

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II (Hämatologie und Onkologie)

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**Etablierung eines Vektorsystems zum shRNA-vermittelten
Knockdown von Y-box binding protein 1**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Katharina Geiger

aus Nürnberg

Würzburg, Februar 2016

Referent: Prof. Dr. R. C. Bargou

Korreferent: Prof. Dr. M. Eilers

Dekan: Prof. Dr. C.-T. Germer

Tag der mündlichen Prüfung: 28. April 2017

Die Promovendin ist Ärztin

gewidmet meinen lieben Eltern,
deren Geist mich beflügelte,
deren Unterstützung mich trug,
deren Weg mich inspirierte.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Multiples Myelom	1
1.1.1	Grundlagen und aktueller Wissensstand	1
1.1.2	Pathogenese& Klinik	2
1.1.3	Diagnostik	4
1.1.4	Therapie	6
1.1.5	Prognose	7
1.2	Y box binding protein 1 (YBX1)	8
1.2.1	Allgemeines	8
1.2.2	Struktur von YBX1: Gen und Protein	9
1.2.3	Funktionen von YBX1 im menschlichen Organismus	9
1.2.4	YBX1 und seine Bedeutung in der Tumorbilogie	12
1.2.5	Bedeutung von YBX1 für das Multiple Myelom	14
1.2.6	YBX1 und MYC	14
1.3	RNA-Interferenz (RNAi)	17
1.3.1	Allgemeines	17
1.3.2	Wirkmechanismus	17
1.3.3	Anwendung in der Molekularbiologie	19
1.3.4	Gentechnische Fortschritte: Von der transienten siRNA zur konditionell exprimierten shRNA	20
1.3.4.1	siRNA Expression durch die RNA-Polymerase III	20
1.3.4.2	shRNA Expression durch die RNA-Polymerase II (miR-shRNA)	21
1.3.4.3	Induzierbares vs. nicht-induzierbares shRNA exprimierendes Vektorsystem	23
1.4	Das Mausmodell MOPC315.BM	25
1.4.1	Gruppe I: Das Xenograft-Modell	25
1.4.2	Gruppe II: Das 5T- Modell	26
1.4.3	Gruppe III: Das Induktions-Modell	27
1.4.4	Gruppe IV: Das transgene Modell	28

1.4.5	Vergleich der vier Gruppen	29
1.4.6	MOPC315.BM: Beschreibung, Vorteile und Anwendung	30
1.5	Fragestellung meiner Arbeit	32
2	MATERIALIEN	33
2.1	Bakterien und Zelllinien	33
2.1.1	Bakterienstämme	33
2.1.2	Zelllinien	33
2.2	Nukleinsäuren	33
2.2.1	shRNA-Inserts	33
2.2.2	Primer	34
2.2.2.1	Liste der verwendeten Primer	34
2.2.3	Plasmide	35
2.3	Antikörper zur indirekten Immunfluoreszenz und Western Blot.....	36
2.3.1	Primärantikörper	36
2.3.2	Sekundärantikörper	36
2.4	Substanzen.....	37
2.4.1	Substanzen bei der Klonierung	37
2.4.2	Substanzen in der Zellkultur	38
2.5	Medien	39
2.5.1	Medien zur Bakterienkultivierung	39
2.5.2	Medien in der Zellkultur	39
2.6	Puffer und Lösungen.....	40
2.7	Enzyme	44
2.8	Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine	45
2.9	Molekular- und zellbiologische Kitsysteme	45
2.10	Geräte	45

2.11 Verbrauchsmaterialien	47
3 METHODEN	48
3.1 Molekularbiologische Methoden	48
3.1.1 Anzucht von Bakterienkulturen.....	48
3.1.1.1 Flüssigkulturen.....	48
3.1.1.2 Kulturen auf Agarplatten	48
3.1.2 Hybridisierung von einzelsträngiger (ss-) DNA	49
3.1.3 Restriktionsverdau.....	49
3.1.4 Phosphorylierung und Dephosphorylierung	49
3.1.5 Ligation.....	50
3.1.6 Herstellen elektrokompenter Zellen.....	50
3.1.7 Transformation	51
3.1.8 Kolonie-PCR.....	51
3.1.9 Aufreinigung von DNA.....	52
3.1.9.1 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> Mini-Präparation	52
3.1.9.2 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> Midi-, Maxi- und Mega-Präparation	53
3.1.9.3 Isolation von DNA aus einem Agarosegel	53
3.1.10 Lagerung von Bakterien bei -80°C	53
3.1.11 Agarose- Gelelektrophorese	54
3.1.12 Sequenzierungen	54
3.1.13 Bestimmung der DNA- Konzentration	54
3.1.14 Klonieren ohne den Gebrauch der Ligase.....	54
3.2 Methoden in der Zellkultur	55
3.2.1 Kultivieren von Zellen in Suspension und Adhärenz	55
3.2.2 Auftauen von Zellen	56
3.2.3 Quantitative und qualitative Zellzählung.....	56
3.2.3.1 Bestimmung der Zellzahl per Durchflusszytometrie	56
3.2.3.2 Zytologische Analyse per Durchflusszytometrie	57
3.2.4 Transfektionsmethoden.....	57
3.2.4.1 Transienter DNA- Transfer	57
3.2.4.2 Virus-vermittelter DNA-Transfer	57
3.2.4.2.1 Virus-Produktion (Calcium-Phosphat-Präzipitation)	57
3.2.4.2.2 Titration lentiviraler Vektoren.....	59
3.2.4.2.3 Stabile lentivirale Transduktion	59

3.2.5	Erzeugung von Einzelzellklonen durch Verdünnung	60
3.2.6	Durchführung eines Cytospins	60
3.3	Proteinbiochemische Methoden	61
3.3.1	Indirekte Immunfluoreszenz	61
3.3.2	Western Blot.....	61
3.3.2.1	Ernte der Zellen	61
3.3.2.2	Proteinextraktion durch Zellyse.....	62
3.3.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	62
3.3.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	62
3.3.2.5	Immunoblot	63
3.3.2.6	Immunbiochemischer Nachweis transferierter Proteine	63
3.3.2.7	Strippen von Membranen	63
4	ERGEBNISSE	64
4.1	Klonierung I: Klonierung <i>YBX1</i> spezifischer shRNAs in den nicht-induzierbaren Vektor pLVTHM	64
4.1.1	Klonierung von <i>YBX1</i> shRNA in pLVTHM.....	65
4.1.2	Transformation der Ligationsreaktion.....	67
4.1.3	Kolonie-PCR von pLVTHM#16, 17, 22, 23.....	67
4.1.4	Minipräparation von pLVTHM#22,23,16,17 und Restriktionsverdau	68
4.1.5	Sequenzierung von pLVTHM#22,23,16,17	69
4.1.6	Maxipräparation der durch Sequenzierung verifizierten Plasmide	70
4.2	Klonierung II: Vergebliche Versuche der Insertion der gegen <i>YBX1</i> gerichteten shRNA in die induzierbaren bakteriellen Vektoren pLVCT-tTR-KRAB und pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2	70
4.2.1	Klonierung von <i>YBX1</i> shRNA in pLVCT-tTR-KRAB und pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2	73
4.2.2	Transformation der mit dem ds-Oligonukleotid ligierten Vektoren pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 und pLVCT-tTR-KRAB in <i>E.coli</i>	76
4.2.3	Vergebliche Versuche der Identifikation eines positiven Klons mit Hilfe von Kolonie-PCR, Restriktionsverdau und Sequenzierung.....	76
4.2.4	Verschiedene Ansätze der Problemlösung	76

4.3 Klonierung III: Ligasefreies Klonieren der gegen <i>YBX1</i> gerichteten shRNA in die induzierbaren bakteriellen Vektoren pLVCT-tTR-KRAB und pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2	77
4.3.1 Design der genspezifischen Primer mit 15 bp-Überhängen	78
4.3.2 PCR-Amplifikation des shRNA tragenden Fragments und präparatorische Aufreinigung	79
4.3.3 Screening der Klone mit Hilfe der Kolonie-PCR	80
4.3.4 Verifizierung der Klone mittels Restriktionsverdau	81
4.3.5 Sequenzierung verschiedener Klone von #22,23,16,17 in pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 und pLVCT-tTR-KRAB	82
4.3.6 Maxipräparation der verifizierten shRNA exprimierenden und der für die Virusproduktion benötigten Plasmide	83
4.4 Klonierung IV: Klonierung YB-1 spezifischer shRNAs in pTRIPZ	84
4.5 Herstellung einer MOPC315.BM.luc Zelllinie mit konditionell exprimierbarer shRNA	85
4.5.1 Bestimmung der Konzentration für eine Puromycin-Selektion	85
4.5.2 Transfektion von #23-5rt3, #23-5tTR15, #17-4rt4 und #17-4tTR1 in HEK 293K- Zellen	86
4.5.2.1 Transiente Transfektion	86
4.5.2.2 Stabile Transfektion	86
4.5.2.2.1 Synthese lentiviraler Partikel	86
4.5.2.2.2 Bestimmung des MOI (=Multiplicity of Infection) und der Induzierbarkeit	87
4.5.3 Transduktion der shRNA-tragenden Viruspartikel in die Zielzelle MOPC315.BM	87
4.5.4 Transduktion des Tet-On Vektors #23-5tTR15 in die Zielzelle MOPC315.BM	88
4.5.3.1 Auswertung per Durchflusszytometrie (FACS)	88
4.5.4 Vergebliche Versuche der Einzellklon-Synthese mit dem Vektorsystem pLVCT-tTR-KRAB und pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2	91
4.5.5 Einzelzellklon im Vektorsystem pTRIPZ	92
4.5.5.1 Auswertung per Durchflusszytometrie (FACS)	92
4.5.5.2 Auswertung per Fluoreszenzmikroskop	93
4.5.5.3 Auswertung per Western Blot	94
5 DISKUSSION	96

5.1	shRNA vs. siRNA	96
5.1.1	Wahl des passenden RNAi-Trägers.....	96
5.2	Induzierbares vs. nicht-induzierbares Expressionssystem	97
5.2.1	Vergleich verschiedener induzierbarer Expressionssysteme.....	98
5.3	Gründe für einen Einsatz mehrerer shRNA-Konstrukte	100
5.4	Auswahl der Sequenzen zum Knockdown	101
5.4.1	Kriterien	101
5.4.2	Anwendung der Kriterien auf die in dem Experiment verwendeten Zielsequenzen	103
5.5	Konstruktion des shRNA-tragenden Vektorsystems: Schwachpunkte 103	
5.6	Einbringen des shRNA-tragenden Vektorsystems in MOPC315.BM104	
5.6.1	Gründe für eine niedrige Transduktionseffizienz.....	104
5.6.2	Diskussion der angewendeten Transfektionsmethode.....	105
5.6.2.1	Transduktion per lentiviralem Träger	105
5.6.3	Limitationen in der Einzelzellklon-Herstellung.....	106
5.7	Zukünftiges Forschungspotential	108
5.7.1	Ausblick auf den Einsatz in vivo	108
5.7.2	Ausblick auf den potenziellen therapeutischen Nutzen.....	110
5.7.3	Zusammenfassung	112
6	ZUSAMMENFASSUNG	114
7	LITERATURVERZEICHNIS	116
8	ANHANG	133
8.1	Abkürzungsverzeichnis	133
8.2	Abbildungsverzeichnis	135

8.3 Tabellenverzeichnis.....	140
8.4 Vektorenverzeichnis.....	141
DANKSAGUNG	149
LEBENS LAUF	150

1 Einleitung

1.1 Multiples Myelom

1.1.1 Grundlagen und aktueller Wissensstand

Das Multiple Myelom ist ein Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zell-Reihe und stellt die monoklonale Vermehrung einer malignen Plasmazelle dar.

Damit lässt es sich in die Klasse der Plasmazellstörungen kategorisieren, zu denen u.a. auch die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) und der M. Waldenström gehören.¹ Erstere stellt eine gesicherte Präkanzerose für das Multiple Myelom dar.²

Mit einer Inzidenz von 4/100.000/Jahr ist es der häufigste Tumor des Knochens und Knochenmarks. Es hat einen Anteil von 10% aller hämatologischen Neoplasien³ und tritt eher im höheren Lebensalter auf. So liegt der Altersmedian bei Primärdiagnose im 65. Lebensjahr.⁴

Verschiedene Einteilungen klassifizieren den vielseitigen Charakter des multiplen Myeloms. Neben eines in den meisten Fällen multiplen Auftretens in Knochenmark und Knochen kann es sich auch solitär als sogenanntes Plasmozytom präsentieren oder einen leukämischen Verlauf nehmen.

Der entartete Plasmazellklon produziert meist komplette oder inkomplette Immunglobuline. Diese gehören meist der Klasse IgG oder IgA an. Das IgD- und IgE-Myelom sind sehr selten.⁵ Eine vermehrte Produktion von Leichtketten äußert sich meist als sogenannte „Bence-Jones-Proteinurie“ (Häufigkeit einzelner Subklassen siehe Tabelle 1).

Tabelle 1. Einteilung und Häufigkeit nach Paraproteinbildung⁶

Typ	Häufigkeit in %
IgG- Myelom	50
IgA-Myelom	25
IgD-, IgE-, IgM-Myelom	1
κ- und λ-Leichtketten-Myelom (Bence-Jones-Myelom)	20-25
nichtsekretorisches Myelom	1-3

Ein Unterschied lässt sich auch in der Dynamik des Verlaufs feststellen: Während das klassische Multiple Myelom eine rasche Progredienz mit entsprechender Klinik aufweist, schreitet das „smoldering myeloma“ nur langsam voran und nimmt einen indolenten Verlauf.⁷

1.1.2 Pathogenese& Klinik

Im Rahmen der physiologischen B-Zell-Differenzierung stellen Plasmazellen das Endprodukt dar, deren Aufgabe die Bildung von Immunglobulinen ist.¹ Sie bilden damit einen wichtigen Teil der sekundären Immunantwort.

Verschiedene genetische Veränderungen führen in einem mehrstufigen Prozess ausgehend von einer post-Keimzentrums-B-Zelle zur Bildung einer malignen Plasmazelle.⁸ Den ersten Schritt in dieser Entwicklung stellt das Auftreten einer limitierten Anzahl klonaler Plasmazellen dar, als MGUS bekannt. Im Gegensatz zum Multiplen Myelom sind die Patienten beschwerdefrei und ohne Endorganschaden im Sinne der CRAB-Kriterien (siehe Tabelle 2). Sie haben jedoch ein jährliches Risiko von einem Prozent eines Übergangs der Erkrankung zum Multiplen Myelom.⁹ Hierbei treten erneut komplexe genetische Mutationen auf. Eine häufig vorkommende Mutation ist dabei die IgH Translokation auf Chromosom 14, die den Enhancer der schweren Kette der Immunglobuline neben ein Protoonkogen setzt und damit eine unkontrollierte Aktivierung bewirkt.⁸ Diese Mutation betrifft 50% aller am Multiplen Myelom Erkrankten und wird als frühes pathogenetisches Ereignis angesehen. Im Gegensatz dazu fällt die aktivierende Mutation des N- und K-ras-Gen in eine spätere Myelomgenetische Phase.¹⁰ Verschiedene auf die Progression eines B-Lymphozyten

Einleitung

zur malignen Plasmazelle einwirkende Stoffwechselwege sind als Übersicht in Abbildung 1 dargestellt.

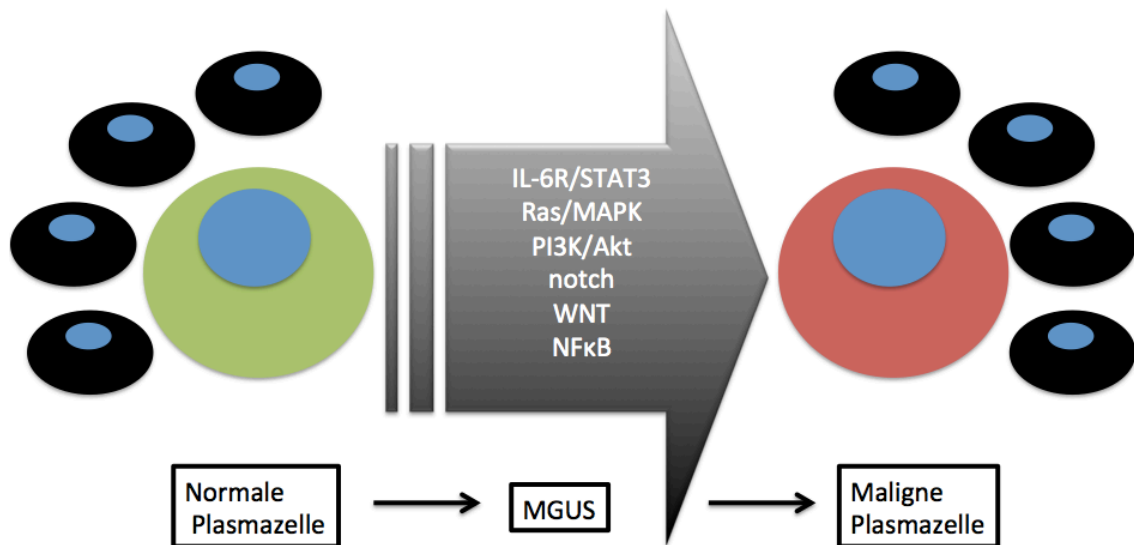


Abbildung 1 Vereinfachte Darstellung der in der pathogenetischen Entwicklung zum Multiplen Myelom bedeutenden Stoffwechselwege mit Andeutung der mehrstufigen Progression über MGUS und der Rolle der *Microenvironment* (schwarz) bestehend aus Knochenmarkstromazellen, Osteoblasten und Osteoklasten (zusammengestellt nach ⁸)

Pathophysiologisch ist für die Progression eine Interaktion der malignen Plasmazellen mit den Knochenmarkstromazellen („Microenvironment“) entscheidend.¹¹ Sie fördern das Wachstum der Tumorzellen und verhindern den Eintritt der Apoptose durch eine Hochregulation antiapoptotischer Enzyme und Zellzyklus-regulierender Zytokine.¹² Als ein auf diesen Kreislauf einwirkender Komplex spielt auch die Interaktion zwischen *YBX1* und *MYC* eine wichtige Rolle, die durch gegenseitige transkriptionelle und translationelle Regulation zum Überleben der malignen Plasmazelle beitragen.¹³ Das genaue Verständnis der zellulären Vorgänge beim Multiplen Myelom hat eine entscheidende Bedeutung für die Evaluierung potentieller molekularer Angriffspunkte neuer Therapieansätze, wie sie z.B. durch *YBX1* gegeben sein könnten.

Auf zellulärer Ebene führt eine Imbalance zugunsten von osteoklastenaktivierenden (RANKL, MIP-1 α , MIP-1 β) und osteoblastenhemmenden (DKK1, sFRP2) Faktoren zu vermehrter Osteolyse und damit zu Knochenschmerzen und pathologischen Spontanfrakturen.^{11,14}

Einleitung

Eine vermehrte Infektanfälligkeit tritt auf, da die Immunglobuline trotz vermehrten Auftretens die Heterogenität ihres infektiologischen Umfeldes durch ihre Monoklonalität nicht mehr adäquat beantworten können. Es kommt zu einem sekundären Antikörpermangel-Syndrom.

Sie lagern sich in den Nierentubuli ab und haben die gefürchtete Myelomniere zur Folge, die in 10% eine Dialysepflichtigkeit herbeiführt. Eine Gammopathie-assoziierte Amyloidose kann ebenso zur Verschlechterung der Nierenfunktion beitragen, jedoch auch vielfältige andere klinische Symptome infolge der Ablagerung in verschiedenen Organsystemen bewirken.

Weitere durch die Erkrankung bedingte Komplikationen stellen eine Panzytopenie infolge Knochenmarkinfiltration, das Hyperviskositätssyndrom und eine Hyperkalziämie und ihre Folgen dar.⁴

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung besteht bei 1-2% der Patienten eine extramedulläre Manifestation der Erkrankung, bei 8% entsteht sie im Laufe der Erkrankung.³

1.1.3 Diagnostik

Entsprechend der Diagnosekriterien der International Myeloma Working Group von 2003 muss das Multiple Myelom in Abgrenzung zu anderen Plasmazellstörungen folgende Charakteristika erfüllen (modifiziert aus ⁵):

Tabelle 2. Diagnosekriterien des multiplen Myeloms und anderer Plasmazellstörungen (modifiziert nach ⁵)

Diagnose	Multiples Myelom	Smoldering Myeloma	MGUS	Solitäres Plasmozytom	Plasmazell-Leukämie
Klonale Plas-mazellen im Knochenmark	≥ 10% <i>und/ oder</i>	≥ 10% <i>und/ oder</i>	< 10% <i>und</i>	< 10% <i>und</i>	
Monoklonales Protein im Se- rum	nachweis- bar <i>und/oder</i>	≥ 30 g/l	< 30 g/l	nicht obligat nachweisbar	
Monoklonales Protein im Urin	nachweis- bar <i>und</i>	<i>und</i>	<i>und</i>	nicht obligat nachweisbar <i>und</i>	
Endorganschä- den (CRAB- Kriterien*)	nachweis- bar	nicht nach- weisbar	nicht nach- weisbar	nicht nach- weisbar <i>und</i>	
andere Mani- festationen				singuläre Os- teolyse (evt. mit Weicht- eiltu-mor)	>2x10 ⁵ /l klonale Plasma- zellen im Blut <i>und/ oder</i>
				klonale Plas- mazellen bi- optisch gesi- chert	>20% Plasma- zellen im Differential- blut
<p>* CRAB-Kriterien:</p> <ul style="list-style-type: none"> • (C) Kalzium im Serum erhöht • (R) Niereninsuffizienz mit Serumkreatinin > 2 mg/dl • (A) Anämie mit Hb <10 g/dl • (B) Osteolysen oder Osteoporose mit Kompressionsfrakturen 					

Prognostisch relevant ist eine Erhöhung von β2-Mikroglobulin, welches mit der Myelomzellmasse und dem Grad der Niereninsuffizienz korreliert.¹⁵ Es wird im

Rahmen der ISS-Klassifikation zusammen mit Serumalbumin zur Unterteilung in 3 prognostische Subgruppen verwendet.

1.1.4 Therapie

„Neue Forschungsergebnisse zur Plasmazelldifferenzierung haben zuletzt einerseits zum Verständnis der Ätiopathogenese beigetragen und andererseits neue (Angriffspunkte für sogenannte „targeted therapies“) gezeigt“.¹

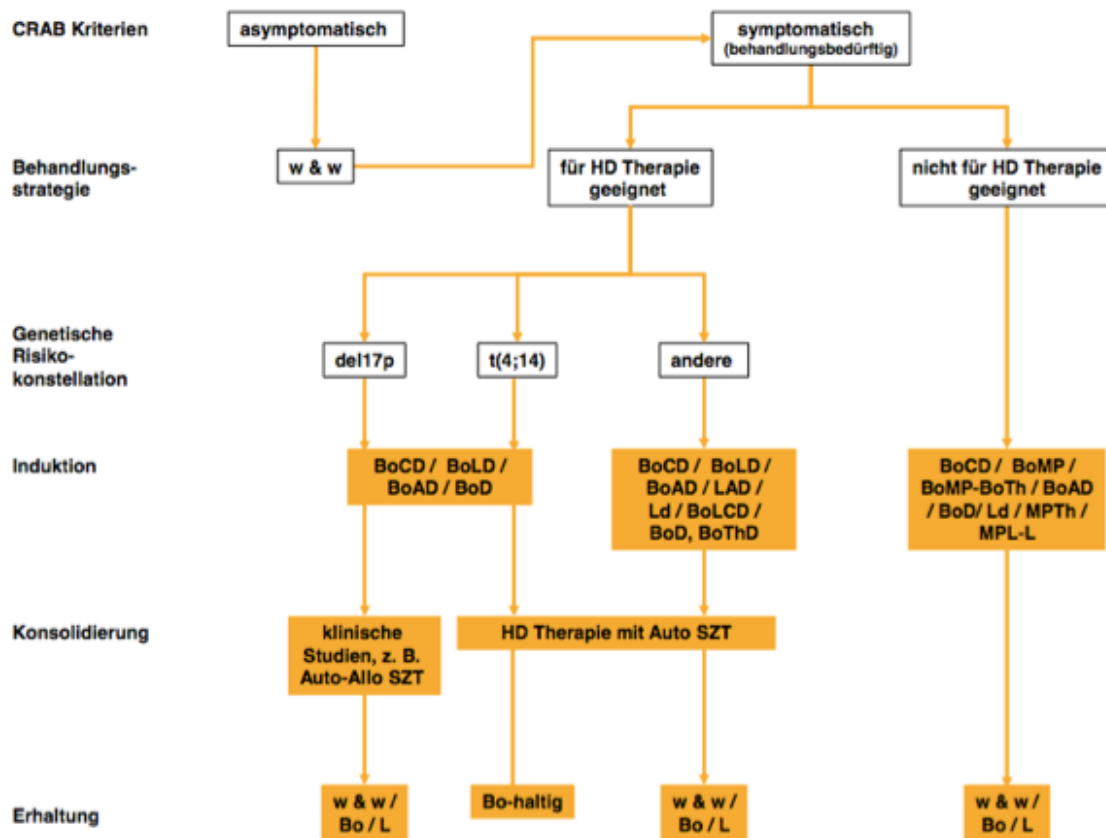
Einen dieser potentiellen Angriffspunkte stellt das Proteasom dar, das für den Abbau von Proteinen sowohl in gesunden wie auch in Krebszellen verantwortlich ist. Durch den Proteasomen-Inhibitor Bortezomib werden vitale Proteolyse-Prozesse unterdrückt und die Myelomzellen somit zur Apoptose gebracht.¹⁶ Die Addition Bortezomibs zu klassischen Therapieregimen hat in den letzten Jahren entscheidende Fortschritte für das Therapieansprechen und die Überlebensrate gebracht.¹⁷

Diese bereichern die gegen die Erkrankung verfügbaren Mittel, ersetzen jedoch nicht bewährte therapeutische Optionen wie die autologe Stammzelltransplantation, die nach wie vor ihren Stellenwert vor allem bei jungen Patienten und Hochrisikopatienten hat.¹⁸

Experimentelle Studienprotokolle unter Verwendung neuerer Substanzen wie Carfilzomib (Proteasominhibitor), Pomalidomid (Immunmodulator), Daratumumab (monoklonaler Antikörper gegen CD38), Elotuzumab (monoklonaler Antikörper gegen SLAMF7) bzw, Panobinostat (Histondeacetylase-Inhibitor) werden in der Rezidivtherapie eingesetzt.^{19,20} Einige neuere zielgerichtete Arzneimittel wie etwa Hsp90- Inhibitoren befinden sich noch in verschiedenen Phasen der Erprobung.²¹

Nach den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie wird folgende Strategie zur möglichen Eradikation des malignen Plasmazellklons favorisiert⁵:

Einleitung



Legende: **w&w** – watch and wait: abwartendes Verhalten; **A** – Doxorubicin; **Auto SZT** – autologe und nachfolgende allogene Stammzelltransplantation; **Bo** – Bortezomib; **C** – Cyclophosphamid; **CRAB**-Kriterien siehe vorhergehende Tabelle; **D** – hochdosiertes Dexamethason; **d** – niedrigdosiertes Dexamethason; **L** – Lenalidomid; **M** – Melphalan; **P** – Prednisolon; **T** – Thalidomid; **HD-Therapie** – Hochdosis-Therapie.

Abbildung 2 Therapiealgorithmus Multiples Myelom nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie. September 2013⁵

Weitere supportive Therapiemaßnahmen wie die Gabe von Bisphosphonaten bei Knochenbeteiligung oder die Substitution von Erythrozytenkonzentraten bei schwerer Anämie werden je nach Indikation durchgeführt.

1.1.5 Prognose

Die Prognose ist aufgrund der Diversität der Erkrankung sehr unterschiedlich. Die mediane Überlebenszeit nach Diagnosestellung liegt bei etwa drei Jahren.⁹ Trotz therapeutischer Fortschritte ist die Erkrankung immer noch unheilbar.²²

Eine Tatsache ist, dass durch die neuen Therapieansätze der letzten Jahre eine signifikante Verlängerung von Lebensquantität und –qualität herbeigeführt werden konnte. Neue molekulare Therapieansätze, die sich auf die Beendigung der schnellen Krankheitsprogression in späten Myelomstadien fokussieren, sind jedoch weiterhin ein zentrales Ziel gegenwärtiger Forschung.

1.2 Y box binding protein 1 (YBX1)

1.2.1 Allgemeines

YBX1 (Y-box binding protein 1) gehört zur Familie der Cold-Shock-Proteine und ist in viele Kernprozesse des Lebens wie Zellwachstum, Apoptose und Embrogenese involviert. Es ist ein Teil der Y-box-Familie, der außer YBX1, auch als DNA-bindendes Protein B (dpbB) oder p50 bezeichnet, noch YBX2, YBX3 und ihre Subfamilien angehören (siehe Tabelle 3).²³

Tabelle 3. Subfamilien von YBX1 (zusammengestellt nach ²³)

Familie	YBX1	YBX2	YBX3
Mitglieder	<i>Frgy1</i> von <i>X. laevis</i> , mouse <i>Msy1</i> , huma- nes <i>YBX1</i> , rabbit <i>p50</i> , chicken <i>Ybx1</i> , bovine <i>EfiA</i>	<i>Frgy2</i> (p54/56) von <i>X. laevis</i> , mouse <i>Msy2</i> , humane YBX2 Pro- teine: YBX2, dbpC, contrin	<i>Ybx3</i> von <i>X. lae- vis</i> , mouse <i>Msy3</i> , humanes <i>dpbA</i> (<i>csdA</i>) Protein

Die Cold-Shock-Proteine enthalten als Gemeinsamkeit die Cold-Shock-Domäne, eine in der Entwicklung vom Bakterium zum Menschen hochkonservierte β -Faltblattstruktur, die Nukleinsäuren binden kann. Bakterielle Cold-Shock-Proteine, die in ihrer Aminosäuresequenz zu etwa 40% mit eukaryotischen Cold-Shock-Proteinen übereinstimmen, können in ihrer Funktion als RNA-Chaperone in praktisch jeden Schritt der Genexpression, inklusive Transkription und Translation eingreifen.²⁴ Cold-Shock-Proteine spielen also eine bedeutende Rolle sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten.

1.2.2 Struktur von YBX1: Gen und Protein

Das Protein YBX1 wird durch das Gen *YBX1* auf Chromosom 1p34 codiert.²⁵ Der genomische Locus ist 19 kb lang und besteht aus 8 Exons und 7 Introns, die im Laufe der mRNA Reifung zu einer 1,5 kb langen mRNA prozessiert werden. Exons 1-5 codieren für die Cold-Shock-Domäne.²⁶

Das YBX1 Protein ist 42 kDa groß und besteht aus 324 Aminosäuren.²⁷ Es besitzt 3 Domänen (siehe Abbildung 3): Die oben beschriebene zentrale Cold-Shock-Domäne, eine Alanin- und Prolin-reiche variable N-terminale Domäne und eine C-terminale Domäne mit jeweils etwa 30 bp langen alternierenden Clustern von basischen und sauren Aminosäuren.²³ Letztere scheint an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt zu sein. Sie zeigte in vitro eine starke Affinität zu einzelsträngiger DNA/RNA²⁸ und scheint die Formation von Dimeren zu begünstigen. Die N-terminale Domäne scheint bei der Initiation der Transkription eine Rolle zu spielen.²⁹

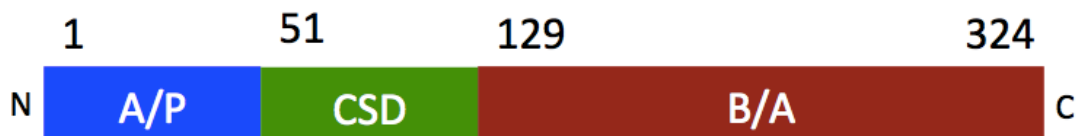


Abbildung 3 Struktureller Aufbau des Proteins YBX1 mit Alanin- und Prolin-reichem N-Terminus (A/P), Cold-Shock-Domäne (CSD) und basischen und sauren Aminosäure-Clustern (B/A) am C-Terminus (modifiziert nach²⁹)

1.2.3 Funktionen von YBX1 im menschlichen Organismus

Zellproliferation. *YBX1* wurde erstmals in Zusammenhang mit der Y-Box-Sequenz des MHC Klasse II-Promotors erwähnt, die er bindet und damit die Transkription inhibiert.³⁰ Die Y-Box ist eine invertierte Version der CCAAT-Box, die in den Promotorregionen vieler eukaryotischer Gene zu finden ist.²⁷ Über sie nimmt *YBX1* in seiner Rolle als Transkriptionsfaktor auf die transkriptionelle Initiation Einfluss, indem es direkt an die Y-Box bindet, wie in oben genannten Fall, oder mit anderen Wachstumsfaktoren als Koaktivator oder Korepressor interagiert.²⁹ Häufig sind von dieser transkriptionellen Einflussnahme wach-

tumsassoziierte Gene betroffen wie *EGFR*.³¹ Dies zeigt die essenzielle Bedeutung *YBX1*s für die Proliferation und Entwicklung von Zellen. Seine proliferationsfördernde Wirkung zeigt sich auch in der Stimulation der Expression von Cyclin A und Cyclin B1 in der G1/S-Phase des Zellzyklus.³²

Regulation von Transkription und Translation. *YBX1* spielt auch eine bedeutende Rolle als Bestandteil des zytoplasmatischen *messenger ribonucleoprotein particle* (mRNP), einer Akkumulation verschiedener Proteine an die mRNA zur kotranskriptionellen Prozessierung.^{33,34} *YBX1* ist damit entscheidend in die Regulation der Genexpression nicht nur auf transkriptioneller, sondern auch auf translationaler Ebene involviert.³⁴

Je nach Höhe seiner Konzentration nimmt *YBX1* einen regulierenden Einfluss auf die Translation, indem es das 5'-cap Ende stabilisiert bzw. destabilisiert (siehe Abbildung 4). Ist *YBX1* in hoher Konzentration vorhanden, bindet es an die mRNA und verhindert damit die Durchführung des Translationsprozesses und die darauf folgenden mRNA-Degradation (Abbildung 4B). Ist es nur in geringer Konzentration vorhanden, fällt sein supprimierender Einfluss weg, der Initiationskomplexes kann gebildet und die Translation veranlasst werden (Abbildung 4A).³⁵

Zusätzlich wird *YBX1* Rolle als Translationsfaktor noch durch den PI3-AKT-Signalweg kontrolliert (Abbildung 4C): Wird *YBX1* durch die Serin/Threoninkinase AKT an Ser-102 phosphoryliert, ist seine Fähigkeit das 5'-cap Ende zu binden gemindert. Seine negative Kontrolle auf die Translation fällt damit weg und diese kann ungestört ablaufen.³⁶ Erste *in vitro*-Versuche, die Inhibition dieser Phosphorylierung als therapeutischen Angriffspunkt beim Mamma- und Prostatakarzinom zu nutzen, verliefen erfolgreich.³⁷

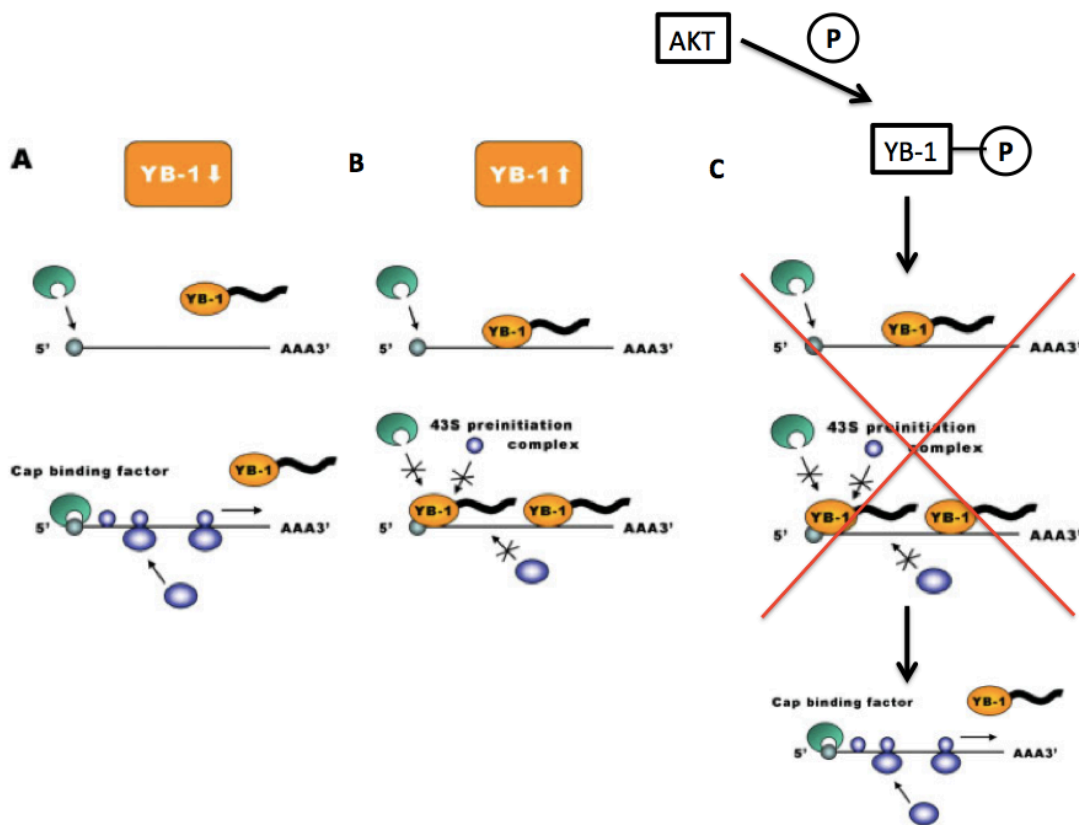


Abbildung 4 Translationelle Kontrolle durch *YBX1* (modifiziert nach ²⁹)

DNA-Reparatur. *YBX1* fungiert auch als Teil der DNA-Reparatur. Es interagiert mit PCNA (Proliferating- Cell- Nuclear- Antigen), welches für die Nukleotid-exzisionsreparatur essenziell ist.²⁸ Hierbei scheint die C-terminale Region von *YBX1* eine wichtige Rolle zu spielen.³⁸

Zelluläre Stressreaktion. *YBX1* erfüllt verschiedene Funktionen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma. Hauptsächlich ist es im Zytoplasma lokalisiert, wird jedoch durch zellulären Stress, wie z.B. Bestrahlung, Zytostatika-behandlung, Hyperthermie oder Virusinfektion in den Zellkern transloziert.³⁹⁻⁴² Es ist in zahlreiche intra- und extrazelluläre Signalwege wie z.B. den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg involviert.⁴³ Neben seiner Rolle in der Kanzerogenese ist es auch in zelluläre Prozesse während der Inflammation und in der Fibrogenese involviert.⁴⁴

Embryogenese. Die das *YBX1* Protein codierende mRNA liegt während verschiedener Entwicklungsstufen^{45,46} und in verschiedenen Geweben⁴⁷ in unterschiedlich hoher Konzentration vor. Die zentrale Rolle *YBX1*s in der Embryoge-

nese zeigt sich in der embryonalen Retardierung und pränatalen Tod der Knockout-Mäuse.^{48,49}

Zusammenfassend stellt sich YBX1 als multifunktionelles Protein dar, welches Einfluss auf zahllose zelluläre Vorgänge nimmt, wie in Abbildung 5 zusammengefasst.

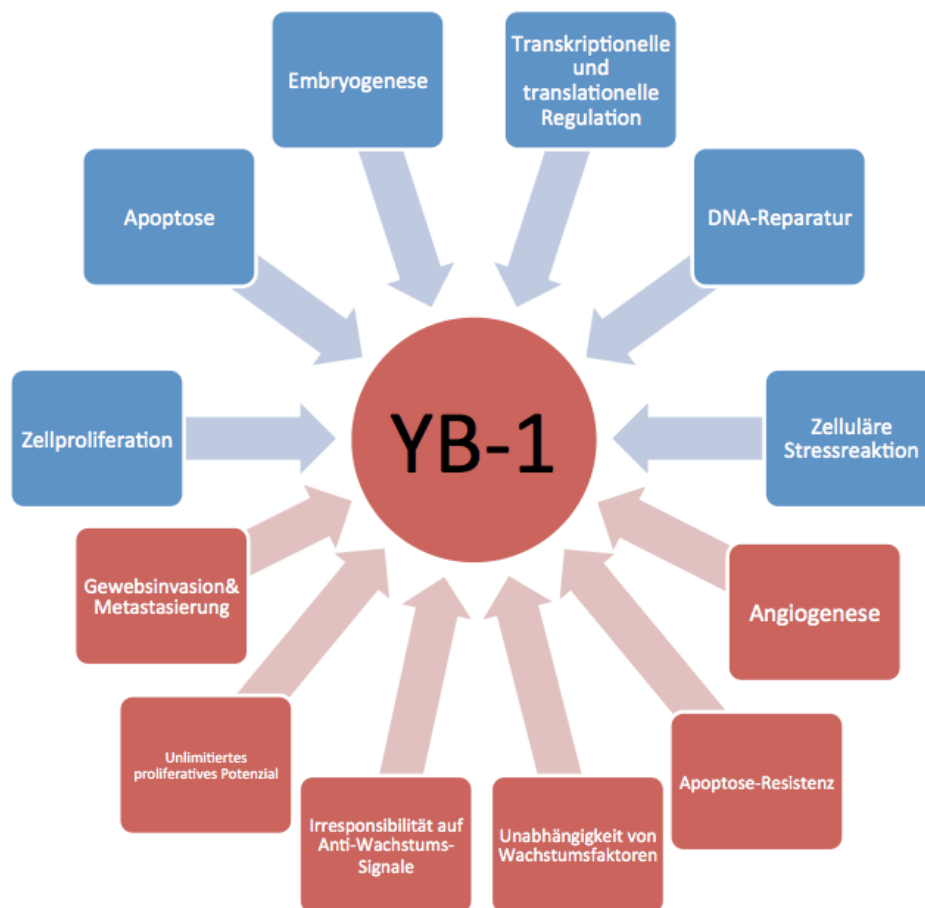


Abbildung 5 Zelluläre Funktionen von YBX1 unter Einbeziehung der Hallmarks of Cancer⁵⁰ von Hanahan und Weinberg von 2000 mit Unterteilung in physiologische (blau) und onkogenetische (rot) Funktionen (zusammengestellt nach⁵¹)

1.2.4 YBX1 und seine Bedeutung in der Tumorbologie

Abgesehen von seinen zahlreichen physiologischen Funktionen im Organismus ist YBX1 in die Pathogenese und Persistenz von Tumoren involviert. Generell ist es dabei in Krebszellen überexprimiert.

Einleitung

Seinen Einfluss auf die Tumorprogression zeigte erstmals die Arbeit von Bargou et al. 1997⁵², die eine positive Korrelation zwischen der Höhe des nukleären *YBX1*s und der Progression beim Mammakarzinomen zeigen konnte.

YBX1 fördert jedoch nicht nur die Tumorprogression, es verhindert auch die p53-abhängige Apoptose maligner Zellen.⁵³

YBX1 begünstigt zudem die Entwicklung von Medikamentenresistenzen durch Induktion des MDR1-Promotors, der Medikamenten-Efflux-Pumpen initiiert.^{52,54}

Diese sind in zahlreichen Chemotherapie-resistenten Krebsarten überexprimiert. Damit wird die Sensibilität gegenüber Zytostatika wie Cisplatin oder Doxorubicin reduziert. Eine Korrelation zwischen nukleärem *YBX1* und MDR1-Expression konnte für verschiedene Krebsentitäten bewiesen werden.^{52,55} Auch beim Multiplen Myelom könnte dies daher in Hinblick auf die Krankheitsprogression in späten häufig therapieresistenten Stadien der Erkrankung eine Bedeutung aufweisen.

In einer Studie von Shibahara *et al.* 2001⁵⁶ über das nicht-kleinzellige Bronchiolalkarzinom zeigte sich ein Zusammenhang zwischen nukleärem *YBX1* und Lokalisation, Tumorgröße, Invasionsgrad, Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung und Prognose. Auch für andere Tumorentitäten konnten ähnliche Zusammenhänge aufgezeigt werden.⁵⁷⁻⁵⁹ *YBX1* könnte damit ein prognostischer Faktor für den Krankheitsverlauf einiger malignen Erkrankungen darstellen und damit eine klinische Bedeutung haben.

Die vielseitige Rolle von *YBX1* in der Onkogenese wurde 2013 von Lasham *et al.*⁵¹ zusammengefasst und umfasst Auswirkungen auf alle Teilbereiche der von Hanahan und Weinberg 2000 postulierten Merkmale von Krebszellen wie Proliferation, Tumorangiogenese, Invasion und Metastasierung oder die replikative Seneszenz (siehe Abbildung 5).⁵⁰

Diese Erkenntnisse führen zu der für meine Arbeit grundlegenden Hypothese, dass *YBX1* in verschiedener Art und Weise als Onkoprotein wirken kann.⁵¹

1.2.5 Bedeutung von YBX1 für das Multiple Myelom

In Hinblick auf die nicht vollständig verstandenen molekularen Mechanismen bei der Pathogenese des Multiplen Myeloms ist eine Erforschung der möglichen beteiligten Faktoren von Bedeutung.

YBX1 scheint aus den folgenden Gründen eine wichtige Rolle beim Multiplen Myelom zu spielen:

Eine Expression von *YBX1* zeigt sich in unreifen und anaplastisch malignen Plasmazellen *in vitro*, während in normalen Plasmazellen, MGUS-Zellen und reifen malignen Plasmazellen kein *YBX1* zu finden ist. Dies deutet auf eine Rolle *YBX1*s in der physiologischen B-Zell-Entwicklung und den noch unreifen Vorstufen hin, während im Stadium der differenzierten Plasma-B-Zelle die Bedeutung schwindet. Durch die Dedifferenzierung im Rahmen der malignen Transformation der Plasma-B-Zellen gewinnt *YBX1* wieder an Bedeutung.⁶⁰

Der *YBX1* Knockdown per siRNA induziert in Plasmazelllinien Apoptose und hemmt die Proliferation.⁶⁰ Ein Zusammenhang scheint auch zwischen dem ebenfalls die Krankheitsprogression fördernden *IGF1* und *YBX1* zu bestehen. *IGF1* führt dabei zur Aktivierung des *IGF1*/PI3-K/Akt- Signalweg in malignen Plasmazellen und damit indirekt zur Aktivierung von *YBX1* über die Phosphorylierung von *YBX1* am Serin 102.⁶¹

Die Überexpression von *YBX1* führt zu Therapieresistenz.⁶⁰ Vor dem Hintergrund der stark von der Therapiesensitivität abhängenden Lebenserwartung der Myelompatienten und der in späten Stadien der Erkrankung häufig vorherrschenden Multi Drug Resistance stellt dies ein wichtiges Faktum dar.

In Bezug auf das Multiple Myelom aber auch andere Tumorentitäten unterstreicht dies den Charakter *YBX1*s als Parameter für Krankheitsprogression, Überleben und Therapieresistenz und den Wert als potenziellen therapeutischen Angriffspunkt.

1.2.6 YBX1 und MYC

MYC ist ein Protoonkogen, das in vielen Tumoren überexprimiert ist. Als Transkriptionsfaktor ist *MYC* an der Expression von 15% aller menschlichen Gene beteiligt. Es wird in verschiedenen Krebsentitäten aufgrund von Translokationen

Einleitung

permanent exprimiert. Ein Beispiel ist hier das Burkitt-Lymphom, bei dem die typische Translokation von *MYC* in 80% der Fälle beobachtet wird.⁶² Zudem sind Mutationen beschrieben, die die Regulation der *MYC* Protein Stabilität beeinflussen und dadurch zu erhöhten *MYC* Protein Mengen führen.⁶³

Eine Überexpression von *MYC* beim Multiplen Myelom wurde aufgrund einer gesteigerten Translation der *MYC* mRNA beschrieben.⁶⁴

Die Translation von mRNAs wird in in der Regel durch eine cap-abhängige Initiation eingeleitet. Manche mRNAs können die Initiation der Translation unter bestimmten zellulären Stresssituationen jedoch durch einen cap-unabhängigen Mechanismus auslösen.

Dazu gibt es in der 5'-untranslated region der mRNA strukturelle Motive, sogenannte internal ribosome entry sites (IRES), die das Ribosom zum richtigen Startcodon führen.

Während der cap-unabhängigen Initiation erkennt die aktivierte 40S Untereinheit diese strukturellen Motive und bindet direkt an die Struktur oder ihre Umgebung und scannt die mRNA Sequenz von der ribosomalen Bindungsstelle bis zum Startcodon.

Für diese cap-unabhängige Initiation sind zusätzliche Proteine sogenannte ITAFs (IRES- transacting factors) erforderlich, wie z.B. YBX1.⁶⁵ Diese wirken als RNA-Chaperone, indem sie den IRES erlauben die richtige Konfirmation einzunehmen und so die Bindung der 40S- Untereinheit ermöglichen.⁶⁶

Ein mRNA-Transkript, das so eine IRES besitzt, ist *MYC*.⁶⁷ Sie hat die Funktion, die *MYC* Expression auch während pathophysiologischer Situationen wie Apoptose, genotoxischem Stress oder viralen Infektionen aufrecht zu erhalten.⁶⁸⁻⁷⁰

Beim Multiplen Myelom ist diese IRES jedoch häufig durch eine C zu T- Mutation laut der Cobbold-Studie von 2010 verändert. Dadurch soll YBX1 als eines von mehreren regulierenden Proteinen an diese mutierte Version der IRES stärker binden können und in Kombination mit anderen ITAFs (=IRES-transacting factors) als synergistischen Effekt eine 27-fache Verstärkung der IRES- Aktivität bewirken.⁶⁴

Einleitung

Dem widersprachen 2013 Bommert *et al.*¹³ Ihnen zufolge stimmt die C zu T-Mutation in ihrer Häufigkeit in der Bevölkerung mit einem *single nucleotide polymorphism* überein und spielt demnach keine Rolle im Verhältnis zwischen *YBX1* und *MYC*. Die durch *YBX1* regulierte Translation der *MYC* mRNA erfolge unabhängig von der berichteten Mutation. In einer Analyse von 87 Multiple Myelom Patienten ist nur bei einem Patienten die angegebene Mutation detektiert worden hier aber auch in den nicht malignen somatischen Zellen. Damit entsprach die Mutationsfrequenz der beschriebenen Frequenz für diesen SNP. Aufgrund dieser Daten besteht kein Zusammenhang zwischen der *MYC*-IRES Mutation und dem Multiplen Myelom.¹³

Ihnen zufolge bestehe eine gegenseitige transkriptionelle und translationelle Kontrolle zwischen *YBX1* und *MYC*. So reduzierte der *YBX1* Knockdown in malignen Plasmazelllinien (HMCLs) die *MYC*- Proteinkonzentration, was deutlich für eine Kontrolle von *MYC* durch *YBX1* auf der Ebene der Translation spricht. Ebenso führte der Knockdown von *MYC* zu reduzierten mRNA- und Protein-Leveln von *YBX1* und *MYC* als Hinweis auf eine transkriptionelle Kontrolle von *YBX1* durch *MYC*. Eine Störung dieses Kreislaufes führe zu Apoptose, was die gegenseitige Kontrolle von *YBX1* und *MYC* zu einem Überlebensfaktor für maligne Plasmazellen mache und ihnen damit einen essenziellen Platz in der Tumorphagenese des Multiplen Myeloms und potenziell auch anderer Tumorentitäten zuweise.¹³

In neueren Studien wird *MYC* auch mit einer Suppression der Metastasierung in Verbindung gebracht⁷¹, so dass es zunehmend sinnvoll erscheint, die Rolle *MYCs* auf die Tumorgenese differenziert zu betrachten und nur den onkogenen Teil des *MYC*-Signalweges als Ziel neuer therapeutischer Strategien zu adressieren, wie es aktuell mit mTOR-Inhibitoren versucht wird.^{72,73}

1.3 RNA-Interferenz (RNAi)

1.3.1 Allgemeines

Die Farbe von Petunien war es, welche Forscher auf die Spuren der RNA-Interferenz brachte. Hofften van der Krol und Kollegen 1990 doch eine intensivere Färbung der Blume durch die exogene Insertion des Gens Dihydroflavonolreduktase und eine daraus folgende Überexpression zu bewirken, sahen sie sich mit dem Gegenteil konfrontiert. Die behandelten Pflanzen waren dank einer Suppression der Genexpression weniger stark gefärbt oder vollkommen weiß.⁷⁴ Erst später wurde klar, dass dies auf ein endogenes Abwehrsystem der Pflanze gegen Viren zurückzuführen war, das auf dem Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) beruhte.⁷⁵

Als erster Modellorganismus zur Erforschung der RNAi diente der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, der sich einer Einschleusung kurzer RNA-Sequenzen und daraus folgender Suppression des zugehörigen Gens besonders zugänglich zeigte.⁷⁵ Anhand der aus ihm gewonnenen Erkenntnisse beschrieben Andrew Fire und Craig Mello 1998 erstmals den auch dem Petunienrätsel zugrunde liegenden Mechanismus der RNA-Interferenz und bekamen dafür 2006 den Nobelpreis für Medizin verliehen.^{76,77}

Die RNA-Interferenz (RNAi), auch RNA-Silencing genannt, ist ein körpereigener Mechanismus, der die Genexpression auf der Ebene der Translation reguliert. In der Natur findet er Anwendung im Rahmen der Virusabwehr und Regulation der Genexpression. Er findet zunehmend Anwendung als Werkzeug von Molekularbiologen und Medizinern. Gemessen an der Anzahl an Publikationen gehört die RNAi zusammen mit den Proteomics zu den dynamischsten Feldern der Biotechnologie.⁷⁸

1.3.2 Wirkmechanismus

Die RNA-Interferenz beruht auf der sequenzspezifischen Erkennung und Degradation von mRNAs.

Die Prozessierung der längeren doppelsträngigen shRNA (dsRNA) zu einer *short interfering RNA* (siRNA) verläuft über die Endonuklease *Dicer*, die das

Einleitung

Vorläufermolekül in Fragmente mit einer Länge von 20-30 bp mit charakteristischen Enden schneidet.⁷⁹ Das 3'Ende trägt einen Dinukleotid-Überhang, während das 5'Ende in einer Monophosphatgruppe endet.⁸⁰ Diese kurzen doppelsträngigen Nukleinsäuren werden an sogenannte Argonautenproteine herangeführt, die einen Einzelstrang binden, während der andere abgebaut wird.⁸¹ Der so entstandene Komplex aus der ss-RNA, dem Argonautenprotein Argonaut 2 (Ago 2) und weiteren Proteinen wird als RNA-induced silencing complex (RISC) bezeichnet.⁸² Dieser stellt das Kernstück der RNA-Interferenz dar und variiert je nach verwendeter RNA und Spezies.

Dieser RISC bindet spezifisch an zu seiner RNA komplementäre mRNAs und führt damit zu einer Spaltung und Abbau dieser Zielsequenzen durch die RNase H-Aktivität des Argonautenproteins⁸³ (siehe Abbildung 6). Alternativ kann der Enzykomplex eine mRNA auch ohne Degradation blockieren, indem er die Transkription oder Translation hemmt.

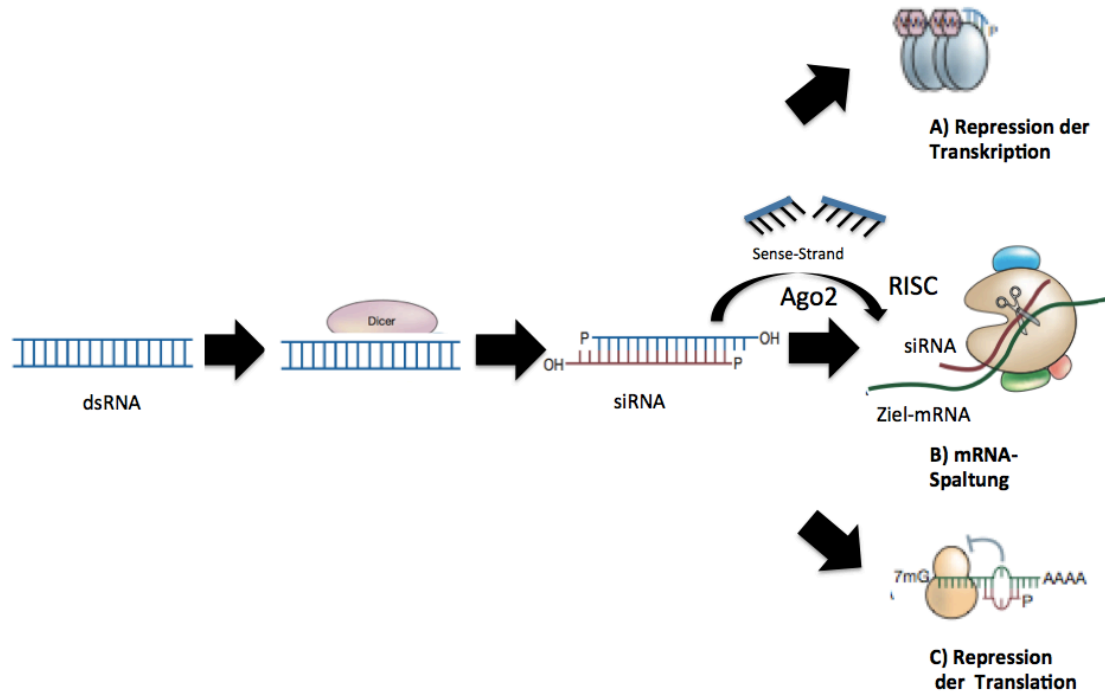


Abbildung 6 Mechanismus der RNA-Interferenz: Doppelsträngige RNA (dsRNA) wird in kurze Stücke durch den *Dicer* geschnitten und damit zur siRNA mit Dinukleotid-Überhang am 3'- und Monophosphatgruppe am 5'-Ende prozessiert. Der Sense-Strang (blau) wird durch das Protein Argonaut 2 (Ago2) abgebaut. Der Antisense-Strang (rot) wird Teil des RISC-Komplexes und wird als solcher komplementärer mRNA präsentiert. Diese wird daraufhin zerschnitten oder die Synthese des Zielproteins durch die Repression der Transkription (Chromatin-Modifikation) oder Translation gehemmt (modifiziert nach ^{83,84}).

1.3.3 Anwendung in der Molekularbiologie

Die Besonderheit der RNA-Interferenz liegt in der Entdeckung, dass dieser endogene ursprünglich der Virusabwehr dienende Mechanismus durch exogene doppelsträngige Nukleinsäuren auf spezifische mRNAs umprogrammiert werden kann. ⁸⁰

Mit der RNA-Interferenz steht ein experimentelles Werkzeug zur effizienten und spezifischen Stilllegung bestimmter Gene zur Verfügung. Indem der vom Körper induzierte Mechanismus durch eine von außen zugeführte kurze einzelsträngige RNA initiiert wird, lassen sich funktionellen Analysen verschiedener

Gene durch einen Knockdown durchführen.⁸⁵ Damit eröffneten sich neue gentechnologische Möglichkeiten und potenzielle therapeutische Optionen.

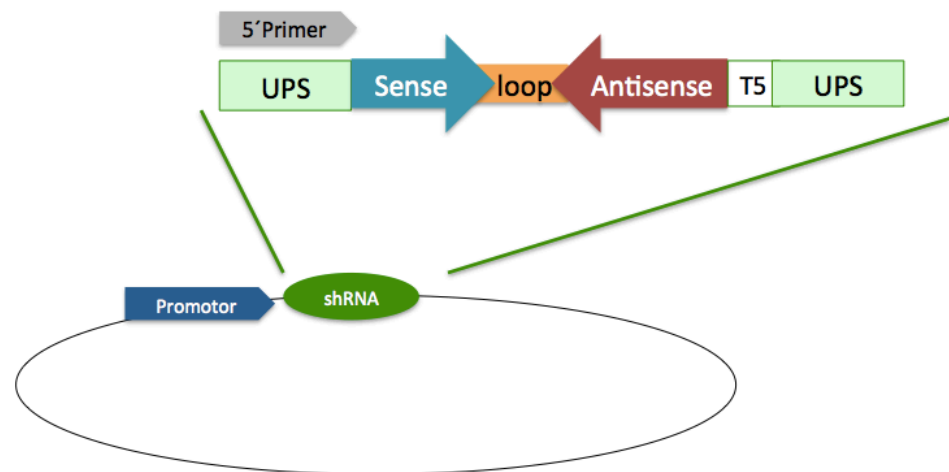
1.3.4 Gentechnische Fortschritte: Von der transienten siRNA zur konditionell exprimierten shRNA

Die exogene Insertion von siRNAs in die Zelle brachte erste Erkenntnisse über Funktionen von stillgelegten Genen, ließ jedoch aufgrund ihres nur transienten Charakters Fragen offen, wie sich wohl ein dauerhafter Knockdown auf die Zellen auswirken würde.

Es war also ein wichtiger Fortschritt, als 2002 verschiedene Forschergruppen dieser Problematik durch die Entwicklung von Plasmid basierten shRNAs begegnen konnten.⁷⁸ Diese lösten das Problem dadurch, indem sie die Zelle dazu brachten, die gewünschte siRNA unter Ausnutzung der zelleigenen Prozessierungs-Mechanismen selbst herzustellen.

1.3.4.1 siRNA Expression durch die RNA-Polymerase III

Hierzu wird ein Vektor benötigt, der die genetischen Informationen für das Vorläufermolekül der siRNA, die shRNA, in sich trägt, bestehend aus *sense strand*, *loop* und *antisense strand*.⁷⁸ Nach Transformation in die Zelle wird die shRNA durch einen Polymerase III-Promotor transkribiert. Häufig zu diesem Zweck benutzt werden der U6- und der H1-Promotor.⁷⁸ Es entsteht eine zu sich selbst komplementäre 19 bp-lange RNA mit einem 3-11 Nukleotide langem *Spacer* dazwischen, die deshalb die charakteristische den Namen prägende Haarnadelstruktur annimmt (siehe Abbildung 7). Durch den *Dicer* wird diese intrazellulär zu einer siRNA prozessiert, die die weiteren Schritte des Knockdowns in dem oben erläuterten Mechanismus initiiert (siehe Abbildung 6).⁸⁶ Im Gegensatz zur exogenen Insertion einer siRNA kann die shRNA also durch Expression seiner im Vektorgenom codierten genetischen Informationen immer wieder neu synthetisiert werden und damit einen dauerhaften Knockdown garantieren.



Beispiel- Plasmidvektor mit inserierter shNRA

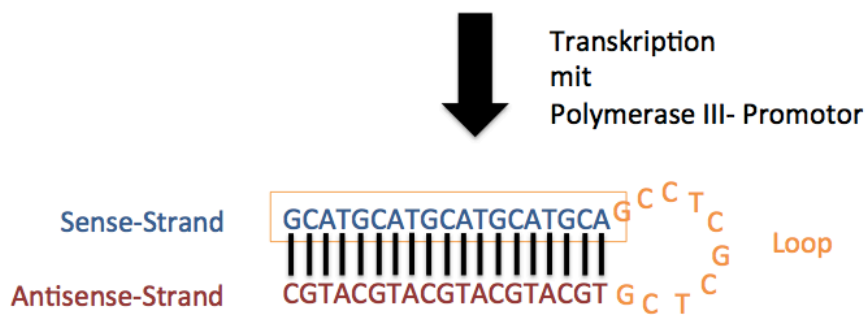


Abbildung 7 Schematische Darstellung des Vektors mit dem shRNA-Konstrukt und daraus resultierendem Transkriptionsprodukt, die in dem weiteren RNAi-Weg prozessiert werden. Vektor mit inserierter shRNA-Sequenz bestehend aus einer universellen Primer-Stelle (UPS), codierende Sequenzen für *sense*, *loop* und *antisense* und einem Terminationssignal (TTTTT). Nach Transkription durch die Polymerase III entsteht daraus eine zu sich selbst komplementäre 19 bp-lange RNA mit einem 3-11 Nukleotide langem *Spacer* in Form einer Schleife (modifiziert nach ⁸⁷).

1.3.4.2 shRNA Expression durch die RNA-Polymerase II (miR-shRNA)

Alternativ kann eine Produktion von shRNAs auch über die Expression einer *micro RNA* (miRNA) erfolgen⁸⁸, wie in verschiedenen Studien erfolgreich demonstriert wurde.⁸⁹⁻⁹¹

Eine miRNA ist eine endogen vorkommende interferierende RNA und wird aus nicht-codierenden Bereichen der genomischen DNA in einem mehrstufigen Prozess hergestellt. miRNAs sind als Regulator in viele zelluläre Prozesse involviert und spielen eine wichtige pathogenetische Rolle in zahlreichen Erkran-

Einleitung

kungen wie Krebs oder Virusinfektionen.⁹² Sie besitzen natürlicherweise eine kurze Schleife in ihrer Struktur, wie sie in den shRNAs erzeugt wird.⁹³

Um die natürlich vorkommende miRNA für gentechnologische Zwecke zu verwenden, wird eine shRNA eingesetzt.⁹⁴ Die Transkription erfolgt hier mit Hilfe der RNA-Polymerase II.⁹¹ Es entsteht ein primäres Transkript, das durch die RNase Drosha zu einer *precursor miRNA* (pre-miRNA) prozessiert wird. Nach der Translokation ins Zytoplasma spaltet Dicer daraus die siRNA, die dem RISC zugeführt und somit den Knockdown des gewünschten Gens induzieren kann (siehe Abbildung 8).⁷⁸

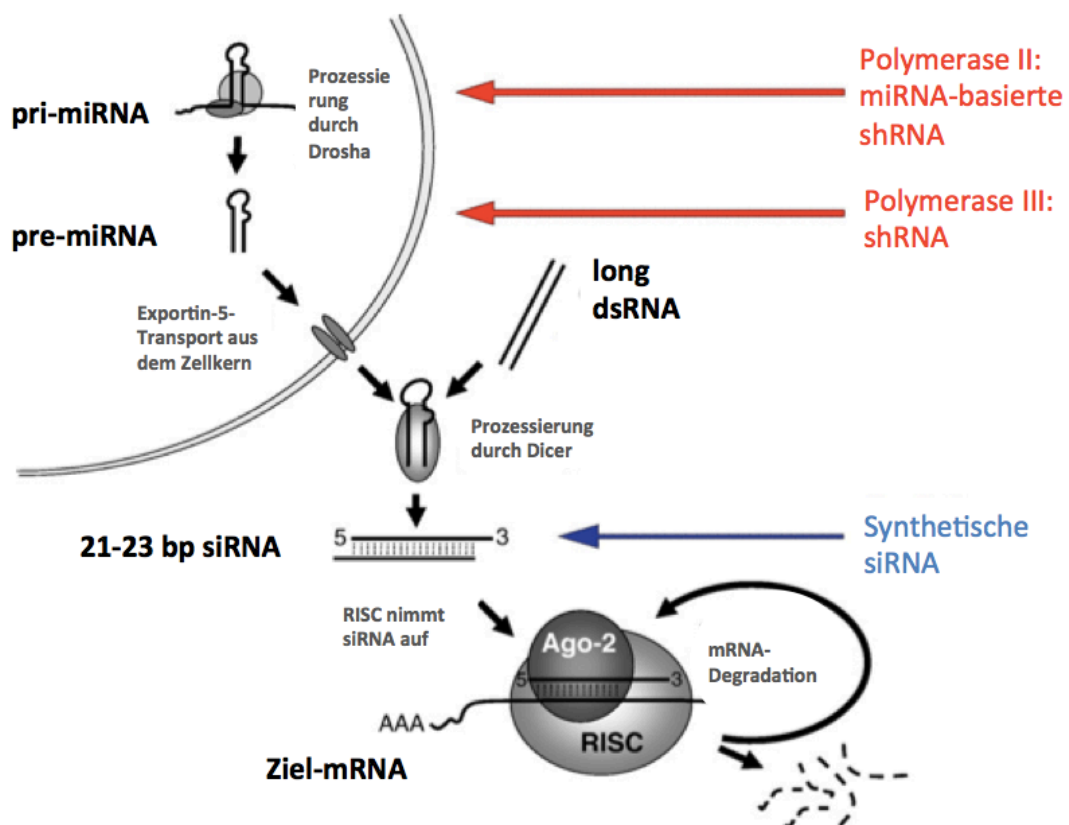


Abbildung 8 Mechanismus der RNA-Interferenz. Die siRNA wird in den RISC integriert, der für die Degradation der Ziel-mRNA verantwortlich ist (modifiziert nach ⁹⁵)

Dieser Typ der shRNA, der auf einer miRNA basiert, hat verschiedene Vorteile und wurde deshalb auch in folgender Arbeit verwendet:

Erstens hat er sich in verschiedenen Studien als effizienter erwiesen.^{96,97} Zweitens können mehrere micro-shRNA Typ shRNAs parallel exprimiert werden, so

dass entweder verschiedene Gene gleichzeitig oder ein Gen durch mehrere shRNAs stillgelegt werden kann. Dies kann sich insbesondere für die Erforschung von Gen-Gen-Interaktionen als nützlich erweisen.^{78,91,98}

Der miR30-basierte Ansatz wurde aufgrund oben genannter Argumente favorisiert und erscheint in Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz vielversprechendere Optionen zu bieten.

1.3.4.3 Induzierbares vs. nicht-induzierbares shRNA exprimierendes Vektorsystem

Während siRNAs nach einigen Zellteilungen aus der Zelle verschwunden sind, kann sich durch die stabile Expression einer shRNA ein dauerhafter RNAi-Effekt in der Zelle etablieren.

Da die Ausschaltung eines Gens jedoch für die Zelle letal sein kann, stellte sich die Frage, ob es nicht möglich ist, eine shRNA konditionell zu exprimieren. Deshalb wurden durch pharmakologische Substanzen induzierbare Vektorsysteme entwickelt. Das bekannteste ist das auch in dieser Arbeit verwendete auf dem Antibiotikum Tetrazyklin basierende System.⁹⁹

Das Grundprinzip ist dem bakteriellen Organismus entlehnt: Damit die Bakterien sich vor Tetrazyklin schützen können, benötigen sie das Produkt des Resistenzgens tetA. Dessen Synthese wird jedoch durch TetR, den Tetrazyklin-Repressor, blockiert, indem dieser an seine Erkennungsstelle, den Tetrazyklin-Operator tetO, bindet. Der Tetrazyklin-Operator befindet sich innerhalb des Promotors, also der Kontrollregion des tetA-Gens. Sobald geringste Mengen Tetrazyklin in das Bakterium gelangen, wird das Antibiotikum vom Repressor erkannt und gebunden. Daraufhin verliert TetR seine Affinität zu tetO und gibt dadurch das Resistenzgen frei, das so exprimiert werden kann.^{99,100}

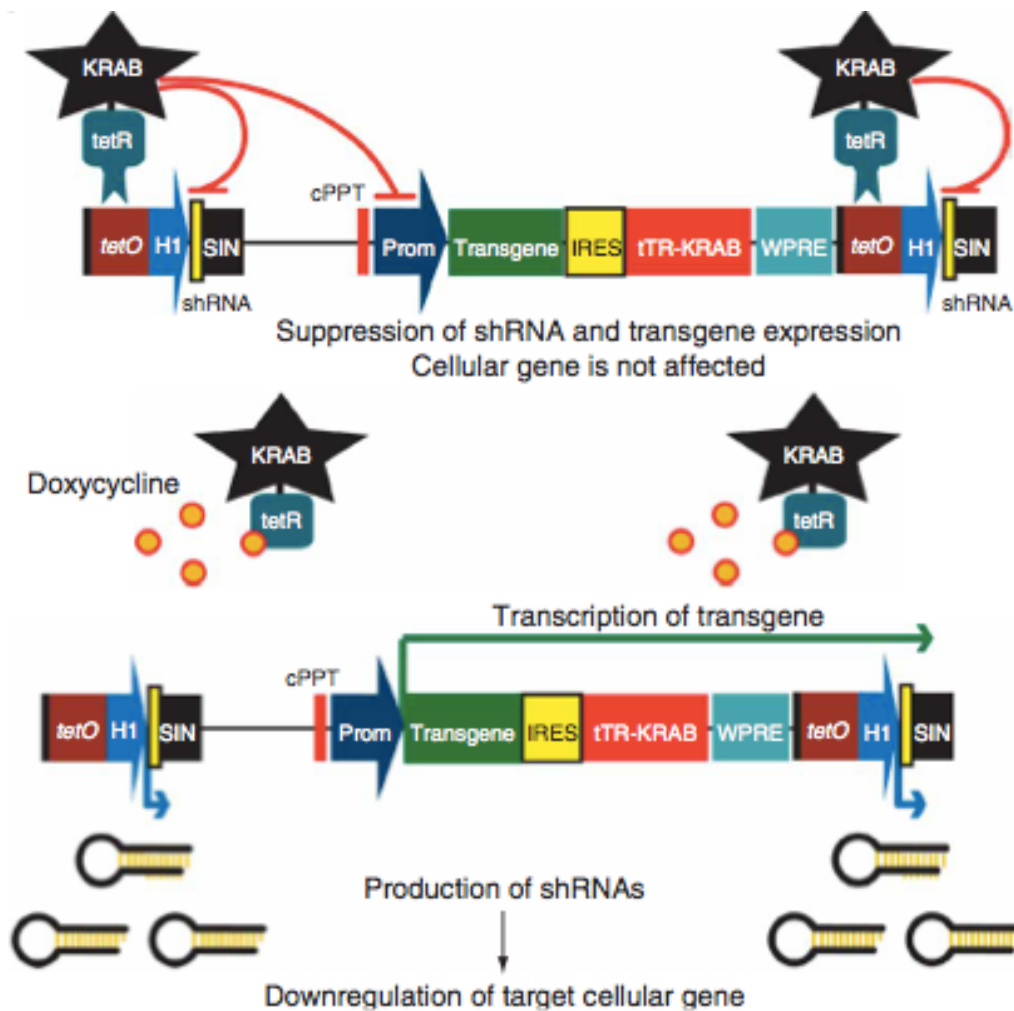


Abbildung 9 Tetrazyklin-induzierbares Vektorsystem. In Abwesenheit von Tetrazyklin ist der Tetrazyklin-Repressor (tetR) an den Tetrazyklin-Operator (tetO) gebunden und die Transkription somit unterdrückt. Sobald Tetrazyklin vorhanden ist, löst sich der Tetrazyklin-Repressor vom Operator und die Transkription kann stattfinden. Self-inactivating (SIN); central polypurine tract (cPPT); Promotor (Prom); Internal ribosome entry site (IRES); woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE) (aus ¹⁰⁰)

Diese induzierbaren Systeme ermöglichen eine transiente Expression der shRNA und damit einen konditionellen Knockdown des Zielgens.

1.4 Das Mausmodell MOPC315.BM

Wegen seiner anatomischen, physiologischen und genomischen Ähnlichkeiten zum Menschen stellt die Maus ein unersetzliches biologisches Modell-System für die Krebsforschung dar.¹⁰¹

Jedoch gab es bisher nur wenige Mausmodelle, die das humane Multiple Myelom und sein Verhalten im menschlichen Körper adäquat simulieren. Man kann die bisherigen Mausmodelle in vier Gruppen einteilen (siehe Tabelle 4):

1.4.1 Gruppe I: Das Xenograft-Modell

Die erste Gruppe arbeitete mit immundefizienten SCID oder NOD scid gamma (NSG)-Mäusen, die keine reifen B- und T-Lymphozyten bilden können und zur Tumorbildung neigen. Sie wurden im Rahmen von Xenograft-Versuchen mit humanen Myelomzelllinien oder primären Zellmaterial von Patienten transplantiert (siehe Abbildung 10).^{102,103} Diese Tumoren wachsen meist schnell, jedoch in den meisten Fällen in einer nicht-orthotopen Umgebung wie der Haut oder Lunge, was jedoch zumindest ein einfaches Monitoring ermöglicht.¹⁰⁴

Diese Modelle ermöglichen Experimente über das humane Multiple Myelom an Mäusen, sind jedoch entfernt vom Verhalten des humanen Multiplen Myeloms *in vivo*.¹⁰⁵ Sie imitieren eher aggressive Stadien, da das primäre Zellmaterial meist Patienten mit einer fortgeschrittenen extramedullären Erkrankung entnommen wird.^{104,106}

In einer neueren Variation dieses Ansatzes wurden knochenähnliche dreidimensionale Strukturen mit humanen oder murinen Knochenmark-Umgebungszellen (BMSC) geschaffen, in SCID-Mäuse implantiert und primäre Myelomzellen injiziert, was zur Bildung von malignen Plasmazellherden führte.¹⁰⁷ Dieses Modell wurde nach seinen Bestandteilen SCID-Mäusen, synthetischem Knochen und humanem Knochenmark *SCID-synth-hu* genannt und dient der Interaktionsforschung zwischen Myelom- und Knochenmarkszellen.¹⁰⁶ Es beinhaltet viele Nachteile seiner Vorgänger nicht, ist jedoch technisch aufwendig.¹⁰⁸

Xenograft- Mausmodell

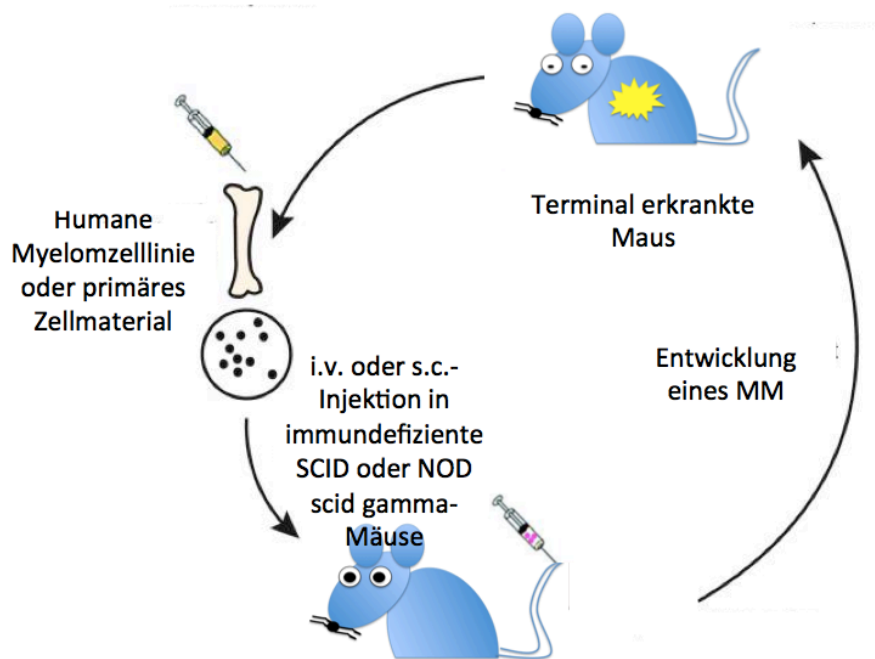


Abbildung 10 Schematische Darstellung des Mausmodells Gruppe I (modifiziert nach ¹⁰⁵)

1.4.2 Gruppe II: Das 5T- Modell

Zusätzlich zu diesen Xenotransplantationsmodellen gibt es jedoch auch Mausstämme z.B. C57BL/KaLwRij, in denen eine Myelom ähnliche Erkrankung spontan im höheren Alter auftreten kann.¹⁰⁹ Die Zelllinien 5T2MM und 5T33MM und deren Subklone 5T33MMvt und 5TGM1 wachsen auch *in vitro* und stellen transplantierbare Mausmyelomlinien dar. Intravenöse Injektion dieser Zellen führte zu einer myelomähnlichen Erkrankung mit Knochenmarklokalisation, osteolytischen Herden, renaler Beteiligung und monoklonaler Gammopathie (siehe Abbildung 11).^{104,105,110} Nachteil des 5TMM-Modells ist vor allem die Abhängigkeit von einem speziellen Mausstamm (C57BL/KaLwRij)¹¹¹ und die Diskrepanzen im Vergleich zur menschlichen Erkrankung.¹⁰⁴ Außerdem ist das Multiple Myelom in Genetik und Verhalten von Mensch zu Mensch unterschiedlich und diese Variabilität geht in diesem Modell mit klonalen Myelomzelllinien verloren.¹⁰⁶

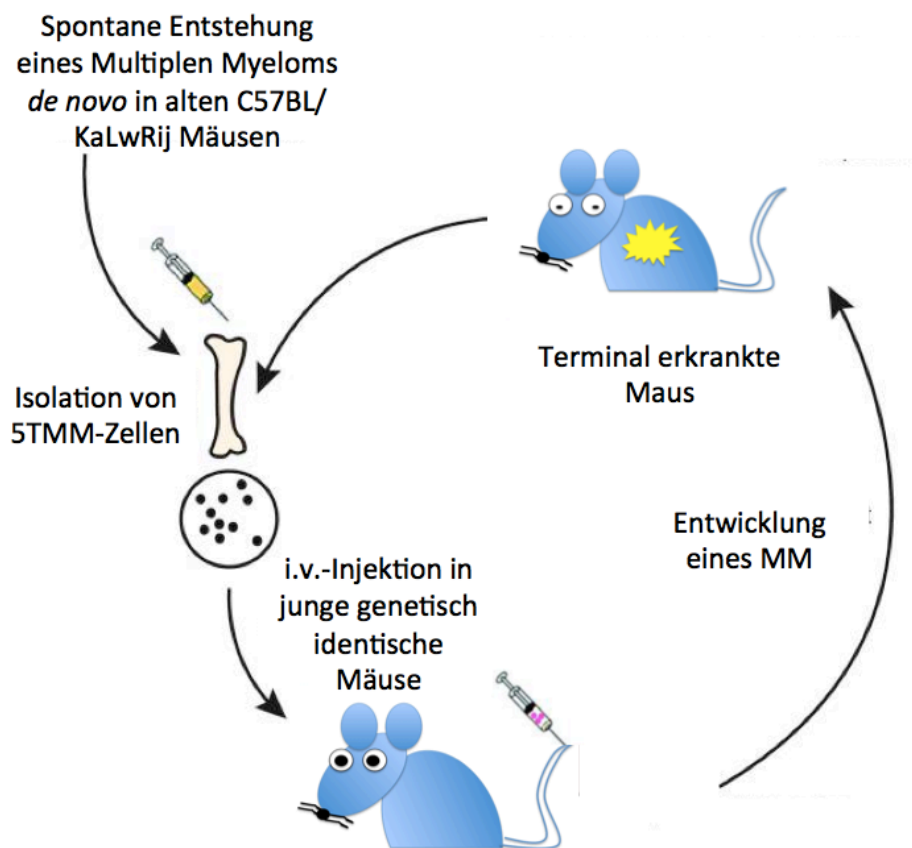


Abbildung 11 Schematische Darstellung des Mausmodells Gruppe II (modifiziert nach ¹⁰⁵)

1.4.3 Gruppe III: Das Induktions-Modell

Die dritte Gruppe stellt den Ursprung von der in folgenden Experimenten verwendeten MOPC315.BM Zelllinie dar. Durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von Mineralöl entsteht in BALB/c ein Plasmazelltumor (siehe Abbildung 12) (MOPC= mineral oil-induced plasmacytomas).¹¹¹

Mineralöl ist eines der Reagenzien, das ein Plasmozytom als Antwort auf einen chronischen Reiz im Peritoneum der Maus induzieren kann.¹¹²

MOPC315 wächst überwiegend im Peritoneum und zeigt keinen Knochenmark-tropismus. Damit fehlen wichtige Charakteristika des humanen Multiplen Myeloms.¹¹¹

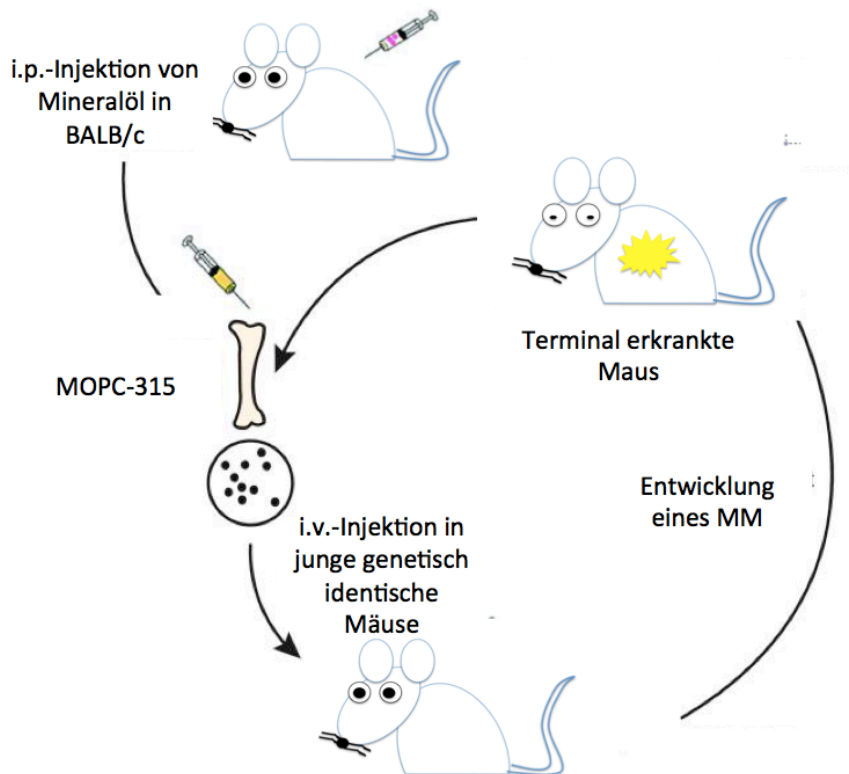


Abbildung 12 Schematische Darstellung des Mausmodells Gruppe III (modifiziert nach ¹⁰⁵)

1.4.4 Gruppe IV: Das transgene Modell

Als letztes sei noch eine Gruppe von Mausmodellen genannt, bei denen verschiedene Gene in das Genom integriert wurden, die in der Pathogenese des Multiplen Myeloms eine Rolle spielen, wie etwa eine Überexpression von IL-6, c-Myc und Bcl-X_L (siehe Abbildung 13).^{113,114} Diese Modelle sind dem humanen Multiplen Myelom in vielen Aspekten sehr ähnlich und erlauben die genauere Charakterisierung von Onkogenen in der Entwicklung des Multiplen Myeloms und gegen sie gerichteter molekularer Therapeutika, sind jedoch zeitaufwendig und kostenintensiv.^{104,111,115}

Transgenes Mausmodell

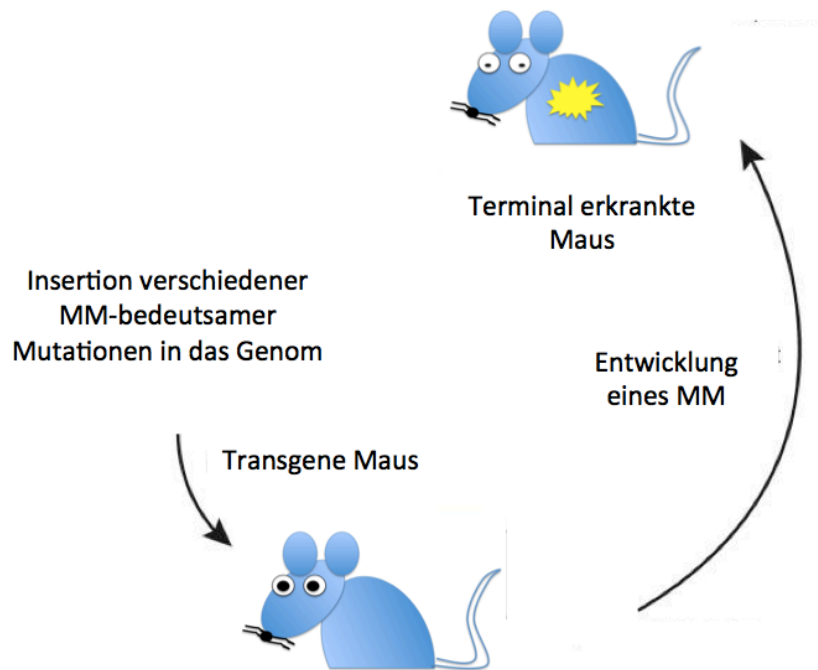


Abbildung 13 Schematische Darstellung des Mausmodells Gruppe IV (modifiziert nach ¹⁰⁵)

1.4.5 Vergleich der vier Gruppen

Keines der genannten Mausmodelle spiegelt alle Facetten des humanen Multiple Myeloms wieder (siehe Tabelle 4). Die Möglichkeit maligne Plasmazellen *in vitro* wachsen zu lassen und sie dann in eine gewöhnliche immunkompetente Labormaus, wie BALB/c, zu injizieren, die daraufhin die Hauptcharakteristika des humanen Multiple Myeloms, wie Knochenmarkbefall und osteolytische Läsionen entwickelt, ist durch keine dieser vier Gruppen gegeben.¹¹¹

Deshalb wurde für die folgenden Versuche das erst 2012 etablierte Mausmodell MOPC315.BM verwendet.

Tabelle 4. Vergleich der vier Gruppen von bisherigen Mausmodellen für das Multiple Myelom (MM) (erstellt aus Informationen von ^{104-106,111})

	Gruppe I*	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV
Eigen-schaften	MM exogen herbei-geführt	MM endogen ent-wickelt	MM durch Substanz indu-ziert	transgene Mutationen begünstigen Entwicklung
Herkunft des Mul-tiplen Myeloms	human	murin	murin	murin
Maus-stämme (Auswahl)	- SCID - NOD scid gamma (→ immundefizient)	C57BL/KaLwRij	MOPC-315	- Myc/Bcl-XL - H2-Ld-hIL6
Studien (Auswahl)	102, 103, 108	109, 110, 116	117, 118	113-115, 119
Nachteile	- Darstellung fortge-schrittener Stadien - fehlende Abbildung der genetischen Va-riabilität des MM - allotope Ansiedlung - schlechte Vaskula-risierung	-limitierte Verfüg-barkeit - fehlende Abbil-dung der geneti-schen Variabilität des MM	-extra-medulläres Wachstum -Wachstum an Injektionsstelle	-hoher Zeit-aufwand -finanzieller Aspekt - unzu-reichende Darstellung Stadien und Entwicklung Tumor
		- Diskrepanz zu Biologie der menschlichen Erkran-kung aufgrund Verwendung muriner Myelomzellen - fehlende Darstellung der für die Erkrankung wichti-gen Interaktion zwischen Myelomzellen und Kno-chenmarks-Umgebungszellen		
* ausgenommen: SCID-synth-hu Modell von Calimeri <i>et al.</i>, 2011				

1.4.6 MOPC315.BM: Beschreibung, Vorteile und Anwendung

Eine Modifikation von MOPC315 über MOPC315.4 zu MOPC315.BM wurde durch wiederholte Injektionen der aus dem Knochenmark isolierten Zellen in

Einleitung

Mäusen erreicht (siehe Abbildung 14).¹¹¹ Eine Knochenmarkbeteiligung wurde dabei durch das klinische Auftreten einer Paraplegie detektiert.

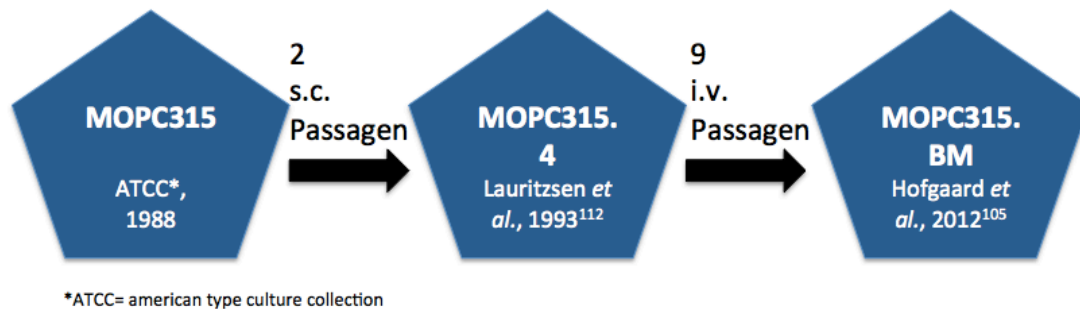


Abbildung 14 Entwicklung von MOPC315.BM (modifiziert nach ¹¹¹)

Nach Hofgaard *et al.* ist MOPC315.BM im Vergleich zu ihren Vorläufern effektiver in der Tumorentwicklung, zeigt höhere Serumkonzentrationen des Myelomproteins M315 (IgA mit Spezifität gegen DNP) und führt schneller zu klinischen Zeichen wie Paraplegie bei unveränderter Chemosensitivität auf Myelomtherapeutika wie z.B. Bortezomib.

Weitere Vorteile sind die Lokalisation der Zellen im Knochenmark und die Kultivierung *in vitro*.¹¹¹

Im Rahmen von *in vivo*-Studien wurden zwei Varianten generiert, MOPC315.BM.Luc mit *Firefly Luciferase* und MOPC315.BM.DsRed mit DsRed.¹¹¹ Die lumineszierenden Signale korrelieren dabei mit der Serumkonzentration des Myelomproteins M315 und ermöglichen eine nicht-invasives Monitoring des Tumorwachstums.¹¹¹

MOPC315.BM.Luc Zellen wurden im Rahmen der Studie von Hofgaard und Kollegen schon nach einer Stunde in der tibiofemorale Region detektiert und entwickelten sich von da an progressiv im gesamten murinen Skelett und in der Milz. Folge waren multiple osteolytische Herde, was als wichtiges Charakteristikum des humanen Multiplen Myeloms gilt.¹¹¹

Der in dieser Doktorarbeit beschriebene Gen-Knockdown mit Hilfe eines shRNA-tragenden Vektorsystems *in vitro* wurde mit den Zellen von MOPC315.BM durchgeführt. Die in der Studie von Hofgaard und Kollegen beschriebenen Erkenntnisse dienten als Ausgangspunkt dieser Versuche, da

durch die Etablierung ihres Mausmodells eine zuverlässige Ausgangsbasis für eine Simulation der Verhältnisse im humanen Multiplen Myelom gegeben war.

1.5 Fragestellung meiner Arbeit

Das Multiple Myelom macht 10% aller hämatologischen Neoplasien aus. Verschiedene Stoffwechselwege, genetische Veränderungen und eine Interaktion mit den umgebenden Knochenmarkstromazellen spielen in der Entwicklung und Progression des Multiplen Myeloms eine Rolle. Bedeutung hat hier auch das onkogenetisch wirkende *YBX1*, dem eine essenzielle Rolle in Physiologie und Pathologie des menschlichen Organismus zukommt. In Multiplen Myelomzelllinien bewirkt sein transients Knockdown per siRNA eine Hemmung der Proliferation und induziert Apoptose.⁶⁰

In der folgenden Arbeit wurde ein induzierbares Vektorsystem zum shRNA-vermittelten Knockdown von *YBX1* in der murinen Plasmazelllinie MOPC entwickelt. Durch den Einsatz einer shRNA versus siRNA konnte die dauerhafte Integration der RNA-Interferenz in die Zelle erreicht werden. Die Möglichkeit eines konditionellen Knockdowns durch Tetrazyklin-Induktion ist aufgrund der essenziellen Rolle von *YBX1* in der Zelle für den dauerhaften Einsatz grundlegend. Durch diese Arbeit wurde ein Beitrag zur genaueren Charakterisierung des putativen Onkogens *YBX1* beigetragen.

Die Expression von *YBX1* in murinen Plasmazelllinien wurde durch den Einsatz der RNA-Interferenz supprimiert. Um dieses Ziel zu erreichen wurden verschiedene Schritte verfolgt. Der molekularbiologischen Produktion der gegen *YBX1* gerichteten shRNA-Oligonukleotide, folgte der Einbau in einen Plasmidvektoren und die Vermehrung in *E.coli*. Nach Verifizierung der entsprechenden Ziel-Sequenzen durch Sequenzierung folgte die Einschleusung in die murinen Plasmazellen per Virusinfektion und die Evaluierung der sich daraus ergebenden Konsequenzen per Western Blot und Zytospin.

2 Materialien

2.1 Bakterien und Zelllinien

2.1.1 Bakterienstämme

One Shot® TOP10 Competent Cells, Invitrogen (Karlsruhe)

Escherichia coli, F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)
 ϕ 80/*lacZ* Δ M15, Δ *lacX7*, *recA1* *araD139* Δ (*araleu*) 7697 *galU*
galK *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*

NEB10-beta Competent *E.coli* (High Efficiency), NEB (Ipswich, MA, USA)

Escherichia coli, *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *fhuA* *lacX74* *galK*
(ϕ 80 Δ (*lacZ*)M15) *mcrA* *galU* *recA1* *endA1* *nupG* *rpsL* (Str^R)
 Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)

Stellar™ Competent Cells, Clontech (Palo Alto, CA, USA)

Escherichia coli, F⁻, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*,
gyrA96, *phoA*, Φ 80d *lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA* - *argF*)
U169, Δ (*mrr* - *hsdRMS* - *mcrBC*), Δ *mcrA*, λ -

2.1.2 Zelllinien

MOPC315.BM.luc murine Plasmozytomzelllinie¹¹¹

HEK- 293 humane embryonale Nierenzelllinie (transformiert durch
Adenovirus Typ 5)¹²⁰

2.2 Nukleinsäuren

2.2.1 shRNA-Inserts

Zur Klonierung von shRNAs wurden Oligonukleotide verwendet, die von der Firma Sigma-Aldrich (München) hergestellt wurden. Sie alle dienen dem Knockdown von *YBX1* und sind gegen Maus-mRNA gerichtet.

Der Aufbau der einzelnen Sequenzen folgte dabei folgendem Muster:

5' CGC GTC CCC - 19 bzw. 21 bp *sense strand* - 9 bp loop - 19 bzw. 21 bp *antisense strand* - TTT TTG GAA AT 3'

Tabelle 5. Liste der verwendeten Oligonukleotide. Es erfolgt nur die Auflistung der forward- Sequenz nach dem oben beschriebenen Farbmuster. Targetspezifische Sequenzen sind grün markiert. GC%= GC-Gehalt; T_m = Schmelztemperatur.

MM_YB1_375neu	(=22)	GC%: 46	T_m >89,2°C	67-mer
5'-CGC GTC CCC TGA CAC CAA GGA AGA CGT ATT CAA GAG ATA				
CGT CTT CCT TGG TGT CAT TTT TGG AAA T-3'				

MM_YB1_1505 neu	(=23)	GC%: 43	T_m >86,5°C	67-mer
5'-CGC GTC CCC GCA CCT GTT AAT AAA GGT CTT CAA GAG AGA				
CCT TTA TTA ACA GGT GCT TTT TGG AAA T-3'				

MM_YB1 77210	(=16)	GC%: 44	T_m >88,1°C	71-mer
5'-CGC GTC CCC GAG AAC CCT AAA CCA CAA GAT TTC AAG AGA				
ATC TTG TGG TTT AGG GTT CTC TTT TTG GAA AT-3'				

MM_YB1 77208	(=17)	GC%: 46	T_m >90,6°C	71-mer
5'-CGC GTC CCC CAT CTC TAC CAT CAT CCG GTT TTC AAG AGA				
AAC CGG ATG ATG GTA GAG ATG TTT TTG GAA AT-3'				

2.2.2 Primer

Die Synthese der Primer wurde von der Firma Eurofins (Mannheim) durchgeführt. Die Länge der Primer *in-for* und *in-rev* ist den speziellen Anforderungen des Ligase-unabhängigen Klonierens (siehe 3.1.14) angepasst.

2.2.2.1 Liste der verwendeten Primer

Lenti_Seq

5'-TCCTTCTGCTACGTCCCTTC-3

in-for

Materialien

5'-CATCGGTACGTATGGCCAGGTACCTTTAAGACCAATGAC-3

in-rev

5'-CAGTTAATAGTTTGC GCAACGTTGTTGCCATTGCTACAG-3

2.2.3 Plasmide

Der detaillierte Aufbau der Vektoren ist dem Vektorenverzeichnis zu entnehmen (siehe 8.4).

pLVTHM	Transfervektor, der das direkte Klonieren von shRNA in einen lentiviralen Vektor erlaubt, mit GFP-Komponente, die erfolgreich infizierte Zellen sichtbar macht. Er besitzt eine Ampicillin-Resistenz zur bakteriellen Selektion der erfolgreichen Insertion.
pLKO.1	Lentiviraler Vektor mit der Möglichkeit der shRNA-Insertion. Er besitzt eine Ampicillin-Resistenz.
pTripZ	Tetracyclin-induzierbarer Vektor (Tet-On) mit der Möglichkeit der shRNA-Insertion. Er besitzt einen RFP-Marker, der eine Identifizierung erfolgreich infizierter Zellen erlaubt.
pLVCT-tTR-KRAB	Tetracyclin-induzierbarer Vektor (Tet-On), der eine shRNA-Insertion über den Transfervektor pLVTHM ermöglicht und einen GFP-Marker zur Visualisierung einer erfolgreichen Infektion besitzt. Er hat eine Ampicillin-Resistenz.
pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2	Tetracyclin-induzierbarer Vektor (Tet-Off), der eine shRNA-Insertion über den Transfervektor pLVTHM ermöglicht und einen GFP-Marker zur Visualisierung einer erfolgreichen Infektion besitzt. Er hat eine Ampicillin-Resistenz.

Materialien

psPAX2 Plasmid, das Informationen für strukturelle Proteine und Enzyme trägt, die nötig sind, einen Virus zu generieren. Es ist ein Bestandteil der Virusproduktion.

pMD2.G Plasmid, das die Informationen für die Hüllproteine des Virus trägt. Es ist ein Bestandteil der Virusproduktion.

2.3 Antikörper zur indirekten Immunfluoreszenz und Western Blot

2.3.1 Primärantikörper

Tabelle 6.

Protein	Spezies	Firma
YBX1	Rabbit	Antibodies online (Aachen, Deutschland)
GFP	Goat	Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA, USA)

2.3.2 Sekundärantikörper

Tabelle 7.

Protein	Konjugation	Firma
anti-rabbit IgG	HRP	Jackson ImmunoResearch (Newmarket, UK)

2.4 Substanzen

2.4.1 Substanzen bei der Klonierung

Tabelle 8.

Substanz	Firma
10x Fast Digest® Green Puffer	Fermentas (St. Leon-Roth)
10x Fast Digest® Puffer	Fermentas (St. Leon-Roth)
10x Oligo Annealing Buffer	Invitrogen (Karlsruhe)
10x Taq Puffer mit KCl (500 mM)	Fermentas (St. Leon-Roth)
2-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
2x Quick/ T4 DNA Ligase Buffer	NEB (Ipswich, MA, USA)
5x Rapid Ligation Buffer	Fermentas (St. Leon-Roth)
6x Loading Dye & SDS-Lösung	Fermentas (St. Leon-Roth)
6x Orange DNA Loading Dye	Fermentas (St- Leon-Roth)
Agar Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	B. Braun (Melsungen)
Bacto™ Hefeextrakt	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Bacto™ Trypton	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (München)
D-(+)-Saccharose	Carl Roth (Karlsruhe)
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako (Hamburg)
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth (Karlsruhe)
dNTP-Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP je 10 mM)	Fermentas (St. Leon-Roth)
EDTA	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol 70% in aqua dest.	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Carl Roth (Karlsruhe)
HEPES	Carl Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
LB-Lennox (5 g/l NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Methanol	Sigma-Aldrich (München)
MgCl ₂ 25mM	Fermentas (St. Leon-Roth)
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth (Karlsruhe)

Materialien

Natriumhydroxid	Carl Roth (Karlsruhe)
NEB-4 Puffer	NEB (Ipswich, MA, USA)
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth (Karlsruhe)
Salzsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
SDS	Carl Roth (Karlsruhe)
SeaKem® LE Agarose	Cambrex Bio Science (Rockland, ME, USA)
SOC Outgrowth Medium	NEB (Ipswich, MA, USA)
TEMED	Sigma-Aldrich (München)
TRIS	Carl Roth (Karlsruhe)
Triton X	Carl Roth (Karlsruhe)
Tween 20	AppliChem (Darmstadt)
Xylencyanol	Sigma-Aldrich (München)
α-D-(+)-Glucose	Carl Roth (Karlsruhe)

2.4.2 Substanzen in der Zellkultur

Tabelle 9.

Substanz	Firma
2-Mercaptoethanol	Invitrogen (Karlsruhe)
DMEM, High Glucose, GlutaMAX™	Invitrogen (Karlsruhe)
Doxycyclin	Clontech (Palo Alto, CA, USA)
Dulbecco's PBS (ohne CaCl₂, ohne MgCl₂)	Invitrogen (Karlsruhe)
FBS	Invitrogen (Karlsruhe)
FBS hitzeinaktiviert	Invitrogen (Karlsruhe)
FBS Tetrazyklin-negativ	Invitrogen (Karlsruhe)
Natriumpyruvat	Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin Lösung	Invitrogen (Karlsruhe)
Polybrene	Sigma-Aldrich (München)
Puromycin Dihydrochlorid	InvivoGen (San Diego, CA, USA)
RPMI 1640	Invitrogen, (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA-Lösung, 10-fach	PAA Laboratories (Cölbe)
TurboFect™ Transfection Reagent	Fermentas (St. Leon-Roth)

2.5 Medien

2.5.1 Medien zur Bakterienkultivierung

LB- Medium	2% (w/v) LB- Lennox (mit 0,5 % (w/v) NaCl) autoklaviert
LB-Medium ohne NaCl	1% (w/v) Bacto™ Trypton, 0,5% (w/v) Bacto™ He- feextrakt, pH 7,4 mit NaOH eingestellt
LB-Carb-Agar	1,5% (w/v) Agar Agar ad LB-Medium bzw. LB- Medium ohne NaCl autoklaviert, abkühlen lassen auf 60° Celsius und 0,1% (v/v) Carbenicillin-Stock hinzugefügt

2.5.2 Medien in der Zellkultur

HEK293	DMEM 10% (v/v) FBS 1% (v/v) Pen/Strep 1% (v/v) Natriumpyruvat
MOPC	DMEM/ RPMI 1640 10% (v/v) FBS ¹ 1% (v/v) Pen/Strep 1% (v/v) Natriumpyruvat 1:1.000 (v/v) 20µM BCS+ 50mM TG frisch hinzugefügt 5% (v/v) HEPES β-Mercaptoethanol

¹ Bei der Klonselktion mit Doxycyclin wurde Tetracyclin-negatives Serum verwendet, um eine Interferenz mit dem TetOn/TetOff-System auszuschließen.

Materialien

2.6 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit *aqua dest.* hergestellt.

Agarosegel Proben-Puffer 10x	49,5 mM Tris-HCl pH 7,6 4,6 mM Xylencyanol 3,6 mM Bromphenolblau 60% (v/v) Glycerol
APS- Lösung	10% (w/v) Ammonium- peroxidsulfat
Blocking-Puffer	5% BSA in TBS-T
Carbenicillin- Stock	100 mg/ml Carbenicillin ad 50% Ethanol
DAPI	1% DAPI in <i>Dako Fluorescent Mounting Medium®</i>
ECL-Detektionsreagenz	90,9% (v/v) Solution A 9,1% (v/v) Solution B 0,09% (v/v) 30% H ₂ O ₂
Solution A	1,4 mM Luminol 100 mM Tris-HCl pH 8,6
Solution B	6,7 mM para-Hydroxy- coumarinsäure in DMSO
GYT broth	LB-Medium 10% (v/v) Glycerol

Materialien

Lämmli 4x (SDS-Probenpuffer)	240 mM Tris-HCl pH 6,8 8% (w/v) SDS 40% (v/v) 100% Glycerol 0,02% (w/v) Bromphenolblau 10% 2-Mercaptoethanol
PBS Puffer 10x	1370 mM NaCl 27 mM KCl 20 mM KH_2PO_4 17 mM Na_2HPO_4 pH 7,4 mit HCl eingestellt
PBS-Triton X	1x PBS 0,2% (v/v) Triton X-100
PBS-Triton X-Tween 20	1x PBS 0,1% (v/v) Triton X-100 0,05% (v/v) Tween 20
RIPA Puffer	150 mM NaCl 1% (v/v) Triton X-100 0,1% (w/v) SDS 0,5% (v/v) Deoxycholat 50 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM PMSF frisch zugegeben
Saccharose- Lösung	20% (w/v) D(+)-Saccharose in 1x PBS steril filtriert
Sammelgel 5%	16,6% (v/v) Rotiphorese 30

Materialien

	116 mM Tris-HCl pH 6,8 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) APS 0,05% TEMED
SDS- Laufpuffer 10x	1% (w/v) SDS 250 mM Tris 2 M Glycin
Standardpuffer 0 (S0)	RIPA
Standardpuffer 1 (S1)	0,625% (w/v) BSA in RIPA
Standardpuffer 2 (S2)	1,25% (w/v) BSA in RIPA
Standardpuffer 3 (S3)	2,5% (w/v) BSA in RIPA
Standardpuffer 4 (S4)	5% (w/v) BSA in RIPA
Standardpuffer 5 (S5)	10% (w/v) BSA in RIPA
<i>Stripping Puffer</i>	200 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS in dH ₂ O pH 2,2, 1% (v/v) Tween-20
TBE Puffer	89 mM Tris

Materialien

	89 mM Borsäure 2 mM EDTA (pH 8,0)
TBS Puffer 25x	500 mM Tris 3250 mM NaCl pH 7,6 mit HCl eingestellt
TBS- 0,025% Triton X-100	0,025% (v/v) Triton X-100 TBS pH 7,6
TBS- 0,1% Tween 20	0,1% (v/v) Tween 20 TBS pH 7,6
TBS- 0,5% Tween 20	0,5% (v/v) Tween 20 TBS pH 7,6
TG semi-dry Puffer	20% (v/v) Methanol 1xTG
TGS pH 8,3 10x	250 mM Tris 1192 mM Glycin 1% (v/v) SDS
Trenngel 7,5-15%	25-50 % (v/v) Rotiphorese 30 376mM Tris-HCl pH 8,8 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) APS 0,05 % (v/v) TEMED
Tris-HCl pH 6,6 bzw. 8,8	1000 mM Tris pH 6,8 oder 8,8 mit HCl eingestellt

2.7 Enzyme

Es wurden Enzyme von den Firmen NEB (Ipswich, MA, USA) und Fermentas (St. Leon-Roth) eingesetzt.

Tabelle 10. Liste der verwendeten Enzyme

Enzym	Firma
Antarctic Phosphatase	NEB (Ipswich, MA, USA)
Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
Quick T4 DNA Ligase	NEB (Ipswich, MA, USA)
T4 DNA Polymerase	Fermentas (St. Leon- Roth)
T4 Polynucleotide Kinase	Fermentas (St. Leon-Roth)

Gesondert seien hier die für die Arbeit zentralen Restriktionsenzyme aufgeführt:

Tabelle 11. Liste der verwendeten Restriktionsenzyme

	Firma	Restriktionsschnittstelle
ClaI	Fermentas (St. Leon-Roth)	5'...AT-CGAT...3' 3'...TAGC-TA...5'
FspI	Fermentas (St. Leon-Roth)	5'...TGC-GCA...3' 3'...ACG-CGT...5'
FspI	NEB (Ipswich, MA, USA)	5'...TGC-GCA...3' 3'...ACG-CGT...5'
MluI	Fermentas (St. Leon-Roth)	5'...A-CGCGT...3' 3'...TGCGC-A...5'
MscI	Fermentas (St. Leon-Roth)	5'...TGG-CCA...3' 3'...ACC-GGT...5'
MscI	NEB (Ipswich, MA, USA)	5'...TGG-CCA...3' 3'...ACC-GGT...5'

2.8 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine

Tabelle 12. Liste der Protein- und DNA- Marker

Marker	Firma
50 bp DNA Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Roth)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Roth)
Ready-Load™ 100 bp DNA Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
Ready-Load™ 1kb DNA Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)

2.9 Molekular- und zellbiologische Kitsysteme

Tabelle 13. Liste der verwendeten Reaktionskits

	Firma	Einsatzbereich
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas (St. Leon-Roth)	Aufreinigung von extrachromosomaler bakterieller DNA
NucleoBond® Xtra Midi, Maxi EF	Macherey-Nagel (Düren)	Aufreinigung größerer Mengen extrachromosomaler bakterieller DNA
Qiagen Plasmid Midi, Maxi, Mega Kits	Qiagen (Hilden)	Aufreinigung größerer Mengen extrachromosomaler bakterieller DNA
QuickLyse® Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)	Aufreinigung von extrachromosomaler bakterieller DNA
Wizard®SV Gel&PCR Clean-Up System	Promega (Madison, WI, USA)	Aufreinigung von extrachromosomaler bakterieller DNA aus Agarosegelen
Clone JET™ PCR Cloning Kit	Fermentas (St. Leon-Roth)	Ligase-freies Klonieren
Calcium Phosphate Transfection Kit	Sigma-Aldrich (München)	Calcium-Phosphat-Transfektion
DC™ Protein Assay	Bio-Rad (Herts, UK)	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

2.10 Geräte

Photometer Sunrise (Tecan, Männedorf, Schweiz)

Materialien

Brutschrank für Bakterienkulturen (Mettler, Schwabach)

Durchflusszytometer CyFlow® SL (Partec, Oberstenfeld)

Elektrophoresekammer für Agarosegele (PepLab, Erlangen)

Elektrophoresekammer für Western Blot Mini-Protean (Bio-Rad, München)

Elektroporations-Impulsgenerator Typ EPI 2500 (Dr. L. Fischer, Heidelberg)

Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE 2000-U und Digital Camera DxM 1200 (Nikon, Tokio, Japan)

Lichtmikroskop TELAVAL 31 (Zeiss, Jena)

PCR-Gerät PCR System 2400 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)

Photometer BioPhotometer DPU-414 (Eppendorf, Hamburg)

Schüttelgeräte

- Bakterenschüttler TH25 (Firma Edmund Bühler, Hechingen)
- Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg)
- Schüttelwasserbad GFL-1083 (GFL, Burgwedel)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)

SDS-PAGE-Apparatur Minigel (Bio-Rad, München)

Sterilarbeitsbank HeraSafe (Heraeus, Hanau)

Wasserbad Köttermann (Köttermann, Uetze/Hänigsen)

Analysenwaage BP 221 S, Max= 220 g, d=0,1 mg (Sartorius, Göttingen)

Zentrifugen

- Hochleistungszentrifuge Avanti™ J-25 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)
- Hochleistungszentrifuge J6-MI (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)
- Mikrozentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)
- Tischzentrifuge Cellspin I Zytozentrifuge für die Zellkultur (Tharmac, Waldsolms)
- Tischzentrifuge Multifuge 3SR (Heraeus, Hanau)

Zellkulturbrutschrank Function Line (Heraeus, Hanau)

2.11 Verbrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterialien wie Zellkulturschalen und -flaschen, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Objektträger und Handschuhe wurden, soweit nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen:

A.Hartenstein (Würzburg)

BD (Franklin Lakes, NJ, USA)

Eppendorf (Hamburg)

Firma Gerhard Menzel (Braunschweig)

Greiner Bio-One (Frickenhausen)

neoLab (Heidelberg)

Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)

Sarstedt (Nürnberg)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Anzucht von Bakterienkulturen

3.1.1.1 Flüssigkulturen

Um eine bakterielle Kultur für weitere Klonierungsschritte zu vermehren, gibt man eine Pipettenspitze mit an ihr haftenden Bakterien aus einem Glycerolstock oder von einer Kolonie einer Agarplatte in ein Kulturröhrchen mit nährstoffreichem LB-Medium. Das Medium wurde zuvor autoklaviert und nach Abkühlen mit dem Antibiotikum Carbenicillin versetzt, um so zu garantieren, dass nur Bakterien wachsen, die die entsprechende Resistenz tragen.

Die Röhrchen werden im Inkubationsschüttler für mindestens acht Stunden geschüttelt, um so ein zur weiteren Verwendung ausreichendes Wachstum zu erreichen.

3.1.1.2 Kulturen auf Agarplatten

Um Agarplatten herzustellen wurden die Zutaten für LB-Medium mit *aqua dest.* gemischt und 1,5% Agar Agar hinzugefügt. Nach dem Autoklavieren konnte das flüssig gewordene Agar Agar mit dem LB-Medium gemischt und nach Abkühlen auf unter 60°C das Carbenicillin zugeführt werden. Anschließend wurde der noch flüssige Agar in Einweg-Plastik-Petrischalen gegossen. Nach deren Abkühlen konnten die Petrischalen in den Kühlschrank überführt und dort für einige Wochen gelagert werden.

Die Vermehrung von der einzelnen Bakterie zur Kolonien auf einer Agarplatte fand vor allem nach der Transformation ihre Anwendung. Hierbei wurde ein bakterienhaltiges Nährmedium mit einem Drigalskispatel schnell und homogen auf einer Carbenicillin-haltigen Agarplatte ausgestrichen und kopfüber gelagert über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden dann Kolonien sichtbar.

Alternativ dazu wurden die Bakterien im Drei-Ösen-Ausstrich mit der ausgeglühten und abgekühlten Öse nicht gleichmäßig ausgestrichen, sondern mit dem Ziel, Bakterien zu vereinzeln. Dies fand seine Anwendung, wenn eine einzelne Kolonie als Ausgangspunkt eines neuen Experimentes dienen sollte.

3.1.2 Hybridisierung von einzelsträngiger (ss-) DNA

Einzelsträngige (ss= single strand) Oligonukleotidsequenzen, die für die Herstellung der shRNA benötigt wurden und von der Firma Sigma-Aldrich (München) hergestellt wurden, sollten mit ihrem komplementären Strang zusammengebracht werden. So entstand das in das Plasmid zu integrierende Ziel-Insert. Der genaue Ablauf der Versuche ist den Annealing-Protokollen der Firma Invitrogen (Karlsruhe) zu entnehmen.

Um zu kontrollieren, ob die beschriebenen Abläufe adäquat erfolgt waren, konnte die im Zwischenschritt entstandene 500 nM Probe durch Agarosegel-Elektrophorese mit einem Aliquot der Ausgangsprobe in ihrer Größe verglichen werden. Dabei sollte die Ausgangsprobe aufgrund ihrer Einzelsträngigkeit eine geringere Größe im Gel darstellen als das doppelsträngige Ergebnis.

3.1.3 Restriktionsverdau

Die hier durchgeführten Restriktionsverdaue folgen den Angaben der Hersteller Fermentas (St. Leon-Roth) und NEB (Ipswich, MA, USA) in der Wahl der Puffer und Reaktionsbedingungen und wurden jeweils mit Negativkontrolle (Wasser statt DNA) durchgeführt. Anschließend wurde ein Aliquot der Proben auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen und somit der protokollgemäße Ablauf des Verdaus kontrolliert.

3.1.4 Phosphorylierung und Dephosphorylierung

Beim Verdau einer DNA- Sequenz gibt es viele potenzielle Probleme, welche die Effizienz des Verdaus reduzieren können. Diese ergeben sich besonders beim diffizileren *blunt end*- Verdau, da sich dessen Überhänge sehr viel schwerer verknüpfen lassen.

So besteht die nicht unerhebliche Gefahr, dass die Vektorenden untereinander ligieren, ohne einen Einbau des Inserts vorgenommen zu haben. Um dies zu umgehen, wurde der Vektor vor der Ligation dephosphoryliert, d.h. die 5'-Enden verlieren ihr endständiges Phosphat und die Ligase kann diese nun nicht mehr miteinander verknüpfen.¹²¹ Damit kann eine Rezirkulation verhindert und somit

Methoden

die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Integration des Inserts erhöht werden.

Die Dephosphorylierung erfolgte hier mit 1 μ l der Antarctic Phosphatase, 50 μ l DNA und 6 μ l Reaktionspuffer für 15 Minuten bei 37°C und anschließender Hitzeinaktivierung für 5 Minuten bei 65°C.

Die Phosphorylierung des Inserts folgt demselben Prinzip: Indem das Insert eine Phosphatgruppe am 5'OH- Ende erhält, wird eine Ligation mit dem Vektor überhaupt erst ermöglicht.

3.1.5 Ligation

Die Ligationsreaktion wurde gemäß der Protokolle von NEB (Ipswich, MA, USA), Invitrogen (Karlsruhe) oder der von Fermentas (St. Leon-Roth) jeweils mit einer Negativkontrolle (Wasser statt Insert) durchgeführt, die alle eine Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur (22-25° C) vorsehen.

Danach folgte die Transformationsreaktion.

3.1.6 Herstellen elektrokompenter Zellen

Beide Verfahren der Transformation benötigen Bakterienzellen, die vorher kompetent gemacht wurden, d.h. in der Lage sind, fremde DNA aufzunehmen.

Dies erfolgt teils durch verschiedene Firmen, bei denen die kompetenten Zellen gekauft wurden, teils in Selbsterstellung.

Dabei wurden eine einzelne *E.coli* Kolonien im Schüttelinkubator auf einen OD600 von 0,4-0,7 in LB-Medium angezogen. Ein Aliquot der Kultur wurde zu diesem Zwecke im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm im Vergleich zu Medium als Nullkontrolle gemessen. Ein OD600 von 0,4-0,7 entspricht der logarithmischen Phase des Bakterienwachstums, die ein optimales Teilungswachstum garantiert. Die folgenden drei Zentrifugationen und die sich ihnen anschließende Resuspension der Bakterien in destillierten Wasser verfolgten das Ziel, den Salzgehalt zu minimieren. Am Ende wurde den Zellen GYT broth zugefügt, welches aus LB-Medium und 10% Glycerol besteht. Sie wurden in 35 μ l Aliquots aufgeteilt und bei -80° Celsius eingefroren. Anhand einer Test-

Methoden

transformation und den dabei entstehenden Kolonien konnte die Transformationseffizienz errechnet werden.

3.1.7 Transformation

In der Absicht das rekombinante Plasmid in ein *E.coli* Bakterium einzuschleusen, wurden verschiedene Methoden verfolgt:

Durch eine kurzzeitige Temperaturerhöhung auf 42° C, den sogenannten Hitzeschock, wurde eine Aufnahme der DNA in das Bakterium erreicht. Der detaillierte Ablauf ist den Protokollen der Firma Invitrogen (Karlsruhe) zu entnehmen. Alternativ konnte durch Elektroporation, das kurzzeitige Permeabilisieren der bakteriellen Zellmembran, eine Aufnahme des rekombinanten Plasmid erreicht werden. Eine Elektroporation erfolgte mit den Daten:

1 msec (Impulsdauer)

1,25 kV/mm

1 mm-Küvette

3.1.8 Kolonie-PCR

Das Prinzip der Kolonie-PCR ist einfach: Sie ist eine Screeningmethode, die positive transformierte Bakterien mittels einer PCR identifiziert. Bakterien wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und in den PCR-Mix überführt. Indem ein bestimmter Abschnitt der Plasmid-DNA, dessen Länge im Zielplasmid bekannt war, in der PCR vervielfältigt wurde, gelang es in der folgenden Agarose-Gelelektrophorese das gesuchte rekombinante Plasmid anhand der Länge von den anderen zu unterscheiden und auf die Ausgangskolonie zurückzuverfolgen. Da Bakterien eingesetzt werden, war die Gefahr unspezifischer Amplifikationen ein größeres Problem als bei aufgereinigter Plasmid-DNA. Als Positivkontrolle diente der Klonierungsvektor oder das zu klonierende DNA Fragment.

Die Kolonie-PCR wurde mit folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 14. Übersicht über die verwendeten PCR-Ansätze

	Kolonie-PCR Ansatz 1	Kolonie-PCR PCR-Mix	In Fusion PCR
Primer fwd (10 µM)	0,17 µl	0,5 µl	1,5 µl
Primer rev (10 µM)	0,17 µl	0,5 µl	1,5 µl
dNTPs (10mM)	-	-	5 µl
dNTPs (2mM)	2,5 µl	-	
Taq- Polymerase (1U)	0,75 µl	0,5 µl	1 µl
Betaine (5M)	-	-	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	-	-	2 µl
MgCl (25 mM)	1,5 µl	-	
10x Polymerasepuffer	2,5 µl (mit KCl)	-	5 µl
<i>Platinum PCR Super Mix</i>	-	20 µl	-
DNA	1 cfu	1 cfu	1 µl
<i>aqua purificata</i>	ad 25 µl	ad 22 µl	ad 50 µl

Tabelle 15. Übersicht über die verwendeten PCR-Programme

	Kolonie- PCR	In Fusion-PCR
Initiale Denaturierung	94°C 5 min	94°C 2 min
Zyklen	25	30
Denaturierung	94°C 30 sec	94°C 15 min
Hybridisierung	50°C 30 sec	60°C 30 sec
Extension	72°C 30 sec	72°C 30 sec
Terminale Extension	72°C 7 min	72°C 7 min

Nachdem nun bekannt war, welche Bakterien das gewünschte Plasmid tragen, war es zur weiteren molekularbiologischen Verwendung essentiell, die Plasmid-DNA aus eben jenen Bakterien zu isolieren und aufzureinigen.

3.1.9 Aufreinigung von DNA

3.1.9.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli* Mini-Präparation

Die Mini-Präparation ist eine Methode, die bei einer großen Anzahl an Proben zur schnellen Isolierung von DNA aus Bakterien angewendet wird.

Methoden

Die einzelnen Schritte sind den Protokollen der Firmen Qiagen (QuickLyse Miniprep Kit) und Fermentas (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) zu entnehmen, deren Reaktionskits beide für eine solche Aufreinigung verwendet wurden.

3.1.9.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli* Midi-, Maxi- und Mega-Präparation

Während die Minipräparation dem Screening der positiv identifizierten Proben aus der Kolonie-PCR diente, war die Maxipräparation den letztendlich als positiv verifizierten Proben mit dem rekombinanten Zielplasmid vorbehalten, um DNA in größeren Mengen zu isolieren.

Die Maxipräparation erfolgte entweder nach dem Protokoll des *Qiagen Plasmid Midi, Maxi, Mega Kit* der Firma *Qiagen* (Hilden) oder dem von *NucleoBond® Xtra Midi, Maxi EF* der Firma *Macherey-Nagel* (Düren).

3.1.9.3 Isolation von DNA aus einem Agarosegel

DNA aus einem Agarosegel zu isolieren, dient der Separierung einer DNA-Bande von einer anderen, die aufgrund ihrer Größe einen kürzeren oder längeren Weg im Gel gewandert ist. Durch UV-Licht kann die Zielbande sichtbar gemacht und aus dem Gel ausgeschnitten werden. Dabei ist zu beachten, die DNA nur einer UV-Quelle mit geringer Wellenlänge und nicht zu lange auszusetzen, um mögliche irreparable DNA-Strangbrüche zu vermeiden.

Als Gel wurde dafür ein 0,8% präparatorisches Agarosegel verwendet, das bis zur Separation der Zielbande bei 75-100 V in der Elektrophoresekammer verblieb. Die weiteren Abläufe folgen dem Protokoll des Reaktionskits *Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System* der Firma *Promega* (Madison, WI, USA) zur Gewinnung der DNA aus einem Agarosegel.

3.1.10 Lagerung von Bakterien bei -80°C

Die Lagerung von Bakterien bei -80°C muss garantieren, dass sich in diesen keine Eiskristalle bilden und sie damit unbrauchbar werden.

Deshalb wurden sogenannte Glycerol-Stocks erstellt, die aus Übernachtskultur der einzufrierenden Kultur und 50% Glycerol bestehen.

3.1.11 Agarose- Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde für folgende Aufgaben verwendet: Isolation einzelner DNA-Banden (siehe 3.1.9.3) und die Analyse von Restriktionsverdauen und PCRs.

3.1.12 Sequenzierungen

Sequenzierungen wurden von der Firma *LGC Genomics* (Berlin) durchgeführt. Auswertung der Sequenzierungen erfolgte mit dem im Internet zugänglichen Programm *Blast N²*, das den Vergleich verschiedener Nukleotidsequenzen ermöglicht.

3.1.13 Bestimmung der DNA- Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte im Photometer bei 260nm.

3.1.14 Klonieren ohne den Gebrauch der Ligase

Für den Fall, dass normale Klonierungsprozesse nicht erfolgreich waren, wurde das *In- Fusion™ PCR Cloning Kit* der Firma Clontech (Palo Alto, CA, USA) angewendet.¹²²

Die Methode arbeitet mit genspezifischen Primern. Diese Primer waren homolog zu dem zu integrierenden Insert konstruiert, jedoch mit einem 15 bp-Überhang, der dem Insertionsenden des Zielvektors entsprach. So wurde in der PCR ein neues Konstrukt amplifiziert: Das Insert mit 15 bp-Anhängen am 3'- und am 5'-Ende. Die PCR lief dabei nach oben genannten Protokoll (siehe 3.1.8) ab. Zur Klonierungsreaktion wurden folgende Komponenten zusammen gegeben (siehe Tabelle 16). Insert und Vektor wurden dabei in einem 2:1 molaren Verhältnis eingesetzt.

² <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Protens>

Tabelle 16. Bestandteile der In-Fusion Klonierungsreaktion für aus dem Agarosegel aufgereinigte PCR-Inserts

	Klonierungsreaktion	Negativkontrolle	Positivkontrolle
PCR-Insert	50 ng	-	2 µl
Vektor	100 ng	1 µl	1 µl
5x Reaktionspuffer	2 µl	2 µl	2 µl
In-Fusion Enzym	1 µl	1 µl	1 µl
aqua dest.	ad 10 µl	ad 10 µl	ad 10 µl

Die Bestandteile wurden zuerst bei 37°C und anschließend bei 50°C für jeweils 15 Minuten inkubiert. In dieser Zeit konnte das In-Fusion Enzym, eine DNA-Polymerase mit 3'-5'Exonuklease-Aktivität¹²¹, die doppelsträngigen Enden von Vektor und Insert in Einzelstränge konvertieren, so dass sie sich dank ihrer homologen Enden in einer Annealing-Reaktion aneinanderfügen konnten. In einer anschließenden Transformationsreaktion mit Stellar™ Competent Cells, wurde der rekombinante Vektor parallel zu Positiv- (zirkulärer Vektor ohne Insert) und Negativkontrolle (linearisierter Vektor ohne Insert) in *E.coli*- Bakterien eingebracht.

Der Erfolg der Klonierungsreaktion wurde anhand Kolonie-PCR (siehe 3.1.8) und Restriktionsverdau (siehe 3.1.3) kontrolliert.

3.2 Methoden in der Zellkultur

3.2.1 Kultivieren von Zellen in Suspension und Adhärenz

In der Kultivierung von Zellen wird das Ziel verfolgt, ihnen *in vitro* ähnliche Umgebungsparameter zu bieten, wie sie *in vivo* aufzufinden sind.¹²³

Teils in Zellkulturflaschen verschiedener Größe teils in Zellkulturschalen wurden sie dazu in einem Brutschrank mit 37°C, 10% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90% gehalten.

Um den Zellen optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, wurde drei Mal pro Woche verbrauchtes Medium gewechselt und die Zellen entsprechend verdünnt.

Methoden

Bei der Suspensionskultur MOPC konnte dies einfach durch einen Austausch des Mediums mit ausführlicher Resuspension verbliebener Zellen geschehen, während adhärente Zellen (wie HEK293K) erst mit Hilfe von Trypsin/EDTA Lösung von ihrer Unterlage abgelöst werden mussten.¹²³

3.2.2 Auftauen von Zellen

Zellen werden bei -150 bis -178°C in Stickstoff gelagert, um sie in ihrem Zustand und ihren Eigenschaften zu konservieren und eine spätere erneute Nutzung möglich zu machen.

Wenn man sie aus diesem Zustand wieder in Flüssigkultur überführt, wurde das die jeweiligen Zellen enthaltende Kryogefäß weniger als eine Minute in das Wasserbad getaucht und anschließend die Zellen mit Medium resuspendiert. Die Zellen wurde bei 350xg für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und in neues Medium überführt, um das toxische Gefrierschutzmittel aus den Zellen zu entfernen. Je nach Zellzahl wurden die Zellen anschließend in das entsprechende Kulturgefäß ausgesät.

3.2.3 Quantitative und qualitative Zellzählung

3.2.3.1 Bestimmung der Zellzahl per Durchflusszytometrie

Eine wichtige Routinetätigkeit lag darin, die Zelldichte zu bestimmen. Dies wurde mit Hilfe eines FACS Gerätes (CyFlow®SL der Firma Partec, Münster), das eine Volumenbestimmung erlaubt, durchgeführt.

Es folgt dem Prinzip, dass Zellen einzeln hintereinander in einer Messkapillare einen Laserstrahl passieren, der die Zellen anhand ihrer optischen Eigenschaften analysiert und lebende von toten Zellen differenzieren kann. Im Seitwärtsstreulicht (SSC) wird dabei die Granularität der Zelle und die Größe und Struktur des Zellkerns abgebildet, im Vorwärtsstreulicht (FSC) das Volumen der Zelle. Diese werden anschließend in einem Punktwolkendiagramm und Histogramm graphisch dargestellt.¹²⁴

Dafür wurden 100 µl Zellen aus der zu bestimmenden Zellkultur mit 900 µl PBS (Verdünnung 1:10) in einem FACS-Röhrchen gemischt und gezählt.

3.2.3.2 Zytologische Analyse per Durchflusszytometrie

Das FACS diente auch der Analyse transfizierter Zellkulturen. So grenzte sich in der Zellzählung nach erfolgreicher Transfektion eine von der normalen Zellpopulation differierende Subpopulation ab, deren Größe Aufschluss über die Transfektionseffizienz erbrachte. Diese Größe konnte bestimmt werden, da der zur Transfektion verwendete Vektor neben dem zu untersuchenden Gen auch das fluorochrome Protein GFP bzw. RFP codierte.

Die Darstellung verschiedener Fluoreszenzintensitäten basiert auf einer relativen Skala. Deshalb erfolgte die Auswertung der Messungen im Vergleich zu einer Negativkontrolle, die die Grenzziehung zur Subpopulation definierte.

Die genauen Abläufe der Messung richten sich nach den Ausführungen unter Punkt 3.2.3.1.

3.2.4 Transfektionsmethoden

Um die Zielsequenz in Form eines rekombinanten Plasmids in die eukaryotische Wirtszelle einzubringen, wurden verschiedene Methoden verfolgt, die im Folgenden näher ausgeführt werden sollen.

3.2.4.1 Transienter DNA- Transfer

Um die Bedingungen für ein Einbringen der Ziel-DNA in die eukaryotische Zelle zu testen, wurde zuerst ein transienter Knockdown in einer gut transfizierbaren Zelllinie (HEK293-Zellen) durchgeführt.

Dazu wurde der Expressionsvektor mit dem die entsprechende shRNA codierenden Oligonukleotid per Transfektion in HEK293-Zellen eingebracht und die Transfektionseffizienz mit Hilfe des Reportergens GFP bzw. RFP evaluiert.¹²³

Dies wurde mit Hilfe des *TurboFect™ in vitro Transfection Reagent* der Firma Fermentas (St. Leon-Roth) durchgeführt und folgte im Ablauf deren Protokollen.

3.2.4.2 Virus-vermittelter DNA-Transfer

3.2.4.2.1 Virus-Produktion (Calcium-Phosphat-Präzipitation)

Die Produktion eines Virus folgte generell dem Prinzip der genetischen Codierung seiner Bestandteile: So wurden DNA für die Umhüllung des Virus (pMD2.G), für essentielle virale Bestandteile (psPAX2) und das rekombinante

Methoden

Plasmid mit dem die shRNA-codierenden Oligonukleotid in einer HEK-293-Zellkultur zueinander gefügt, so dass sie miteinander einen Virus produzieren konnten. Im Vorfeld wurde eine Aufreinigung dieser Plasmid-DNA per Maxi-präparation durchgeführt.

Aus Sicherheitsgründen war das virale Genom auf mehrere Plasmide verteilt. Es wurde bei allen Arbeitsschritten mit Lentiviren unter sterilen Bedingungen und der Sicherheitsstufe 2 gearbeitet.

Die Calcium-Phosphat-Präzipitation ist eine Methode der Transfektion, bei der die DNA durch Komplexbildung mit Calcium-Phosphat per Endozytose in die Zelle gelangt.¹²⁵ Die Methode ist sowohl für transiente als auch für stabile Transfektionsexperimente einsetzbar.¹²⁶

Um eine Kontrolle der Transfektionseffizienz zu ermöglichen, ist ein Reporter-gen in der rekombinanten DNA enthalten, das für das fluoreszierende Protein GFP (grün) bzw. RFP (rot) codiert. Es wird in transfizierten Zellen exprimiert und ermöglicht eine Kontrolle der Transfektion mit dem Fluoreszenzmikroskop oder dem FACS. Dies ermöglichte eine schnelle Auswertung, welche Ansätze für eine weitere Analyse ausgewählt werden.

Die HEK293 Zellen mit einer niedrigen Passagenzahl wurden in 15 cm-Schalen in einer Dichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen ausplattiert, um sie dann drei Tage später bei circa 70% Konfluenz zu transfizieren. Zwei Stunden vor Transfektionsbeginn wurde das Medium gewechselt, um die Zellen in die logarithmische Wachstumsphase zu halten.

Anschließend wurde der Transfektionsmix vorbereitet, dessen Bestandteile pro 15 cm- Schale in folgender Reihenfolge zueinander pipettiert wurden:

Rekombinantes Vektorplasmid	22,5 µg
Envelope-Plasmid (pMD2.G)	7,9 µg
Verpackungsplasmid (psPAX2)	14,6 µg
<i>aqua dest.</i>	1,01 ml
CaCl ₂ 2,5M	113 µl
2x HBS	1,14 ml

Methoden

2xHBS wurde tropfenweise unter intensivem Durchmischen hinzugefügt und das Gemisch nach fünf Minuten Inkubationszeit gleichmäßig auf die 15cm-Schale mit den HEK-Zellen verteilt.

Zur Kontrolle des Transfektionserfolges wurde im Fluoreszenzmikroskop evaluiert, ob die HEK-Zellen in den nächsten Tagen rot bzw. grün fluoreszierten.

Nach einem Austausch des Mediums 14-16 Stunden nach Transfektion wurde der Überstand mit lentiviralen Partikeln drei Mal in 12- Stunden- Absätzen geerntet, 5 min bei 400x g zentrifugiert und durch einen 0,45 µm-Filter steril filtriert.

Um eine höhere Konzentration der Viruspartikel zu erreichen, wurde die Methode der Ultrazentrifugation angewandt. Hierbei wurde der filtrierte Überstand bei 47.000xg (25.000 rpm) und 4°C für 1,5 bis 2 Stunden mit einem SW28Ti Rotor zentrifugiert. Teilweise wurde für ein saubereres Viruspellet der Zellkulturüberstand mit einem 20% Saccharose-Kissen unterschichtet. Das Virus-haltige Pellet wurde in PBS resuspendiert und in kleinen Aliquots bei -80°C gelagert.

Die Protokolle der Transfektion sind an jenen von Tronolab¹²⁷ (Lausanne, CH), Flemington Lab (New Orleans, LA, USA), Classic Protocol von Nature Methods (2005) und Lamond Lab (Dundee, GB) orientiert.

3.2.4.2.2 Titration lentiviraler Vektoren

Um eine ungefähre Vorstellung von Quantität und Qualität der produzierten Viruspartikel (MOI=multiplicity of infection) zu bekommen, wurde eine Kontrollinfektion von HEK- Zellen vorgenommen.

Hierzu wurden circa 70% konfluente HEK-Zellen in zunehmender Menge (1-300 µl) mit den produzierten Viruspartikeln unter Zugabe von 4 µg/ml Polybrene infiziert. Dadurch sollte die optimale Konzentration für die spätere Infektion der Zielzellen ermittelt werden.

Im Vergleich der Zellen mit und ohne Zugabe von Doxycyclin (1 µg/ml) wurde ihre Induzierbarkeit getestet.

3.2.4.2.3 Stabile lentivirale Transduktion

Die anschließende Infektion der eukaryotischen Zielzelle, MOPC, erfolgte mit Hilfe der Spin-Infektions-Methode.

Methoden

Dazu wurden etwa 50 µl hochkonzentriertes Virus (alternativ etwa 150 µl unkonzentriertes Virus) zu 1×10^5 Zellen/Well in einem 6-Well gegeben. Um die Bindung der Viren an die Zellmembran durch Neutralisierung von Ladungsdifferenzen zu erleichtern, wurden 4 µg/ml Polybrene hinzugefügt (Albers, 2010). Diese Bestandteile wurden eine Stunde bei 1.000xg zentrifugiert und anschließend mit 2 ml frischem Medium pro Well versetzt.

Am Tag danach wurden die Zellen mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert und in den darauffolgenden Tagen mit Hilfe der Durchflusszytometrie und des Fluoreszenzmikroskopes ausgewertet. Doxycyclin musste hierbei im Rahmen des Nährmediumwechsels wegen seiner limitierten Halbwertszeit von 24 Stunden stets erneut frisch hinzugefügt werden, um eine Fluktuation der Genexpression zu vermeiden.¹²⁸

3.2.5 Erzeugung von Einzelzellklonen durch Verdünnung

Eine Zelle dient hierbei als Ausgangspunkt einer klonalen Kolonie, deren Mitglieder alle die gleichen genetischen Eigenschaften exprimieren sollen.

Dazu wurde auf 5x96 Well rechnerisch eine Zelle in jedes dritte Well ausgesät (100 µl/Well, 1 Zelle/300 µl), ihr Wachstum in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des Lichtmikroskopes beobachtet und anschließend diejenigen Wells, in denen Zellen gewachsen waren, auf den *YBX1* Knockdown nach Induktion mit Doxycyclin (1 µg/ml) im Western-Blot getestet.

3.2.6 Durchführung eines Cytospins

Um Zellproben für eine spätere Färbung und Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop vorzubereiten, wurden die Suspensionszellen mit einer Zytocentrifuge auf Objektträger immobilisiert und anschließend in PFA fixiert. Damit standen sie für immunzytochemische Analysen zur Verfügung.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Objektträger wurden durch einstündige Inkubation mit Serum geblockt. Anschließend wurde der Objektträger drei Mal fünf Minuten in PBS gewaschen. Der Zugabe des ersten Antikörpers, der in Antibody Diluent (AD) zuvor verdünnt worden war mit einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur, folgten Waschschriffe von drei Mal fünf Minuten in PBS, 0,1% Triton, 0,05% Tween 20-Lösung und ein Mal fünf Minuten PBS-Lösung. Die verwendeten Antikörper waren polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen [rabbit] oder der Ziege [goat]. Zur Detektion wurden Fluoreszenz-markierte Zweitantikörper eingesetzt. Diese wurde in entsprechender Verdünnung eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Mal waschen mit PBS, 0,1% Triton, 0,05% Tween und einmal mit PBS konnten die Präparate mit einem DAPI-haltigem Eindeckelmedium (Anti-Fade) und Deckgläschen versiegelt werden. Die Analyse der Proteinexpression erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

3.3.2 Western Blot

Der Western Blot in Kombination mit der SDS-PAGE und Immunfärbung ist ein Verfahren, das Proteine identifiziert und ihre relative Menge bestimmt. Somit spielt es eine wichtige Rolle bei der Analyse von Prozessen, die als Manipulation auf der DNA-Ebene auch Auswirkungen auf die Proteinexpression haben, wie der Knockdown eines Gens.

Der Western Blot stellt somit ein wichtiges Verfahren dar, um einen RNAi vermittelten Protein „Knockdown“ zu verifizieren.

3.3.2.1 Ernte der Zellen

Der Western Blot dient der Analyse bestimmter Proteine, die man aus zellulärem Material zuvor isoliert hat. Hierzu wurden eine bestimmte Anzahl Zellen der Zellkultur entnommen und zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen. Alle folgenden Schritte erfolgten bei 4°C, um einer Degradation der Proteine durch Proteinasen entgegenzuwirken.

3.3.2.2 Proteinextraktion durch Zellyse

Um eine weitere Analyse der Proteine vornehmen zu können, wurde ein Lysat der Zellen hergestellt. Dies erfolgte durch den Lysepuffer RIPA, der in einem 30-minütigen Inkubationsschritt die Zellen aufschloss. Sie wurden anschließend zentrifugiert (15 min, 4 °C, 15.000 rpm), um nicht gelöste Zellreste abzutrennen.

3.3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Um die Proteinkonzentration des Lysates zu quantifizieren, wurde es in Relation zu einer definierten Proteinlösung vermessen.

Der Photometer bestimmt die Farbintensität der Probe unbekannter Konzentration und anhand der Eichkurve konnte die Protein-Konzentration berechnet werden.

Um die Kalibrierungproben mit aufsteigender Konzentration (0-10 mg/ml) herzustellen, wurde gemäß des Protokolles *DC™ Protein Assay* der Firma *Bio-Rad* (Herts, UK) gearbeitet.

Danach konnte die Messung mit Hilfe des Programmes *Magellan* der Firma *Tecon* (Crailsheim) durchgeführt werden.

3.3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der Gelelektrophorese werden Proteine in einem elektrischen Feld nach Größe, Ladung und Form in Banden aufgetrennt. In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) jedoch erfolgt dies alleine nach Größe, da die Ladung der Proteine durch das SDS maskiert und die Form denaturiert wird.

Zuerst wurde dafür das Trenngel, dessen prozentualer Anteil an Polyacrylamid je nach gewünschter Porengröße differierte (7,5-15%), in die Gelkassette gegossen und nach dessen Polymerisation das Sammelgel. Die Kassette wurde anschließend in eine Elektrophoresekammer überführt, mit Laufpuffer überschichtet und die Proben in die einzelnen Taschen gefüllt. Eine Tasche war dabei dem Protein-Molekulargewichtsmarker (Fermentas) vorbehalten, der aus einer Mischung Proteinen definierten Molekulargewichtes besteht und somit dem Vergleich dient.

Die Proben wurde zuvor aus 40 µg Protein (in 10 µl RIPA) und 10 µl zweifach Lämmli hergestellt und dann bei 96°C für 5 Minuten erhitzt.

Methoden

Die Elektrophorese lief zuerst für 30 Minuten bei 150 V, wobei die Proben das Sammelgel durchliefen und, nachdem sie das Trenngel erreicht hatten, für weitere 30 Minuten bei 180 V bis der Lauffrontmarker Bromphenolblau am unteren Rand des Gels angekommen war.

3.3.2.5 Immunoblot

Da eine spezifische Detektion einzelner Proteine nicht direkt aus dem Gel erfolgen kann, muss das aufgetrennte Proteingemisch auf eine Membran im *West Electroblotting-Verfahren* (Tank Transfer) transferiert werden.

Dazu wurde ein *Blotting-Sandwich* errichtet, in dessen Mitte sich Gel und Membran befinden, darum herum jeweils auf beiden Seiten zwei Filterpapiere. Alle Bestandteile sollten etwa gleich groß sein, wurden zuvor in den Transfer-Puffer getränkt und ohne Luftblasen zusammengesetzt. Die Membran bestand aus PVDF und musste vor dem Blotten in 100% Methanol aktiviert werden.

In der mit Transfer-Puffer befüllten Elektrophoresekammer fand anschließend der Transfer auf die PVDF-Membran (bei 300 W für eine Stunde) statt. Die dabei angelegte Stromstärke war abhängig von der Größe der Membran.

3.3.2.6 Immunbiochemischer Nachweis transferierter Proteine

Die hier angewendeten immunbiochemischen Methoden folgen dem Prinzip der unter 3.3.1 geschilderten Abläufe, ein Protein durch einen spezifischen Antikörper sichtbar zu machen. Nach Inkubation mit einem HRP markiertem Zweitantikörper wurde zur Detektion des Proteins per Chemilumineszenz die Membran mit ECL-Detektionsreagenz benetzt und Röntgenfilme für verschiedene Zeiten belichtet.

3.3.2.7 Strippen von Membranen

Durch das *Strippen* wird die Membran von an sie gebundenen Antikörpern befreit und dadurch die Untersuchung weiterer Proteine auf derselben Membran ermöglicht. In diesem Fall wurden die an die pVDF-Membran gebundenen Antikörper durch einen *Stripping Puffer* mit pH 2,2 über Nacht bei 4° Celsius denaturiert und damit gelöst. Am nächsten Morgen wurde die Membran mit destilliertem Wasser abgewaschen und der immunbiochemische Nachweis transferierter Proteine, wie in Punkt 3.3.2.6 dargestellt, erneut durchgeführt.

4 Ergebnisse

Ziel meiner Bemühungen ist der funktionelle Knockout von *YBX1* in einem Tetrazyklin-induzierbaren Tet-On/Off-System. Verlässt die *YBX1* mRNA den Zellkern wird sie von im die Zelle integrierten RNAi-Mechanismus erkannt, gebunden und blockiert, so dass kein Protein produziert werden kann und somit die weiteren Stoffwechselwege, in die *YBX1* involviert ist, nicht ablaufen können. Die Gabe von Doxyzyklin führt jedoch zu einer Suppression der *YBX1* shRNA und damit zu einem reversiblen Knockout. Dies ist nötig, da *YBX1* eine essenzielle Funktion in der Zelle hat und seine dauerhafte Ausschaltung ein Absterben der Zelle zur Folge hätte.

Der Weg vom „nackten“ shRNA-codierenden Oligonukleotid zur Zielzelle MOPC315.BM, die ein stabil integriertes und konstitutionell exprimierbares shRNA-Expressionskonstrukt gegen *YBX1* in sich trägt, verlief über mehrere Teilschritte:

Im Rahmen unserer Klonierungsstrategie erfolgte als erstes eine Klonierung der shRNA gegen *YBX1* in einen nicht-induzierbaren Vektor. Der shRNA-beinhaltende Teil dieses Vektors wurde anschließend in einen induzierbaren Vektor mit Hilfe des Ligase-unabhängigen Klonierens eingebracht. Der Zwischenschritt war notwendig, da ein direktes Klonieren in den induzierbaren Vektor nicht möglich ist.

Der Vektor wurde via lentiviralem Konstrukt in die Zielzelle MOPC315.BM transduziert. Per durchflusszytometrischer Analyse GFP bzw. RFP exprimierender Zellen und Puromycin-Selektion wurde eine stabile murine Zelllinie etabliert. Die Isolation eines Einzelzellklons mit den gewünschten Eigenschaften wurde anschließend per Immunhistochemie und Western Blot bestätigt.

4.1 Klonierung I: Klonierung *YBX1* spezifischer shRNAs in den nicht-induzierbaren Vektor pLVTHM

In einem ersten Schritt wurden die Klonierung in ein nicht-induzierbares Vektorsystem vollführt, um die so entstandenen Plasmide danach durch einen erneuten Verdau in ein induzierbares Vektorsystem zu überführen.

4.1.1 Klonierung von YBX1 shRNA in pLVTHM

Verschiedene zur YBX1 mRNA komplementäre Sequenzen (vergleiche Tabelle 5) wurden ausgewählt, um als shRNA einen Knockdown von YBX1 zu bewirken (siehe Abbildung 15). Die Auswahl der Sequenzen wurde dabei anhand der Literatur und webbasierter Software getroffen.

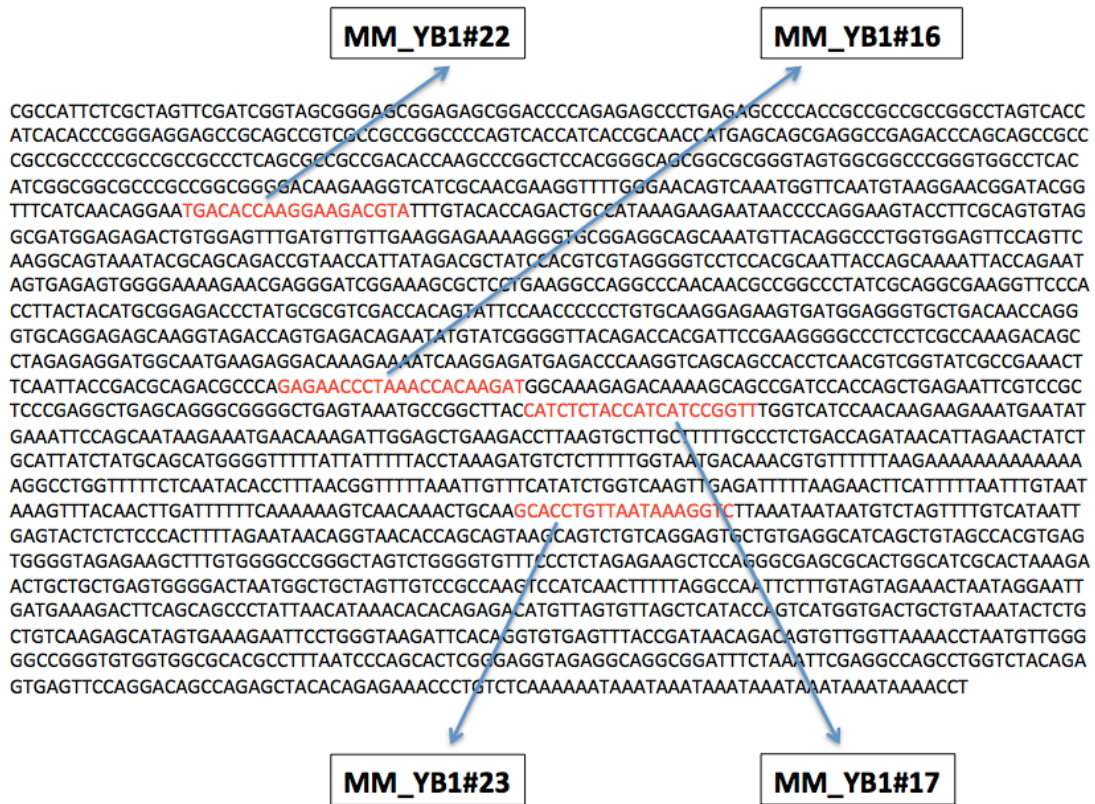


Abbildung 15 mRNA-Sequenz von YBX1 (Maus) und der Sequenzen zur Konstruktion der shRNAs

Es wurden die entsprechenden Oligonukleotidpaare zu den Sequenzen bestellt. Diese wurden zu Doppelstrang-Oligonukleotiden hybridisiert (siehe 3.1.2).

Ergebnisse

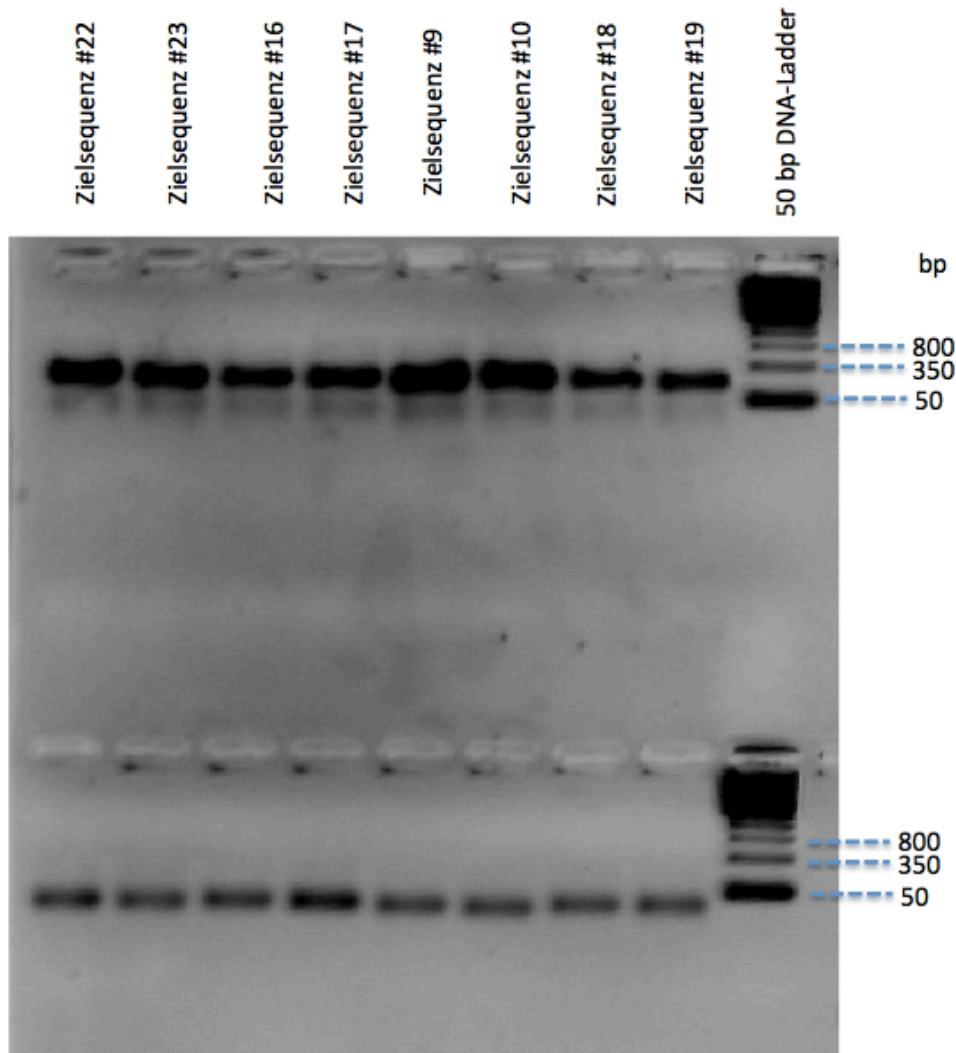


Abb.

Abbildung 16 Analytisches Agarosegel zur Bestätigung von Annealing mit den einzelsträngigen ss-Oligonukleotiden unten und den doppelsträngigen ds-Oligonukleotiden oben (beide etwa 50 bp Länge). ds-Oligonukleotide #9,10,18,19 sind MYC-spezifisch und für die folgende Arbeit irrelevant.

Das so entstandene doppelsträngige Oligonukleotid wurde in den Vektor pLVTHM (siehe 8.4 Punkt (1)) über die MluI und ClaI- Schnittstelle kloniert. Das Plasmid wurde nach MluI/ClaI Verdau durch ein präparatives Agarosegel aufgereinigt und mit dem doppelsträngigen Oligonukleotid ligiert. Das entstandene Ligationsprodukt wurde je nach inseriertem Oligonukleotid pLVTHM#16, pLVTHM#17, pLVTHM#22 und pLVTHM#23 genannt. Die Ligation wurde anschließend in kompetente *E.coli* transformiert.

4.1.2 Transformation der Ligationsreaktion

Um eine Vermehrung und Selektionierung von pLVTHM#16,17,22,23 zu erreichen, wurden sie in chemisch kompetente *Escherichia coli* durch einen Hitzeschock eingebracht. Es wurden etwa 2-5 µl Ligationsprodukt in 20-50 µl kompetenten Bakterien transformiert (siehe 3.1.7 Transformation).

Die Bakterien wurden auf LB/Carbenicillin-Platten ausgestrichen. Eine Transformation wurde zur Abschätzung des Backgrounds mit verdautem pLVTHM ohne Insert als Negativkontrolle durchgeführt.

4.1.3 Kolonie-PCR von pLVTHM#16, 17, 22, 23

Für eine erste Identifikation, ob das Insert integriert wurde, wurde eine Kolonie-PCR mit den Primern H1 und SP6 vorgenommen (siehe Kapitel 3.1.8).

Die Kolonie-PCR erlaubte anhand der Größe, positive Kolonien schnell zu identifizieren (siehe Tabelle 17 und 3.1.8):

Tabelle 17. Bewertung der Kolonie-PCR

Bewertung	PCR-Produkt	Erwartete Länge
Keine Insertion	H1 (5533) bis SP6 (5923)	390 bp
Insertion erfolgreich	H1 (5533) bis SP6 (5923) + 67-71 bp shRNA Insert:	457-461 bp

Ergebnisse

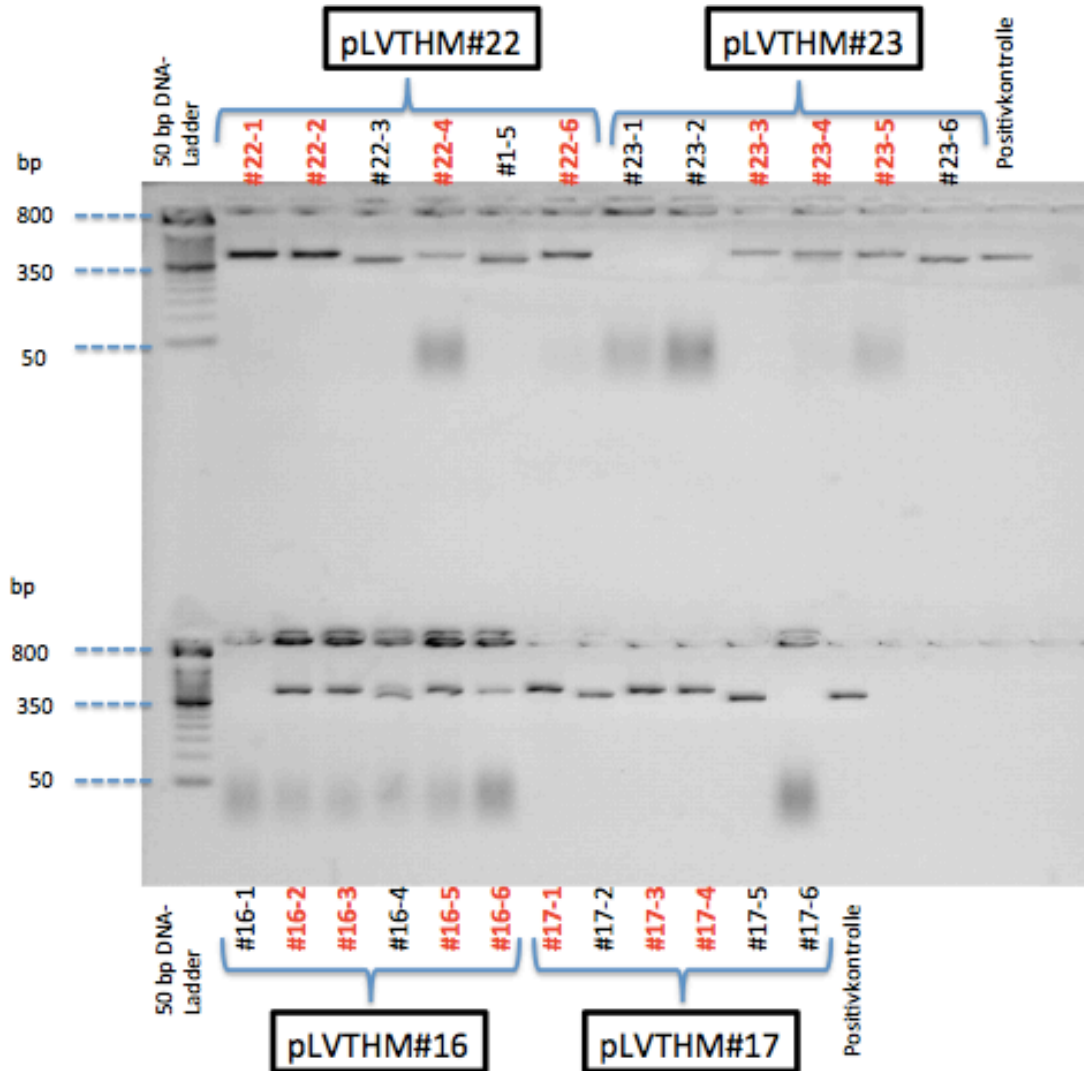


Abbildung 17 Kolonie-PCR zur Identifikation der Vektoren mit erfolgreich inseriertem Oligonukleotid (rot) vs. fehlerhafte Insertion (schwarz) jeweils für pLVTHM#16,17,22,23, die im Vergleich zur Positivkontrolle (pLVTHM ohne Insert) etwas höher liegen

Die positiv identifizierte Kolonien wurden in einer Übernachtskultur bei 37°C vervielfältigt.

4.1.4 Minipräparation von pLVTHM#22,23,16,17 und Restriktionsverdau

Als nächster Schritt erfolgte eine Minipräparation der positiven Proben, um die Plasmid-DNA aus den Bakterien zu isolieren (siehe 3.1.9.1).

Ergebnisse

Über einen Restriktionsverdau mit MluI und ClaI wurde das Ergebnis verifiziert. Erbrachte der erneute Verdau nicht die Auftrennung in zwei Zielbanden von etwa 11 .000 bp und 70 bp, wurden die entsprechenden Proben aussortiert.

4.1.5 Sequenzierung von pLVTHM#22,23,16,17

Zur Sequenzierung ausgewählt wurden pro Konstrukt 1-2 positive Proben: pLVTHM#22-1, #22-2, #23-5, #16-2, #16-3, #17-1, #17-4.

Durch eine Analyse ihrer Nukleotidsequenz sollten Fehler bei der Oligosynthese ausgeschlossen und die Sequenzen abschließend verifiziert werden (vergleiche Kapitel 3.1.12).

Zu diesem Zwecke wurden sie mit dem Primer H1 sequenziert. Die Sequenzierung wurde von der Firma *LGC Genomics* (Berlin) vorgenommen.

Ausgewertet wurde mit dem Programm Blast N, welches einen Vergleich des Inserts mit der anfangs verwendeten Sequenz bzw. einen Vergleich der Anschlussstellen von Insert und Vektor mit dem Ursprungsvektor pLVTHM ermöglichte (siehe Abbildung 18).

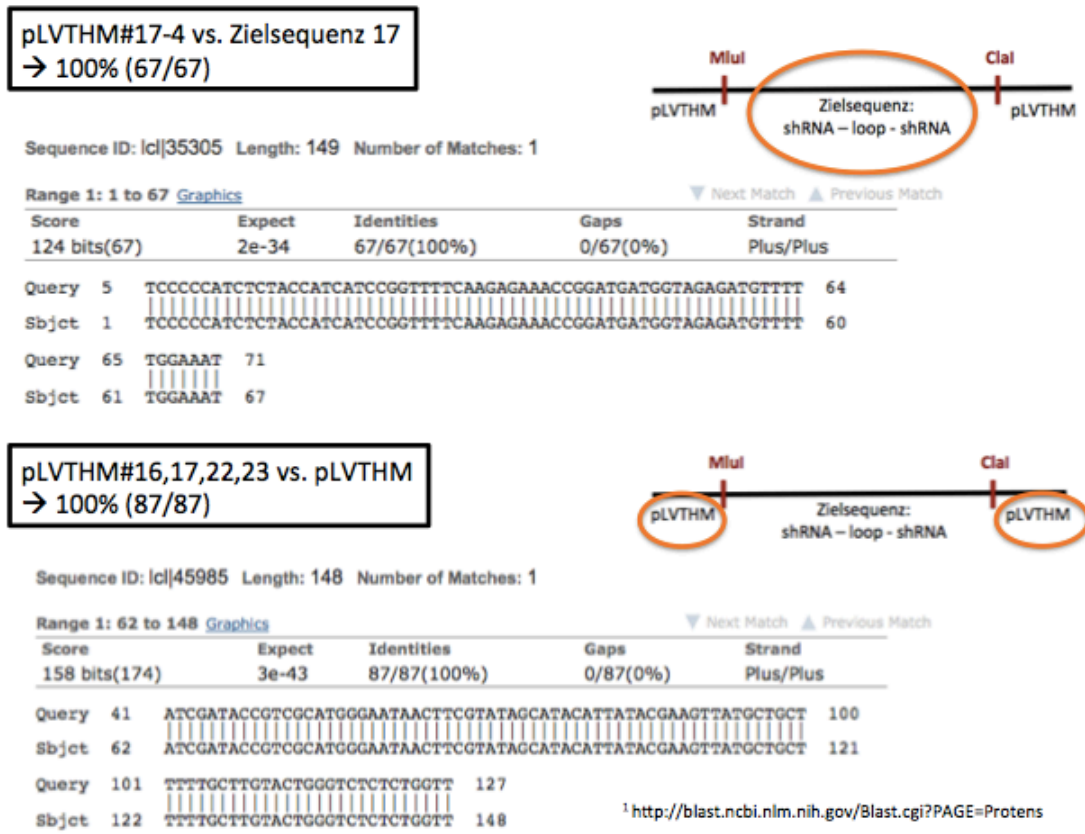


Abbildung 18 Ergebnis der Sequenzierung für pLVTHM#17-4 als Beispiel. Vergleich der inserierten Sequenz (Subject) mit den ursprünglich ausgewählten Zielsequenzen (Query) und der Insertionsstelle (Subject) mit pLVTHM ohne Insert (Query) (ausgewertet mit Blast N¹). Schematisch ist daneben orange markiert, welcher Bereich jeweils verglichen wird.

4.1.6 Maxipräparation der durch Sequenzierung verifizierten Plasmide

Nach der Bestätigung der richtigen Sequenz wurde diese in 100 ml Übernachtskultur bei 37°C vervielfältigt und anschließend eine Maxipräparation der oben genannten Plasmide durchgeführt (vergleiche Kapitel 3.1.9.2).

4.2 Klonierung II: Vergebliche Versuche der Insertion der gegen YBX1 gerichteten shRNA in die induzierbaren bakteriellen Vektoren pLVCT-tTR-KRAB und pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2

In einem zweiten Schritt wurde nun nach erfolgreicher Konstruktion von vier verschiedenen nicht-induzierbaren Vektoren mit inseriertem shRNA, diese ver-

Ergebnisse

daut und das MscI/FspI-Fragment in einen induzierbaren Vektor kloniert (siehe Abbildung 19).

pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 und pLVCT-tTR-KRAB bilden hierbei die induzierbaren Vektoren. Sie werden in der Gegenwart von Tetrazyklin an- (Tet-On: pLVCT-tTR-KRAB) bzw. abgeschaltet (Tet-Off: pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2). Die Vektoren sind im Vektorenverzeichnis (siehe 8.4) dargestellt. Das zugrunde liegende Prinzip ist in Kapitel 1.3.4.3 erläutert.

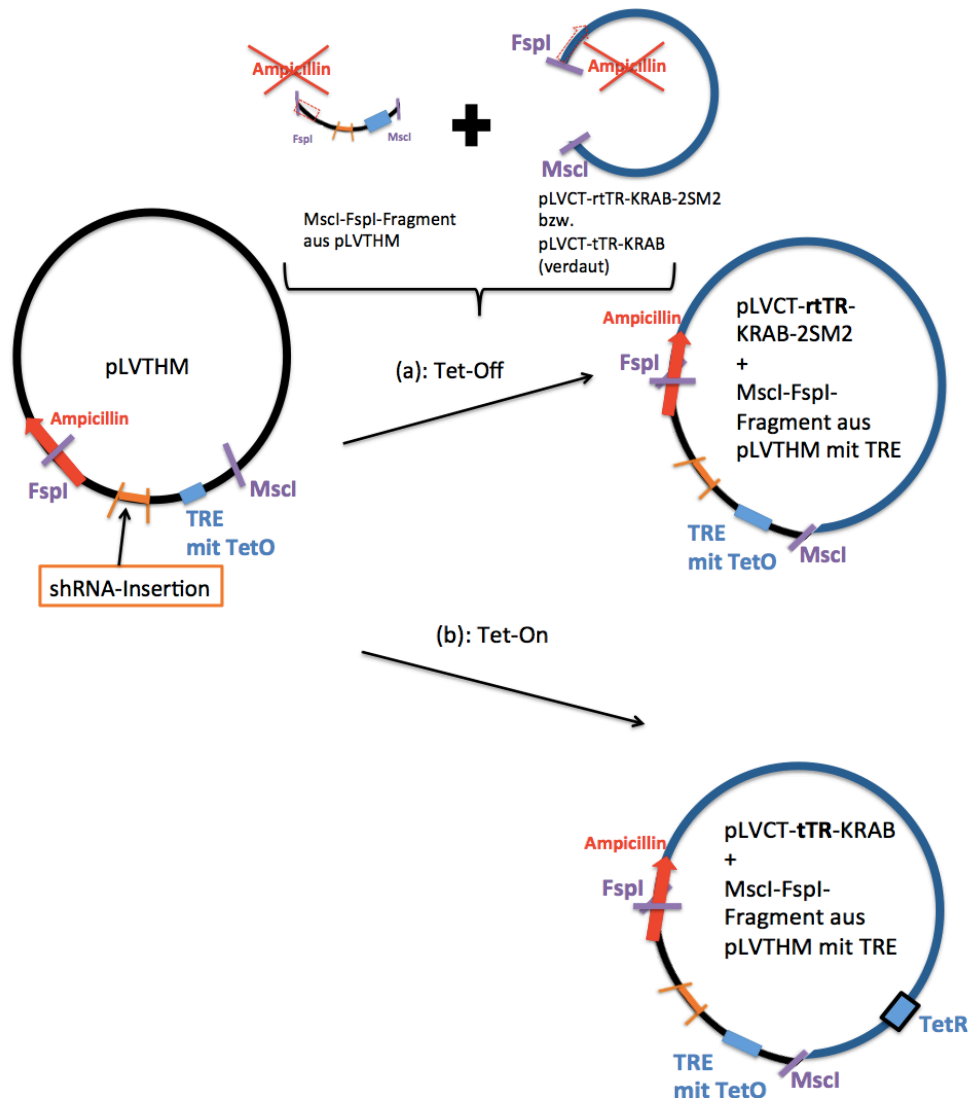


Abbildung 19 Schematische Darstellung des Insert-Transfers vom nicht-induzierbaren Vektor pLVTHM in den induzierbaren Vektor pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 bzw. pLVCT-tTR-KRAB anhand eines Restriktionsverdaues mit den Restriktionsenzymen MscI und FspI. Der Verdau inaktiviert die rot markierte Ampicillin-Resistenz, die durch die Insertion des MscI-FspI-Fragmentes in pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 bzw. pLVCT-tTR-KRAB wieder erworben wird. pLVTHM besitzt zudem ein Tetrazyklin-Responsiv-Element (TRE) mit Tetrazyklin-Operator (TetO), das sich innerhalb des Bereiches zwischen MscI und FspI befindet und somit mittransferiert wird. pLVTHM kann das TRE selbst nicht nutzen, da es das entsprechende Protein nicht besitzt, das an den Tetrazyklin-Operator bindet. Bei dem Vektor pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 hingegen ist es dafür verantwortlich, dass die Expression TRE-kontrollierter Gene durch Tetrazyklin und seine Derivate unterdrückt wird, d.h. unser Ziel-Gen in der Gegenwart von Tetrazyklin nicht vervielfältigt wird. Der Vektor pLVCT-tTR-KRAB hingegen besitzt einen Tetrazyklin-Repressor. Hier wird unser Ziel-Gen nur vervielfältigt, wenn Tetrazyklin vorhanden ist.

Ergebnisse

Um die Integrität der beteiligten Vektoren und Inserts zu testen, wurde initial eine Kolonie-PCR mit H1 und SP6 durchgeführt. Diese erlaubte die einzelnen Komponenten anhand ihrer Größe zu differenzieren und verifizieren (siehe Abbildung 20).

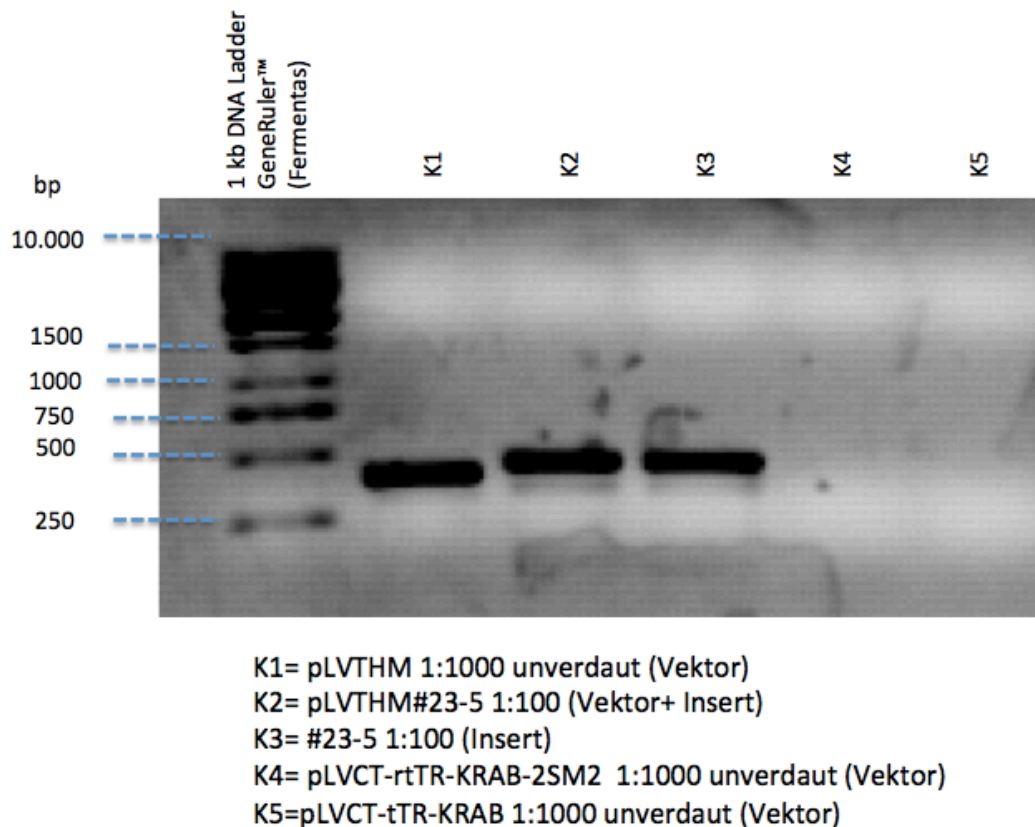


Abbildung 20 Kolonie-PCR mit H1 und SP6. K1 (Legende s.o.) liegt bei 390 bp (Entfernung von H1 und SP6 auf pLVTHM). K2 und K3 liegen bei ca. 460 bp (Entfernung von H1 und SP6 auf pLVTHM+ Länge Insert). K4 und K5 sind erwartungsgemäß ohne Zielbande geblieben, da sie keinen Ansatzpunkt für den H1-Primer besitzen und diesen erst im Zuge der Transferierung des Inserts aus pLVTHM erwerben.

4.2.1 Klonierung von YBX1 shRNA in pLVCT-tTR-KRAB und pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2

Um die ausgewählten Zielsequenzen in die induzierbaren Vektoren zu integrieren, wurden sie aus dem nicht-induzierbaren Vektor pLVTHM per Restriktionsverdau mit MscI und FspI ausgeschnitten, anhand eines präparatorischen Agarsegels isoliert (siehe Abbildung 21b) und sowohl in pLVCT-tTR-KRAB als auch in pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 kloniert.

Ergebnisse

Um das MscI-FspI-Fragment von der reinen Zielsequenz (#16,17,22,23) und dem in pLVTHM eingebauten Insert (pLVTHM#16,17,22,23) zu unterscheiden, wird sie im Folgenden e#16,17,22,23 genannt. Eine Übersicht der dabei miteinander ligierten Fragmente ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18. Ligationsreaktionen: Jeder der Ligationspartner A wurde mit jedem der Ligationspartner B zusammengefügt.

Ligationspartner A (Vektor)	Ligationspartner B (Insert)
pLVCT-tTR-KRAB	e#22-2
pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2	e#23-5
	e#16-2
	e#17-4

Ergebnisse

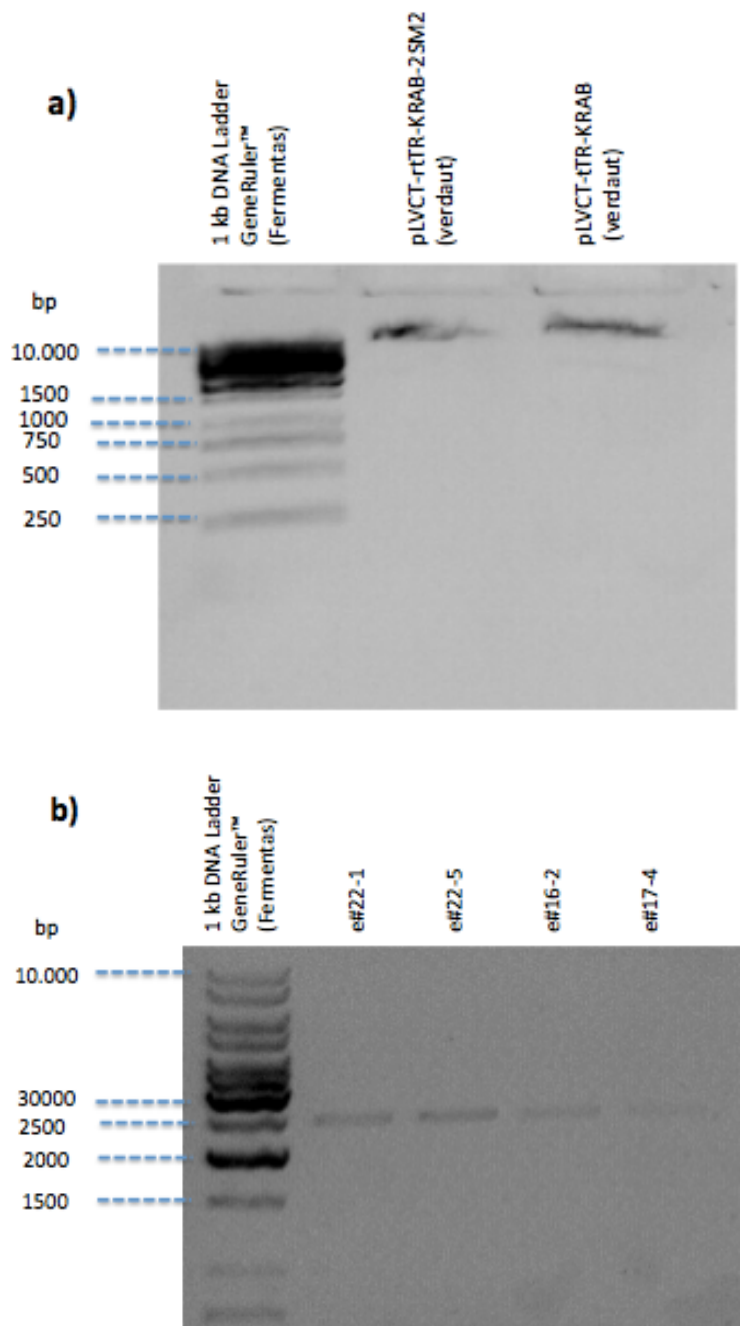


Abbildung 21 Nach Verdau: (a) Darstellung von Vektoren pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 und pLVCT-tTR-KRAB im durch MscI und FspI verdauten Zustand (Zielbande liegt bei etwa 13.000 bp) und (b) der aufgereinigten Inserts nach Isolation aus dem Agarosegel (Zielbande liegt bei 2.435 bp, welches der Entfernung von MscI und FspI in pLVTHM entspricht).

Als Kontrolle wurde pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 bzw. pLVCT-tTR-KRAB mit MscI und FspI verdaut und aufgereinigt, jedoch ohne Insert ligiert und transformiert.

Ergebnisse

Durch den Verdau wird die Resistenz gegen Ampicillin inaktiviert und somit das Wachstum auf den LB/Carbenicillin-Platten reduziert.

4.2.2 Transformation der mit dem ds-Oligonukleotid ligierten Vektoren pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 und pLVCT-tTR-KRAB in E.coli

Die Plasmide wurden zur Selektion und Vermehrung in chemisch kompetente TOP-10 *E.coli* transformiert (vergleiche Kapitel 3.1.7), auf LB/Carbenicillin-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°Celsius inkubiert.

4.2.3 Vergebliche Versuche der Identifikation eines positiven Klons mit Hilfe von Kolonie-PCR, Restriktionsverdau und Sequenzierung

Eine Amplifikation des Insertionsabschnittes mit Hilfe der Primer H1 und SP6 im Rahmen der Kolonie-PCR erbrachte trotz 244 gepickter Kolonien und zahlreicher Variationen der einzelnen Parameter keine positiven Klone. Ebenfalls konnte im Restriktionsverdau mit MscI und FspI kein richtiger Klon identifiziert werden. Eine Sequenzanalyse mit dem Primer *Lenti-Seq*, dessen Startpunkt sich außerhalb der Insertionsregion befindet, erklärte, warum. Die Klone ergaben reine Vektorsequenzen ohne Insert, d.h. Wildtyp pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 bzw. pLVCT-tTR-KRAB.

4.2.4 Verschiedene Ansätze der Problemlösung

Da eine erfolgreiche Insertion des MscI-FspI-Fragmentes auf konventionelle Weise bis dahin nicht geglückt war, variierten wir einzelne Schritte, wie es im Folgenden aufgelistet ist (Tabelle 19). Abschließend konnte es jedoch auch trotz dieser Variationen nie gelingen, mit Hilfe des ligaseabhängigen Klonierens zweier „blunt end“-schneidender Restriktionsenzyme einen richtigen Klon für pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 und/oder pLVCT-tTR-KRAB zu isolieren.

Tabelle 19. Ansätze zur Klonierung von e#16,17,22,23 in pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 und pLVCT-tTR-KRAB

Ansatz	Gedankengang
Dephosphorylierung der Vektoren	Um das Risiko der Rezirkulation ohne Integration des Zielinserts durch die „blunt end“ schneidenden Restriktionsenzyme Msc I und Fsp I zu minimieren, werden die verdauten Vektoren pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 und pLVCT-tTR-KRAB vor der Ligation dephosphoryliert (vergleiche Kapitel 3.1.4).
Phosphorylierung des Inserts	Um die Chance der Integration des Inserts in den dephosphorylierten Vektor zu ermöglichen, werden seine Enden phosphoryliert.
Verdau mit XbaI und EcoRI	Erfolgreiche Insertion über alternativen Weg erkennen
Kolonie PCR mit Lenti-Seq Primer und SP6	Der Startpunkt von Lenti-Seq befindet sich außerhalb der Insertionsregion, so dass eine Differenzierung, ob das Insert in pLVTHM oder einem induzierbaren Vektor steckt, allein anhand der Kolonie-PCR möglich wird.

4.3 Klonierung III: Ligasefreies Klonieren der gegen *YBX1* gerichteten shRNA in die induzierbaren bakteriellen Vektoren pLVCT-tTR-KRAB und pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2

Nach den vergeblichen Insertionsversuchen wechselten wir zu einer alternativen Klonierungsmethode, die mit Hilfe von Rekombinationsenzymen statt einer Ligase die Insertion der Fragmente in den Vektor katalysiert.

Das detaillierte Procedere ist in Kapitel 3.1.14 erläutert. Der Ablauf des generellen Versuchszyklus ist in Abbildung 22 schematisch dargestellt:

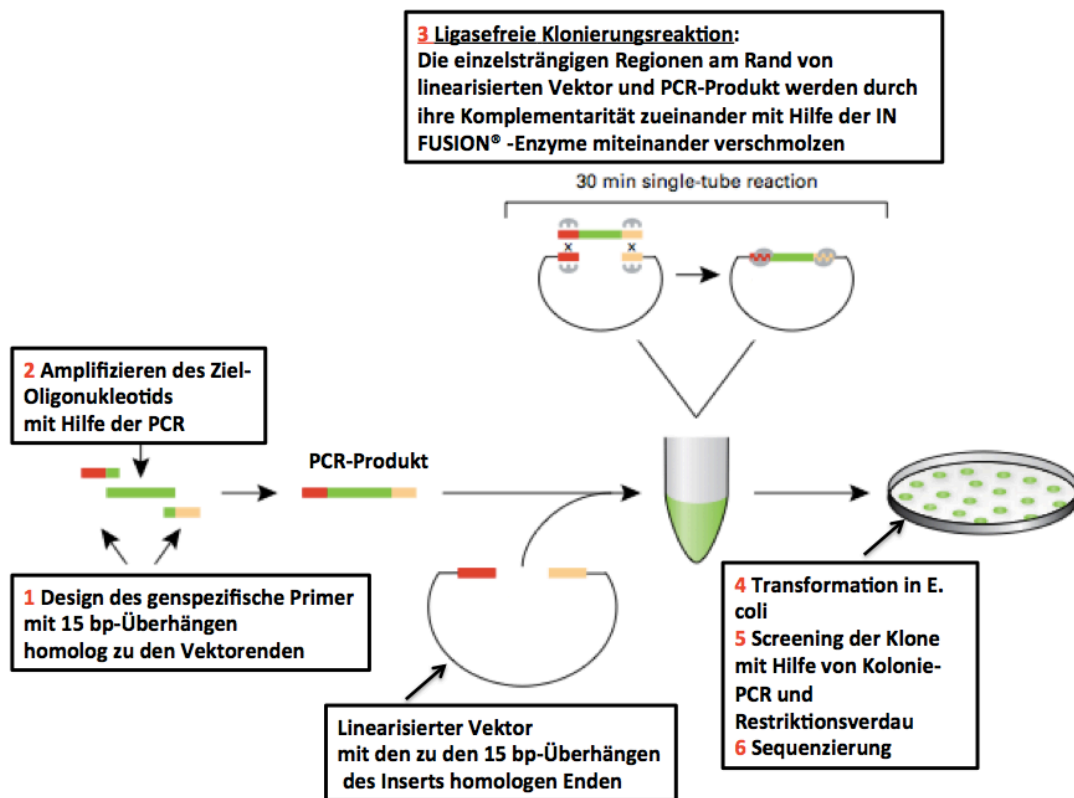


Abbildung 22 Ablauf der IN FUSION®-Reaktion als alternative Klonierungsmethode. Der linearisierte Vektor entspricht dabei den durch MscI und FspI verdauten pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 und pLVCT-tTR-KRAB, Ziel-Insert ist e#16,17,22,23 (modifiziert nach Clontech, In-Fusion® Advantage PCR Cloning Kit User Manual)

Im Folgenden sind ausgewählte Bilder aus verschiedenen Versuchszyklen beispielhaft dargestellt. Die IN FUSION®-Reaktion wurde jedoch für alle Oligonukleotide (#16,17,22,23) in Kombination mit den Vektoren pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 und pLVCT-tTR-KRAB durchgeführt.

4.3.1 Design der genspezifischen Primer mit 15 bp-Überhängen

Die Methode basiert auf am Rand unserer Zielsequenz ansetzender 15 bp-Überhänge, die eine Rekombination mit dem komplementären Vektorüberhang eingehen und so eine Integration des Inserts ermöglichen. Diese Überhänge mussten jedoch erst komplementär zu den letzten 15 bp synthetisiert werden (siehe Abbildung 23). Im Fall von pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 und pLVCT-tTR-KRAB waren diese 15 Nukleotide identisch. Dazu wurden zwei Primer von der

Ergebnisse

Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bestellt, die in der PCR diese 15 bp Überhänge einbauen sollten. Diese Primer wurden *In-for* und *In-rev* genannt.

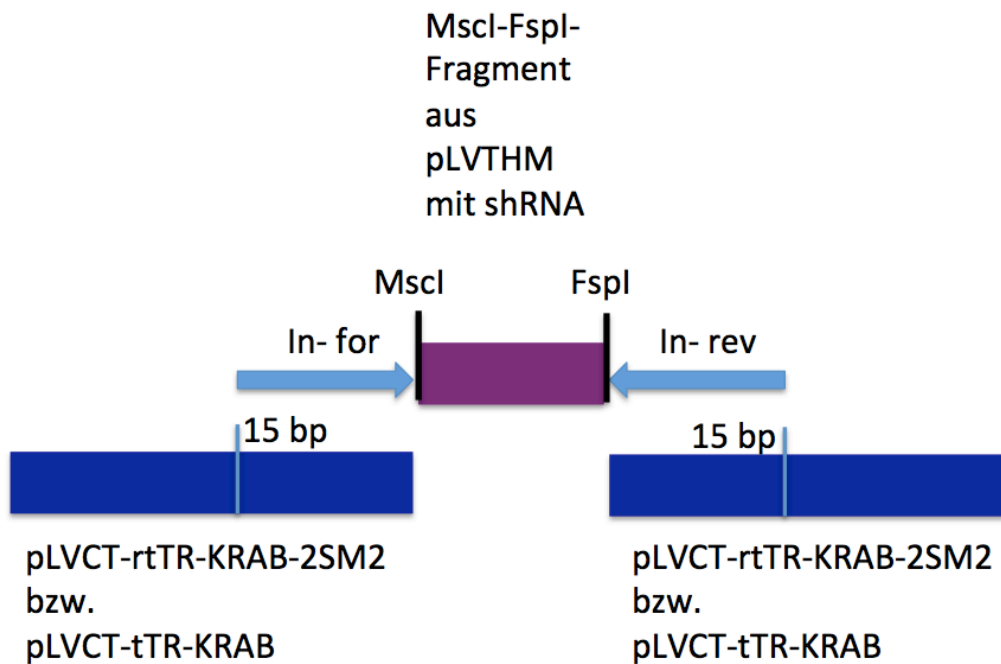


Abbildung 23 Design der Primer *In-for* und *In-rev*

4.3.2 PCR-Amplifikation des shRNA tragenden Fragments und präparatorische Aufreinigung

Die PCR-Amplifikation des Inserts mit den Überhängen erbrachte ein Fragment bei etwa 2500 bp und eine unspezifische Bande bei 750 bp (siehe 0). Dies machte laut Clontech-Protokoll eine Aufreinigung zum Abtrennen der unspezifischen 750 bp-Bande aus einem präparativen Agarosegel vor den weiteren Schritten nötig.

Ergebnisse

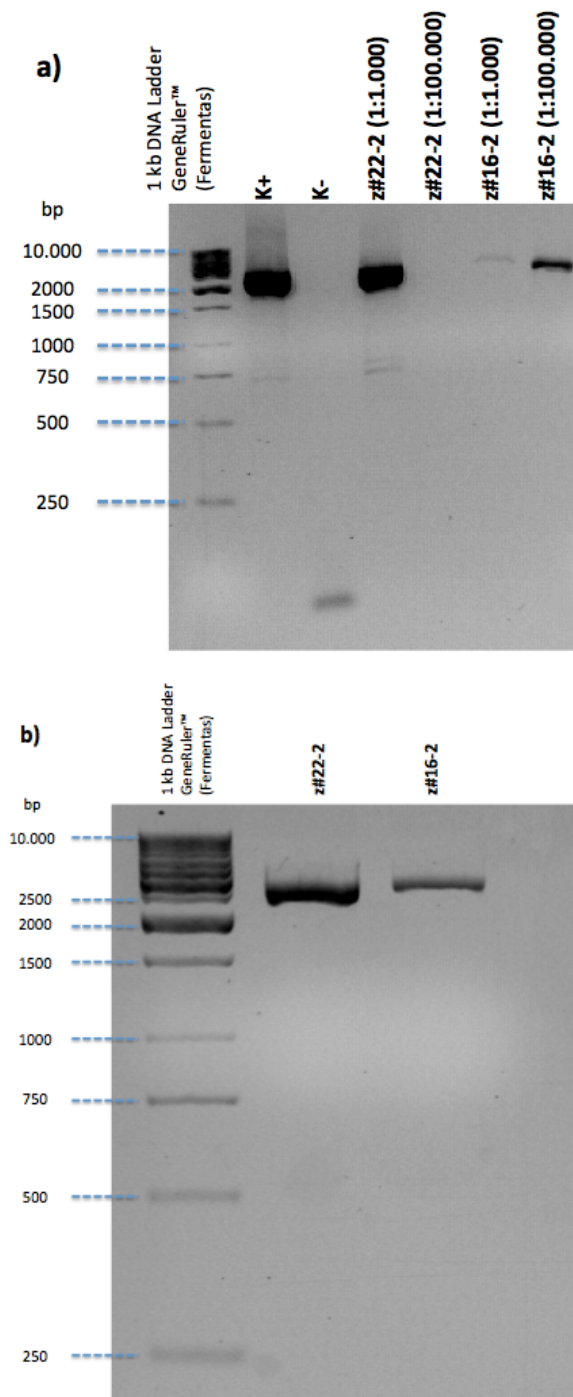


Abbildung 24 PCR-Amplifikation und Hinzufügen des 15 bp-Überhang an #22-2 bzw. #16-2, so dass z#22-2 bzw. z#16-2 entsteht. Fragmentgröße liegt bei 2.500 bp (a). Positivkontrolle ist das Insert #23-5, Negativkontrolle ist Wasser. Die unspezifische Bande bei 750 bp wird durch ein präparatives Agarosegel entfernt, so dass nur noch das 2.500 bp-Fragment verbleibt (b).

4.3.3 Screening der Klone mit Hilfe der Kolonie-PCR

Ergebnisse

Um den Erfolg der ligationslosen Klonierungsreaktion mit Hilfe der IN FUSION®-Enzyme und der darauf folgenden Transformation in *Stellar™ Competent E.coli* zu beurteilen (detailliertes Procedere siehe 3.1.14), wurde ein Screening der entstehenden Kolonien per Kolonie-PCR mit H1 und SP6 durchgeführt.

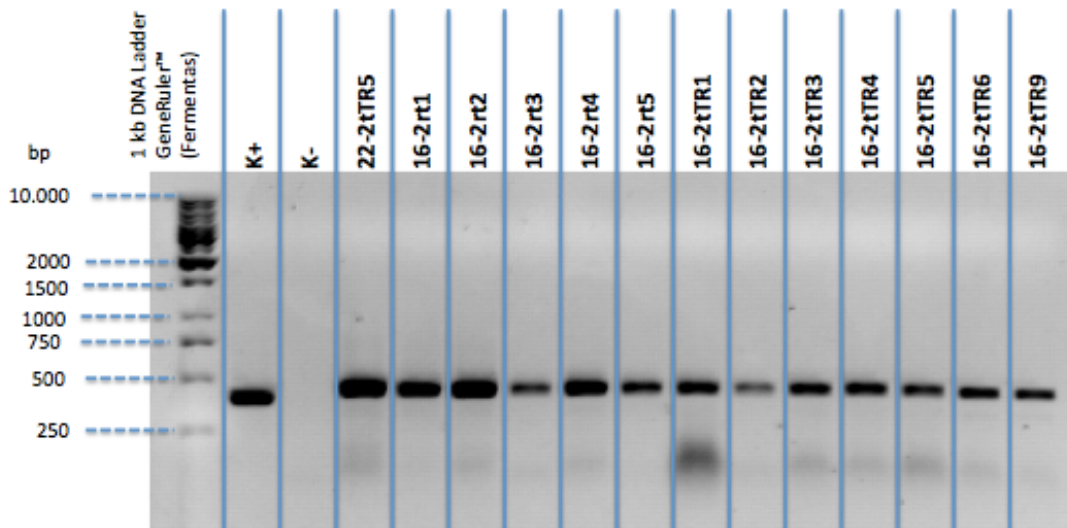


Abbildung 25 Kolonie-PCR von Klonen aus der Klonierungsreaktion nach Transformation. Es zeigte sich ein positives Ergebnis für alle getesteten Klone mit Fragmentgröße bei 460 bp (Entfernung von H1 zu SP6 auf dem MscI-FspI-Fragment aus pLVTHM mit shRNA-Insert) im Vergleich zur Positivkontrolle (pLVTHM unverdaut) mit Fragmentgröße bei 390 bp (Entfernung von H1 und SP6 auf pLVTHM ohne Insert) und Negativkontrolle (Wasser)

4.3.4 Verifizierung der Klone mittels Restriktionsverdau

Die Klone wurden in einem Restriktionsverdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen validiert. Der Verdau mit MscI und FspI zeigte die gewünschten Fragmente von etwa 2.200 bp und 10.000 bp Länge. Um welchen Vektor es sich dabei jedoch handelt, ob pLVTHM oder pLVCT-tTR-KRAB, ist aufgrund ähnlicher Fragmentgrößen und selbst durch die Sequenzierung aufgrund identischer Umgebungssequenz um das Insert nicht zu bestimmen.

Deshalb erfolgte ein Kontrollverdau mit MscI und NotI. Der Klon #23-5tTR15 korrelierte hierbei in seinen Fragmenten mit der Kontrolle K2 (Vektor pLVCT-

Ergebnisse

tTR-KRAB), was die Klonierung des Inserts von pLVTHM auf pLVCT-tTR-KRAB bestätigt (siehe Abbildung 26).

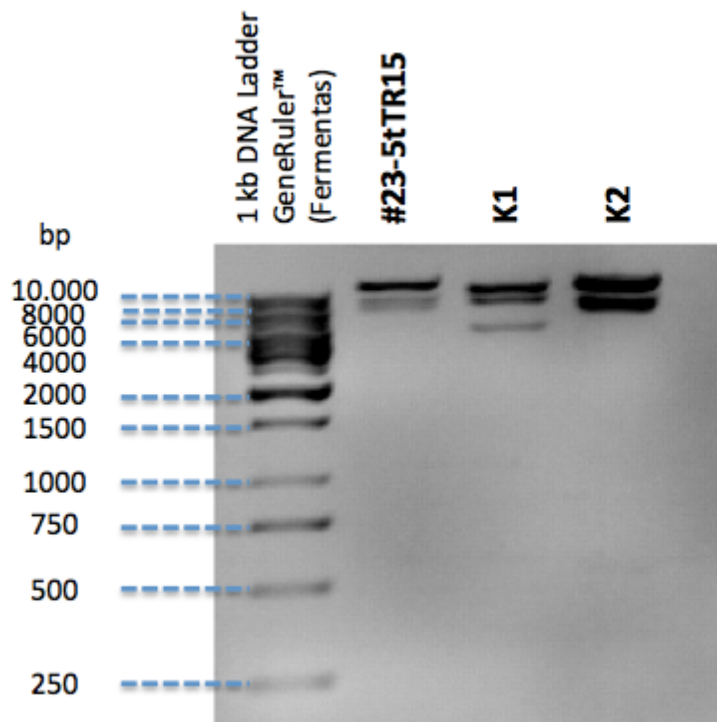


Abbildung 26 Kontrollverdau mit MscI und NotI. Die Kontrolle K1 ist der Vektor pLVTHM mit Fragmenten bei etwa 3800 und 8000 bp. Die Kontrolle K2 entspricht pLVCT-tTR-KRAB mit Fragmenten bei etwa 6000 und 7000 bp. Der Klon #23-5tTR15 entspricht in seinem Verdau K2..

4.3.5 Sequenzierung verschiedener Klone von #22,23,16,17 in pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 und pLVCT-tTR-KRAB

Um eine letztliche Verifizierung vor dem Einsatz im Rahmen von *in vitro*- Experimenten vorzunehmen, wurden die Klone sequenziert und die Sequenz verifiziert. Als Primer wurde *Lenti-Seq* verwendet, der vor der Insertionsstelle bindet. Auf pLVTHM startet er ab dem 4796. Basenpaar, die Insertionsregion liegt zwischen 4945-7380 bp. Somit werden auch Teile des Transfervektors pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 und pLVCT-tTR-KRAB sequenziert Dieser Bereich stimmt jedoch in seiner Sequenz zu 100% mit pLVTHM an der korrelierenden Stelle überein. Das Problem der identischen Insertionsregion zwischen pLVTHM und pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 bzw. pLVCT-tTR-KRAB konnte jedoch durch den

Ergebnisse

oben aufgeführten differenzierenden Verdau mit MscI und NotI gelöst werden (siehe Abbildung 26).

Die Auswertung durch das Programm Blast N ergab dabei erfolgreiche Insertionen, im Folgenden beispielhaft aufgeführt (siehe Abbildung 27), so dass von einer erfolgreichen Konstruktion der shRNA-tragenden Vektoren ausgegangen werden kann.

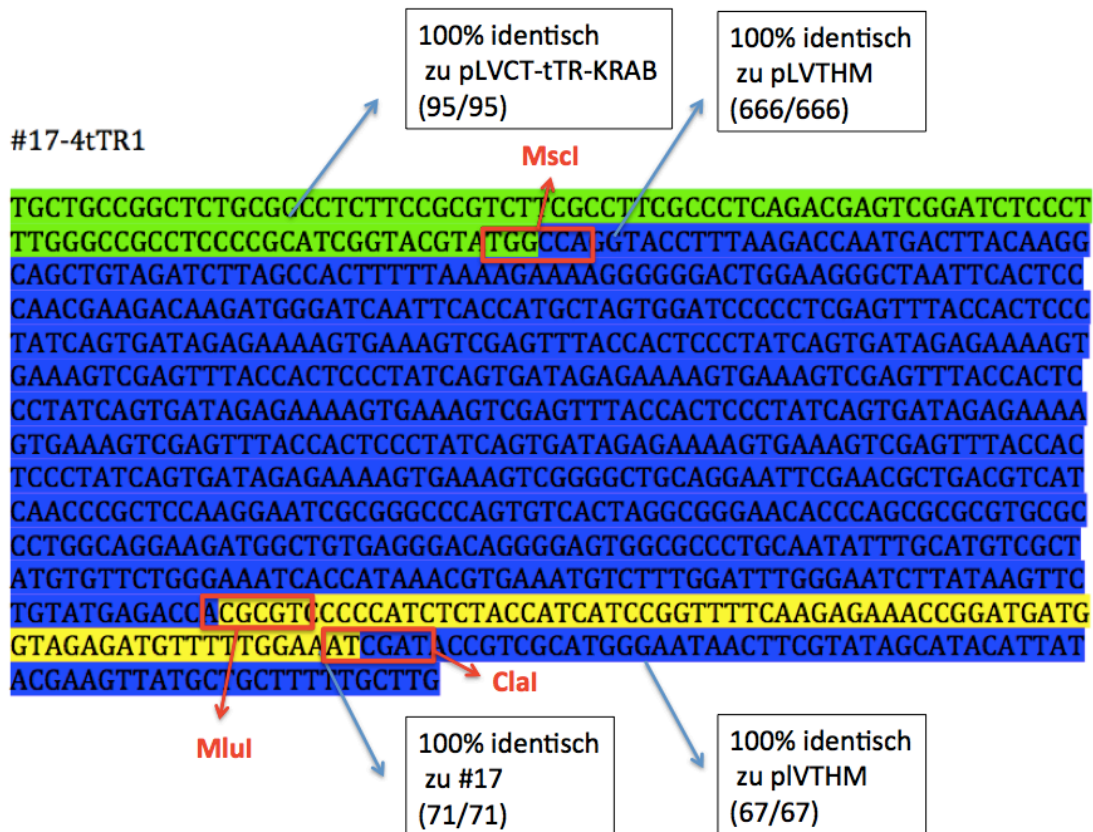


Abbildung 27 Ergebnisse der Sequenzierungen beispielhaft für #17-4tTR1. Vergleich mit pLVCT-tTR-KRAB (grün), pLVTHM (blau) und der ursprünglich ausgewählten Zielsequenzen (gelb) (ausgewertet mit Blast N¹). Markierung der Restriktionsenzym-Schnittstellen (rot).

Es waren somit 4 Vektoren mit der YBX1 shRNA für die weiteren Versuche vorhanden.

4.3.6 Maxipräparation der verifizierten shRNA exprimierenden und der für die Virusproduktion benötigten Plasmide

Von den Plasmiden mit inserierter shRNA-Sequenz wurde eine Maxipräparation (bis zu 7,4 mg pro Präparation) durchgeführt (vergleiche 3.1.9.2).

Ergebnisse

Für die Herstellung der Lentiviren wurde ebenfalls eine größere Menge der Plasmide, die für virale Proteine kodieren, pMD2.G und psPAX2 (vergleiche 2.2.3 und 8.4), benötigt. Dies geschah per Megapräparation (bis zu 1,4 mg pro Präparation).

4.4 Klonierung IV: Klonierung YB-1 spezifischer shRNAs in pTRIPZ

Aufgrund der Schwierigkeiten mit den Vektoren pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 bzw. pLVCT-tTR-KRAB wurde ein weiteres Vektorsystem getestet. Die Klonierung der shRNAs erfolgte analog zu den oben beschriebenen Abläufen. Deshalb sollen diese Klonierungsversuche nur kurz zusammengefasst werden.

pTRIPZ ist ein Vektor mit einer induzierbaren Expressionskassette, die in Gegenwart von Doxycyclin angeschaltet wird (Tet-On) (siehe Abbildung 28). Die Induktion kann durch die rote Fluoreszenz des koexprimierten RFP detektiert werden. Der Vektor besitzt eine microRNA-30 basierte Schleifenstruktur, welche aufgrund effektiverer Drosha- und Dicer-Prozessierung mit einer höheren Knockdown-Effizienz verbunden wird. Zudem besitzt der Vektor noch eine Ampicillin- und Puromycin-Resistenz, welche der Selektion dienen.

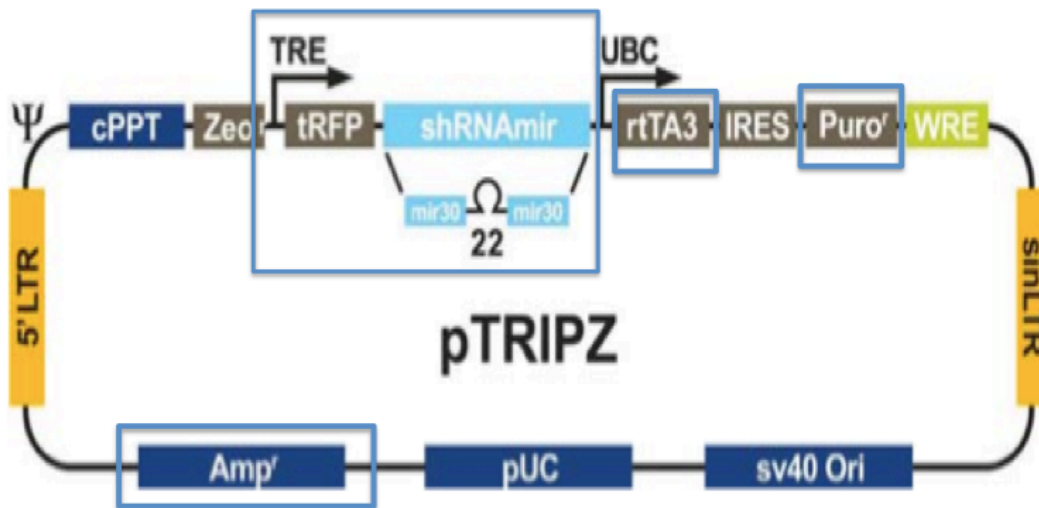


Abbildung 28 pTRIPZ-Vektor schematisiert dargestellt mit mir30-basierter Schleifenstruktur als shRNA-Insertionsregion, die unter der Kontrolle des Tetrazyklin-regulierbaren Elementes (TRE) mit RFP in der Gegenwart von Tetrazyklin exprimiert wird. (modifiziert nach¹²⁹).

Die *YBX1* spezifischen shRNAs wurden über die *XhoI* und *EcoRI*- Schnittstelle in den nicht-induzierbaren Vektor pGIPZ kloniert (siehe 8.4 (4)). Das *MluI*-*XhoI*-Fragment wurde anschließend in den induzierbaren Vektor pTRIPZ umkloniert. Mit einer Kolonie-PCR wurden positive Klone identifiziert, die durch eine Sequenzierung verifiziert wurden.

4.5 Herstellung einer MOPC315.BM.luc Zelllinie mit konditionell exprimierbarer shRNA

4.5.1 Bestimmung der Konzentration für eine Puromycin-Selektion

Puromycin ist ein Nukleosid-Antibiotikum, das in der Gentechnologie als eukaryotischer Selektionsmarker eingesetzt wird. Puromycin hat eine zytotoxische Wirkung auf nicht-transfizierte Zellen, die das Puromycin N-acetyl-transferase Gen nicht exprimieren.

Um Puromycin wirkungsvoll einsetzen zu können, war es vor Beginn der Transfektionsexperimente wichtig, die minimale Konzentration zu bestimmen, die nicht-transfizierten Zellen zu 100% abtötet.

Dies „Kill-Curve“ Bestimmung ergab eine Konzentration von 2 µg/ml für die MOPC315.BM.luc Zellen. Diese Konzentration wurde daher für die Selektionierung nach Transduktion mit dem pTRIPZ Lentivirus benutzt.

4.5.2 Transfektion von #23-5rt3, #23-5tTR15, #17-4rt4 und #17-4tTR1 in HEK 293K- Zellen

Analog der Transformation für prokaryotische Zellen entspricht die Transfektion dem Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Man unterscheidet dabei ein nur temporäres Einbringen dieser Fremd-DNA (transiente Transfektion) von einer stabilen Integration in das zelluläre Wirts-Genom (stabile Transfektion). Beide Formen wurden im Zuge der Experimente durchgeführt.

4.5.2.1 Transiente Transfektion

Das direkte Einbringen des shRNA-tragenden Vektors in die einer Transfektion leicht zugänglichen HEK-Zellen diente als Testlauf für eine stabile Transfektion. Die shRNA wird hierbei zwar exprimiert, aber nicht dauerhaft in das Genom der Wirtszelle integriert.¹³⁰ Indem eine Suppression der Genexpression nur vorübergehend initiiert wurde, konnte eine generelle Funktionabilität ausgetestet werden.

Die Transfektion wurde mit *TurboFect™ in vitro Transfection Reagent* der Firma *Fermentas* (St. Leon-Roth) durchgeführt. Die Analyse der transgenen Expression 24 Stunden nach Transfektion erbrachte für die Tet-On-Vektoren pLVCT-tTR-KRAB und pTRIPZ grün (GFP) bzw. rot (RFP) fluoreszierende Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Zugabe von Doxycyclin, welches für eine Expression von GFP bzw. RFP und damit einen Erfolg der transienten Transfektion sprachen.

4.5.2.2 Stabile Transfektion

4.5.2.2.1 Synthese lentiviraler Partikel

Für stabile Knockdown-Experimente ist eine dauerhafte Integration der shRNA in das Wirtsgenom unerlässlich. Eine effiziente Methode besteht dabei in der Produktion viraler Partikel, die die shRNA-codierende DNA beinhalten und die Zielzellen infizieren können. Andere essenzielle Bestandteile für die Viruspro-

Ergebnisse

duktion stellen die oben erwähnten Plasmide pMD2.G und psPAX2 dar (vergleiche 2.2.3).

Der exakte Ablauf der Versuche ist im Methodenteil im Kapitel 3.2.4.2.1 beschrieben. Die Virusproduktion erfolgte dabei durch Kotransfektion von pMD2.G, psPAX2 und jeweils der lentiviralen Plasmide mit den shRNA (#23-5rt3, #23-5tTR15, #17-4rt4, #17-4tTR1 und Positivkontrolle pGIPZ) in HEK 293-Zellen per Calcium-Phosphat-Präzipitation.

Um eine höhere Konzentration und damit eine erhöhte Infektiosität der viralen Partikel-Präparationen zu erreichen, wurden die Virionen anschließend mit Hilfe einer Ultrazentrifuge konzentriert.

4.5.2.2 Bestimmung des MOI (=Multiplicity of Infection) und der Induzierbarkeit

Um die Frage zu beantworten, wie viele Virionen notwendig sind, um eine Infektion der HEK-Zellen zu erreichen, wurden HEK 293-Zellen (1×10^5 Zellen/Well auf 24-Well) mit lentiviralen Partikeln absteigender Konzentration (300 μ l; 100 μ l; 30 μ l; 10 μ l; 3 μ l; 1 μ l) infiziert. Als Positivkontrolle wurde pGIPZ verwendet, der eine nicht funktionelle shRNA und GFP exprimiert.

Um eine Induzierbarkeit der shRNA durch Tetrazyklin (Tet-On) bzw. eben nicht (Tet-Off) und damit die Funktionalität der integrierten Tet-On bzw. Tet-Off-Sequenzen zu testen, wurde anschließend Doxyzyklin, ein Tetrazyklin-Derivat zu den infizierten Zellen gegeben.

Hierbei zeigte sich, dass durch die Ultrazentrifugation der lentiviralen Partikel die Infektiosität um den Faktor 30 erhöht wurde. Die Induzierbarkeit der Tet-On Vektoren durch Doxycyclin konnte dabei auch nachgewiesen werden.

4.5.3 Transduktion der shRNA-tragenden Viruspartikel in die Zielzelle MOPC315.BM

Erklärtes Ziel der folgenden Transduktionsversuche war die Generierung eines Klons von MOPC315.BM-Zellen mit integrierter shRNA gegen *YBX1* (Oligonukleotide #23-5rt3, #23-5tTR15, #17-4rt4 bzw. #17-4tTR1). Eine Trägerschaft der shRNA von allen Zellen einer Population müsste sich als universelle grüne

Ergebnisse

bzw. rote Fluoreszenz der gesamten Zellpopulation äußern und würde den optimalen Ausgangspunkt für weitere Experimente *in vitro* und *in vivo* darstellen. Erster Schritt war die Infektion der MOPC315.BM-Zellen mit den produzierten Viruspartikel per Spin-Infektions-Methode (vergleiche 3.2.4.2.3). Einer Induktion mit Doxycyclin der Tet-On Vektoren bzw. der Tet-Off Vektoren durch die Abwesenheit von Doxycyclin tags darauf schloss sich die Auswertung mit Hilfe von FACS, Fluoreszenzmikroskop und Zytospin in den darauf folgenden Tagen an (vergleiche 3.2.3.2 und 3.2.6). Um eine exakte Differenzierung zwischen induziertem und nicht-induziertem Zustand zu erreichen und jede Anwesenheit von Tetrazyklin-Spuren auszuschließen, wurde mit Tetrazyklin-inaktiviertem fetalen Rinderserum gearbeitet. Beispielhaft sei im Folgenden der zeitliche Ablauf eines solchen Versuchszyklusses skizziert (siehe Tabelle 20)

Tabelle 20. Schematischer Ablauf eines Versuchszyklusses am Beispiel des Tet-On Vektors #23-5tTR15.

Zeit	Auswertungsschritte
Tag 1	Transduktion des Tet-On Vektors #23-5tTR15 in die Zielzelle MOPC315.BM
Tag 2	Induktion mit Doxycyclin eines Teiles der Zellen im Vergleich zu weiterhin nicht-induziert belassenen Zellen
Tag 3	Auswertung per Fluoreszenzmikroskopie, FACS, Zytospin, Western Blot induzierte vs. nicht-induzierte Zellen Anlage von Einzelzellklonen
Tag 4-20	Tägliche Auswertung per Fluoreszenzmikroskopie, FACS, Zytospin, Western Blot induzierte vs. nicht-induzierte Zellen
Tag 13	Einzelzellklone: Induktion mit Doxycyclin eines Teiles der Zellen im Vergleich zu weiterhin nicht-induziert belassenen Zellen
Tag 15-20	Einzelzellklone: Tägliche Auswertung per Fluoreszenzmikroskopie, FACS, Zytospin, Western Blot induzierte vs. nicht-induzierte Zellen

4.5.3.1 Auswertung per Durchflusszytometrie (FACS)

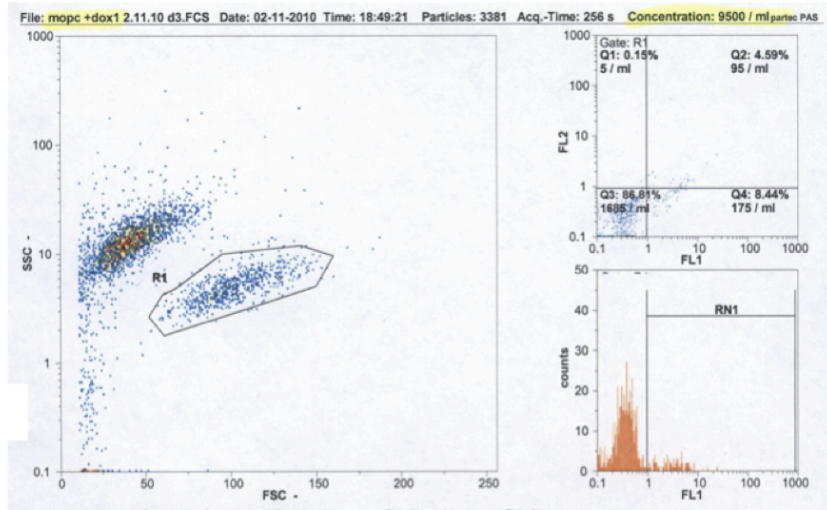
Im Zuge einer Infektion der MOPC315.BM-Zellen mit der shRNA differierte sich eine Subpopulation sichtbar von der Ausgangspopulation in ihren Eigenschaften, so dass sie in der Durchflusszytometrie sichtbar wurde. In der frühen Detektion zeigte diese Methode die höchste Sensitivität.

Ergebnisse

Beispielhaft ist eine solche Messung im Folgenden abgebildet (siehe Abbildung 29).

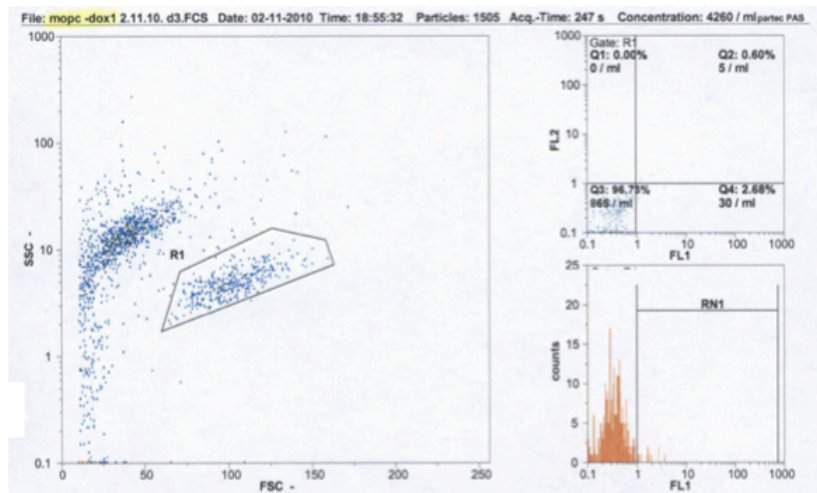
Ergebnisse

a)



Region	Gate	Count	Count/ml	%Gated	Mean-x	CV-x%	Mean-y	CV-y%
R1	<None>	675	1960	19.96	101.83	18.61	5.14	31.80
RN1	R1	88	270	13.04	4.21	94.38	-	-
Q1	R1	1	5	0.15	0.77	0.00	1.27	0.00
Q2	R1	31	95	4.59	6.67	98.47	1.59	48.57
Q3	R1	586	1685	86.81	0.35	47.30	0.25	59.94
Q4	R1	57	175	8.44	2.87	43.24	0.63	33.06

b)



Region	Gate	Count	Count/ml	%Gated	Mean-x	CV-x%	Mean-y	CV-y%
R1	<None>	336	900	22.33	101.81	17.07	5.08	32.07
RN1	R1	10	35	2.98	2.02	40.25	-	-
Q1	R1	0	0	0.00	-	-	-	-
Q2	R1	2	5	0.60	1.58	73.98	1.33	11.42
Q3	R1	325	865	96.73	0.35	52.44	0.22	67.45
Q4	R1	9	30	2.68	2.01	43.99	0.73	23.81

Abbildung 29 Beispielhafte Darstellung zweier durchflusszytometrischer Messungen aus dem Versuchszyklus V1 72 Stunden nach Doxycyclin-Induktion des Tet-On Vektors #23-5tTR15. Die lebenden Zellen befinden sich im Gate R1 im FSC/SSC Histogramm. Man sieht also, dass nur etwa 20% der Zellen unabhängig von Induktion oder Nicht-Induktion zu diesem Zeitpunkt noch vital sind. Die differierende Subpopulation wurde mit Q4 und RN1 aus dem Anteil lebender Zellen (R1) im Vergleich zu einer Negativkontrolle nicht-transduzierter Zellen vermessen. Transduzierte Zellen mit (a) und ohne (b) Doxycyclin-Induktion wurden miteinander verglichen. Ausgehend von RN1 differiert sich im Doxycyclin-induzierten Versuchsteil (Abbildung 29a) eine Subpopulation (13%) im Vergleich zum nicht-induzierten Versuchsteil (Abbildung 29b) mit 3% RN1-Anteil.

4.5.4 Vergebliche Versuche der Einzellklon-Synthese mit dem Vektorsystem pLVCT-tTR-KRAB und pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2

Um die Isolierung einer erfolgreich transduzierten Zelle als Ausgangspunkt einer monoklonalen Population mit identischen genetischen und phänotypischen Eigenschaften vorzunehmen, wurde eine Erzeugung von Einzelzellklonen durch Aussäen in einer hohen Verdünnung vorgenommen (vergleiche 3.2.5). Ausgangspopulation waren hierbei in Bezug auf den pLVCT-tTR-KRAB- Vektor (Tet-On) transduzierte nicht mit Doxycyclin induzierte Zellen, deren Doxycyclin-induziertes Gegenstück in Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie eine hohe Transduktionseffizienz gezeigt hatte. Dies geschah ca. 96 Stunden nach Beginn des Induktionszyklus. Auch diese Zellen wurden auf eine generelle Funktionabilität und eine Suppression der Genexpression von *YBX1* mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskop, FACS, Zytospin und Western Blot ab Tag 12 nach Dilution evaluiert, d.h. in Bezug auf das Tet-On System wurden die Zellen am Tag 10 mit Doxycyclin induziert und dann täglich im FACS vermessen, unter dem Fluoreszenzmikroskop bezüglich des Anteils fluoreszierender Zellen bewertet und per Zytospin und Western Blot bezüglich ihrer Eigenschaften untersucht.

Dabei ließ sich unter Verwendung des Vektorsystems pLVCT-tTR-KRAB und pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 leider kein Einzelzellklon mit den gewünschten Eigenschaften selektionieren.

Die Fluoreszenzmikroskopie und die Durchflusszytometrie waren stets durch ein heterogenes Bild mit transduzierten und nicht-transduzierten Zellen geprägt.

Es ließ sich keine homogen fluoreszierende Einzelzellklonlinie trotz sechs verschiedener Versuchszyklen und mehrerer Vereinzellungen darstellen.

4.5.5 Einzelzellklon im Vektorsystem pTRIPZ

pTRIPZ erwies sich als das effektivere Vektorsystem. Nach Transduktion der MOPC315.BM.luc wurden diese bei unterschiedlichen Puromycinkonzentrationen (3,5; 4,0; und 4,5 µg/ml) selektioniert. Hierzu wurden die Zellen im entsprechenden Medium in hoher Verdünnung in je fünf 96 Well Platten ausgesät. Die Wells, in denen ein Klon wuchs, wurden geteilt und ein Teil mit Doxycyclin versetzt. Am Fluoreszenzmikroskop wurde hierzu 24 Stunden später die Klone identifiziert, die eine uniforme starke Rotfärbung aufwiesen. Diese Klone wurden dann expandiert und im Western Blot nach Induktion der shRNA gegen *YBX1* auf ihre Fähigkeit getestet, *YBX1* Protein herunter zu regulieren. Von den positiven 42 Klonen zeigte der Klon 4007 die beste Regulation.

4.5.5.1 Auswertung per Durchflusszytometrie (FACS)

In der Durchflusszytometrie zeigte sich nur bei den Doxycyclin-induzierten Zellen im Gegensatz zu nicht-induzierten Zellen und Kontrollpopulation eine Fraktion, die sich in ihrer Fluoreszenzintensität von der Negativkontrolle unterschied (siehe Abbildung 30). Es ist deutlich zu sehen, dass sich nach Zugabe von Doxycyclin der MOPC314.BM.luc Klon 4007 eine uniforme Zunahme der RFP-Fluoreszenz zeigt. Dies zeigt, dass alle Zellen dieses Klones auf die Doxycyclin Gabe mit der Expression des RFP-Proteins und damit der shRNA gegen *YBX1* reagieren.

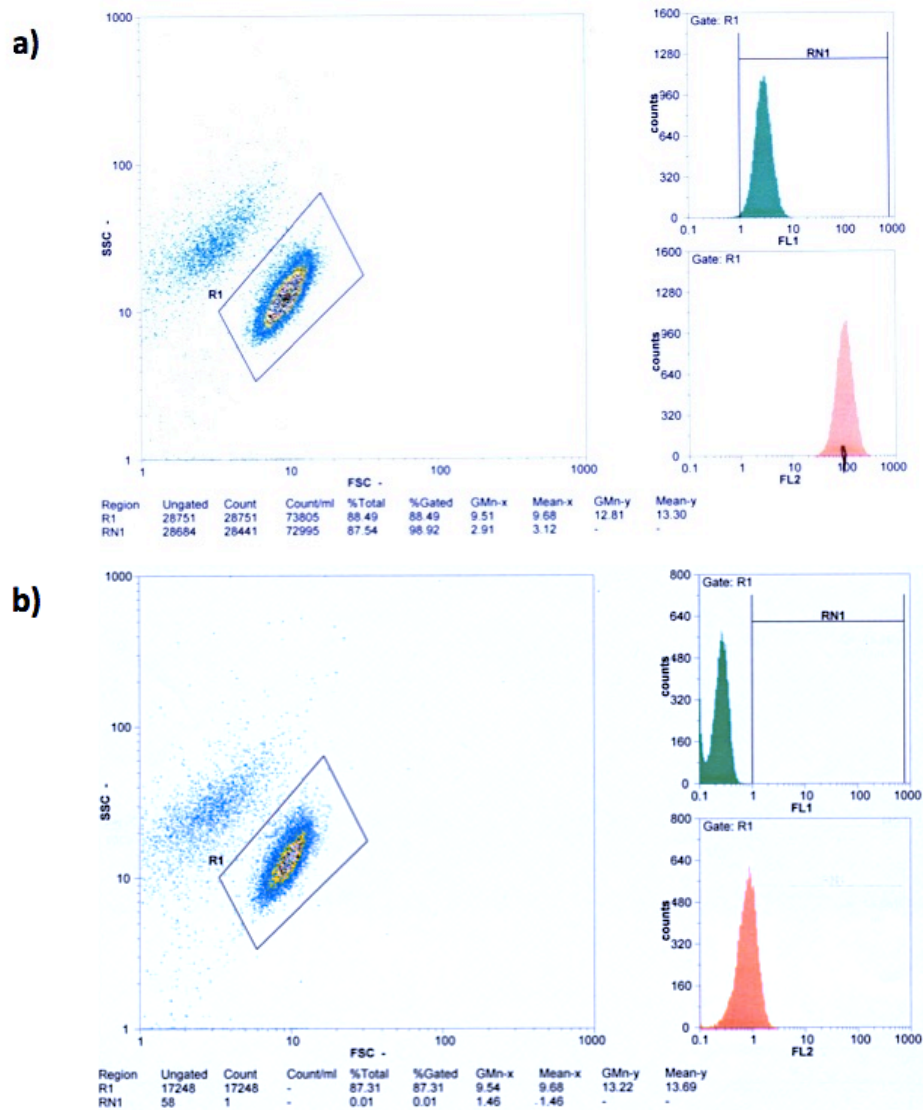


Abbildung 30 Vergleich zweier durchflusszytometrischer Messungen von MOPC315.BM.luc Klon 4007 nach 5 Tagen mit (a) und ohne (b) Doxycyclin-Induktion. Die lebenden Zellen befinden sich im Gate R1 im FSC/SSC Histogramm. Im Fluoreszenzkanal 2 ist die RFP Expression dargestellt. Die shRNA wird im pTRIPZ mit der RFP mRNA exprimiert. Die Doxycyclin-Induktion führt zu einem kompletten Shift der Population von RFP-negativ (Peak bei ca. 0,9) zu RFP-positiv (Peak bei ca. 100). Die Verschiebung des Peaks im Fluoreszenzkanal 1 ist auf das RFP Protein zurückzuführen, das aufgrund seines Emmisionsspektrum leicht im Kanal 1 detektiert wird.

4.5.5.2 Auswertung per Fluoreszenzmikroskop

Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte sich, dass der Einzelzellklon MOPC315-4007, der pTRIPZ mit einer *YBX1* shRNA enthält, *YBX1* im Zyto-

Ergebnisse

plasma exprimiert und nach 5 Tagen Induktion der shRNA mit Doxycyclin keine *YBX1* Expression mehr nachgewiesen werden kann (siehe Abbildung 31).

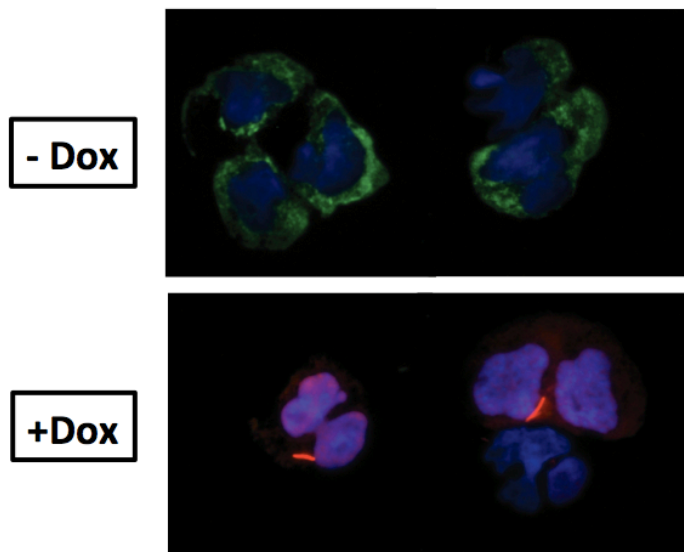


Abbildung 31 *YBX1* Knockdown in MOPC315.BM.luc (*YBX1* grün durch *YBX1* Antikörper und das Fluorochrom FITC, Nucleus blau durch DAPI-Färbung). Nach Induktion der shRNA mit Doxycyclin (+Dox) ist im Vergleich zur Kontrolle (-Dox) nach 5 Tagen kein *YBX1* mehr detektierbar. Die zusätzlich auftretende Rotfärbung ist auf das koexprimierte RFP zurückzuführen.

4.5.5.3 Auswertung per Western Blot

Während das Zielgen auf mRNA-Ebene häufig bereits supprimiert ist, wird der Erfolg auf der Proteinebene meist erst nach einer Latenzzeit sichtbar. Dies ist auf die verschiedenen Halbwertszeiten der Proteine zurück zu führen, so dass für den Klon 4007 im Western Blot die *YBX1* Proteinexpression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der shRNA mit Doxycyclin durchgeführt wurde. Es zeigte sich, dass die *YBX1* Proteinexpression im Vergleich zu der β -Actin Ladekontrolle bereits am Tag 1 vermindert ist. Die Expression nimmt weiter bis zum Tag 4 ab und bleibt ab diesem Zeitpunkt auf einem konstanten schwachen Expressionsniveau (siehe Abbildung 32).

Ergebnisse

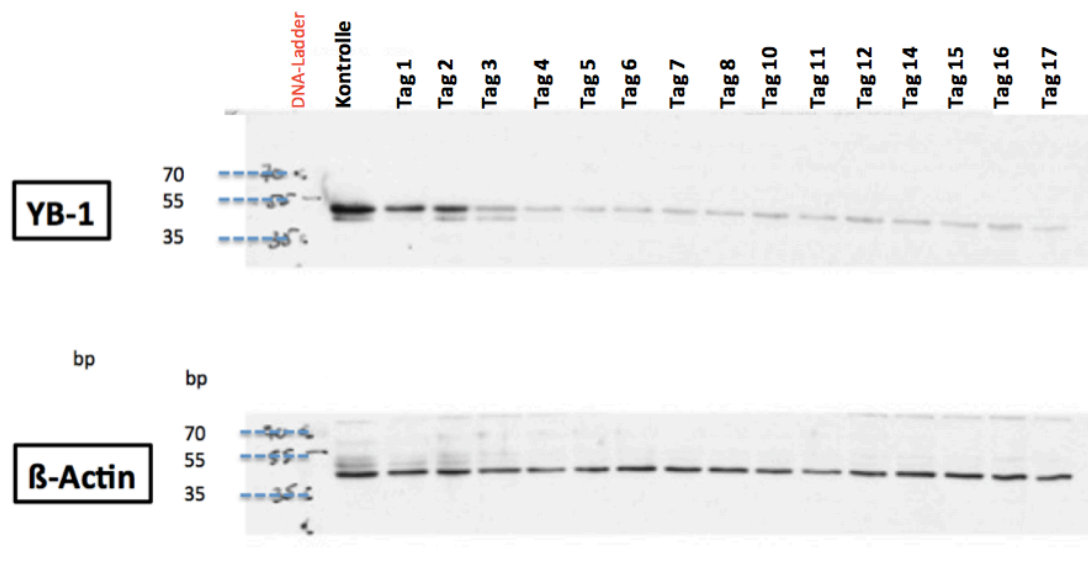


Abbildung 32 Western Blot des *YBX1* Knockdowns in MOPC315.BM-Zellen Tag 1 bis Tag 17. Es zeigt sich eine ab Tag 4 nach Induktion gleichbleibende Suppression der *YBX1* Proteinexpression im Vergleich zu der Ladekontrolle β -Actin.

Eine erneute Selektion des Klons 4007 mit höheren Puromycinkonzentrationen führte nicht zu einer stärkeren Reduktion des *YBX1* Protein. Damit war die Generierung eines MOPC315.BM.luc Zellklons, der eine konditionelle shRNA gegen *YBX1* trägt und eine deutliche Reduktion der *YBX1* Proteinexpression ermöglicht, erfolgreich gelungen.

5 Diskussion

Das Ziel dieses Projektes war die Etablierung eines regulierbaren und dauerhaften RNAi-Mechanismus gegen das putative Onkogen *YBX1* in der murinen Plasmozytomzelllinie MOPC315.BM durch ein virales Vektorsystem mit integrierter shRNA.

Um dies zu erreichen, waren verschiedene Schritte und Komponenten nötig, deren Bedeutung im Folgenden erläutert werden soll.

5.1 shRNA vs. siRNA

Um die folgenden Versuche, die auf dem Prinzip der in der Einleitung beschriebenen RNA-Interferenz basieren (vergleiche 1.3), durchzuführen, bedurfte es eines möglichst optimalen biotechnologischen Tools zur Suppression eines spezifischen Gens. Dieses Tool sind kurze RNA-Doppelstränge von 21-23 Basenpaaren, die sogenannte short interfering RNAs (siRNAs).

Es gibt zwei Möglichkeiten, diese siRNAs in der Zielzelle zu etablieren: Transient mittels Einschleusung synthetischer siRNAs direkt in die Zielzelle oder dauerhaft mittels Einschleusung von Expressionsvektoren in den Zellkern mit shRNA-codierender Sequenz als „regenerative(r) Pool für siRNAs“.¹²³

Da sich die Wahl des passenden RNAi-Trägers grundsätzlich vor Beginn der Experimente stellte, sei ihrer Diskussion ein kurzer Absatz gewidmet.

5.1.1 Wahl des passenden RNAi-Trägers

Der Entschluss, welche Methode für ein Versuchsdesign besser passt, ist abhängig von Zelltyp, Zeitrahmen und der Entscheidung für ein transiente oder stabile Integration in die Zelle.⁹³

Für einen limitierten Versuch, der die potentiellen Effekte eines Knockdowns für ein Gen evaluiert, mag die siRNA-Technologie die bessere Wahl sein. Es gibt eine Fülle von Möglichkeiten, die Knockdown-Effizienz jeder siRNA-Sequenz rasch zu validieren oder gar eine siRNA mit hoher Effizienz, minimalen unspezifischen Effekten und niedriger zellulärer Toxizität rasch kommerziell anfertigen zu lassen.^{93,123} Um eine Wirkung in der Zelle zu erzielen, ist jedoch eine hohe

zytoplasmatische Konzentration nötig, die auch mit mehr unerwünschten Nebeneffekten verbunden ist.⁹³ Die siRNA-Konzentration variiert zudem je nach proliferativem Status der Zelle und wird bei jeder Zellteilung verdünnt, so dass nach einigen Zyklen wenig von dem Knockdown-Effekt verbleibt.^{86,93}

In der folgenden Arbeit bestand jedoch die Absicht, einen dauerhaften RNAi-Mechanismus in einer Zelle zu etablieren. Ein Expressionsvektor mit shRNA-Integration wurde deshalb favorisiert.

shRNAs überwinden das Problem der Transienz, haben daneben aber auch noch andere Vorteile. Sie sind kosteneffektiver, da das wiederholte Einbringen einer synthetischen siRNA in die Zelle entfällt und bieten die Möglichkeit der Antibiotikaselektion positiv transfizierter Zellen und Induzierbarkeit (vergleiche 5.2).¹²³ Letztere Eigenschaften waren eine obligate Voraussetzung der hier dargestellten Experimente. Viele Zelltypen können zudem nur unzureichend mit einer siRNA transfiziert werden. Für diese bieten Adeno-, oder Lentivirus-basierte Vektoren der shRNA-Zellintegration eine mögliche Option.¹²³

Großer Nachteil der Verwendung von shRNAs ist jedoch der mit ihnen verbundene größere Zeitaufwand bedingt durch die Generierung des Vektorkonstrukts und die Selektion shRNA-positiver Zellklone durch Antibiotikaresistenz oder Fluoreszenzmarker.^{93,123}

5.2 Induzierbares vs. nicht-induzierbares Expressionssystem

Vielfach geht der Knockdown eines spezifischen Gens nicht folgenlos an einer Zelle vorbei und führt z.B., falls das supprimierte Gen für Zellüberleben, Zellzyklusregulation oder Zellentwicklung zuständig ist, zum Tod der Zelle, ohne dass eine Erforschung anderer Auswirkungen der Gensuppression erfolgen konnte. Die kontinuierliche Suppression eines Genes über längere Zeit kann außerdem zu einem graduellen Verlust der supprimierenden Wirkung und/oder zu einer negativen Zellselektion führen und somit Versuchsergebnisse beeinflussen.¹³¹⁻¹³³

Eine Möglichkeit, diese Problematik zu umgehen, besteht in der Verwendung von induzierbaren, konditionellen Promotorkonstrukte. Ähnlich der Funktion eines Lichtschalters ermöglichen sie die Expression der shRNA an- bzw. abzu-

Diskussion

schalten. Die Konformationsänderung wird dabei durch die Zugabe entsprechender Induktoren induziert.¹³⁴ Das Monitoring erfolgt über fluoreszierende Proteine, wie GFP oder RFP, die mit der shRNA koexprimiert werden.

Dabei führt die Reversibilität zur Reexpression des supprimierten Proteins und des ursprünglichen zellulären Phänotyps.¹³³

Dies beinhaltet einige Vorteile:

Von dem definierten Zeitpunkt der Induktion aus können die zeit- und dosisabhängigen Auswirkungen in der Zelle beobachtet werden¹³⁵ und dies repetitiv, so dass statistische Schwankungen relativiert und die Wirkung unerwünschter Nebeneffekte auf die Beobachtungen minimiert werden kann. Zusätzlich geschehen diese Beobachtung zweier verschiedener Zustände eines Gens, im exprimierten und supprimierten Zustand, an derselben Zelle, so dass die Varianz phänotypischer Eigenheiten verschiedener Zellen als Faktor verschwindet und die Zellen eine Kontrollpopulation zu sich selbst bilden.^{135,136}

Im Vergleich zum nicht-induzierbaren System ergeben sich jedoch auch gewisse Hindernisse:

So ist die Etablierung eines induzierbaren Systems in einen höheren Organismus eine komplexere Aufgabe angefangen von der Klonierung über die Transfektion der Zielzelle und die Selektionierung eines Klons mit dem entsprechenden Phänotyp.^{132,135} Auch im Verlauf meiner Versuche ergaben sich Probleme die shRNA vom nicht-induzierbaren in das induzierbare System zu transferieren und einen induzierbaren Einzelzellklon zu identifizieren.

5.2.1 Vergleich verschiedener induzierbarer Expressionssysteme

Induzierbare Vektorsysteme sollten zwei wichtige Anforderungen erfüllen: Starke Induzierbarkeit und hohe Spezifität.¹³²

Ersteres bedeutet, dass im inaktiven Zustand die basale Aktivität möglichst gering sein sollte, während bei einer Aktivierung schnell hohe Expressionslevel erreicht werden sollten.¹³² Letzteres setzt eine hohe Affinität zwischen Promotor und dem an ihn bindenden Induktor voraus. Weder darf der Promotor von anderen Agenzien induziert werden, noch darf der Induktor an anderen Promotoren auf der DNA wirken.¹³²

Diskussion

Die am häufigsten eingesetzten induzierbaren Expressionssysteme sind das Tetracyclin-induzierbare System (Tet-on bzw. Tet-off) und das Ecdyson-induzierbare System.^{132,137}

Das Antibiotikum Tetrazyklin bzw. sein Derivat Doxycyclin wurden in den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchen als Induktor eingesetzt. Es bewirkt eine rasche Induktion und höhere Expressionslevel als andere Expressionssysteme¹³⁷, welche nach Entfernung des Induktors schnell reversibel sind. Zusätzlich arbeitet es mit einer nichttoxischen, gut definierten pharmakologischen Substanz.⁷⁸

Eine Reduzierung der initial beschriebenen Hintergrund-Aktivität konnte durch Verwendung von Vektoren mit einem Tet-Repressor-Protein und dem KRAB Protein erreicht werden. Dieses Protein basiert auf KRAB (Krüppel-associated box), eine Zinkfinger-Struktur, die als starker transkriptionaler Repressor im nicht-induzierten Zustand agiert.^{132,138} Trotzdem wurde auch in meinen Versuchen eine basale Aktivität in 2-6% der transduzierten und selektionierten Zellen im nicht induzierten Zustand detektiert.

Dabei erreicht im direkten Vergleich von Tet-On und Tet-Off-System in der Studie von Meyer-Ficca und Kollegen das Tet-On System das höhere Expressionslevel, während das Tet-Off System die niedrigere basale Aktivität aufweist.¹³⁷

Weitere Nachteile sind der kontinuierlich notwendige Einsatz von Tetracyclin und unter *in vivo*-Bedingungen die Einlagerung dieses Antibiotikums in den Knochen mit nur langsamer Abgabe daraus. Dies verhindert eine schnelle und präzise Induktion bzw. Aufhebung der Induktion. Wenn die Rolle eines Genes während der embryonalen Entwicklung beobachtet werden soll und es auf einen sehr genauen Induktionszeitpunkt mit eng regulierter Expression ohne Hintergrund-Aktivität ankommt, steht Ecdyson, welches jedoch eine sehr viel geringeres Expressionslevel aufweist, als Alternative zur Verfügung.^{132,139} Im Laufe dieser Versuche war dies kein Problem und es konnte ein An- bzw. Abschalten von *YBX1* innerhalb von 72 Stunden erreicht werden. Der weitere Einsatz im Tiermodell wird zeigen, ob sich aus den oben genannten Punkten negative Konsequenzen ergeben.

Für einen Einsatz des Tetrazyklin-induzierbaren Systems sind zwei unterschiedliche Komponenten notwendig, die beide in den Vektor integriert und stabil transfiziert werden müssen, was mit erheblichem Aufwand verbunden ist: das Tetrazyklin-responsive Element (TRE) und das unter seiner Kontrolle stehende Zielgen.¹³² Diese doppelte Klonierung wurde durch die Verwendung eines Vektors mit schon vorhandenem TRE-System umgangen.

Mögliche Nebeneffekte von Tetrazyklin-Derivaten in der Zelle sind beschrieben. Diese treten jedoch erst bei viel höheren Konzentrationen (10-80 µg/ml) auf, als sie in den folgenden Versuchen (1 µg/ml) angewendet wurden.¹³² Zudem stehen Zellklone zum Vergleich zur Verfügung, die statt der shRNA gegen *YBX1* eine nicht funktionelle Kontroll-shRNA exprimieren.

Zusammenfassend ist eine Induzierbarkeit des shRNA-exprimierenden Vektors aufgrund der essentiellen Rolle von *YBX1* in der Zelle und seines potentiell letalen Knockdowns geboten und das Tetracyclin-induzierbare Expressionssystem unter dem Gesichtspunkt seiner geringen Kosten und Toxizität und seiner vielfältigen Einsatzmöglichkeiten und hohen Spezifität das ideale System für den hier zu induzierenden Knockdown von *YBX1*.

5.3 Gründe für einen Einsatz mehrerer shRNA-Konstrukte

Die Rahmenbedingungen, die an ein RNAi-Experiment gestellt werden, sind, eine möglichst hohe Transfektionseffizienz durch die geschickte Auswahl eines experimentellen Systems zu erreichen und effiziente shRNA-Sequenzen in Vorexperimenten auszuwählen. Dazu ist es nötig, die Knockdown-Kapazität mehrere shRNAs vor Beginn zu testen.¹²³

Eine parallele Austestung mehrerer Oligonukleotide, jede gegen ihre eigene Sequenz auf dem Zielgen gerichtet, wurde entsprechend allgemeiner Empfehlungen durchgeführt. Denn die Konstruktion einer Zielsequenz nach den obigen Kriterien kann ihre Funktionalität nicht garantieren und es lässt sich auch keine Aussage über ihre Effizienz treffen, bevor sie nicht experimentell bewiesen wurde.¹⁴⁰

Durch die Austestung verschiedener Oligonukleotide steigt die Wahrscheinlichkeit, mindestens eine Sequenz zu finden, die zu einer signifikanten Gensupp-

ression führt.⁹³ Lassen sich darüber hinaus mehrere funktionierende Oligonukleotide finden, so kann ihre Effektivität anhand ihrer supprimierenden Wirkung miteinander verglichen werden und mit der effizientesten im Rahmen der folgenden Experimente weitergearbeitet werden.⁹³

5.4 Auswahl der Sequenzen zum Knockdown

5.4.1 Kriterien

Das Design von siRNAs bzw. shRNAs ist immer noch mehr ein empirischer als ein rationaler Prozess, da die der RNA-Interferenz zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch nicht vollständig entschlüsselt sind.¹⁴¹ Es existieren jedoch bestimmte Algorithmen, die die Auswahl erleichtern. Deshalb sind die folgenden aufgeführten Kriterien nur Empfehlungen, keine Bedingungen, da auch außerhalb der Kriterien eine effiziente Zielsequenz möglich ist.

Grundsätzlich ist jede beliebige Sequenz aus der mRNA qualifiziert, als Angriffspunkt einer shRNA bzw. siRNA herangezogen zu werden.¹²³ Es gibt jedoch Unterschiede in der Empfänglichkeit der Ziel-mRNA für einen Knockdown unter anderem je nach Zugänglichkeit der Bindungsregion.^{142,143} So sollte man vom 5´ und 3´-Ende mindestens 50 bp Abstand halten, da hier häufig regulatorische Proteine binden, die die Erreichbarkeit der Zielsequenz für den RISC-Komplex einschränken könnten.¹⁴¹ Vier oder mehr Wiederholungen des gleichen Nukleotides sollten vermieden werden, insbesondere das Terminations-signal für die RNA-Polymerase III poly-T.¹³⁰ Ebenso sollten Palindrome innerhalb der Sequenz umgangen werden. Sie können interne Schleifen bilden.¹⁴⁴ Weitere Anforderungen, die als Voraussetzung für erfolgreiche Knockdown-Experimente gelten, sind ein GC-Gehalt von 30- 50% innerhalb einer 19-27 Nukleotide langen Sequenz.^{123,144} Ein höherer GC-Gehalt wird wegen der Gefahr der Bildung einer schwer zugänglichen Sekundärstruktur vermieden.¹⁴⁵ Über die optimale Länge herrschen Kontroversen.^{146,147} Sequenzen, die länger als 30 bp sind, fallen jedoch einer Interferon-ähnlichen Abwehrreaktion der Zelle zum Opfer. Erstes Nukleotid der Zielsequenz sollte ent-

Diskussion

weder ein A oder G sein, da der RNA-Polymerase III Promotor vor allem mit Purinen als erstem Nukleotid gut funktioniert.¹⁴¹

Zu beachten ist auch die thermodynamische Stabilität von Strang und Gegenstrang. Hierbei sollte das 3'-Ende des *sense* Stranges bzw. das 5'-Ende des *antisense* Stranges mit einer niedrigen thermodynamischen Stabilität ausgestattet werden, welches durch mindestens ein Adenosin oder Thymin garantiert wird. Dadurch wird das Entwinden des Doppelstranges erleichtert und ein effizienter Eintritt des *antisense* Stranges in den RISC gewährleistet.^{144,150} Es gibt jedoch auch Gegenstimmen, die keinerlei Korrelation zwischen thermodynamischer Stabilität und Effizienz der Gensuppression sehen.¹⁵¹

Ferner ist ein Sequenzvergleich durchzuführen, um eine Spezifität der verwendeten Zielsequenzen zu garantieren. Sollte die Sequenz nämlich im Genom des Menschen oder der Maus an anderer Stelle noch einmal vorkommen, sind ungewollte Nebeneffekte nicht auszuschließen.¹²³

Die bisherigen Angaben beziehen sich jedoch nur auf die prozessierte siRNA, den Kern der shRNA. siRNA und shRNA-Design gleichen sich zwar in vielen Punkten, aber einige Elemente sind shRNA-spezifisch, um ihre effiziente endogene Prozessierung in der Zelle zu garantieren.¹⁴⁸ Konstruiert man eine aus Strang, Gegenstrang und Schleife bestehende shRNA, ist zusätzlich noch die 3-11 bp lange Schleife für die haarnadelförmige Struktur als Designelement der Zielsequenzen miteinzubeziehen. Sie ist eine große Schwachstelle. Schon ein einziges falsches Nukleotid kann die Spezifität unwiederbringlich alterieren. Zudem wird die Sequenzierung in vielen Fällen durch die intrinsische Sekundärstruktur der Schleife erschwert.^{93,152} Über die optimale Länge herrschen auch hier Kontroversen.^{86,148,149,153}

Zudem herrscht Uneinigkeit, welches Konstrukt, das Polymerase II- oder das Polymerase III-basierte (vergleiche 1.3.4.1 und 1.3.4.2), eine stärkere Gensuppression bewirkt. Abhängig ist dies erwartungsgemäß auch von anderen Parametern wie der Länge der Schleife.^{136,148} Grundlage dieser Arbeit ist jedoch ein Polymerase-II-basiertes miR30-Konstrukt. Spezielle auf die miR30-shRNA zugeschnittene Regeln der Sequenzgestaltung sind zum aktuellen Zeitpunkt noch wenig erforscht und bekannt.^{91,94,98}

5.4.2 Anwendung der Kriterien auf die in dem Experiment verwendeten Zielsequenzen

Verschiedene im Internet verfügbare Programme wurden zur Optimierung und Auswahl der Zielsequenzen hinzugezogen.

Wenn man die von uns ausgewählten Zielsequenzen nach den oben aufgeführten Kriterien analysiert (vergleiche Tabelle 5), wird deutlich, dass die Empfehlungen größtenteils erfüllt sind.

Unsere Zielsequenzen liegen zwischen 67-71 bp mit einer Strang- bzw. Gegenstrang- Sequenz von 19 bzw. 21 bp und einer Schleife von 9 bp. Der GC-Gehalt der ausgewählten Zielsequenzen liegt stets im Bereich zwischen 30-50%. Das 3'-Ende wurde mit einer niedrigen Stabilität ausgestattet. Die Sequenzen liegen im mittleren Bereich, mehr als 377 bp vom 5'-Ende bzw. 655 bp vom 3'-Ende entfernt. Mehr als drei Wiederholungen desselben Nukleotids innerhalb der Strang-Sequenz und Palindrome wurden vermieden.

Die eigentliche Zielsequenz beginnt nie mit einem A, im Fall von #23 und #16 zumindest mit einem G. Dies ist tolerierbar, da die folgenden Versuche nicht auf der RNA-Polymerase III, sondern auf der RNA-Polymerase II basieren.

5.5 Konstruktion des shRNA-tragenden Vektorsystems: Schwachpunkte

Im Laufe der Versuche gab es einige Probleme, das nicht-induzierbare Vektorsystem in ein induzierbares zu überführen. Vor diesem Hintergrund ist es wichtig, zu reflektieren, dass es verschiedene Wege der Vektorkonstruktion gibt.

Die am häufigsten durchgeführte Methode, die auch in dieser Arbeit verfolgt wurde, basiert auf der Synthese, dem Annealing und der Ligation zweier komplementärer Oligonukleotide in einen Expressionsvektor. Diese Methode ist schnell durchführbar, aber durch die unumgängliche Synthese der Oligonukleotide teuer und die Rate falsch positiver Klone mit einzelnen Substitutionen oder Deletionen hoch (20-40%). Ein nicht unwesentlicher Anteil des Problems ist hierbei die Länge der Oligonukleotide (>35 bp), die die Gefahr einer Mutation durch Synthesefehler beinhaltet. Um so mehr, da derer zwei Oligonukleotide

benötigt werden.¹⁵² Einzelne Punktmutationen wurden auch in dieser Arbeit beobachtet.

Die zweite Strategie verfolgt die Vektorkonstruktion mittels eines PCR-Ansatzes. Vorteil im Vergleich zu ersterer Methode ist, dass nur ein einziges langes Oligonukleotid synthetisiert werden muss. Nachteil ist jedoch die Mutationsrate im Rahmen der wiederholten Zyklen der PCR selbst.¹⁵²

Der dritte Ansatz basiert auf dem Prinzip, dass eine Polymerase das 3'-Ende überlappender Oligonukleotide verlängert. Jede der beiden Oligonukleotide dient dabei sowohl als Template als auch als Primer. Diese Methode ist kostengünstiger als die anderen beiden, beinhaltet jedoch auch eine hohe Mutationsrate im Rahmen der PCR.

Eine Variation dieser dritten Methode wurde im Zuge des ligasefreien Klonierens verfolgt, bei dem ebenfalls mit überlappenden Primer-Überhängen gearbeitet wurde, wenngleich kein neues Oligonukleotid im eigentlichen Sinne im Rahmen dieses Prozesses synthetisiert wurde. Diese Methode half den kritischen Schritt des shRNA-Transfers in einen anderen Vektor, die durch konventionelle Mittel nicht zu erreichen gewesen war, zu verwirklichen.

5.6 Einbringen des shRNA-tragenden Vektorsystems in MOPC315.BM

5.6.1 Gründe für eine niedrige Transduktionseffizienz

In meinen Experimenten ergaben beide Methoden nur niedrige Transduktionsraten um 10%. Dies schmälerte die Wahrscheinlichkeit einen Einzelklon mit den gewünschten Eigenschaften zu selektionieren und vereitelte die Auswertung der Versuche in Hinblick auf statistische Belange. Über die Gründe dafür kann nur spekuliert werden. So mag die fehlende Effizienz abgesehen von technischen Gründen mit den ausgewählten Zielsequenzen, den Zielzellen oder den Umgebungsparameter zusammenhängen.

Generelle Gründe für eine niedrige Transduktionseffizienz, die ich in dieser Arbeit eine Rolle gespielt haben könnten, sind im Folgenden aufgeführt:

In einer Studie von Krueger und Kollegen von 2007 wurden einige Tausend siRNAs gegen Zielgene aus verschiedenen Genfamilien getestet. Einige Kandidaten waren trotz identischer Versuchsbedingungen über eine Schwelle von 70% nur äußerst schwierig zu supprimieren. Die Forscher erklärten sich dies durch eine unterschiedliche Empfänglichkeit der tangierten mRNA-Sequenz für einen Knockdown je nach Zugänglichkeit der Bindungsregion.¹⁴³ Dies unterstreicht die Tatsache, dass die Gensuppression nicht nur von der siRNA- bzw. shRNA-Sequenz selbst, sondern auch von anderen äußeren Faktoren abhängig ist.

Im Allgemeinen sind Suspensionszellen zudem häufig schwer zu transduzieren, so dass meist eine im Vergleich zu adhärennten Zellen vielfach höhere Konzentration an shRNA nötig ist.¹²³ So waren auch in meinen Experimenten im Vergleich zu der an adhärennten HEK293K-Zellen errechneten MOI bei den suspendierten MOPC315.BM höhere Dosen notwendig, um eine suffiziente Transduktion zu erreichen.

Letztendlich mögen wohl mehrere additive Effekte eine Rolle gespielt haben, die zu der nicht ganz optimalen Transduktionseffizienz geführt haben.

5.6.2 Diskussion der angewendeten Transfektionsmethode

Das Einbringen von Oligonukleotiden, mehrfach negativ geladenen Makromolekülen, über die hydrophobe Zellmembran in eine Zelle, Transfektion bzw. in Bezug auf Viren Transduktion genannt, stellt eine der größten Herausforderungen für den Einsatz der Technik der RNA-Interferenz dar.^{78,80}

Man unterscheidet physikalische, biochemische und virale Methoden der Transfektion. In der folgenden Arbeit wurde die Virus-vermittelte Transduktion im Rahmen der Infektion der murinen Plasmazytomzellen MOPC315.BM mit dem shRNA-tragenden Vektorsystem benutzt.

5.6.2.1 Transduktion per lentiviralem Träger

Wegen ihrer vielfältigen Einsatzmöglichkeiten und ihrer hohen Effizienz, insbesondere auch bei schwer zu transfizierenden Zellen, ist die Bedeutung der Virus-vermittelten Transduktion in den letzten Jahren gestiegen.¹²³

Die Virus-vermittelte Transduktion basiert auf verschiedenen Virussystemen wie Adeno- oder Lentiviren. Den folgenden Versuchen liegt ein lentivirales HIV-derivatives System zugrunde. Lentiviren sind Retroviren mit einem RNA-Genom, das in doppelsträngige DNA umgesetzt und in das Genom der Zielzelle eingebracht wird. Dieser biologische Mechanismus ist auch gentechnologisch sehr wichtig ist, um das Transgen in das Zielgenom zu integrieren und permanent zu exprimieren. Mit dieser Integration fremder DNA erwächst jedoch auch die Gefahr einer unerwünschten Mutation des Genoms.⁷⁸ Die genomische DNA von Adenoviren verbleibt im Gegensatz dazu nur vorübergehend in den infizierten Zellen. Lentivirale Vektoren gelten jedoch generell als weniger toxisch als adenovirale⁹³ und bewirken eine schwächere Immunantwort.⁷⁸ Ihre erfolgreiche Anwendung auch *in vivo* in Bezug auf verschiedenste Erkrankungen wurde bereits in zahlreichen Studien demonstriert.^{131,154,155}

5.6.3 Limitationen in der Einzelzellklon-Herstellung

Theoretisch soll eine einzige parenterale Zelle als Ausgangspunkt einer monoklonalen Population dienen, deren Ziel eine genetische und phänotypische Uniformität ist. Praktisch ergeben sich dabei einige Probleme.

Ein prinzipieller Widerspruch liegt darin, dass kultivierte Zellen unterhalb einer kritischen Zelldichte nicht wachsen, eine Einzelligkeit jedoch per definitionem gefordert wird. Diese Diskrepanz kann aufgelöst werden, indem die Zellen in einem möglichst kleinem Volumen Medium gehalten werden, wie in diesen Experimenten, oder das Klonierungsmedium mit Wachstumsfaktoren zusätzlich angereichert wird.¹³⁴

Generell entstehen aus mit Fremd-DNA transfizierten Zellen nicht automatisch Populationen mit homogener genetischer Konstitution und gewünschten Eigenschaften.¹⁵⁶ In vielen Fällen stammen die mutmaßlichen Einzelzellklone trotz suffizienter Vereinzlungstechniken eben doch nicht von einer einzelnen Zelle ab, wie es auch in den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchen häufig der Fall war. Die Wahrscheinlichkeit des Überlebens einer Kolonie, die von mehr als einer Zelle abstammt, ist zudem höher als die einer Kolonie, die von einer Zelle abstammt.¹⁵⁶

Diskussion

Eine Möglichkeit, diese Gefahr zu minimieren, wenngleich nicht zu eliminieren, besteht darin, mehrere Vereinzlungszyklen hintereinander durchzuführen, wie es auch in der vorliegenden Arbeit der Fall war.

Die in den Experimenten vorliegende Transduktionseffizienz von nur etwa 10% verringerte dabei die Wahrscheinlichkeit einen Klon mit den gewünschten Eigenschaften zu isolieren beträchtlich. War rechnerisch nur in jedem dritten Well eine Zelle ausgesät, ergab die theoretische Chance auf eine Zelle mit den gewünschten Eigenschaften zu treffen bei 15% Transduktionseffizienz 4,5% aller Wells.

Ein kritischer Punkt war die insuffiziente Depletion nicht transfizierter bzw. nicht transduzierter Zellen, die durch fehlende Fluoreszenz gekennzeichnet sind. Für ein Knockdown-Experiment ist es wichtig, möglichst viele, am besten alle nicht transduzierten Zellen zu depletieren. Dies ist theoretisch möglich durch Erhöhung der Transfektionseffizienz, Anwendung einer höheren Konzentration lentiviraler Partikel (MOI) in der Transduktion oder Antibiotikaselektion. Erstere Punkte brachten nur eine höhere Apoptoserate aller Zellen, letzterer Punkt war zumindest für die Trono-Vektoren (pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 und pLVCT-tTR-KRAB), die kein Selektionsgen besitzen, nicht durchführbar.¹²⁸

Ein weiteres Problem der Vereinzlung besteht darin, dass sich die Zellen häufig nicht gleichmäßig in ihrer Nährflüssigkeit verteilen, sondern die Neigung besitzen aneinanderzuhaften.¹⁵⁶

Eine andere Störgröße auf dem Weg zu einer monoklonalen Kolonie ist im erneuten Verlust der Homogenität gegeben. Ursprünglich genetisch identische Zellen können durch die Proliferation der monoklonalen Ausgangszelle und damit einhergehende Mutationen wieder eine Heterogenität erwerben.¹⁵⁶ Insbesondere für Tumorzellen, wie die in dieser Arbeit verwendeten MOPC315.BM, ist diese Gefahr nicht zu unterschätzen.

5.7 Zukünftiges Forschungspotential

5.7.1 Ausblick auf den Einsatz *in vivo*

Die Etablierung eines gegen *YBX1* gerichteten Vektorsystems in einer murinen Plasmazytomzelle eröffnet neue Wege zur genaueren Charakterisierung der Rolle von *YBX1* im Multiplen Myelom.

Dabei ist von einem stufenweisen Prozess auszugehen:

Auswirkungen des Knockdowns von *YBX1* auf MOPC315.BM könnten erst in der Zellkultur, später im Modellorganismus unter vielen verschiedenen Fragestellungen ergründet werden. Einige der zentralen Fragen sind folgende: Inwiefern trägt *YBX1* zum Überleben der Tumorzellen bei? Mit welchen anderen Signaltransduktionswegen innerhalb der Zelle interagiert es und welche Auswirkungen hat dies?

Das in dieser Arbeit etablierte System bietet dabei einige Vorteile im Vergleich zu bisherigen Ansätzen: Im Gegensatz zu den Knockout-Mäusen, die in mühevoller und zeitaufwendiger Arbeit gezüchtet werden müssen, ist der Knockdown einer Zelllinie deutlich schneller im Mausmodell zu etablieren und kann auch zeitlich und räumlich limitiert und exakt reguliert eingesetzt werden, während der Knockout die Genexpression im ganzen Organismus ubiquitär und dauerhaft ausschaltet.¹⁵⁷ Für *YBX1* wurde gezeigt dass ein Knockdown zu einer embryonalen Letalität führt.⁴⁸ Das shRNA-getriggerte Vektorsystem lässt zudem die Nachteile eines wiederholten Einbringens „nackter“ siRNA hinter sich und damit die hohen Kosten und die durch die hohe Konzentration resultierenden Off-Target-Effekte.

Es verbleiben jedoch auch Bedenken. Das Zielgen wird beim Knockdown im Gegensatz zum Knockout meist nicht zu hundert Prozent abgeschaltet, sondern es verbleibt eine Restaktivität.¹⁵⁸ Eine 90-95%ige Runterregulation ist für funktionelle Analysen meist ausreichend, aber eben nicht immer.¹²³ Für den therapeutischen Einsatz zur Bekämpfung onkologischer oder infektiologischer Erkrankungen ist der größtmögliche Knockdown zur Prävention eines Rezidivs anzustreben.⁷⁸

Diskussion

Diese Restaktivität kann nämlich dazu führen, dass die Funktion eines Proteins, das supprimiert werden soll, aufrecht erhalten wird. Dies sei durch ein Beispiel aus dem Bereich der Hämostase untermauert: Würde man Faktor VIII, einen wichtigen Akteur im Rahmen der Blutstillung, per RNA-Interferenz supprimieren, würde schon ein Prozentpunkt mehr oder weniger Aktivität einen gewichtigen Unterschied bei der Blutstillung ausmachen. Der Effekt eines Knockouts wäre dem eines Knockdowns nicht vergleichbar.

Weiterhin wurden phänotypische Unterschiede zwischen Knockout- und Knockdown-Tieren beobachtet⁷⁸: In einer Studie zur Erforschung des Schmerzrezeptors TRPV1 wiesen beide vergleichbare Reaktionen auf einen Hitzestimulus auf, doch nur bei den shRNA-exprimierenden Tieren war die Wahrnehmung neuropathischer Schmerzen reduziert.¹⁵⁹ Daraus kann gefolgert werden, dass Erkenntnisse aus einem Knockdown-Experiment nicht uneingeschränkt mit einer Ausschaltung des Gens gleichgesetzt werden können, also Diskrepanzen zwischen dem modellhaften *YBX1* Knockdown und einem kompletten Genverlust im Multiplen Myelom in realiter bestehen. Jedoch mag diese Restaktivität gering genug sein, um pathologische *YBX1* Wirkungen in der Tumorzelle zu unterdrücken und hoch genug, um seine essenziellen physiologischen Funktionen im Organismus aufrecht zu erhalten und sich somit als vorteilhaft erweisen.

Auch für die dieser Arbeit zugrunde liegende Methodik verbleiben Herausforderungen in Theorie und Praxis, die angegangen werden müssen. Die Optimierung des shRNA-Designs über verlässlichere Algorithmen, die Minimierung unspezifischer Nebenwirkungen, der Ausbau bisheriger Klonierungsstrategien, die Weiterentwicklung des viralen Vektorsystems hin zu mehr Transfektionseffizienz, die Steigerung der Sensitivität zur Selektion positiver Klone sind nur einige theoretische Parameter, deren Weiterentwicklung die Erforschung der Genfunktion erleichtern würden.

Zusammenfassend stellt jedoch das shRNA-tragende Vektorsystem zur Suppression eines Gens im Moment eines der optimalsten Systeme dar, dass für die Charakterisierung der Rolle von *YBX1* im Multiplen Myelom herangezogen werden kann.

5.7.2 Ausblick auf den potenziellen therapeutischen Nutzen

Die Entdeckung des Mechanismus der RNA-Interferenz weckte Hoffnungen auf eine zielgerichteten Stilllegung pathologischer Gensequenzen und eine dadurch induzierbare potentielle Heilung verschiedenster Erkrankungen. Schon dreieinhalb Jahre nach der ersten Anwendung in Säugetierzellen starteten die ersten RNAi-Therapieversuche am Menschen.⁷⁸

Auch das Einbringen der shRNA gegen *YBX1* in murine Plasmazytomzellen nährt den Wunsch, *YBX1* in therapeutischer Absicht vorübergehend ausschalten zu können und somit zur Bekämpfung des Multiplen Myeloms beizutragen. Frühe hochtrabende Erwartungen wurden durch erste Berichte über auftretende Toxizitäten bei der Anwendung im Mausmodell gedämpft.^{160,161} Diese wurden auf eine Übersättigung der zellulären RNAi-Maschinerie zurückgeführt^{94,162} und traten in Zusammenhang mit den hier nicht verwendeten Polymerase-III getriebenen shRNAs auf. Insbesondere eine Übersättigung von Exportin 5, das für die Translokation Polymerase III-gesteuerter shRNAs aus dem Zellkern verantwortlich ist, spielte dabei eine essenzielle Rolle.⁹⁵ Eine Einhaltung der Sicherheitsstandards präklinischer Entwicklungsphasen wie für andere Substanzen ist vor diesem Kontext obligat. Das Problem könnte jedoch durch die Verwendung zwar schwächerer aber auch weniger toxischer Polymerase II-basierter miR30-shRNAs, die zudem über alternativen Weg aus dem Zellkern transportiert werden, überwunden werden.^{95,163,164} Strategien, die von endogenen Mechanismen profitieren, mit diesen dabei jedoch nicht interferieren, ist die daraus resultierende Lehre.¹⁶⁵

Ein großes Problem stellt das Einbringen der RNAi-Träger in die Zelle dar. Virus-basierte Strategien scheinen hier perspektivisch die besten Erfolgsaussichten zu bieten.⁸⁶ Neben dem Einsatz für Tier und Mensch toxischer Transfektionsreagenzien stehen jedoch Bedenken über die mit einem Virus-vermittelten Transfer verbundenen Sicherheitsrisiken einem kommerziellen therapeutischen Einsatz im Weg (vergleiche 5.6.2.1).⁷⁸ Zudem ist die *in vivo*-Transduktion viraler Vektoren immer noch sehr ineffizient.⁹⁸

Doch andere Wege als der virale Transport sind *in vivo* durch zahlreiche Barrieren limitiert: Freie Oligonukleotide werden von der Niere aus dem Blut filtriert,

von Nukleasen degradiert, vom retikuloendothelialen System phagozytiert und müssen, falls sie es bis dorthin schaffen, noch das Kapillarendothel überwinden, bevor sie ihr Zielgewebe erreichen.⁷⁸ Der kommerzielle therapeutische Einsatz der RNA-Interferenz ist also eng an Fortschritte in der shRNA-Auslieferung an die Zelle gekoppelt.¹⁶⁶

Die Entwicklung der Technik ist jedoch inzwischen soweit gediehen, dass einige auf RNA-Interferenz basierende Medikamente aktuell in verschiedenen Phasen der klinischen Erprobung sind. Diese basieren wegen der oben erläuterten systemischen Verteilungsprobleme auf lokalen Applikationen, zunehmend kommen jedoch auch systemische Anwendungen hinzu.¹⁶⁷ Als Beispiel für eine Anwendung im chronischen Krankheitsbereich sei eine gegen VEGF gerichtete siRNA genannt, die Gefäßneubildungen bei der altersabhängigen Makuladegeneration in der Maus um 84% verringern konnte.¹⁶⁸ Ein Beispiel für akute Anwendungen sei das gegen das Respiratory Syncytial Virus gerichtete ALN-RSV01, das den Respirationstrakt als Zielorgan adressiert.¹⁶⁹

Grundsätzlich kann die Knockdown-Technologie gegen jede Krankheit eingesetzt werden, bei der eine Überexpression bestimmter Gene an der Entstehung, Aufrechterhaltung und Ausbreitung von Krankheiten beteiligt ist. Hier seien insbesondere Entzündungen, Viruserkrankungen und Tumorleiden genannt.⁷⁸ Dies ist ihr großer Vorteil im Vergleich zu traditionellen zielgerichteten kleinmolekularen Therapien.

In Bezug auf die Krebstherapie ergeben sich mehrere Angriffspunkte in Hinblick auf verschiedene Tumorcharakteristika: Erstens könnte durch die Inhibition verschiedener tumorförderlicher Faktoren wie Onkogene die unkontrollierte Proliferation von Tumorzellen blockiert werden. Zweitens könnten Faktoren, die die Gefäßneubildung und damit Aufrechterhaltung des Tumors befördern, gebremst werden. Drittens könnten für Metastasierung zuständige Ziele attackiert werden. Und viertens bietet es sich an, chemoresistente Zellen durch Behandlung mit RNA-Interferenz wieder zu resensibilisieren.⁷⁸

Alle diese Tumorcharakteristika werden auch in einen Zusammenhang mit *YBX1* gebracht. Zusammenfassend bietet sich durch die Verbindung der Tech-

nik der RNA-Interferenz mit dem potentiellen Therapieziel *YBX1* eine mögliche Perspektive im Kampf gegen das Multiple Myelom.

Mit dem in dieser Arbeit verfolgten Ansatz würde die shRNA gegen *YBX1*, wenn sie es bis zur therapeutischen Anwendung schafft, stellvertretend für einen neuen Ablauf der Medikamentenerzeugung stehen:

Damit könnte sich der Weg von der Identifizierung krankheitsbefördernder DNA-Abschnitte über die Erforschung per supprimierender siRNA bzw. shRNA und Austestung im Tiermodell bis hin zum therapeutischen Einsatz als kommerzieller Ansatz zur Entwicklung neuer Therapieoptionen etablieren.⁷⁸

5.7.3 Zusammenfassung

Von einem Vektor exprimiert und lentiviral transferiert wurde in der folgenden Arbeit erstmals eine gegen *YBX1* gerichtete shRNA stabil und induzierbar in die murine Plasmazytomzelle MOPC315.BM integriert.

Im Kampf gegen das Multiple Myelom wurde dadurch ein wertvolles Instrument für *in vivo*-Experimente und eine denkbare gentherapeutische Anwendung in Zukunft geschaffen. Die Bestimmung des *YBX1* Status von Myelomzellen könnte damit ähnlich der HER2neu-Bestimmung bei Mammakarzinom-Patienten klinischer Standard werden, als Prognosefaktor und zur Identifizierung von Patienten, die von dem Einsatz einer Virotherapie profitieren würden.²⁷

Eine mögliche konkrete Anwendungsmöglichkeit für den Myelompatienten könnte in der autologen Transplantation hämatopoietischer Zellen liegen. Diese müssten vor der Transplantation *ex vivo* mit einem lentiviralem Vektor transduziert worden sein, der die Synthese von gegen *YBX1* gerichteter shRNAs steuert.⁹⁸ Die generelle Durchführbarkeit dieser Technik wurde bereits für andere Krankheitsentitäten in klinischen Versuchen bewiesen. Dazu gehören das metastasierte maligne Melanom und durch AIDS-verursachte Lymphome.^{170,171}

In der Gestaltung zukünftiger Therapiestrategien muss jedoch beachtet werden, dass eine komplette Tumorremission vermutlich nicht durch die Inhibierung eines einzelnen Proteins erreicht werden kann. Gerade beim Multiplen Myelom, bei dem eine komplexe Beziehung zwischen Tumor- und Knochenmarksmikroenvironment herrscht, ist ein Angriff von verschiedenen und unabhängig von-

Diskussion

einander aktivierten Signalwegen, ergo eine Kombinationstherapie, wie sie bereits bei vielen Tumorentitäten praktiziert wird, zielführend. *YBX1* könnte damit einer von vielen Akteuren sein, der zur effizienten Apoptose von Myelomzellen und damit einer dauerhaften Remission beiträgt. Ein möglicher Partner für einen kombinierten therapeutischen Angriff könnte dabei MDR1/P-Glykoprotein sein, da beide in der sehr häufig sich entwickelnden Therapieresistenz von Myelompatienten eine Rolle spielen. Eine mögliche additive Wirkung legen verschiedene Studien nahe.^{52,172}

Es bleiben noch viele theoretische wie praktische Fragen bis dahin offen, denn, gerade weil *YBX1* auch vielfältige essentielle Funktionen im physiologischen Organismus ausübt, ist eine gezielte Suppression obligat, aber durch weitere Fortschritte auf diesem Gebiet mögen sich Möglichkeiten ergeben, der Lösung dieses Ziels näher zu kommen.

6 Zusammenfassung

Die Funktion eines Gens zu erforschen, indem man es ausschaltet, und damit seiner Rolle im komplexen Zusammenspiel der einzelnen Prozesse des menschlichen Körpers nachzugehen, stellt heutzutage eines der vielversprechendsten Felder der Gentechnologie dar.

Der als RNA-Interferenz bekannte Mechanismus wurde in dieser Arbeit durch den Einsatz von sogenannten *short hairpin RNAs* (shRNAs), dauerhaft in das Wirtsgenom integrierter Knockdown-Träger, für das Gen bzw. Protein Y box binding Protein (*YBX1*) angewendet.

YBX1, ein Vertreter der Cold-Shock-Proteine, stellt einen zentralen Interakteur lebensnotwendiger Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Embryogenese im menschlichen Körper dar. Seine Dysregulation wird jedoch auch in einen Zusammenhang mit Entzündung, Tumorformation und –aufrechterhaltung gebracht, unter anderem auch für das Multiple Myelom.

Das Multiple Myelom ist für 1% aller Krebserkrankungen weltweit verantwortlich mit noch immer ungelösten Problemen unzulänglicher Therapie und deletärer Prognose.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit geschaffen, die Rolle von *YBX1* für das Multiple Myelom mit Hilfe einer Maus-Plasmazelllinie *in vivo* zu untersuchen. Dies geschah durch die Suppression der Genexpression von *YBX1* mittels verschiedener gegen *YBX1* gerichteter Polymerase II-getriebener *short hairpin RNAs* (shRNAs). Diese wurden in ein lentivirales Plasmid kloniert. Durch das Vorhandensein von Tetrazyklin induzierbaren Promotoren (Tet-On bzw. Tet-Off) wurde die Möglichkeit geschaffen, einen konditionellen Knockdown von *YBX1* zu induzieren. Dies war notwendig, da initiale Arbeiten mit humanen Myelomzelllinien zeigten, dass der Knockdown von *YBX1* Apoptose induzieren kann. Mit diesem Konstrukt wurden in HEK293 Zellen lentivirale Partikel hergestellt und damit die murine Plasmazytomzelle MOPC315.BM stabil transduziert. Nach Selektion, Klonierung und Testung (Puromycin-Selektion, RFP-Expression und Western-Blot Analyse) stand ein Zellklon zur Verfügung, der einen induzierbaren *YBX1* Knockdown zeigt.

Zusammenfassung

Damit gelang die Etablierung eines gegen *YBX1* gerichteten Vektorsystems in einer murinen Plasmazelllinie *in vitro*. Mit Hilfe dieser Zelllinien kann nun in weiteren Arbeiten untersucht werden, wie ein *YBX1* Knockdown das Tumorwachstum *in vivo* beeinflusst.

7 Literaturverzeichnis

1. Classen M, Diehl V, Kochsiek K. Innere Medizin. München: Elsevier; 2009.
2. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009;113:5412-7.
3. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American journal of hematology* 2012;87:78-88.
4. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic proceedings* 2003;78:21-33.
5. Leitlinie: Multiples Myelom September 2013
Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie. (Accessed 22.11.2015, at <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/multiples-myelom/@@view/html/index.html#ID0E2KAE>.)
6. Therapiebegleiter zum Multiplen Myelom. (Accessed 10.11.2014, at https://www.myelom.org/fileadmin/Daten/Literatur/Therapiebegleiter_LHRM/1209_LHRM_therapiebegleiter-multiples-myelom.pdf.)
7. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *The New England journal of medicine* 2007;356:2582-90.
8. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature reviews Cancer* 2012;12:335-48.
9. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *The New England journal of medicine* 2004;351:1860-73.
10. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer research* 2004;64:1546-58.
11. Oranger A, Carbone C, Izzo M, Grano M. Cellular mechanisms of multiple myeloma bone disease. *Clinical & developmental immunology* 2013;2013:289458.
12. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004;104:607-18.

13. Bommert KS, Effenberger M, Leich E, et al. The feed-forward loop between YB-1 and MYC is essential for multiple myeloma cell survival. *Leukemia* 2013;27:441-50.
14. Roodman GD. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Journal of cellular biochemistry* 2010;109:283-91.
15. Bataille R, Durie BG, Grenier J. Serum beta2 microglobulin and survival duration in multiple myeloma: a simple reliable marker for staging. *British journal of haematology* 1983;55:439-47.
16. Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:630-9.
17. Palumbo A, Rajkumar SV, San Miguel JF, et al. International Myeloma Working Group consensus statement for the management, treatment, and supportive care of patients with myeloma not eligible for standard autologous stem-cell transplantation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2014;32:587-600.
18. van Rhee F, Giral S, Barlogie B. The future of autologous stem cell transplantation in myeloma. *Blood* 2014;124:328-33.
19. Herold G. *Innere Medizin*. Köln: Herold, G.; 2013.
20. Uptodate. Treatment of relapsed or refractory multiple myeloma. (Accessed 22.11.2015, at http://www.uptodate.com/contents/treatment-of-relapsed-or-refractory-multiple-myeloma?source=search_result&search=multiple+myeloma&selectedTitle=6~150#H3343411844.)
21. Reddy N, Voorhees PM, Houk BE, Brega N, Hinson JM, Jr., Jillela A. Phase I trial of the HSP90 inhibitor PF-04929113 (SNX5422) in adult patients with recurrent, refractory hematologic malignancies. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia* 2013;13:385-91.
22. Rajkumar SV. Treatment of multiple myeloma. *Nature reviews Clinical oncology* 2011;8:479-91.

23. Eliseeva IA, Kim ER, Guryanov SG, Ovchinnikov LP, Lyabin DN. Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Biochemistry Biokhimiia* 2011;76:1402-33.
24. Mihailovich M, Militti C, Gabaldon T, Gebauer F. Eukaryotic cold shock domain proteins: highly versatile regulators of gene expression. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2010;32:109-18.
25. Makino Y, Ohga T, Toh S, et al. Structural and functional analysis of the human Y-box binding protein (YB-1) gene promoter. *Nucleic acids research* 1996;24:1873-8.
26. Toh S, Nakamura T, Ohga T, et al. Genomic organization of the human Y-box protein (YB-1) gene. *Gene* 1998;206:93-7.
27. Lage H, Surowiak P, Holm PS. [YB-1 as a potential target in cancer therapy]. *Der Pathologe* 2008;29 Suppl 2:187-90.
28. Izumi H, Imamura T, Nagatani G, et al. Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'-->5' exonuclease activity. *Nucleic acids research* 2001;29:1200-7.
29. Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, Ashizuka M, Kuwano M. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2003;25:691-8.
30. Didier DK, Schiffenbauer J, Woulfe SL, Zacheis M, Schwartz BD. Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988;85:7322-6.
31. Sakura H, Maekawa T, Imamoto F, Yasuda K, Ishii S. Two human genes isolated by a novel method encode DNA-binding proteins containing a common region of homology. *Gene* 1988;73:499-507.
32. Jurchott K, Bergmann S, Stein U, et al. YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:27988-96.

33. Keene JD. Ribonucleoprotein infrastructure regulating the flow of genetic information between the genome and the proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:7018-24.
34. Matsumoto K, Wolffe AP. Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends in cell biology* 1998;8:318-23.
35. Evdokimova V, Ruzanov P, Imataka H, et al. The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *The EMBO journal* 2001;20:5491-502.
36. Evdokimova V, Ovchinnikov LP, Sorensen PH. Y-box binding protein 1: providing a new angle on translational regulation. *Cell cycle* 2006;5:1143-7.
37. Law JH, Li Y, To K, et al. Molecular decoy to the Y-box binding protein-1 suppresses the growth of breast and prostate cancer cells whilst sparing normal cell viability. *PloS one* 2010;5.
38. Chang YW, Mai RT, Fang WH, Lin CC, Chiu CC, Wu Lee YH. YB-1 disrupts mismatch repair complex formation, interferes with MutS α recruitment on mismatch and inhibits mismatch repair through interacting with PCNA. *Oncogene* 2014;33:5065-77.
39. Koike K, Uchiumi T, Ohga T, et al. Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS letters* 1997;417:390-4.
40. Fujita T, Ito K, Izumi H, et al. Increased nuclear localization of transcription factor Y-box binding protein 1 accompanied by up-regulation of P-glycoprotein in breast cancer pretreated with paclitaxel. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005;11:8837-44.
41. Stein U, Jurchott K, Walther W, Bergmann S, Schlag PM, Royer HD. Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:28562-9.
42. Holm PS, Bergmann S, Jurchott K, et al. YB-1 relocates to the nucleus in adenovirus-infected cells and facilitates viral replication by inducing E2 gene expression through the E2 late promoter. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:10427-34.

43. Jurchott K, Kuban RJ, Krech T, et al. Identification of Y-box binding protein 1 as a core regulator of MEK/ERK pathway-dependent gene signatures in colorectal cancer cells. *PLoS genetics* 2010;6:e1001231.
44. Brandt S, Raffetseder U, Djurdjaj S, et al. Cold shock Y-box protein-1 participates in signaling circuits with auto-regulatory activities. *European journal of cell biology* 2012;91:464-71.
45. Wolffe AP, Tafuri S, Ranjan M, Familiari M. The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from *Escherichia coli* to man. *The New biologist* 1992;4:290-8.
46. Wolffe AP. Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 1994;16:245-51.
47. Spitkovsky DD, Royer-Pokora B, Delius H, et al. Tissue restricted expression and chromosomal localization of the YB-1 gene encoding a 42 kD nuclear CCAAT binding protein. *Nucleic acids research* 1992;20:797-803.
48. Lu ZH, Books JT, Ley TJ. YB-1 is important for late-stage embryonic development, optimal cellular stress responses, and the prevention of premature senescence. *Molecular and cellular biology* 2005;25:4625-37.
49. Uchiumi T, Fotovati A, Sasaguri T, et al. YB-1 is important for an early stage embryonic development: neural tube formation and cell proliferation. *The Journal of biological chemistry* 2006;281:40440-9.
50. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
51. Lasham A, Print CG, Woolley AG, Dunn SE, Braithwaite AW. YB-1: oncoprotein, prognostic marker and therapeutic target? *The Biochemical journal* 2013;449:11-23.
52. Bargou RC, Jurchott K, Wagener C, et al. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nature medicine* 1997;3:447-50.

53. Lasham A, Moloney S, Hale T, et al. The Y-box-binding protein, YB1, is a potential negative regulator of the p53 tumor suppressor. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:35516-23.
54. Goldsmith ME, Madden MJ, Morrow CS, Cowan KH. A Y-box consensus sequence is required for basal expression of the human multidrug resistance (mdr1) gene. *The Journal of biological chemistry* 1993;268:5856-60.
55. Rybalkina E, Stromskaia TP, Ovchinnikov LP, Stavrovskaja AA. [Connection of intracellular protein YB-1 localization in cell cultures of human tumors with multidrug resistance]. *Voprosy onkologii* 2013;59:623-8.
56. Shibahara K, Sugio K, Osaki T, et al. Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2001;7:3151-5.
57. Janz M, Harbeck N, Dettmar P, et al. Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2002;97:278-82.
58. Schitteck B, Psenner K, Sauer B, Meier F, Iftner T, Garbe C. The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2007;120:2110-8.
59. Kolk A, Jubitz N, Mengele K, et al. Expression of Y-box-binding protein YB-1 allows stratification into long- and short-term survivors of head and neck cancer patients. *British journal of cancer* 2011;105:1864-73.
60. Chatterjee M, Rancso C, Stuhmer T, et al. The Y-box binding protein YB-1 is associated with progressive disease and mediates survival and drug resistance in multiple myeloma. *Blood* 2008;111:3714-22.
61. Shushanov SS, Mar'ina LG, Kravtsova TA, Chernykh YB, Kakpakova ES. Coexpression of two mRNA isoforms of insulin-like growth factor-1 gene and mRNA of YB-1 gene in patients with multiple myeloma. *Bulletin of experimental biology and medicine* 2013;154:654-7.

62. Boxer LM, Dang CV. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 2001;20:5595-610.
63. Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nature reviews Cancer* 2008;8:976-90.
64. Cobbold LC, Wilson LA, Sawicka K, et al. Upregulated c-myc expression in multiple myeloma by internal ribosome entry results from increased interactions with and expression of PTB-1 and YB-1. *Oncogene* 2010;29:2884-91.
65. Cobbold LC, Spriggs KA, Haines SJ, et al. Identification of internal ribosome entry segment (IRES)-trans-acting factors for the Myc family of IRESs. *Molecular and cellular biology* 2008;28:40-9.
66. Stoneley M, Willis AE. Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 2004;23:3200-7.
67. Nanbru C, Lafon I, Audigier S, et al. Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:32061-6.
68. Stoneley M, Chappell SA, Jopling CL, Dickens M, MacFarlane M, Willis AE. c-Myc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis. *Molecular and cellular biology* 2000;20:1162-9.
69. Subkhankulova T, Mitchell SA, Willis AE. Internal ribosome entry segment-mediated initiation of c-Myc protein synthesis following genotoxic stress. *The Biochemical journal* 2001;359:183-92.
70. Johannes G, Sarnow P. Cap-independent polysomal association of natural mRNAs encoding c-myc, BiP, and eIF4G conferred by internal ribosome entry sites. *Rna* 1998;4:1500-13.
71. Liu H, Radisky DC, Yang D, et al. MYC suppresses cancer metastasis by direct transcriptional silencing of alpha v and beta 3 integrin subunits. *Nature cell biology* 2012;14:567-74.
72. Elkon R, Loayza-Puch F, Korkmaz G, et al. Myc coordinates transcription and translation to enhance transformation and suppress invasiveness. *EMBO reports* 2015.

73. Pourdehnad M, Truitt ML, Siddiqi IN, Ducker GS, Shokat KM, Ruggero D. Myc and mTOR converge on a common node in protein synthesis control that confers synthetic lethality in Myc-driven cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013;110:11988-93.
74. van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *The Plant cell* 1990;2:291-9.
75. Graw J. *Genetik*. Berlin: Springer; 2010.
76. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-11.
77. Advanced Information on The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006. (Accessed 03.08.2013, at http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/advanced-medicineprize2006.pdf.)
78. Kurreck J. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angewandte Chemie* 2009;48:1378-98.
79. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409:363-6.
80. Gavrillov K, Saltzman WM. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *The Yale journal of biology and medicine* 2012;85:187-200.
81. Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 2005;123:607-20.
82. Pham JW, Pellino JL, Lee YS, Carthew RW, Sontheimer EJ. A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* 2004;117:83-94.
83. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004;431:343-9.
84. Hannon GJ, Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 2004;431:371-8.

85. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-8.
86. Kaszubiak A, Holm PS, Lage H. Overcoming the classical multidrug resistance phenotype by adenoviral delivery of anti-MDR1 short hairpin RNAs and ribozymes. *International journal of oncology* 2007;31:419-30.
87. Chen CM, Chiu SL, Shen W, Cline HT. Co-expression of Argonaute2 Enhances Short Hairpin RNA-induced RNA Interference in *Xenopus* CNS Neurons In Vivo. *Frontiers in neuroscience* 2009;3:63.
88. Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Molecular cell* 2002;9:1327-33.
89. Unwalla HJ, Li MJ, Kim JD, et al. Negative feedback inhibition of HIV-1 by TAT-inducible expression of siRNA. *Nature biotechnology* 2004;22:1573-8.
90. Iovino N, Denti MA, Bozzoni I, Cortese R. A loxP-containing pol II promoter for RNA interference is reversibly regulated by Cre recombinase. *RNA biology* 2005;2:86-92.
91. Xia XG, Zhou H, Xu Z. Multiple shRNAs expressed by an inducible pol II promoter can knock down the expression of multiple target genes. *BioTechniques* 2006;41:64-8.
92. Yeung ML, Bennasser Y, Jeang KT. miRNAs in the biology of cancers and viral infections. *Current medicinal chemistry* 2007;14:191-7.
93. Moore CB, Guthrie EH, Huang MT, Taxman DJ. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods in molecular biology* 2010;629:141-58.
94. Maczuga P, Koornneef A, Borel F, et al. Optimization and comparison of knockdown efficacy between polymerase II expressed shRNA and artificial miRNA targeting luciferase and Apolipoprotein B100. *BMC biotechnology* 2012;12:42.
95. Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Advanced drug delivery reviews* 2007;59:75-86.

96. Boden D, Pusch O, Silbermann R, Lee F, Tucker L, Ramratnam B. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic acids research* 2004;32:1154-8.
97. Rhee SW, Stimers JR, Wang W, Pang L. Vascular smooth muscle-specific knockdown of the noncardiac form of the L-type calcium channel by microRNA-based short hairpin RNA as a potential antihypertensive therapy. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2009;329:775-82.
98. Lebedev TD, Spirin PV, Prassolov VS. Transfer and Expression of Small Interfering RNAs in Mammalian Cells Using Lentiviral Vectors. *Acta naturae* 2013;5:7-18.
99. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:5547-51.
100. Szulc J, Wiznerowicz M, Sauvain MO, Trono D, Aebischer P. A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nature methods* 2006;3:109-16.
101. Bernardi R, Grisendi S, Pandolfi PP. Modelling haematopoietic malignancies in the mouse and therapeutical implications. *Oncogene* 2002;21:3445-58.
102. Feo-Zuppari FJ, Taylor CW, Iwato K, et al. Long-term engraftment of fresh human myeloma cells in SCID mice. *Blood* 1992;80:2843-50.
103. Huang YW, Richardson JA, Tong AW, Zhang BQ, Stone MJ, Vitetta ES. Disseminated growth of a human multiple myeloma cell line in mice with severe combined immunodeficiency disease. *Cancer research* 1993;53:1392-6.
104. Tassone P, Neri P, Burger R, et al. Mouse models as a translational platform for the development of new therapeutic agents in multiple myeloma. *Current cancer drug targets* 2012;12:814-22.
105. Hu J, Van Valckenborgh E, Menu E, De Bruyne E, Vanderkerken K. Understanding the hypoxic niche of multiple myeloma: therapeutic implications and contributions of mouse models. *Disease models & mechanisms* 2012;5:763-71.
106. DeWeerd S. Animal models: Towards a myeloma mouse. *Nature* 2011;480:S38-9.

107. Calimeri T, Battista E, Conforti F, et al. A unique three-dimensional SCID-polymeric scaffold (SCID-synth-hu) model for in vivo expansion of human primary multiple myeloma cells. *Leukemia* 2011;25:707-11.
108. Miyakawa Y, Ohnishi Y, Tomisawa M, et al. Establishment of a new model of human multiple myeloma using NOD/SCID/gammac(null) (NOG) mice. *Biochemical and biophysical research communications* 2004;313:258-62.
109. Radl J, De Glopper ED, Schuit HR, Zurcher C. Idiopathic paraproteinemia. II. Transplantation of the paraprotein-producing clone from old to young C57BL/KaLwRij mice. *Journal of immunology* 1979;122:609-13.
110. Vanderkerken K, Asosingh K, Croucher P, Van Camp B. Multiple myeloma biology: lessons from the 5TMM models. *Immunological reviews* 2003;194:196-206.
111. Hofgaard PO, Jodal HC, Bommert K, et al. A novel mouse model for multiple myeloma (MOPC315.BM) that allows noninvasive spatiotemporal detection of osteolytic disease. *PloS one* 2012;7:e51892.
112. Potter M. Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice. *Physiological reviews* 1972;52:631-719.
113. Kovalchuk AL, Kim JS, Park SS, et al. IL-6 transgenic mouse model for extraosseous plasmacytoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:1509-14.
114. Cheung WC, Kim JS, Linden M, et al. Novel targeted deregulation of c-Myc cooperates with Bcl-X(L) to cause plasma cell neoplasms in mice. *The Journal of clinical investigation* 2004;113:1763-73.
115. Chesi M, Robbani DF, Sebag M, et al. AID-dependent activation of a MYC transgene induces multiple myeloma in a conditional mouse model of post-germinal center malignancies. *Cancer cell* 2008;13:167-80.
116. Croese JW, Vas Nunes CM, Radl J, van den Enden-Vieveen MH, Brondijk RJ, Boersma WJ. The 5T2 mouse multiple myeloma model: characterization of 5T2 cells within the bone marrow. *British journal of cancer* 1987;56:555-60.

117. Valeriote F, Grates H. MOPC-315 murine plasmacytoma as a model anticancer screen for human multiple myeloma. *Journal of the National Cancer Institute* 1986;76:61-5.
118. Lauritzsen GF, Weiss S, Dembic Z, Bogen B. Naive idiotypic-specific CD4+ T cells and immunosurveillance of B-cell tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91:5700-4.
119. Park SS, Kim JS, Tessarollo L, et al. Insertion of c-Myc into Igh induces B-cell and plasma-cell neoplasms in mice. *Cancer research* 2005;65:1306-15.
120. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* 1977;36:59-74.
121. Reinard T. *Molekularbiologische Methoden*. Stuttgart: Ulmer; 2010.
122. Clontech, In-Fusion® Advantage PCR Cloning Kit User Manual - PT4065 - 1. (Accessed 23.08.2013, at <http://takara.co.kr/file/manual/pdf/PT4065-1.pdf>)
123. Schmitz S. *Der Experimentator. Zellkultur*. Heidelberg: Spektrum; 2011.
124. BD Biosciences. Brochure: BD FACSCalibur. (Accessed 04.09.2013, at http://www.bdbiosciences.com/documents/facscalibur_brochure.pdf)
125. Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 1973;52:456-67.
126. Flemington Lab. Calcium Phosphat Transfection Method. *Experimental Design Considerations*. (Accessed 31.08.2013, at <http://www.flemingtonlab.com/Protocols/CalciumPhosphateTransf.pdf>)
127. Tronolab: Tronolab Protocols, EPFL 2007. Production of lentovectors by Calcium phosphate in 293T cells. (Accessed 31.08.2013, at <http://tronolab.epfl.ch/webdav/site/tronolab/shared/Vector%20Production%20EPFL%202007.pdf>)
128. ThermoScientific pTRIPZ_Technical_Manual. (Accessed 01.09.2013, at http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/pTRIPZ_Technical_Manual.pdf.)
129. Thermo Scientific TRIPZ Inducible Lentiviral shRNA Controls (Accessed 10.11.2015, at <http://www.health.umn.edu/sites/default/files/tripz-lentiviral-inducible-shrnamir-manual.pdf>.)

130. Addgene pLKO.1 - TRC Cloning Vector. (Accessed 28.08.2013, at <http://www.addgene.org/tools/protocols/plko/>)
131. Gupta S, Maitra R, Young D, Gupta A, Sen S. Silencing the myotrophin gene by RNA interference leads to the regression of cardiac hypertrophy. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2009;297:H627-36.
132. Van Craenenbroeck K, Vanhoenacker P, Leysen JE, Haegeman G. Evaluation of the tetracycline- and ecdysone-inducible systems for expression of neurotransmitter receptors in mammalian cells. *The European journal of neuroscience* 2001;14:968-76.
133. Gupta S, Schoer RA, Egan JE, Hannon GJ, Mittal V. Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:1927-32.
134. Lindl T, Gstraunthaler G. *Zell- und Gewebekultur. Von den Grundlagen zur Laborbank.* Heidelberg: Spektrum; 2008.
135. Lai JF, Juang SH, Hung YM, et al. An ecdysone and tetracycline dual regulatory expression system for studies on Rac1 small GTPase-mediated signaling. *American journal of physiology Cell physiology* 2003;285:C711-9.
136. Stegmeier F, Hu G, Rickles RJ, Hannon GJ, Elledge SJ. A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:13212-7.
137. Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Kaiser H, Brack AR, Kandolf R, Kupper JH. Comparative analysis of inducible expression systems in transient transfection studies. *Analytical biochemistry* 2004;334:9-19.
138. Rossi FM, Guicherit OM, Spicher A, et al. Tetracycline-regulatable factors with distinct dimerization domains allow reversible growth inhibition by p16. *Nature genetics* 1998;20:389-93.
139. No D, Yao TP, Evans RM. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93:3346-51.

140. Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic acids research* 2002;30:1757-66.
141. Invivogen: siRNA und shRNA Design Guidelines Review, June/July 2013, siRNA Wizard,. (Accessed 08.09.2013, at <http://www.invivogen.com/review-sirna-shrna-design>)
142. Overhoff M, Alken M, Far RK, et al. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *Journal of molecular biology* 2005;348:871-81.
143. Krueger U, Bergauer T, Kaufmann B, et al. Insights into effective RNAi gained from large-scale siRNA validation screening. *Oligonucleotides* 2007;17:237-50.
144. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nature biotechnology* 2004;22:326-30.
145. Heale BS, Soifer HS, Bowers C, Rossi JJ. siRNA target site secondary structure predictions using local stable substructures. *Nucleic acids research* 2005;33:e30.
146. Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nature biotechnology* 2005;23:222-6.
147. Siolas D, Lerner C, Burchard J, et al. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nature biotechnology* 2005;23:227-31.
148. Li L, Lin X, Khvorova A, Fesik SW, Shen Y. Defining the optimal parameters for hairpin-based knockdown constructs. *Rna* 2007;13:1765-74.
149. Ge Q, Ilves H, Dallas A, et al. Minimal-length short hairpin RNAs: the relationship of structure and RNAi activity. *Rna* 2010;16:106-17.
150. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003;115:199-208.
151. Hong J, Wei N, Chalk A, et al. Focusing on RISC assembly in mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2008;368:703-8.

152. McIntyre GJ, Fanning GC. Design and cloning strategies for constructing shRNA expression vectors. *BMC biotechnology* 2006;6:1.
153. Liu YP, Schopman NC, Berkhout B. Dicer-independent processing of short hairpin RNAs. *Nucleic acids research* 2013;41:3723-33.
154. Bot I, Guo J, Van Eck M, et al. Lentiviral shRNA silencing of murine bone marrow cell CCR2 leads to persistent knockdown of CCR2 function in vivo. *Blood* 2005;106:1147-53.
155. Eren-Kocak E, Turner CA, Watson SJ, Akil H. Short-hairpin RNA silencing of endogenous fibroblast growth factor 2 in rat hippocampus increases anxiety behavior. *Biological psychiatry* 2011;69:534-40.
156. Clarke J, Porter A, Davis J. *Cloning*. Chichester (UK): Wiley Blackwell; 2011:231-54.
157. Sledz CA, Williams BR. RNA interference in biology and disease. *Blood* 2005;106:787-94.
158. Shi Y. Mammalian RNAi for the masses. *Trends in genetics : TIG* 2003;19:9-12.
159. Christoph T, Bahrenberg G, De Vry J, et al. Investigation of TRPV1 loss-of-function phenotypes in transgenic shRNA expressing and knockout mice. *Molecular and cellular neurosciences* 2008;37:579-89.
160. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 2006;441:537-41.
161. Borel F, van Logtenstein R, Koornneef A, et al. In vivo knock-down of multidrug resistance transporters ABCC1 and ABCC2 by AAV-delivered shRNAs and by artificial miRNAs. *Journal of RNAi and gene silencing : an international journal of RNA and gene targeting research* 2011;7:434-42.
162. Boudreau RL, Martins I, Davidson BL. Artificial microRNAs as siRNA shuttles: improved safety as compared to shRNAs in vitro and in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2009;17:169-75.
163. Giering JC, Grimm D, Storm TA, Kay MA. Expression of shRNA from a tissue-specific pol II promoter is an effective and safe RNAi therapeutic.

Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy
2008;16:1630-6.

164. McBride JL, Boudreau RL, Harper SQ, et al. Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2008;105:5868-73.

165. Tiemann K, Rossi JJ. RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects. EMBO molecular medicine 2009;1:142-51.

166. Lage H. Potential applications of RNA interference technology in the treatment of cancer. Future oncology 2005;1:103-13.

167. Haussecker D. The Business of RNAi Therapeutics in 2012. Molecular therapy Nucleic acids 2012;1:e8.

168. Cashman SM, Bowman L, Christofferson J, Kumar-Singh R. Inhibition of choroidal neovascularization by adenovirus-mediated delivery of short hairpin RNAs targeting VEGF as a potential therapy for AMD. Investigative ophthalmology & visual science 2006;47:3496-504.

169. DeVincenzo J, Lambkin-Williams R, Wilkinson T, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2010;107:8800-5.

170. Dannull J, Lesher DT, Holzkecht R, et al. Immunoproteasome down-modulation enhances the ability of dendritic cells to stimulate antitumor immunity. Blood 2007;110:4341-50.

171. DiGiusto DL, Krishnan A, Li L, et al. RNA-based gene therapy for HIV with lentiviral vector-modified CD34(+) cells in patients undergoing transplantation for AIDS-related lymphoma. Science translational medicine 2010;2:36ra43.

172. Nieth C, Pribsch A, Stege A, Lage H. Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). FEBS letters 2003;545:144-50.

173. Addgene pLVTHM Plasmid Data. (Accessed 19.08.2013, at <http://www.addgene.org/122477>)

Literaturverzeichnis

174. Addgene pLVCTtTR-KRAB Plasmid Data. (Accessed 21.08.2013, at <http://www.addgene.org/11643/>)
175. Addgene pLVCTrtTRKRAB-2SM2 Plasmid Data. . (Accessed 21.08.2013, at [http://www.addgene.org/11779/.](http://www.addgene.org/11779/))
176. Thermo Scientific GIPZ Lentiviral shRNA. UserManual. (Accessed 10.11.2015, at [http://www.health.umn.edu/sites/default/files/gipz-lentiviral-shrnamir-manual.pdf.](http://www.health.umn.edu/sites/default/files/gipz-lentiviral-shrnamir-manual.pdf))
177. Snap Gene pTRIPZ Sequence and Map. (Accessed 10.11.2015, at [http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/viral_expression_and_packaging_vectors/pTRIPZ/.](http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/viral_expression_and_packaging_vectors/pTRIPZ/))
178. Addgene psPAX2 Plasmid Data. (Accessed 27.08.2013, at <http://www.addgene.org/12260/>)
179. Addgene pMD2.G Plasmid Data. (Accessed 27.08.2013, at <http://www.addgene.org/12259/>)

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
APS	Ammoniumpersulfat
BMSCs	<i>bone marrow stromal cells</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Celsius
Carb	Carbenicillin
cfu	<i>colony forming unit</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	Natrium-Desoxylsäure
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
ds-DNA	doppelsträngige DNA
ds-RNA	doppelsträngige RNA
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FL 1-4	Fluoreszenzkanäle 1-4
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
esiRNA	<i>endogenous siRNA</i>
GYT broth	<i>glucose-yeast-extract-tryptone</i>
h	Stunde
HMCL	<i>human myeloma cell lines</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
i.p.	intraperitoneal
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
ITAF	<i>IRES-transacting factor</i>
LB-Medium	Luria Bertani- Medium
M	molar

Anhang

MDR	<i>multidrug resistance</i>
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
miRNA	<i>micro RNA</i>
MM	Multiplres Myelom
MOI	Multiplicity of Infection
MOPC	<i>motor-oil induced plasmocytoma cells</i>
NOD	<i>non-obese diabetic</i>
PMSF	Phenylmethyisulfonylfluorid
pVDF	Polyvinylidendifluorid
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
s.c.	subkutan
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
ss-DNA	<i>single strand- DNA</i>
TEMED	N,N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

8.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1** Vereinfachte Darstellung der in der pathogenetischen Entwicklung zum Multiplen Myelom bedeutenden Stoffwechselwege mit Andeutung der mehrstufigen Progression über MGUS und der Rolle der *Microenvironment* (schwarz) bestehend aus Knochenmarkstromazellen, Osteoblasten und Osteoklasten (zusammengestellt nach ⁸)..... 3
- Abbildung 2** Therapiealgorithmus Multiples Myelom nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie. September 2013⁵ 7
- Abbildung 3** Struktureller Aufbau des Proteins YBX1 mit Alanin- und Prolinreichem N-Terminus (A/P), Cold-Shock-Domäne (CSD) und basischen und sauren Aminosäure-Clustern (B/A) am C-Terminus (modifiziert nach ²⁹) 9
- Abbildung 4** Translationelle Kontrolle durch *YBX1* (modifiziert nach ²⁹)..... 11
- Abbildung 5** Zelluläre Funktionen von YBX1 unter Einbeziehung der Hallmarks of Cancer⁵⁰ von Hanahan und Weinberg von 2000 mit Unterteilung in physiologische (blau) und onkogenetische (rot) Funktionen (zusammengestellt nach⁵¹) 12
- Abbildung 6** Mechanismus der RNA-Interferenz: Doppelsträngige RNA (dsRNA) wird in kurze Stücke durch den *Dicer* geschnitten und damit zur siRNA mit Dinukleotid-Überhang am 3'- und Monophosphatgruppe am 5'-Ende prozessiert. Der Sense-Strang (blau) wird durch das Protein Argonaut 2 (Ago2) abgebaut. Der Antisense-Strang (rot) wird Teil des RISC-Komplexes und wird als solcher komplementärer mRNA präsentiert. Diese wird daraufhin zerschnitten oder die Synthese des Zielproteins durch die Repression der Transkription (Chromatin-Modifikation) oder Translation gehemmt (modifiziert nach ^{83,84})..... 19
- Abbildung 7** Schematische Darstellung des Vektors mit dem shRNA- Konstrukt und daraus resultierendem Transkriptionsprodukt, die in dem weiteren RNAi-Weg prozessiert werden. Vektor mit inserierter shRNA-Sequenz bestehend aus einer universellen Primer-Stelle (UPS), codierende

Sequenzen für *sense*, *loop* und *antisense* und einem Terminationssignal (TTTTT). Nach Transkription durch die Polymerase III entsteht daraus eine zu sich selbst komplementäre 19 bp-lange RNA mit einem 3-11 Nukleotide langem *Spacer* in Form einer Schleife (modifiziert nach ⁸⁷)..... 21

Abbildung 8 Mechanismus der RNA-Interferenz. Die siRNA wird in den RISC integriert, der für die Degradation der Ziel-mRNA verantwortlich ist (modifiziert nach ⁹⁵)..... 22

Abbildung 9 Tetrazyklin-induzierbares Vektorsystem. In Abwesenheit von Tetrazyklin ist der Tetrazyklin-Repressor (tetR) an den Tetrazyklin-Operator (tetO) gebunden und die Transkription somit unterdrückt. Sobald Tetrazyklin vorhanden ist, löst sich der Tetrazyklin-Repressor vom Operator und die Transkription kann stattfinden. Self-inactivating (SIN); central polypurine tract (cPPT); Promotor (Prom); Internal ribosome entry site (IRES); woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE) (aus ¹⁰⁰)..... 24

Abbildung 10 Schematische Darstellung des Mausmodells Gruppe I (modifiziert nach ¹⁰⁵)..... 26

Abbildung 11 Schematische Darstellung des Mausmodells Gruppe II (modifiziert nach ¹⁰⁵)..... 27

Abbildung 12 Schematische Darstellung des Mausmodells Gruppe III (modifiziert nach ¹⁰⁵)..... 28

Abbildung 13 Schematische Darstellung des Mausmodells Gruppe IV (modifiziert nach ¹⁰⁵)..... 29

Abbildung 14 Entwicklung von MOPC315.BM (modifiziert nach ¹¹¹)..... 31

Abbildung 15 mRNA-Sequenz von *YBX1* (Maus) und der Sequenzen zur Konstruktion der shRNAs..... 65

Abbildung 16 Analytisches Agarosegel zur Bestätigung von Annealing mit den einzelsträngigen ss-Oligonukleotiden unten und den doppelsträngigen ds-Oligonukleotiden oben (beide etwa 50 bp Länge). ds-Oligonukleotide #9,10,18,19 sind *MYC*-spezifisch und für die folgende Arbeit irrelevant.... 66

Abbildung 17 Kolonie-PCR zur Identifikation der Vektoren mit erfolgreich inseriertem Oligonukleotid (rot) vs. fehlerhafte Insertion (schwarz) jeweils für pLVTHM#16,17,22,23, die im Vergleich zur Positivkontrolle (pLVTHM ohne Insert) etwas höher liegen..... 68

Abbildung 18 Ergebnis der Sequenzierung für pLVTHM#17-4 als Beispiel. Vergleich der inserierten Sequenz (Subject) mit den ursprünglich ausgewählten Zielsequenzen (Query) und der Insertionsstelle (Subject) mit pLVTHM ohne Insert (Query) (ausgewertet mit Blast N¹). Schematisch ist daneben orange markiert, welcher Bereich jeweils verglichen wird..... 70

Abbildung 19 Schematische Darstellung des Insert-Transfers vom nicht-induzierbaren Vektor pLVTHM in den induzierbaren Vektor pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 bzw. pLVCT-tTR-KRAB anhand eines Restriktionsverdaues mit den Restriktionsenzymen MscI und FspI. Der Verdau inaktiviert die rot markierte Ampicillin-Resistenz, die durch die Insertion des MscI-FspI-Fragmentes in pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 bzw. pLVCT-tTR-KRAB wieder erworben wird. pLVTHM besitzt zudem ein Tetrazyklin-Responsive-Element (TRE) mit Tetrazyklin-Operator (TetO), das sich innerhalb des Bereiches zwischen MscI und FspI befindet und somit mittransferiert wird. pLVTHM kann das TRE selbst nicht nutzen, da es das entsprechende Protein nicht besitzt, das an den Tetrazyklin-Operator bindet. Bei dem Vektor pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 hingegen ist es dafür verantwortlich, dass die Expression TRE-kontrollierter Gene durch Tetrazyklin und seine Derivate unterdrückt wird, d.h. unser Ziel-Gen in der Gegenwart von Tetrazyklin nicht vervielfältigt wird. Der Vektor pLVCT-tTR-KRAB hingegen besitzt einen Tetrazyklin-Repressor. Hier wird unser Ziel-Gen nur vervielfältigt, wenn Tetrazyklin vorhanden ist..... 72

Abbildung 20 Kolonie-PCR mit H1 und SP6. K1 (Legende s.o.) liegt bei 390 bp (Entfernung von H1 und SP6 auf pLVTHM). K2 und K3 liegen bei ca. 460 bp (Entfernung von H1 und SP6 auf pLVTHM+ Länge Insert). K4 und K5 sind erwartungsgemäß ohne Zielbande geblieben, da sie keinen

Ansatzpunkt für den H1-Primer besitzen und diesen erst im Zuge der Transferierung des Inserts aus pLVTHM erwerben. 73

Abbildung 21 Nach Verdau: (a) Darstellung von Vektoren pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 und pLVCT-tTR-KRAB im durch MscI und FspI verdauten Zustand (Zielbande liegt bei etwa 13.000 bp) und (b) der aufgereinigten Inserts nach Isolation aus dem Agarosegel (Zielbande liegt bei 2.435 bp, welches der Entfernung von MscI und FspI in pLVTHM entspricht). 75

Abbildung 22 Ablauf der IN FUSION®-Reaktion als alternative Klonierungsmethode. Der linearisierte Vektor entspricht dabei den durch MscI und FspI verdauten pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 und pLVCT-tTR-KRAB, Ziel-Insert ist e#16,17,22,23 (modifiziert nach Clontech, In-Fusion® Advantage PCR Cloning Kit User Manual) 78

Abbildung 23 Design der Primer *In- for* und *In- rev* 79

Abbildung 24 PCR-Amplifikation und Hinzufügen des 15 bp-Überhang an #22-2 bzw. #16-2, so dass z#22-2 bzw. z#16-2 entsteht. Fragmentgröße liegt bei 2.500 bp (a). Positivkontrolle ist das Insert #23-5, Negativkontrolle ist Wasser. Die unspezifische Bande bei 750 bp wird durch ein präparatives Agarosegel entfernt, so dass nur noch das 2.500 bp-Fragment verbleibt (b). 80

Abbildung 25 Kolonie-PCR von Klonen aus der Klonierungsreaktion nach Transformation. Es zeigte sich ein positives Ergebnis für alle getesteten Klone mit Fragmentgröße bei 460 bp (Entfernung von H1 zu SP6 auf dem MscI-FspI-Fragment aus pLVTHM mit shRNA-Insert) im Vergleich zur Positivkontrolle (pLVTHM unverdaut) mit Fragmentgröße bei 390 bp (Entfernung von H1 und SP6 auf pLVTHM ohne Insert) und Negativkontrolle (Wasser)..... 81

Abbildung 26 Kontrollverdau mit MscI und NotI. Die Kontrolle K1 ist der Vektor pLVTHM mit Fragmenten bei etwa 3800 und 8000 bp. Die Kontrolle K2 entspricht pLVCT-tTR-KRAB mit Fragmenten bei etwa 6000 und 7000 bp. Der Klon #23-5tTR15 entspricht in seinem Verdau K2.. 82

- Abbildung 27** Ergebnisse der Sequenzierungen beispielhaft für #17-4tTR1. Vergleich mit pLVCT-tTR-KRAB (grün), pLVTHM (blau) und der ursprünglich ausgewählten Zielsequenzen (gelb) (ausgewertet mit Blast N¹). Markierung der Restriktionsenzym-Schnittstellen (rot). 83
- Abbildung 28** pTRIPZ-Vektor schematisiert dargestellt mit mir30-basierter Schleifenstruktur als shRNA-Insertionsregion, die unter der Kontrolle des Tetrazyklin-regulierbaren Elementes (TRE) mit RFP in der Gegenwart von Tetrazyklin exprimiert wird. (modifiziert nach¹²⁹). 85
- Abbildung 29** Beispielhafte Darstellung zweier durchflusszytometrischer Messungen aus dem Versuchszyklus V1 72 Stunden nach Doxycyclin-Induktion des Tet-On Vektors #23-5tTR15. Die lebenden Zellen befinden sich im Gate R1 im FSC/SSC Histogramm. Man sieht also, dass nur etwa 20% der Zellen unabhängig von Induktion oder Nicht-Induktion zu diesem Zeitpunkt noch vital sind. Die differierende Subpopulation wurde mit Q4 und RN1 aus dem Anteil lebender Zellen (R1) im Vergleich zu einer Negativkontrolle nicht-transduzierter Zellen vermessen. Transduzierte Zellen mit (a) und ohne (b) Doxycyclin-Induktion wurden miteinander verglichen. Ausgehend von RN1 differiert sich im Doxycyclin-induzierten Versuchsteil (Abbildung 29a) eine Subpopulation (13%) im Vergleich zum nicht-induzierten Versuchsteil (Abbildung 29b) mit 3% RN1-Anteil. 91
- Abbildung 30** Vergleich zweier durchflusszytometrischer Messungen von MOPC315.BM.luc Klon 4007 nach 5 Tagen mit (a) und ohne (b) Doxycyclin-Induktion. Die lebenden Zellen befinden sich im Gate R1 im FSC/SSC Histogramm. Im Fluoreszenzkanal 2 ist die RFP Expression dargestellt. Die shRNA wird im pTRIPZ mit der RFP mRNA exprimiert. Die Doxycyclin-Induktion führt zu einem kompletten Shift der Population von RFP-negativ (Peak bei ca. 0,9) zu RFP-positiv (Peak bei ca. 100). Die Verschiebung des Peaks im Fluoreszenzkanal 1 ist auf das RFP Protein zurückzuführen, das aufgrund seines Emmisionsspektrum leicht im Kanal 1 detektiert wird. 93

Abbildung 31 *YBX1* Knockdown in MOPC315.BM.luc (*YBX1* grün durch *YBX1* Antikörper und das Fluorochrom FITC, Nucleus blau durch DAPI-Färbung). Nach Induktion der shRNA mit Doxycyclin (+Dox) ist im Vergleich zur Kontrolle (-Dox) nach 5 Tagen kein *YBX1* mehr detektierbar. Die zusätzlich auftretende Rotfärbung ist auf das koexprimierte RFP zurückzuführen. ... 94

Abbildung 32 Western Blot des *YBX1* Knockdowns in MOPC315.BM-Zellen Tag 1 bis Tag 17. Es zeigt sich eine ab Tag 4 nach Induktion gleichbleibende Suppression der *YBX1* Proteinexpression im Vergleich zu der Ladekontrolle β -Actin. 95

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Einteilung und Häufigkeit nach Paraproteinbildung ⁶	2
Tabelle 2. Diagnosekriterien des multiplen Myeloms und anderer Plasmazellstörungen (modifiziert nach ⁵).....	5
Tabelle 3. Subfamilien von <i>YBX1</i> (zusammengestellt nach ²³).....	8
Tabelle 4. Vergleich der vier Gruppen von bisherigen Mausmodellen für das Multiple Myelom (MM) (erstellt aus Informationen von ^{104-106,111}).....	30
Tabelle 5. Liste der verwendeten Oligonukleotide. Es erfolgt nur die Auflistung der forward- Sequenz nach dem oben beschriebenen Farbmuster. Targetspezifische Sequenzen sind grün markiert. GC%= GC-Gehalt; T _m = Schmelztemperatur.....	34
Tabelle 6.	36
Tabelle 7.	36
Tabelle 8.	37
Tabelle 9.	38
Tabelle 10. Liste der verwendeten Enzyme	44

Tabelle 11.	Liste der verwendeten Restriktionsenzyme.....	44
Tabelle 12.	Liste der Protein- und DNA- Marker	45
Tabelle 13.	Liste der verwendeten Reaktionskits.....	45
Tabelle 14.	Übersicht über die verwendeten PCR-Ansätze.....	52
Tabelle 15.	Übersicht über die verwendeten PCR-Programme	52
Tabelle 16.	Bestandteile der In-Fusion Klonierungsreaktion für aus dem Agarosegel aufgereinigte PCR-Inserts.....	55
Tabelle 17.	Bewertung der Kolonie-PCR	67
Tabelle 18.	Ligationsreaktionen: Jeder der Ligationspartner A wurde mit jedem der Ligationspartner B zusammengefügt.	74
Tabelle 19.	Ansätze zur Klonierung von e#16,17,22,23 in pLVCT-rtTR-KRAB- 2SM2 und pLVCT-tTR-KRAB.....	77
Tabelle 20.	Schematischer Ablauf eines Versuchszyklusses am Beispiel des Tet-On Vektors #23-5tTR15.....	88

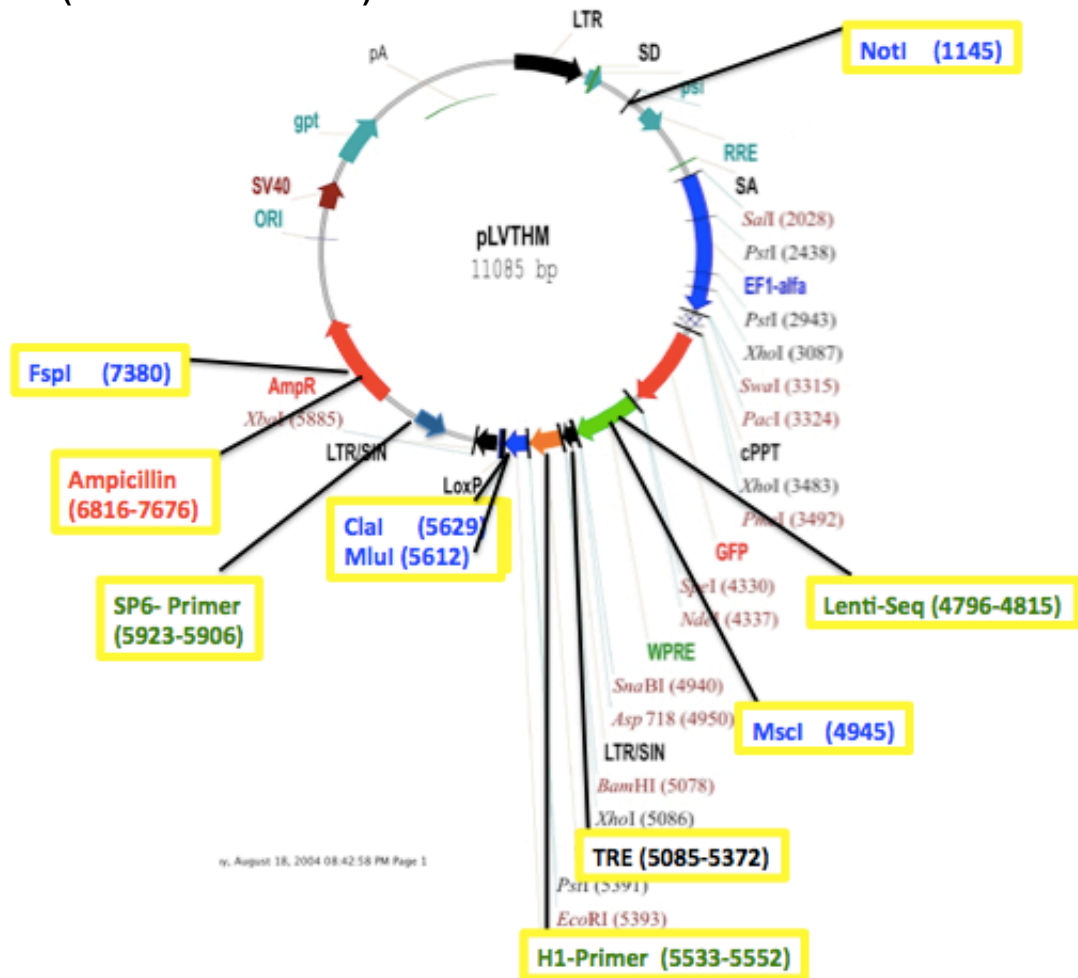
8.4 Vektorenverzeichnis

Für alle Vektoren sind bedeutsame Stellen hervorgehoben (blau= Restriktions-schnittstellen, grün= Primer, rot= Selektionsmarker, schwarz= für den Tet-On bzw. –Off- Mechanismus bedeutsame Elemente).

Dargestellt sind im Folgenden:

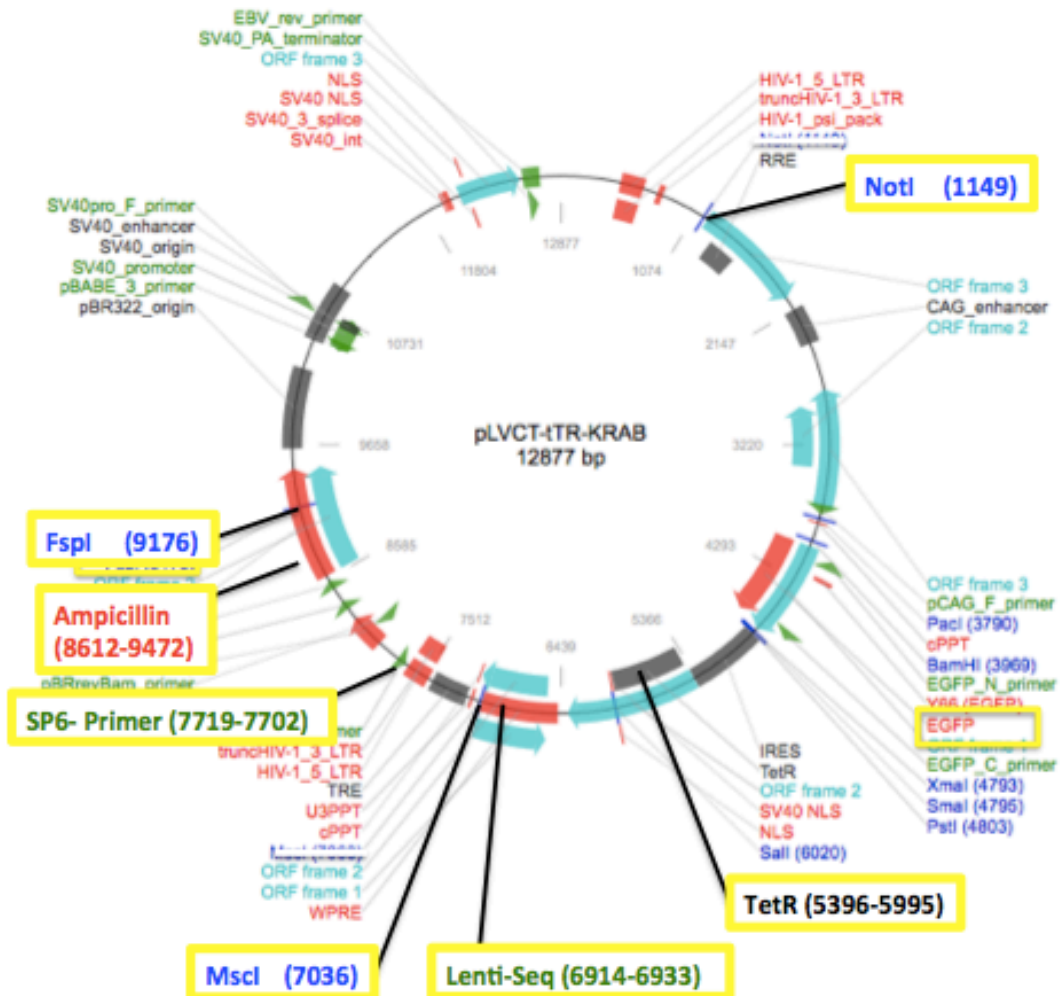
- (1) pLVTHM
- (2) pLVCT-tTR-KRAB
- (3) pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2
- (4) pGIPZ
- (5) pTRIPZ
- (6) psPAX2
- (7) PMD2.G

(1) Vektor pLVTHM (nicht-induzierbar)
(modifiziert nach ¹⁷³)



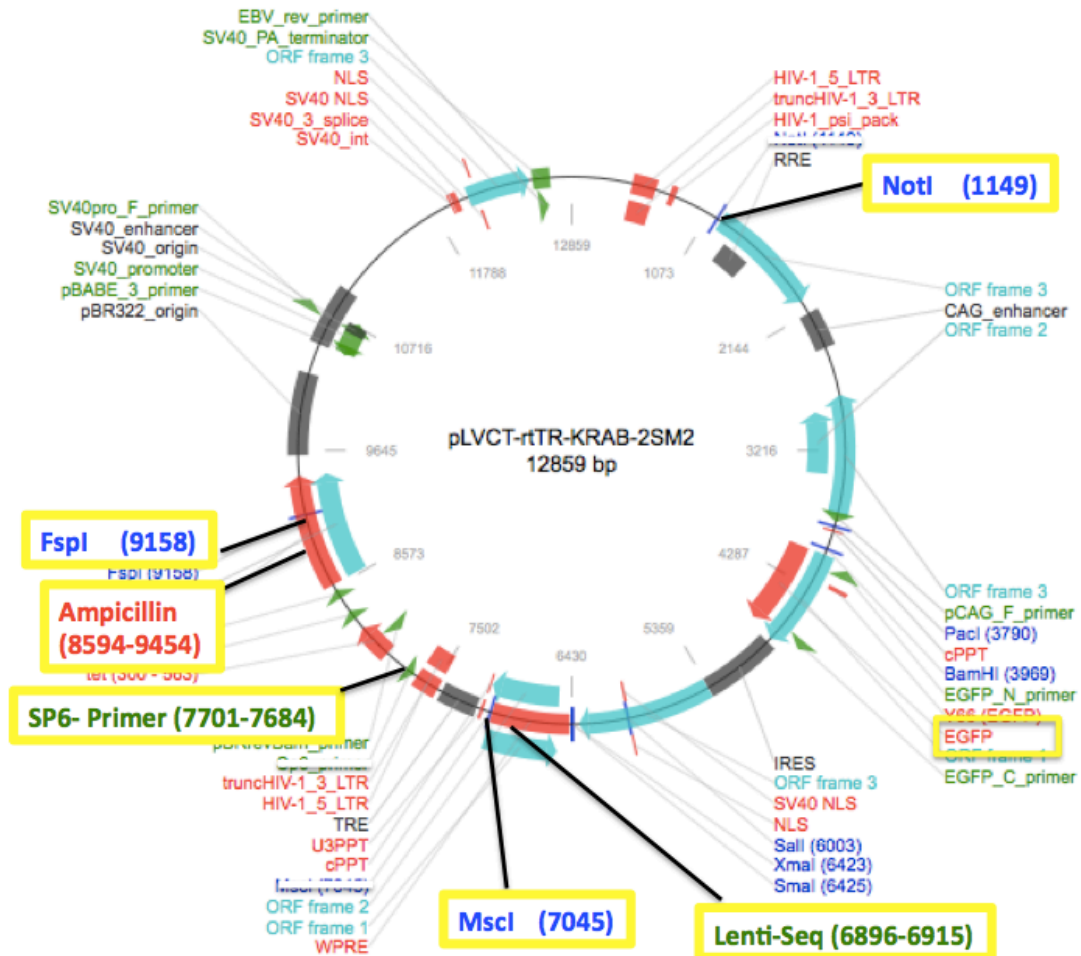
(2) Vektor pLVCT-tTR-KRAB (Tetrazyklin-induzierbar)
(modifiziert nach ¹⁷⁴)

→ Tet-On: wird in der Anwesenheit von Tetrazyklin induziert

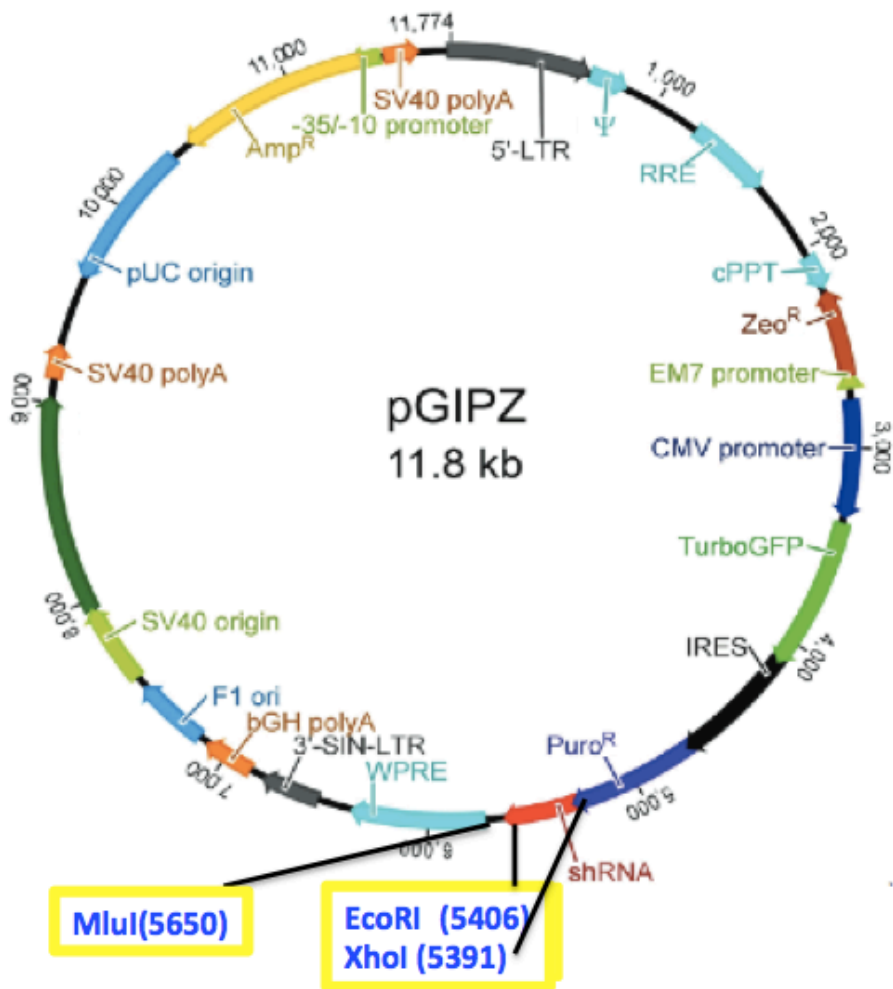


(3) Vektor pLVCT-rtTR-KRAB-2SM2 (Tetrazyklin-induzierbar)
(modifiziert nach ¹⁷⁵)

→ Tet-Off: wird in der Abwesenheit von Tetrazyklin induziert

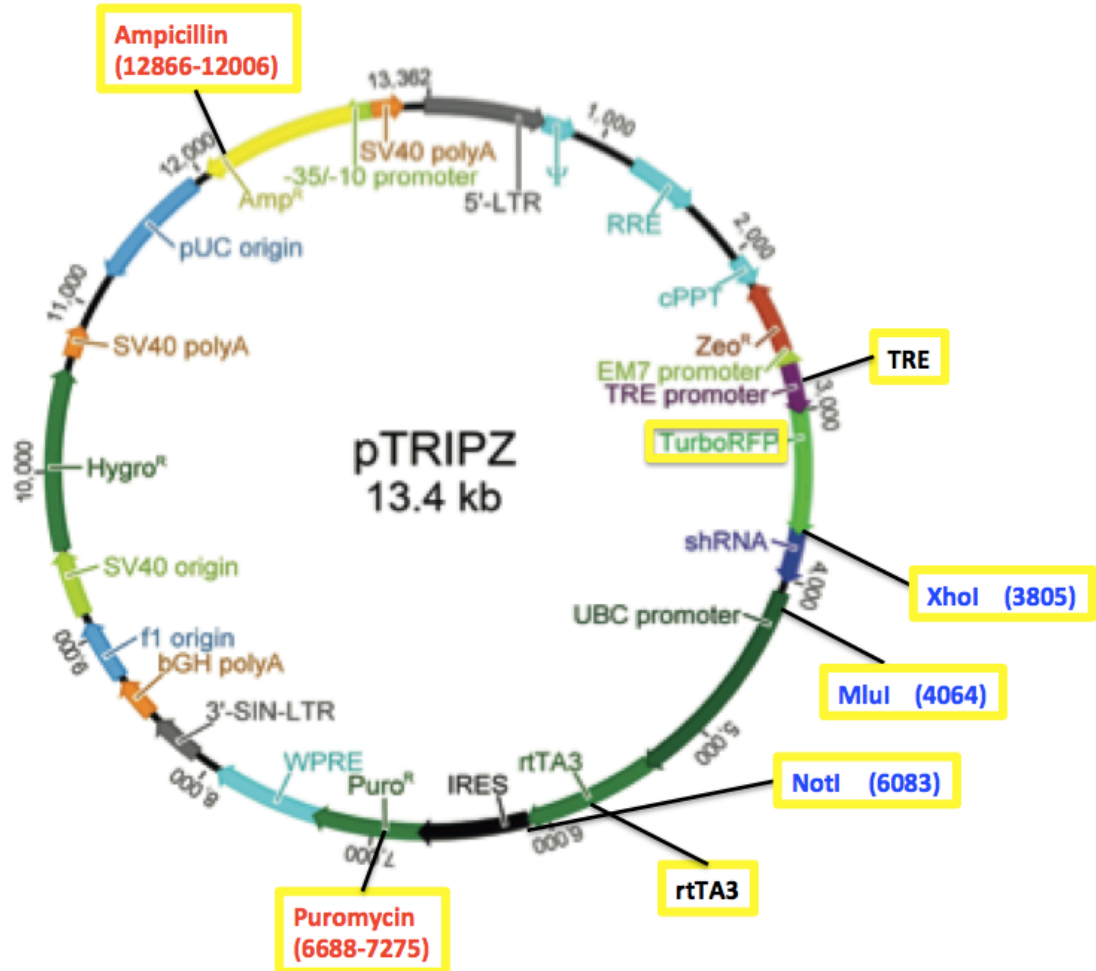


(4) Vektor pGIPZ (nicht- induzierbar)
(modifiziert nach ¹⁷⁶)

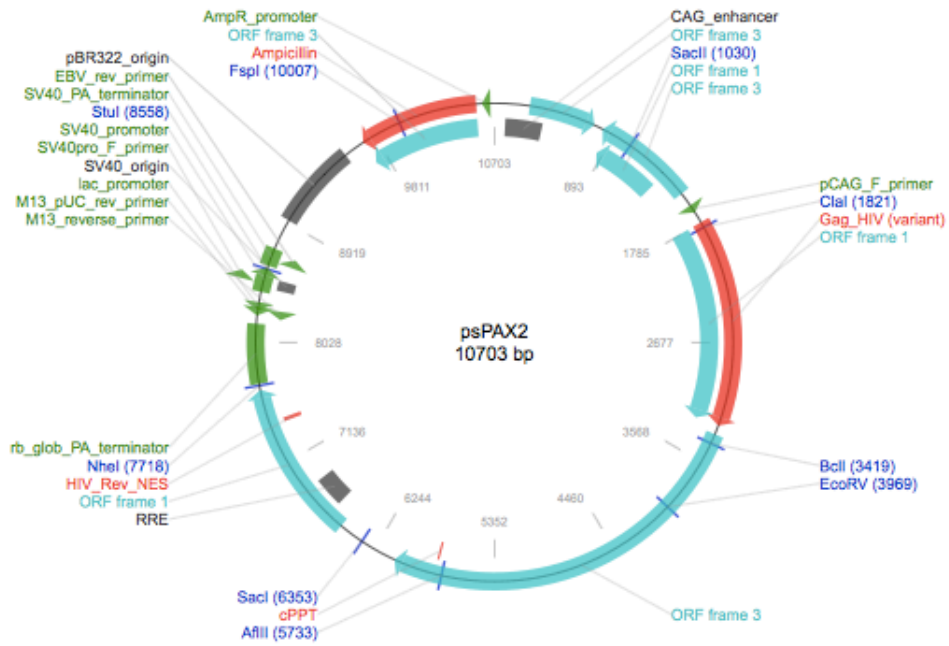


(5) Vektor pTRIPZ
(modifiziert nach ^{129,177})

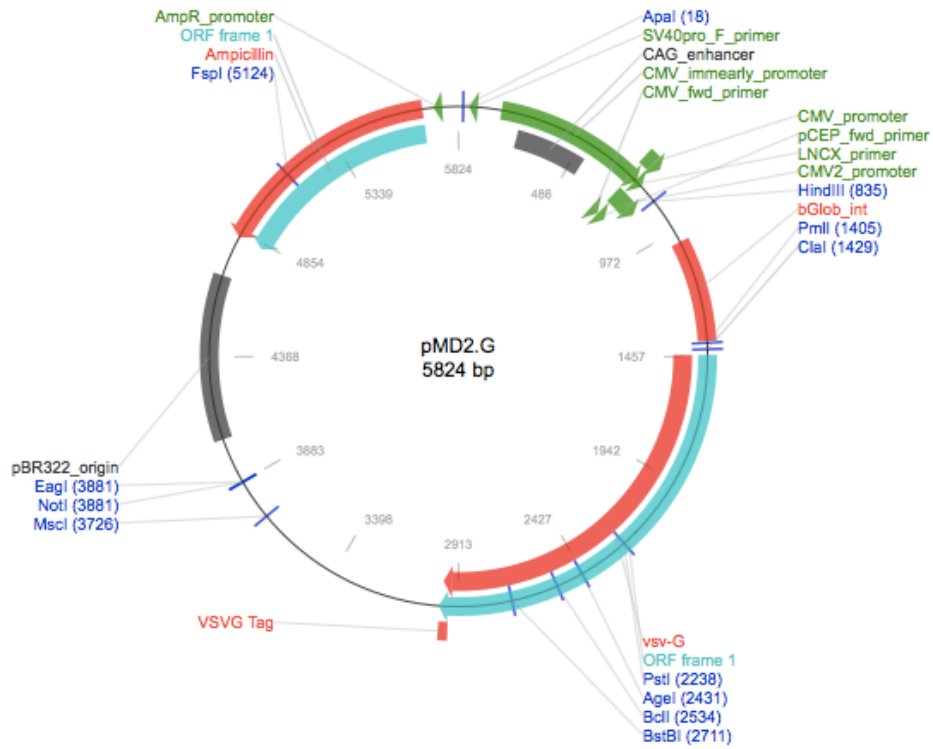
→ Tet-On: wird in der Anwesenheit von Tetrazyklin induziert



(6) Vektor psPAX2 als Bestandteil der Virusproduktion
(aus 178)



(7) Vektor pMD2.G als Bestandteil der Virusproduktion
(aus ¹⁷⁹)



Danksagung

Danksagung

Vielen Personen gebührt mein Dank für Ihre Hilfe, ohne die diese Arbeit nie fertig geworden wäre.

An erster Stelle stehen Dr. Kurt Bommert und der Leiter der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ralf Bargou. Vielen Dank Ihnen für die Überlassung des Promotionsthemas und die Betreuung der Arbeit sowie die Übermittlung von Kenntnissen des grundlegenden naturwissenschaftlichen Arbeitens und der speziellen Denkweise.

Dr. Kathryn Bommert Dank für das Anlernen der Techniken der Immunhistochemie. Dr. Madlen Effenberger und Nina Königl standen mir immer mit ihrer Expertise jedoch auch mit ihrer menschlichen Unterstützung zur Seite.

Auch der restlichen Arbeitsgruppe, die mit Ihren interessanten Vorträgen meinen Wissenshorizont erweiterten und interessante Diskussionen führten, vielen Dank.

Zuletzt seien noch meine Eltern und mein Freund genannt, die immer an diese Arbeit geglaubt haben und mir dabei geholfen haben, sie in der langen Endphase zu forcieren sowie mich zu motivieren.