiple Myelom Zellen sind abhängig von MBD2

Im kompetitiven Wachstumsassay und in Apoptosemessungen konnte festgestellt werden, dass LP1, L363 und OPM2 sensitiv waren, während U266 nur mit shRNA#3 einen Wachstumsregress zeigte. Dies lässt vermuten, dass U266 zumindest weniger sensitiv gegenüber MBD2 ist, bzw. dass das onkogene Programm weniger von der spezifischen epigenetischen Regulation von DNA-Abschnitten abhängt. In den Wachstumsanalysen zeigt sich wiederum, dass U266 wie bereits in den MEN1 shRNA-Experimenten, bei Behandlung mit scr eine Zunahme der transduzierten Zellen im kompetitiven Wachstum zeigt. Im Vergleich dazu zeigt die Behandlung mit shRNA#1 nur eine Nulllinie, hier ändert sich also der Anteil der transduzierten Zellen im Vergleich zu den nicht transduzierten Zellen nur minimal. Möglicherweise hat die scr-Sequenz doch einen funktionellen Effekt auf die Zelllinien und die shRNA#1 keinen, oder die shRNA#1-Sequenz hat einen negativen Effekt auf die Zelle, der über den wachstumsfördernden Aspekt der Transduktion im Allgemeinen hinausgeht bzw. diesen sozusagen aufhebt. Die anderen Zelllinien zeigen unter Verwendung beider shRNAs eine hohe Sensitivität sowohl in Wachstums- als auch in Apoptosemessungen. Es kann also davon ausgegangen werde, dass MBD2 auch hier eine essenzielle Funktion für die Krebszellen erfüllt. Um diese Abweichung vom erwarteten Wachstumsmuster in den U266 Zellen und KMS-12-BM Zellen zu

untersuchen, könnte man z.B. die Menge der Translation bestimmter Wachstumsmarker und die generelle Proteinproduktion in transduzierten und nicht-transduzierten Zellen bestimmen.

4.5.3. Potenzielle Mechanismen der MBD2 Abhängigkeit

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass MBD2 KD allein bereits einen signifikanten Effekt auf die Zellen hat. Da MBD2 nicht nur im Kontext des NurD-Komplexes [53], sondern auch die spezifische Depletion von MBD2 selbst [94] einen antiproliferativen Effekt u.a. auf Prostatazellen hat, ist davon auszugehen, dass MBD2 durch seine epigenetische Beeinflussung der DNA von entscheidender Bedeutung für Tumoren ist. So kann die Expression von Protonengenen unterdrückt und sogar spezifische Methylierungsmuster erreicht werden, wie es bei der humanen Telomerase-Reverse-Transkriptase der Fall ist. Außerdem scheint die Funktion von MBD2 nicht von anderen MBD-Proteinen übernommen zu werden, die Funktion ist also in dem Protein konserviert [12]. Da die meisten Experimente zu diesem Thema nicht an Zellen aus dem hämato-onkologischen System durchgeführt wurden, stellt sich natürlich die Frage, inwieweit diese Informationen auf andere Systeme übertragbar sind. Die Beobachtungen zeigen sich jedoch kongruent in Zellen verschiedener Krebsarten, und diese Spezialisierung verschiedener MBD-Proteine zeigt sich auch in mehreren Leukämie/Lymphom-Zelllinien [58].

4.6. Simultanes Targeting von MBD2 und MEN1

Um eine synthetische Letalität zu erreichen, d.h. die Krebszelle nicht nur von einer, sondern von mehreren Seiten anzugreifen, wurden nach Proteinen, die synergistisch mit MEN1 interagieren, gesucht. Es wurde bereits gezeigt, dass der NurD-Komplex, insbesondere mit MTA2 und dem assoziierten IKZF1, die Wirkung von VTP50469 verstärken und die Effekte eines MEN1 KD in $MLLr^{+}$ Zelllinien signifikant erhöhen kann [5]. Da MBD2 ebenfalls Teil des NurD-Komplexes ist, sind die Informationen über die berechnete Abhängigkeit von Men1 und MBD2, die aus der Recherche in Online-Datenbanken ersichtlich war, nicht überraschend. Obwohl MM-Zellen nicht empfindlich auf VTP50469 in therapeutisch relevanten Dosen reagierten, wären weitere Experimente, die eine Kombination von Inhibitor und MBD2 shRNA untersuchen, interessant.

Die primäre Funktion von MBD2 und MEN1 ist die epigenetische Modifikation der DNA, häufig durch Methylierung. Die H3K27-Methylierung führt zu einer verminderten Expression von Genen, die an der Zelldifferenzierung beteiligt sind, und wird sowohl durch MEN1 [27] als auch dem NurD-Komplex initiiert bzw. aufrechterhalten [53]. Es zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Trimethylierung von H3K27 und krebsauslösenden Prozessen, so ist diese nicht nur vermehrt in Krebszellen zu beobachten, sondern ihre Umkehrung führt auch zu vermehrter Apoptose[48]. Dieser Prozess wurde auch in MM-Zellen beobachtet [112]. Solche Beobachtungen unterstützen die Theorie, dass sich MBD2 und MEN1 tatsächlich im Sinne einer synthetischen Letalität in ihrer Wirkung verstärken und dass durch eine kombinierte Hemmung beider Proteine ein deutlich stärkerer Effekt beobachtet werden kann.

Auch die Funktion von MBD2 im Kontext der für die MLLr$^+$ Leukämie Zelllinien entscheidenden H3K4me3 ist von Interesse. Obwohl eine direkte Interaktion nicht nachgewiesen werden konnte, ist eine indirekte Verbindung zwischen den Methytransferasen, deren Bindungspartner wie MEN1 und den DNA-bindenden Proteinen wie MBD2 nicht auszuschließen [85] und weitere Untersuchung sicher lohnend.

4.7. Degradationsmarkierung als nützliches Instrument zur Untersuchung der Machbarkeit des Proteinabbaus

Obwohl einige gut wirksame MEN1-Inhibitoren verfügbar sind, haben die Experimente zu der Schlussfolgerung geführt, dass die Hemmung des gesamten Proteins einen anderen, wichtigeren Effekt auf maligne Zellen haben könnte. Da Inhibitoren in der Regel nur eine funktionelle Domäne hemmen können, können Proteine, die wie MEN1 mehrere Funktionen und kein eindeutiges aktives Zentrum besitzen, nur in der Bindung mit einigen ausgewählten Bindungspartnern gehemmt werden[103]. Um jedoch die Möglichkeit zu haben, das Fehlen der gesamten Funktion von MEN1 zu beurteilen, muss man auf Methoden wie RNA-Interferenz oder CRISPR/Cas9-Experimente zurückgreifen, die für eine mögliche Therapie von Patienten keine entscheidende Relevanz haben, da sie kompliziert zu handhaben sind oder das Genom der Zellen bereits vor der Therapie verändert werden müsste. PROTACs hingegen gehen das Problem nicht auf genetischer, sondern auf Proteinebene an. Sie könnten potentiellen Patienten verabreicht werden und sind

daher von signifikanter therapeutischer Relevanz, und sie ermöglichen es, die Funktionen von Proteinen aus einem anderen Blickwinkel zu betrachten, z.B. durch abrupten oder reversiblen Abbau [56].

Um die Anforderungen an die Entwicklung einer PROTAC zu definieren, eignet sich die Erstellung eines dTAG. Hier kann die Funktionalität eines solchen Abbauansatzes getestet werden. Die Entwicklung der dTAG erwies sich mit den bekannten Plasmid Inserts als sehr zeitaufwendig, daher wurde auf den neuen experimentellen Ansatz von Shy et al., 2023 zurückgegriffen, die mit ihrer Vorgehensweise eine deutlich höhere Effizienz in Aussicht stellen. Durch die Bindung des CRISPR/Cas9-Komplexes an das HDRT steigt die Wahrscheinlichkeit einer funktionierenden KI. Nachdem nach erfolglosen Experimenten mit dem Plasmid keine Population mit KI isoliert werden konnte, wurde das ssHDRT etabliert. Hier konnte nach mehreren Sortier- und Kultivierungszyklen eine Population isoliert werden, in der signifikant mehr GFP als in den Vergleichszellen gemessen werden konnte. Entgegen der ursprünglichen Annahme war die Expressionsstärke etwas geringer und nur schwer von der nicht GFP transfizierten Population zu unterscheiden. Trotz mehrerer Versuche konnten keine Population isoliert werden, die dTomato exprimierte, dass als zweiter Fluoreszenzfarbstoff zuvor verwendet wurde. Somit konnten auch keine Population isolieret werden, die gleichzeitig dTomato und GFP exprimieren, was einen homologen KI anzeigt hätte. Dennoch ist davon auszugehen, dass die GFP^+ -Population auch Zellen mit homologer KI enthält, da im Immunoblot die relative Menge der schwereren MEN1-dTAG-Zellen deutlich höher war als der Anteil der Wildtyp-MEN1-Zellen. Durch Zugabe von dTag 13 konnten die Funktionalität des KI nachgewiesen werden. Eine DNA-Sequenzierung der fraglichen Region sollte noch durchgeführt werden, um das KI auch auf genetischer Ebene nachzuweisen. Außerdem ist natürlich die Isolierung einer sicher homologen Population anzustreben. Darüber hinaus wurde bisher nicht getestet, wie sich der gezielte Abbau von MEN1 auf das Überleben und Wachstum von MM-Zellen auswirkt. Somit können keine Rückschlüsse auf die Wirkung von dTAG gezogen werden.

5. Zusammenfassung

Das Multiple Myelom (MM) ist auch heute noch eine Erkrankung mit einer relativ hohen Sterblichkeitsrate, die aufgrund der häufig im Verlauf der Behandlung auftretenden Medikationsresistenzen und der schwerwiegenden Symptome wie Osteolyse eine schwer zu behandelnde Erkrankung darstellt. Im Rahmen der Suche nach neuen Strategien zur Therapie dieser Erkrankung zeigt sich, dass das multiple endocrine neoplasia 1 Gen (MEN1), das insbesondere in akuten myeloischen Leukämie-Zellen eine Rolle spielt, ein potenzieller Ansatzpunkt sein könnte. MEN1 ist ursprünglich als Tumorsuppressor bekannt, dessen Mutation zur Entwicklung der namensgebenden multiplen endokrinen Neoplasien beim Menschen führt. Als entscheidendes Bindungsprotein für die Funktion des Chimärproteins der Lysin Methyltransferase 2A (KMT2A) hat es in jüngster Zeit auch in der Erforschung hämato-onkologischer Erkrankungen Bedeutung erlangt. Bei der Untersuchung bioinformatischer Daten aus Knock-out (KO) -Experimenten wurden nun Hinweise auf eine Relevanz von MEN1 unabhängig von der KMT2A-MEN1 Interaktion. Die Arbeiten haben gezeigt, dass MEN1 nicht nur in KMT2A-reagierenden AML- und B-akute lymphatische Leukämie (ALL) -Zelllinien ein essentieller Bestandteil des onkogenen Programms ist, sondern auch in MM-Zellen, die im Wesentlichen nur in Ausnahmefällen KMT2A-Veränderungen aufweisen. Um die Zufälligkeit des Nachweises möglichst auszuschließen, wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Sowohl im small hairpin Ribonukleinsäure (shRNA) Knock-down (KD) als auch im Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) -KO konnte einen kompetitiven Nachteil der MEN1-defizienten MM-Zellen im Vergleich zu Kontroll- oder unbehandelten Zellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte in der RNA-Interferenz für die meisten Zelllinien eine deutlich erhöhte Apoptoserate nach Behandlung mit der MEN1 shRNA festgestellt werden. Mit der CRISPR/Cas9 KO-Methode konnte der nachteilige Effekt des Men1-Defekts sogar über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Die Zellen wurden mit einem potenziellen MEN1-Degradator behandelt, um zu testen, ob dieser mehr Potential zur Behandlung des MM hat als die bereits entwickelten Inhibitoren. Hier konnte festgestellt werden, dass bei Behandlung der MM-Zellen mit VTP50649 keine Sensitivität in therapeutisch relevanten Dosen im Vergleich zur Kontroll-B-ALL-Zelllinie bestand. In der Folge wurden mögliche Interaktionspartner von MEN1 untersucht und die Untersuchungen auf Methyl-CpG-binding domain protein 2

(MBD2) fokussiert, wo ein Akteur gefunden wurde, der ebenfalls im MM von entscheidender Bedeutung ist. Bereits die Behandlung von MM-Zellen mit dem aus der Therapie des Myelodysplastischen Syndroms bekannten Methylierungsinhibitor Decitabin zeigte in fast allen Zelllinien in relevanten Dosen eine Sensitivität. Somit ist eine MBD2-KD unabhängig von einem möglichen additiven Effekt in Kombination mit einer MEN1-Defizienz hochwirksam auf die Zellen. Dies konnten anhand des kompetitiven Wachstumsnachteils und der hochgradig erhöhten Apoptoseraten in RNA-Interferent Experimenten nachgewiesen werden. Eine neue, möglicherweise effizientere Methode zur Herstellung von FKBP12-KI im Sinne eines degradation TAG wurde etabliert und ein partiell homozygoten FKBP12-KI im MEN1-Gen in MM-Zellen nachgewiesen werden. Durch die Verwendung eines Single-Strand homology directet repair Templates (HDRT) ist die Toxizität reduziert und die Effektivität durch die partielle Bindung des Ribonukleoprotein-Konstrukts an das HDRT scheint höher zu sein. Damit sind die Vorarbeiten für weitere Untersuchungen mit Hilfe von MEN1-targeting Degradatoren geschaffen und die Entwicklung einer proteolysis targeting chimera möglich.

6. Literaturverzeichnis

1. Allman D, Wilmore JR, Gaudette BT (2019) The Continuing Story of T-cell Independent Antibodies. Immunol Rev 288:128. doi: 10.1111/IMR.12754

2. Alzrigat M, Párraga AA, Jernberg-Wiklund H (2018) Epigenetics in multiple myeloma: From mechanisms to therapy. Semin Cancer Biol 51:101–115. doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2017.09.007

3. van Andel H, Kocemba KA, Spaargaren M, Pals ST (2019) Aberrant Wnt signaling in multiple myeloma: molecular mechanisms and targeting options. Leukemia 33:1063–1075. doi: 10.1038/S41375-019-0404-1

4. Ashihara E, Kawata E, Nakagawa Y, Shimazaski C, Kuroda J, KyokoTaniguchi, Uchiyama H, Tanaka R, Yokota A, Takeuchi M, Kamitsuji Y, Inaba T, Taniwaki M, Kimura S, Maekawa T (2009) beta-catenin small interfering RNA successfully suppressed progression of multiple myeloma in a mouse model. Clin Cancer Res 15:2731–2738. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1350

5. Aubrey BJ, Cutler JA, Bourgeois W, Donovan KA, Gu S, Hatton C, Perlee S, Perner F, Rahnamoun H, Theall ACP, Henrich JA, Zhu Q, Nowak RP, Kim YJ, Parvin S, Cremer A, Olsen SN, Eleuteri NA, Pikman Y, McGeehan GM, Stegmaier K, Letai A, Fischer ES, Liu XS, Armstrong SA (2022) IKAROS and MENIN coordinate therapeutically actionable leukemogenic gene expression in MLL-r acute myeloid leukemia. Nature Cancer 2022 3:5 3:595–613. doi: 10.1038/s43018-022-00366-1

6. Balogh K, Rácz K, Patócs A, Hunyady L (2006) Menin and its interacting proteins: elucidation of menin function. Trends Endocrinol Metab 17:357–364. doi: 10.1016/J.TEM.2006.09.004

7. Bertolino P, Tong WM, Galendo D, Wang ZQ, Zhang CX (2003) Heterozygous Men1 Mutant Mice Develop a Range of Endocrine Tumors Mimicking Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. Molecular Endocrinology 17:1880–1892. doi: 10.1210/ME.2003-0154

8. Bjorklund CC, Ma W, Wang ZQ, Davis RE, Kuhn DJ, Kornblau SM, Wang M, Shah JJ, Orlowski RZ (2011) Evidence of a Role for Activation of Wnt/β-

Catenin Signaling in the Resistance of Plasma Cells to Lenalidomide. J Biol Chem 286:11009. doi: 10.1074/JBC.M110.180208

9. Buttlar J (2020) Die Epigenetik. In: Tutorium Genetik - eine (ausführliche) Einführung. Springer, Berlin, pp 299–327

10. Cao Y, Liu R, Jiang X, Lu J, Jiang J, Zhang C, Li X, Ning G (2009) Nuclear-Cytoplasmic Shuttling of Menin Regulates Nuclear Translocation of β-Catenin. Mol Cell Biol 29:5477–5487. doi: 10.1128/MCB.00335-09/ASSET/56F813E9-7ADE-4869-9765-9CD0B110A141/ASSETS/GRAPHIC/ZMB0200982910007.JPEG

11. Chappard D (2015) Multiple myeloma and bone. Morphologie 99:29–30. doi: 10.1016/J.MORPHO.2015.04.001

12. Chatagnon A, Bougel S, Perriaud L, Lachuer J, Benhattar J, Dante R (2009) Specific association between the methyl-CpG-binding domain protein 2 and the hypermethylated region of the human telomerase reverse transcriptase promoter in cancer cells. Carcinogenesis 30:28–34. doi: 10.1093/CARCIN/BGN240

13. Chen YX, Yan J, Keeshan K, Tubbs AT, Wang H, Silva A, Brown EJ, Hess JL, Pear WS, Hua X (2006) The tumor suppressor menin regulates hematopoiesis and myeloid transformation by influencing Hox gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A 103:1018. doi: 10.1073/PNAS.0510347103

14. Conant D, Hsiau T, Rossi N, Oki J, Maures T, Waite K, Yang J, Joshi S, Kelso R, Holden K, Enzmann BL, Stoner R (2022) Inference of CRISPR Edits from Sanger Trace Data. CRISPR J 5:123–130. doi: 10.1089/CRISPR.2021.0113

15. Cosgun KN, Jumaa H, Robinson ME, Kistner KM, Xu L, Xiao G, Chan LN, Lee J, Kume K, Leveille E, Fonseca-Arce D, Khanduja D, Ng HL, Feldhahn N, Song J, Chan W-C, Chen J, Taketo MM, Kothari S, Davids MS, Schjerven H, Jellusova J, Müschen M (2023) Targeted engagement of β-catenin-Ikaros complexes in refractory B-cell malignancies. bioRxiv 2023.03.13.532152. doi: 10.1101/2023.03.13.532152

16. Costacurta M, He J, Thompson PE, Shortt J (2021) Personalized Medicine Molecular Mechanisms of Cereblon-Interacting Small Molecules in Multiple Myeloma Therapy. J Pers Med 1185. doi: 10.3390/jpm11111185

17. Dale B, Cheng M, Park KS, Kaniskan HÜ, Xiong Y, Jin J (2021) Advancing targeted protein degradation for cancer therapy. Nat Rev Cancer 21:638–654. doi: 10.1038/S41568-021-00365-X

18. Damiani E, Duran MN, Mohan N, Rajendran P, Dashwood RH (2020) Targeting Epigenetic 'Readers' with Natural Compounds for Cancer Interception. J Cancer Prev 25:189. doi: 10.15430/JCP.2020.25.4.189

19. Dawson MA, Kouzarides T (2012) Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. Cell 150:12–27. doi: 10.1016/J.CELL.2012.06.013

20. Desai MA, Webb HD, Sinanan LM, Scarsdale JN, Walavalkar NM, Ginder GD, Williams DC (2015) An intrinsically disordered region of methyl-CpG binding domain protein 2 (MBD2) recruits the histone deacetylase core of the NuRD complex. Nucleic Acids Res 43:3100. doi: 10.1093/NAR/GKV168

21. Dun X, Jiang H, Zou J, Shi J, Zhou L, Zhu R, Hou J (2010) Differential expression of DKK-1 binding receptors on stromal cells and myeloma cells results in their distinct response to secreted DKK-1 in myeloma. Mol Cancer 9:247. doi: 10.1186/1476-4598-9-247

22. Dutta-Simmons J, Zhang Y, Gorgun G, Gatt M, Mani M, Hideshima T, Takada K, Carlson NE, Carrasco DE, Tai YT, Raje N, Letai AG, Anderson KC, Carrasco DR (2009) Aurora kinase A is a target of Wnt/beta-catenin involved in multiple myeloma disease progression. Blood 114:2699–2708. doi: 10.1182/BLOOD-2008-12-194290

23. Eberl HC, Spruijt CG, Kelstrup CD, Vermeulen M, Mann M (2013) A Map of General and Specialized Chromatin Readers in Mouse Tissues Generated by Label-free Interaction Proteomics. Mol Cell 49:368–378. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.026

24. Fedorov Y, Anderson EM, Birmingham A, Reynolds A, Karpilow J, Robinson K, Leake D, Marshall WS, Khvorova A (2006) Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. RNA 12:1188–1196. doi: 10.1261/RNA.28106

25. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S (2006) The epigenetic progenitor origin of human cancer. Nature Reviews Genetics 2006 7:1 7:21–33. doi: 10.1038/nrg1748

26. Fish RJ, Kruithof EKO (2004) Short-term cytotoxic effects and long-term instability of RNAi delivered using lentiviral vectors. BMC Mol Biol 5:9. doi: 10.1186/1471-2199-5-9

27. Gao SB, Feng ZJ, Xu B, Wu Y, Yin P, Yang Y, Hua X, Jin GH (2009) Suppression of lung adenocarcinoma through menin and polycomb gene-mediated repression of growth factor pleiotrophin. Oncogene 2009 28:46 28:4095–4104. doi: 10.1038/onc.2009.273

28. Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nature Methods 2009 6:5 6:343–345. doi: 10.1038/nmeth.1318

29. Gnanapragasam MN, Scarsdale JN, Amaya ML, Webb HD, Desai MA, Walavalkar NM, Wang SZ, Zhu SZ, Ginder GD, Williams DC (2011) p66α - MBD2 coiled-coil interaction and recruitment of Mi-2 are critical for globin gene silencing by the MBD2 - NuRD complex. Proc Natl Acad Sci U S A 108:7487–7492. doi: 10.1073/PNAS.1015341108/SUPPL_FILE/PNAS.201015341SI.PDF

30. Grennan AK (2006) Genevestigator. Facilitating Web-Based Gene-Expression Analysis. Plant Physiol 141:1164–1166. doi: 10.1104/PP.104.900198

31. Grieselhuber NR, Mims AS (2021) Novel Targeted Therapeutics in Acute Myeloid Leukemia: an Embarrassment of Riches. Curr Hematol Malig Rep 16:192–206. doi: 10.1007/S11899-021-00621-9/TABLES/2

32. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. Nature 2006 441:7092 441:537–541. doi: 10.1038/nature04791

33. Grinat J, Heuberger J, Vidal RO, Goveas N, Kosel F, Berenguer-Llergo A, Kranz A, Wulf-Goldenberg A, Behrens D, Melcher B, Sauer S, Vieth M, Batlle

E, Stewart AF, Birchmeier W (2020) The epigenetic regulator Mll1 is required for Wnt-driven intestinal tumorigenesis and cancer stemness. Nat Commun 11. doi: 10.1038/S41467-020-20222-Z

34. Guo WH, Qi X, Yu X, Liu Y, Chung CI, Bai F, Lin X, Lu D, Wang L, Chen J, Su LH, Nomie KJ, Li F, Wang MC, Shu X, Onuchic JN, Woyach JA, Wang ML, Wang J (2020) Enhancing intracellular accumulation and target engagement of PROTACs with reversible covalent chemistry. Nature Communications 2020 11:1 11:1–16. doi: 10.1038/s41467-020-17997-6

35. Guru SC, Goldsmith PK, Lee Burns A, Marx SJ, Spiegel AM, Collins FS, Chandrasekharappa SC (1998) Menin, the product of the MEN1 gene, is a nuclear protein. Cell Biology 95:1630–1634

36. Haapaniemi E, Botla S, Persson J, Schmierer B, Taipale J (2018) CRISPR–Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. Nature Medicine 2018 24:7 24:927–930. doi: 10.1038/s41591-018-0049-z

37. Han X, Gui B, Xiong C, Zhao L, Liang J, Sun L, Yang X, Yu W, Si W, Yan R, Yi X, Zhang D, Li W, Li L, Yang J, Wang Y, Sun YE, Zhang D, Meng A, Shang Y (2014) Destabilizing LSD1 by Jade-2 promotes neurogenesis: An antibraking system in neural development. Mol Cell 55:482–494. doi: 10.1016/j.molcel.2014.06.006

38. Heider U, Hofbauer LC, Zavrski I, Kaiser M, Jakob C, Sezer O (2005) Novel aspects of osteoclast activation and osteoblast inhibition in myeloma bone disease. Biochem Biophys Res Commun 338:687–693. doi: 10.1016/J.BBRC.2005.09.146

39. Heppner C, Bilimoria KY, Agarwal SK, Kester MB, Whitty LJ, Guru SC, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Marx SJ, Burns AL (2001) The tumor suppressor protein menin interacts with NF-κB proteins and inhibits NF-κB-mediated transactivation. Oncogene 2001 20:36 20:4917–4925. doi: 10.1038/sj.onc.1204529

40. Hofbauer L, … AN-… IJ of, 2001 undefined (2001) Receptor activator of nuclear factor-κB ligand and osteoprotegerin: Potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. Wiley Online Library

41. Howe FS, Fischl H, Murray SC, Mellor J (2017) Is H3K4me3 instructive for transcription activation? BioEssays 39:1–12. doi: 10.1002/BIES.201600095

42. Issa GC, Aldoss I, DiPersio J, Cuglievan B, Stone R, Arellano M, Thirman MJ, Patel MR, Dickens DS, Shenoy S, Shukla N, Kantarjian H, Armstrong SA, Perner F, Perry JA, Rosen G, Bagley RG, Meyers ML, Ordentlich P, Gu Y, Kumar V, Smith S, McGeehan GM, Stein EM (2023) The menin inhibitor revumenib in KMT2A-rearranged or NPM1-mutant leukaemia. Nature 615:920. doi: 10.1038/S41586-023-05812-3

43. Jin S, Zhao H, Yi Y, Nakata Y, Kalota A, Gewirtz AM (2010) c-Myb binds MLL through menin in human leukemia cells and is an important driver of MLL-associated leukemogenesis. J Clin Invest 120:593. doi: 10.1172/JCI38030

44. Kantarjian H, Issa JPJ, Rosenfeld CS, Bennett JM, Albitar M, DiPersio J, Klimek V, Slack J, De Castro C, Ravandi F, Helmer R, Shen L, Nimer SD, Leavitt R, Raza A, Saba H (2006) Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes. Cancer 106:1794–1803. doi: 10.1002/CNCR.21792

45. Karatas H, Townsend EC, Cao F, Chen Y, Bernard D, Liu L, Lei M, Dou Y, Wang S (2013) High-Affinity, Small-Molecule Peptidomimetic Inhibitors of MLL1/WDR5 Protein–Protein Interaction. J Am Chem Soc 135:669. doi: 10.1021/JA306028Q

46. Kim B, Song TY, Jung KY, Kim SG, Cho EJ (2017) Direct interaction of menin leads to ubiquitin-proteasomal degradation of β-catenin. Biochem Biophys Res Commun 492:128–134. doi: 10.1016/J.BBRC.2017.08.011

47. Klose RJ, Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: The mark and its mediators. Trends Biochem Sci 31:89–97. doi: 10.1016/j.tibs.2005.12.008

48. Kondo Y, Shen L, Cheng AS, Ahmed S, Boumber Y, Charo C, Yamochi T, Urano T, Furukawa K, Kwabi-Addo B, Gold DL, Sekido Y, Huang THM, Issa JPJ (2008) Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. Nature Genetics 2008 40:6 40:741–750. doi: 10.1038/ng.159

49. Krivtsov A V., Evans K, Gadrey JY, Eschle BK, Hatton C, Uckelmann HJ, Ross KN, Perner F, Olsen SN, Pritchard T, McDermott L, Jones CD, Jing D, Braytee A, Chacon D, Earley E, McKeever BM, Claremon D, Gifford AJ, Lee HJ, Teicher BA, Pimanda JE, Beck D, Perry JA, Smith MA, McGeehan GM, Lock RB, Armstrong SA (2019) A Menin-MLL Inhibitor Induces Specific Chromatin Changes and Eradicates Disease in Models of MLL-Rearranged Leukemia. Cancer Cell 36:660-673.e11. doi: 10.1016/J.CCELL.2019.11.001

50. Kühn MWM, Armstrong SA (2015) Designed to kill: Novel menin-MLL inhibitors target MLL-rearranged leukemia. Cancer Cell 27:431–433. doi: 10.1016/j.ccell.2015.03.012

51. Kunkel EJ, Butcher EC (2003) Plasma-cell homing. Nature Reviews Immunology 2003 3:10 3:822–829. doi: 10.1038/nri1203

52. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ (2002) A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. New England Journal of Medicine 346:564–569. doi: 10.1056/NEJMOA01133202

53. Lai AY, Wade PA (2011) NuRD: A multi-faceted chromatin remodeling complex in regulating cancer biology. Nat Rev Cancer 11:588. doi: 10.1038/NRC3091

54. Landau HJ, McNeely SC, Nair JS, Comenzo RL, Asai T, Friedman H, Jhanwar SC, Nimer SD, Schwartz GK (2012) The checkpoint kinase inhibitor AZD7762 potentiates chemotherapy-induced apoptosis of p53-mutated multiple myeloma cells. Mol Cancer Ther 11:1781–1788. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0949/84459/AM/THE-CHECKPOINT-KINASE-INHIBITOR-AZD7762

55. Laubach JP, Moreau P, San-Miguel JF, Richardson PG (2015) Panobinostat for the treatment of multiple myeloma. Clinical Cancer Research 21:4767–4773. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0530

56. Li X, Song Y (2020) Proteolysis-targeting chimera (PROTAC) for targeted protein degradation and cancer therapy. J Hematol Oncol 13. doi: 10.1186/S13045-020-00885-3

57. Liu HY, Liu YY, Yang F, Zhang L, Zhang FL, Hu X, Shao ZM, Li DQ (2020) Acetylation of MORC2 by NAT10 regulates cell-cycle checkpoint control and resistance to DNA-damaging chemotherapy and radiotherapy in breast cancer. Nucleic Acids Res 48:3638–3656. doi: 10.1093/NAR/GKAA130

58. Lopez-Serra L, Ballestar E, Fraga MF, Alaminos M, Setien F, Esteller M (2006) A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer. Cancer Res 66:8342–8346. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1932

59. Lyu P, Javidi-Parsijani P, Atala A, Lu B (2019) Delivering Cas9/sgRNA ribonucleoprotein (RNP) by lentiviral capsid-based bionanoparticles for efficient 'hit-and-run' genome editing. Nucleic Acids Res 47:e99. doi: 10.1093/NAR/GKZ605

60. Manghwar H, Lindsey K, Zhang X, Jin S (2019) CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. Trends Plant Sci 24:1102–1125. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2019.09.006

61. Matkar S, Thiel A, Hua X (2013) Menin: a scaffold protein that controls gene expression and cell signaling. Trends Biochem Sci 38:394. doi: 10.1016/J.TIBS.2013.05.005

62. Matthes T, Manfroi B, Huard B (2016) Revisiting IL-6 antagonism in multiple myeloma. Crit Rev Oncol Hematol 105:1–4. doi: 10.1016/J.CRITREVONC.2016.07.006

63. Maura F, Bolli N, Angelopoulos N, Dawson KJ, Leongamornlert D, Martincorena I, Mitchell TJ, Fullam A, Gonzalez S, Szalat R, Abascal F, Rodriguez-Martin B, Samur MK, Glodzik D, Roncador M, Fulciniti M, Tai YT, Minvielle S, Magrangeas F, Moreau P, Corradini P, Anderson KC, Tubio JMC, Wedge DC, Gerstung M, Avet-Loiseau H, Munshi N, Campbell PJ (2019) Genomic landscape and chronological reconstruction of driver events in multiple myeloma. Nat Commun 10. doi: 10.1038/S41467-019-11680-1

64. Meng Q, Xia Y (2011) c-Jun, at the crossroad of the signaling network. Protein Cell 2:889–898. doi: 10.1007/S13238-011-1113-3

65. von Metzler I (2022) Multiples Myelom. Therapie-Handbuch - Onkologie und Hämatologie 204–211. doi: 10.1016/B978-3-437-23824-6.00029-8

66. Meyers RM, Bryan JG, McFarland JM, Weir BA, Sizemore AE, Xu H, Dharia N V., Montgomery PG, Cowley GS, Pantel S, Goodale A, Lee Y, Ali LD, Jiang G, Lubonja R, Harrington WF, Strickland M, Wu T, Hawes DC, Zhivich VA, Wyatt MR, Kalani Z, Chang JJ, Okamoto M, Stegmaier K, Golub TR, Boehm JS, Vazquez F, Root DE, Hahn WC, Tsherniak A (2017) Computational correction of copy number effect improves specificity of CRISPR-Cas9 essentiality screens in cancer cells. Nat Genet 49:1779–1784. doi: 10.1038/NG.3984

67. Michels TC, Petersen KE (2017) Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. Am Fam Physician 95:373-383A

68. Miranda Furtado CL, Dos Santos Luciano MC, Silva Santos R Da, Furtado GP, Moraes MO, Pessoa C (2019) Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. Epigenetics 14:1164. doi: 10.1080/15592294.2019.1640546

69. Mishra AK, Dingli D (2019) Metformin inhibits IL-6 signaling by decreasing IL-6R expression on multiple myeloma cells. Leukemia 33:2695–2709. doi: 10.1038/S41375-019-0470-4

70. Moser K, Tokoyoda K, Radbruch A, MacLennan I, Manz RA (2006) Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. Curr Opin Immunol 18:265–270. doi: 10.1016/J.COI.2006.03.004

71. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65:55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4

72. Nachiyappan A, Gupta N, Taneja R (2022) EHMT1/EHMT2 in EMT, cancer stemness and drug resistance: emerging evidence and mechanisms. FEBS J 289:1329–1351. doi: 10.1111/FEBS.16334

73. Nandakumar B, Binder M, Dispenzieri A, Kapoor P, Buadi F, Gertz MA, Lacy M, Dingli D, Hwa L, Leung N, Hayman SR, Gonsalves WI, Kourelis T, Muchtar E, Warsame RM, Go RS, Hobbs MA, Kyle RA, Rajkumar SV, Kumar S (2019)

Continued improvement in survival in multiple myeloma (MM) including high-risk patients. https://doi.org/101200/JCO20193715_suppl8039 37:8039–8039. doi: 10.1200/JCO.2019.37.15_SUPPL.8039

74. Nelakurti DD, Pappula AL, Rajasekaran S, Miles WO, Petreaca RC (2020) Comprehensive Analysis of MEN1 Mutations and Their Role in Cancer. undefined 12:1–19. doi: 10.3390/CANCERS12092616

75. Nishii K, Katayama N, Chen F, Usui E, Kadowaki S, Mitani H, Masuya M, Kageyama SI, Kita K, Shiku H (2001) Aggressive neoplastic plasma cell growth with MLL gene rearrangement after high-dose therapy with autologous stem cell support for multiple myeloma. Bone Marrow Transplantation 2001 27:5 27:555–558. doi: 10.1038/sj.bmt.1702817

76. Qiang YW, Chen Y, Brown N, Hu B, Epstein J, Barlogie B, Shaughnessy JD (2010) Characterization of Wnt/β-catenin signalling in osteoclasts in multiple myeloma. Br J Haematol 148:726. doi: 10.1111/J.1365-2141.2009.08009.X

77. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, 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 SY, Caers J, Usmani SZ, Lahuerta JJ, Johnsen HE, Beksac M, Cavo M, Goldschmidt H, Terpos E, Kyle RA, Anderson KC, Durie BGM, Miguel JFS (2014) International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. Lancet Oncol 15:e538–e548. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5

78. Ravandi F, Lancet J, Amor AA, Badar T, Barrientos J, Bashey A, Burgues JMB, Curran E, Janssen J, Jeyakumar D, Kishtagari A, Montesinos P, Morillo D, Rosenberg A, Schiller G, Ahmed U, Cacovean A, Morris S, Follit C, Mandap C, Butler T, Carraway H (2023) AML-522 COVALENT-101: Phase I Study of BMF-219, a Covalent Menin Inhibitor, in Adult Patients With AML, ALL (With KMT2A/MLL1 Rearrangements, NPM1 Mutation), DLBCL, MM, and CLL/SLL (NCT05153330). Clin Lymphoma Myeloma Leuk 23:S310–S311. doi: 10.1016/S2152-2650(23)01077-7

79. Rodriguez-Otero P, Paiva B, San-Miguel JF (2021) Roadmap to cure multiple myeloma. Cancer Treat Rev 100:102284. doi: 10.1016/j.ctrv.2021.102284

80. Rowley JD, Olney HJ (2002) International workshop on the relationship of prior therapy to balanced chromosome aberrations in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: Overview report. Genes Chromosomes Cancer 33:331–345. doi: 10.1002/GCC.10040

81. Schmolka N, Karemaker ID, Cardoso da Silva R, Recchia DC, Spegg V, Bhaskaran J, Teske M, de Wagenaar NP, Altmeyer M, Baubec T (2023) Dissecting the roles of MBD2 isoforms and domains in regulating NuRD complex function during cellular differentiation. Nature Communications 2023 14:1 14:1–13. doi: 10.1038/s41467-023-39551-w

82. Schrezenmeier E, Jayne D, Dörner T (2018) Targeting B Cells and Plasma Cells in Glomerular Diseases: Translational Perspectives. J Am Soc Nephrol 29:741–758. doi: 10.1681/ASN.2017040367

83. Seki A, Rutz S (2018) Optimized RNP transfection for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in primary T cells. J Exp Med 215:985–997. doi: 10.1084/JEM.20171626

84. Shapiro-Shelef M, Calame KC (2005) Regulation of plasma-cell development. Nature Reviews Immunology 2005 5:3 5:230–242. doi: 10.1038/nri1572

85. Sharifi-Zarchi A, Gerovska D, Adachi K, Totonchi M, Pezeshk H, Taft RJ, Schöler HR, Chitsaz H, Sadeghi M, Baharvand H, Araúzo-Bravo MJ (2017) DNA methylation regulates discrimination of enhancers from promoters through a H3K4me1-H3K4me3 seesaw mechanism. BMC Genomics 18. doi: 10.1186/S12864-017-4353-7

86. Sheng JJ, Jin JP (2016) TNNI1, TNNI2 and TNNI3: Evolution, Regulation, and Protein Structure-Function Relationships. Gene 576:385. doi: 10.1016/J.GENE.2015.10.052

87. Shy BR, Vykunta VS, Ha A, Talbot A, Roth TL, Nguyen DN, Pfeifer WG, Chen YY, Blaeschke F, Shifrut E, Vedova S, Mamedov MR, Chung JYJ, Li H, Yu R, Wu D, Wolf J, Martin TG, Castro CE, Ye L, Esensten JH, Eyquem J, Marson A (2023) High-yield genome engineering in primary cells using a hybrid ssDNA repair template and small-molecule cocktails. Nat Biotechnol 41:521. doi: 10.1038/S41587-022-01418-8

88. Singh S, Narang AS, Mahato RI (2011) Subcellular Fate and Off-Target Effects of siRNA, shRNA, and miRNA. Pharmaceutical Research 2011 28:12 28:2996–3015. doi: 10.1007/S11095-011-0608-1

89. Song JJ, Kingston RE (2008) WDR5 Interacts with Mixed Lineage Leukemia (MLL) Protein via the Histone H3-binding Pocket. J Biol Chem 283:35258. doi: 10.1074/JBC.M806900200

90. Song TY, Lim J, Kim B, Han JW, Youn HD, Cho EJ (2014) The role of tumor suppressor menin in IL-6 regulation in mouse islet tumor cells. Biochem Biophys Res Commun 451:308–313. doi: 10.1016/J.BBRC.2014.07.113

91. Sparbier CE, Gillespie A, Gomez J, Kumari N, Motazedian A, Chan KL, Bell CC, Gilan O, Chan YC, Popp S, Gough DJ, Eckersley-Maslin MA, Dawson SJ, Lehner PJ, Sutherland KD, Ernst P, McGeehan GM, Lam EYN, Burr ML, Dawson MA (2023) Targeting Menin disrupts the KMT2A/B and polycomb balance to paradoxically activate bivalent genes. Nat Cell Biol 25:258. doi: 10.1038/S41556-022-01056-X

92. Standal T, Seidel C, Hjertner O, Plesner T, Sanderson RD, Waage A, Borset M, Sundan A (2002) Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. Blood 100:3002–3007. doi: 10.1182/blood-2002-04-1190

93. Stewart CK, Li J, Golovan SP (2008) Adverse effects induced by short hairpin RNA expression in porcine fetal fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun 370:113–117. doi: 10.1016/J.BBRC.2008.03.041

94. Stirzaker C, Song JZ, Ng W, Du Q, Armstrong NJ, Locke WJ, Statham AL, French H, Pidsley R, Valdes-Mora F, Zotenko E, Clark SJ (2016) Methyl-CpG-binding protein MBD2 plays a key role in maintenance and spread of DNA methylation at CpG islands and shores in cancer. Oncogene 2017 36:10 36:1328–1338. doi: 10.1038/onc.2016.297

95. Sun X, Gao H, Yang Y, He M, Wu Y, Song Y, Tong Y, Rao Y (2019) PROTACs: great opportunities for academia and industry. Signal Transduction and Targeted Therapy 2019 4:1 4:1–33. doi: 10.1038/s41392-019-0101-6

96. Svoboda LK, Bailey N, Van Noord RA, Krook MA, Harris A, Cramer C, Jasman B, Patel RM, Thomas D, Borkin D, Cierpicki T, Grembecka J, Lawlor ER (2017) Tumorigenicity of Ewing sarcoma is critically dependent on the trithorax proteins MLL1 and menin. Oncotarget 8:458. doi: 10.18632/ONCOTARGET.13444

97. Tai YT, Acharya C, An G, Moschetta M, Zhong MY, Feng X, Cea M, Cagnetta A, Wen K, Van Eenennaam H, Van Elsas A, Qiu L, Richardson P, Munshi N, Anderson KC (2016) APRIL and BCMA promote human multiple myeloma growth and immunosuppression in the bone marrow microenvironment. Blood 127:3225–3236. doi: 10.1182/BLOOD-2016-01-691162

98. Tai YT, Mayes PA, Acharya C, Zhong MY, Cea M, Cagnetta A, Craigen J, Yates J, Gliddon L, Fieles W, Hoang B, Tunstead J, Christie AL, Kung AL, Richardson P, Munshi NC, Anderson KC (2014) Novel anti–B-cell maturation antigen antibody-drug conjugate (GSK2857916) selectively induces killing of multiple myeloma. Blood 123:3128. doi: 10.1182/BLOOD-2013-10-535088

99. Thakker R V. (2010) Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 24:355–370. doi: 10.1016/J.BEEM.2010.07.003

100. Wakimoto Y, Jiang J, Wakimoto H (2014) Isolation of Single-Stranded DNA. Curr Protoc Mol Biol 107:2.15.1-2.15.9. doi: 10.1002/0471142727.MB0215S107

101. Wang Y, Ozawa A, Zaman S, Prasad NB, Chandrasekharappa SC, Agarwal SK, Marx SJ (2011) The tumor suppressor protein menin inhibits AKT activation by regulating its cellular localization. Cancer Res 71:371. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3221

102. Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM (2004) Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. Gene 341:19–39. doi: 10.1016/j.gene.2004.06.044

103. Winter GE, Buckley DL, Paulk J, Roberts JM, Souza A, Dhe-Paganon S, Bradner JE (2015) Selective Target Protein Degradation via Phthalimide Conjugation. Science 348:1376. doi: 10.1126/SCIENCE.AAB1433

104. Wolffhardt TM, Ketzer F, Telese S, Wirth T, Ushmorov A (2023) Dependency of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia and Multiple Myeloma Cell Lines on

MEN1 Extends beyond MEN1–KMT2A Interaction. Int J Mol Sci 24:16472. doi: 10.3390/IJMS242216472

105. Xie Y, Wang F, Yu J, Zhang J, Liu Y, Li M, Qi J (2021) Silencing of MBD2 and EZH2 inhibits the proliferation of colorectal carcinoma cells by rescuing the expression of SFRP. Oncol Rep 46. doi: 10.3892/OR.2021.8201

106. Xu B, Li SH, Zheng R, Gao S Bin, Ding LH, Yin ZY, Lin X, Feng ZJ, Zhang S, Wang XM, Jin GH (2013) Menin promotes hepatocellular carcinogenesis and epigenetically up-regulates Yap1 transcription. Proc Natl Acad Sci U S A 110:17480–17485. doi: 10.1073/PNAS.1312022110/-/DCSUPPLEMENTAL/SD01.XLS

107. Yang YF, Pan YH, Tian QH, Wu DC, Su SG (2018) CBX1 Indicates Poor Outcomes and Exerts Oncogenic Activity in Hepatocellular Carcinoma. Transl Oncol 11:1110–1118. doi: 10.1016/J.TRANON.2018.07.002

108. Yao R, Sun X, Xie Y, Liu L, Han D, Yao Y, Li H, Li Z, Xu K (2018) Lithium chloride inhibits cell survival, overcomes drug resistance, and triggers apoptosis in multiple myeloma via activation of the Wnt/β-catenin pathway. Am J Transl Res 10:2610

109. Yokoyama A, Somervaille TCP, Smith KS, Rozenblatt-Rosen O, Meyerson M, Cleary ML (2005) The Menin Tumor Suppressor Protein Is an Essential Oncogenic Cofactor for MLL-Associated Leukemogenesis. Cell 123:207–218. doi: 10.1016/J.CELL.2005.09.025

110. Zeisig BB, Milne T, García-Cuéllar M-P, Schreiner S, Martin M-E, Fuchs U, Borkhardt A, Chanda SK, Walker J, Soden R, Hess JL, Slany RK (2004) Hoxa9 and Meis1 Are Key Targets for MLL-ENL-Mediated Cellular Immortalization. Mol Cell Biol 24:617. doi: 10.1128/MCB.24.2.617-628.2004

111. Zhang X, Zhang H, Lan H, Wu J, Xiao Y (2023) CAR-T cell therapy in multiple myeloma: Current limitations and potential strategies. Front Immunol 14. doi: 10.3389/FIMMU.2023.1101495

112. Zhao F, Chen Y, Li R, Liu Y, Wen L, Zhang C (2010) Triptolide alters histone H3K9 and H3K27 methylation state and induces G0/G1 arrest and caspase-

dependent apoptosis in multiple myeloma in vitro. Toxicology 267:70–79. doi: 10.1016/J.TOX.2009.10.023

113. Zhou M, Zhou K, Cheng L, Chen X, Wang J, Wang XM, Zhang Y, Yu Q, Zhang S, Wang D, Huang L, Huang M, Ma D, Cheng T, Wang CY, Yuan W, Zhou J (2018) MBD2 ablation impairs lymphopoiesis and impedes progression and maintenance of T-ALL. Cancer Res 78:1632–1642. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1434/657755/AM/MBD2-ABLATION-IMPAIRS-LYMPHOPOIESIS-AND-IMPEDES

114. Zhu J, Sammons MA, Donahue G, Dou Z, Vedadi M, Getlik M, Barsyte-Lovejoy D, Al-Awar R, Katona BW, Shilatifard A, Huang J, Hua X, Arrowsmith CH, Berger SL (2015) Prevalent p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth. Nature 525:206. doi: 10.1038/NATURE15251

115. GEKID-Atlas. https://atlas.gekid.de/CurrentVersion/atlas.html. Accessed 9 Oct 2022

116. Cancer Facts & Figures 2021 | Enhanced Reader. Accessed 29 Jul 2023

117. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge für Patienten mit monoklonaler Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) oder Multiplem Myelom

118. NCI Thesaurus. https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI%20Thesaurus&code=C48812. Accessed 7 Oct 2022

119. Decitabine | C8H12N4O4 | CID 451668 - PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/451668. Accessed 19 Apr 2024

7. Danksagung

Die Inhalte der Seite wurden aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

8. Lebenslauf

Die Inhalte dieser und der darauffolgenden Seite wurden aus Gründen des Datenschutzes entfernt.