



Funktionelle Charakterisierung von YB-1 im Zytoplasma des Multiplen Myeloms

**Functional Characterization of YB-1
in the Cytoplasm of Multiple Myeloma**

**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin**

vorgelegt von

Madlen Effenberger

aus

Spremberg

Würzburg 2012

Eingereicht am: 27.09.2012

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. T. Hünig

1. Betreuer: Prof. Dr. R. Bargou

2. Betreuer: Prof. Dr. U. Holzgrabe

3. Betreuer: Prof. Dr. M. Scharl

4. Betreuer: Dr. K. Bommert

Tag des Promotionskolloquiums: 18.02.2013

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung	5
1.1. Das Multiple Myelom	5
1.1.1. Epidemiologie	5
1.1.2. Pathogenese	5
1.1.2.1. Normale B-Zell-Entwicklung	5
1.1.2.2. Entwicklung der malignen Plasmazelle	6
1.1.3. Symptome, Diagnose und Klassifikation	8
1.1.4. Therapie	9
1.1.5. Prognose	10
1.1.6. Expression von Onkogenen beim MM	10
1.2. Das Y-Box-bindende Protein 1 (YB-1).....	12
1.2.1. Genomische Organisation und YB-1-Gen-Regulation	12
1.2.2. Proteinstruktur	13
1.2.3. Funktionen von YB-1	14
1.2.3.1. Zellkern	14
1.2.3.2. Zytoplasma	15
1.2.4. YB-1-Expression in normalen und malignen Geweben	18
1.2.5. YB-1 und das Multiple Myelom	21
Zielstellung	22
2. Material und Methoden	23
2.1. Zellbiologische Methoden	23
2.1.1. Kultivierung humaner Zelllinien	23
2.1.2. Kultivierung muriner Zelllinien	23
2.1.3. Herstellung der stabilen, Doxycyclin-induzierbaren Zelllinie AMO-1-tet	23
2.1.4. Transiente Transfektion von Myelomzelllinien mittels Elektroporation	24
2.1.5. Magnetbasierte Aufreinigung von LNGFR-positiven Zellen	26
2.2. Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting - FACS).....	27
2.2.1. Zellzahlbestimmung	27
2.2.2. Bestimmung der Zellviabilität	27
2.2.2.1. Statistische Auswertung	28
2.2.3. Bestimmung der Caspase-Aktivität	28
2.2.4. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials	28
2.3. Biologische und proteinbiochemische Methoden.....	28
2.3.1. Western Blot-Analyse	28
2.3.2. Quantitative <i>real-time</i> PCR	31
2.3.3. Sequenzierung der MYC-IRES	32
2.3.4. Immunzytochemische Färbung von humanen Zelllinien	32

2.3.5.	Immunhistochemische Färbung primärer humaner MM-Proben.....	32
2.3.6.	Immunpräzipitation (IP) von YB-1	33
2.3.7.	Microarray-Analyse der IPten mRNAs.....	35
2.3.8.	Dichtegradienten-Zentrifugation.....	35
2.3.9.	Phenol-RNA-Extraktion.....	37
2.4.	<i>Molekularbiologische Methoden.....</i>	37
2.4.1.	Konstruktion des Expressionsplasmids pFC8A-YB-1	37
2.4.2.	Konstruktion des shRNA-Expressionsplasmids gegen TCTP	38
2.5.	<i>Hersteller.....</i>	40
3.	<i>Ergebnisse.....</i>	42
3.1.	<i>Expression, Lokalisation und posttranslationale Modifikation von YB-1 in humanen Myelomzelllinien.....</i>	42
3.1.1.	YB-1-Expression im Zytoplasma von humanen Myelomzelllinien.....	42
3.1.2.	Humane Myelomzelllinien sind phospho-YB-1 negativ.....	43
3.2.	<i>Identifizierung YB-1-gebundener mRNAs im Zytoplasma von MM-Zellen.....</i>	45
3.2.1.	<i>MYC</i> und <i>TCTP</i> sind YB-1-gebundene mRNAs in malignen Plasmazellen.....	45
3.2.2.	Die <i>MYC</i> -IRES ist nicht mutiert beim Multiplen Myelom	51
3.3.	<i>Expression von YB-1, TCTP und MYC in primären Plasmazytomzellen</i>	52
3.3.1.	Primäre MM-Zellen sind <i>TCTP</i> - und <i>MYC</i> -mRNA-positiv.....	52
3.3.2.	Heterogene <i>MYC</i> -Expression in primären, intramedullären MM-Zellen.....	54
3.3.3.	Erhöhte Korrelation zwischen YB-1 und <i>MYC</i> in extramedullären Myelomen	57
3.4.	<i>Funktionelle Charakterisierung von YB-1 im Zytoplasma humaner Myelomzelllinien.....</i>	59
3.4.1.	Abnahme der <i>MYC</i> - und <i>TCTP</i> -Expression infolge des YB-1-Knockdowns.....	59
3.4.2.	YB-1 kontrolliert die Verfügbarkeit der <i>MYC</i> -mRNA für den Translationsapparat	60
3.4.3.	Der YB-1-Knockdown aktiviert Caspasen und induziert Apoptose.....	63
3.5.	<i>Funktionelle Bedeutung von TCTP und MYC im Multiplen Myelom.....</i>	65
3.5.1.	Der <i>TCTP</i> -Knockdown hat keinen Einfluss auf die Viabilität von HMZL	65
3.5.2.	Reduktion der YB-1-Protein- und mRNA-Expression infolge des <i>MYC</i> -Knockdowns.....	65
3.5.3.	Caspase-Aktivierung und der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials induziert Apoptose in <i>MYC</i> -Knockdown-Zellen.....	66
3.5.4.	Die YB-1-Überexpression schützt zum Teil vor <i>MYC</i> -Knockdown-induzierter Apoptose	68
3.5.5.	<i>MYC</i> reguliert direkt die <i>YB-1</i> -Transkription <i>in vitro</i>	70
3.6.	<i>Web-basierte Kategorisierung YB-1-gebundener mRNAs.....</i>	71
3.6.1.	Eine Vielzahl YB-1-gebundener mRNAs werden funktionell dem Translationsapparat zugeordnet	71
3.6.2.	Signifikante Anhäufung von <i>MYC</i> -Zielgenen unter den YB-1-gebundenen mRNAs ...	73
3.6.3.	YB-1-gebundene mRNAs enthalten präferentiell TOP-Motive in ihrer 5'-NTR	75
4.	<i>Diskussion.....</i>	76

Literaturverzeichnis	86
Abkürzungsverzeichnis	101
Anhang.....	104
A1: Tabelle der YB-1 gebundenen mRNAs für AMO-1, MM.1S, MOPC und PZT mit einem Vermerk zu bekannten 5'NTR-Elementen (IRES, TOP).....	104
A2: Pathologische Bewertung der immunhistochemischen Analyse intramedullärer MM- Fälle.....	108
A3: Ergebnisse der WebGestalt-Annotationen Gene Ontology (GO)-Analyse.....	109
Lebenslauf	110
Veröffentlichungen und Vorträge.....	111
Danksagung.....	112
Eidesstattliche Erklärung	113

Teile der hier vorgestellten Arbeit wurden bereits in der folgenden Veröffentlichung publiziert:

Kathryn S. Bommert*, Madlen Effenberger*, Ellen Leich, Maritta Küspert, Daniel Murphy, Christian Langer, Roland Moll, Sigfried Janz, Anja Mottok, Susann Weißbach, Andreas Rosenwald, Ralf Bargou und Kurt Bommert

The feed-forward loop between YB-1 and MYC is essential for multiple myeloma cell survival.
Leukemia (2013) **27**, 441–50; doi10.1038/leu.2012.185

* gleichberechtigte Erstautorenschaft

Zusammenfassung

Das Y-Box-bindende Protein 1 (YB-1) ist ein Vertreter der hochkonservierten Familie eukaryotischer Kälteschockproteine und ein DNA/RNA-bindendes Protein. In Abhängigkeit von seiner Lokalisation übernimmt es Aufgaben bei der DNA-Transkription oder mRNA-Translation. YB-1 ist ein potentielles Onkogen beim Multiplen Myelom (MM), das in primären MM-Zellen exprimiert ist. Für die funktionellen Untersuchungen von YB-1 in der vorliegenden Arbeit wurden humane Myelomzelllinien (HMZL) verwendet, die als *in vitro* Modell dieser malignen B-Zell-Erkrankung dienen. Aufgrund der potentiellen Expression von YB-1 im Zellkern und/oder Zytoplasma von HMZL, wurde zunächst die Lokalisation des Proteins bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass YB-1 in den HMZL ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert ist. Eine Translokation von YB-1 in den Nukleus kann durch die Serin-Phosphorylierung (Aminosäure 102) in der Kälteschockdomäne induziert werden. Die analysierten Myelomzelllinien zeigen jedoch kein nukleäres YB-1 und keine S102-Phosphorylierung. Diese Ergebnisse stützen die These, dass die Regulation der mRNA-Translation im Zytoplasma die vorherrschende Funktion von YB-1 beim MM ist. YB-1 könnte über diesen Mechanismus seine anti-apoptotische Wirkung vermitteln und die MM-Zellen vor genotoxischem Stress schützen. Um YB-1-regulierte mRNAs zu identifizieren wurden YB-1-Immunpräzipitationen mit zwei HMZL, einer Maus-Plasmozytomzelllinie und einem primären Maus-Plasmazelltumor durchgeführt. Zu den YB-1-gebundenen mRNAs gehören Translationsfaktoren und ribosomale Proteine, die eine starke Beteiligung von YB-1 beim RNA-Metabolismus bestätigen. In der vorliegenden Arbeit wurden spezifisch zwei mRNA-Kandidaten untersucht, die für den malignen Phänotyp von MM-Zellen wichtig sein können: das translationell kontrollierte Tumorprotein TCTP und MYC. Sowohl TCTP als auch MYC wurden bereits in Zusammenhang mit der Proliferation und Apoptose-Resistenz von malignen Zellen beschrieben. Die immunhistochemische Untersuchung der Knochenmarkbiopsien von MM-Patienten ergab eine gute Ko-Expression von YB-1 und TCTP in intramedullären MM-Zellen, während MYC erst in extramedullärem MM-Tumormaterial verstärkt mit der hohen YB-1-Expression korreliert.

Die funktionellen Analysen der Arbeit haben gezeigt, dass YB-1 für die Translation der *TCTP*- und *MYC*-mRNA essentiell ist. Es kontrolliert die Verteilung dieser mRNAs zwischen translationell aktiven und inaktiven *messenger* Ribonukleoprotein-Partikeln. Die shRNA-vermittelte Reduktion von YB-1 führte zur Hemmung der *TCTP*- und *MYC*-Translation in der Phase der Initiation. Um den Einfluss der Kandidaten auf das Überleben der HMZL zu untersuchen, wurden proteinspezifische Knockdown-Experimente durchgeführt. Beim

shRNA-vermittelten TCTP-Knockdown konnten keine Auswirkungen auf die Proliferation oder Viabilität von MM-Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu ist MYC für das Überleben und Wachstum der HMZL ausschlaggebend, denn der MYC-Knockdown induzierte Apoptose. Wie beim YB-1-Knockdown war ein Anstieg der Caspase-Aktivität und der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials in den HMZL nachweisbar. Da es beim MYC-Knockdown gleichzeitig zur einer Reduktion der YB-1-Protein- und mRNA-Expression kam, wurde der Einfluss von MYC auf die Transkription des *YB-1*-Gens untersucht. Mit Hilfe von embryonalen Mausfibroblasten, die ein induzierbares MYC als Transgen besitzen, konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von MYC mit einer Zunahme der *YB-1*-mRNA einher geht. *YB-1* ist somit ein direktes Zielgen des Transkriptionsfaktors MYC.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben zum ersten Mal ein gegenseitiges regulatorisches Netzwerk aufgezeigt, in dem *YB-1* transkriptionell durch MYC reguliert wird und YB-1 für die Translation der *MYC*-mRNA essentiell ist. Die Ko-Expression beider Proteine trägt zum Wachstum und Überleben von malignen Plasmazellen bei.

Summary

The Y-box binding protein 1 (YB-1) is a member of the highly conserved coldshock-domain protein family and a DNA/RNA-binding protein. Therefore YB-1 can be involved in DNA transcription or mRNA translation depending on its localization in the cell. YB-1 is a potential oncogene in Multiple Myeloma (MM) and is expressed in primary MM cells. Human myeloma cell lines (HMCLs), which serve as the *in vitro* model for this B-cell malignancy, were used to functionally characterize YB-1 in MM. In this study it was shown that the YB-1 protein is expressed exclusively in the cytoplasm of HMCLs. Its translocation into the nucleus can be induced through the phosphorylation of a serine residue (amino acid 102) in the coldshock-domain of the protein. The analyzed myeloma cell lines are negative for nuclear YB-1 and the S102-phosphorylation. These results support the hypothesis that the regulation of mRNA translation in the cytoplasm is the primary function of YB-1 in MM. Through this mechanism YB-1 could mediate its anti-apoptotic effects and protect MM cells against genotoxic stress. To identify YB-1 regulated mRNAs in the cytoplasm immunoprecipitations of two HMCLs, one mouse plasmacytoma cell line and one primary mouse plasma cell tumor were performed. YB-1 bound mRNAs include translation factors and ribosomal proteins, which confirms the strong participation of YB-1 in the metabolism of RNAs. In the present study two mRNA candidates were specifically investigated which might be important for the malignant phenotype of MM cells: the translationally controlled tumor protein (TCTP) and MYC. Both, TCTP and MYC have been described in conjunction with proliferation and apoptosis-resistance of malignant cells. The immunohistochemical staining of bone marrow biopsies from MM patients revealed a good co-expression of YB-1 and TCTP in intramedullary MM cells, whereas MYC and YB-1 correlate strongly with each other in extramedullary MM tumors.

The functional analysis of this study showed, that YB-1 is essential for the translation of *TCTP* and *MYC* mRNA. It controls the distribution of these mRNAs between translationally active and inactive messenger ribonucleoprotein particles. The shRNA-mediated reduction of YB-1 expression inhibits *TCTP* and *MYC* translation in the initiation phase. To investigate the influence of the candidates for HMCL survival protein-specific knockdown experiments were performed. The TCTP knockdown showed no effect on proliferation or viability of the analyzed MM cells. In contrast, MYC is crucial for MM cell survival and growth, as the knockdown induced apoptosis. Comparable with the performed YB-1 knockdown experiments apoptosis induction was verified here by an increase of activated caspases and disruption of the mitochondrial membrane potential in HMCLs.

Interestingly, the knockdown of MYC also reduced YB-1 protein and mRNA expression. To investigate the influence of MYC on *YB-1* gene transcription mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from MYC transgenic animals were used. The activation of MYC protein in these cells induced *YB-1* mRNA expression, showing that *YB-1* is a direct target of the transcription factor MYC.

The work presented here revealed for the first time a feed-forward loop of YB-1 and MYC expression in MM cells. In this loop *YB-1* is transcribed by MYC and YB-1 is essential for *MYC* mRNA translation. Consequently, both proteins mutually up-regulate each other via combined transcriptional/translational activity to support cell growth and survival of malignant plasma cells.

1. Einleitung

1.1. Das Multiple Myelom

Das Multiple Myelom (MM, syn. Plasmozytom) ist eine unheilbare maligne Erkrankung terminal differenzierter B-Zellen und gehört zur Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome. Es ist durch die klonale Expansion von – in der Regel Immunglobulin (Ig)-sezernierenden – malignen Plasmazellen charakterisiert. Plasmazytomzellen sind bis auf wenige Ausnahmen überwiegend im Knochenmark lokalisiert und akkumulieren dort. Dabei verdrängen sie die normale Hämatopoese und führen zu Knochendestruktionen (1).

1.1.1. *Epidemiologie*

Mit ca. 10% ist das Plasmazytom die häufigste B-Zell-Erkrankung innerhalb der malignen hämatologischen Erkrankungen (2). In Bezug auf alle malignen Neoplasien wird die relative Häufigkeit in Europa und Nordamerika auf ca. 1% geschätzt (3). Die jährliche Progressionsrate von MGUS zum MM liegt bei 0.6-3% und ist abhängig vom monoklonalen Ig-Level (4). Die Inzidenz des MM beträgt etwa 3-4 Neuerkrankungen/100.000 Einwohner jährlich und ist bei Männern signifikant höher als bei Frauen (5). In Mitteleuropa liegt das Durchschnittsalter bei der Diagnosestellung zwischen 60 und 70 Jahren.

1.1.2. *Pathogenese*

Die Pathogenese des MM ist ein Mehrstufenprozess, der ausgehend von der normalen Plasmazelle durch eine Abfolge genetischer (onkogener) Veränderungen über das Stadium der monoklonalen Gammopathie ungewisser Signifikanz (MGUS) zum symptomatischen MM führt (6, 7).

1.1.2.1. *Normale B-Zell-Entwicklung*

Bei der normalen B-Zell-Entwicklung entstehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark Pro-B- und anschließend Prä-B-Zellen (Abb. 1.1). Diese entwickeln sich zu unreifen B-Zellen mit einer abgeschlossenen VDJ-Rekombination, d.h. der erfolgreichen Umlagerung der V-, D- und J-Gensegmente für die Sequenz der schweren Immunglobulin-Ketten (IgH) und der V- und J-Gensegmente für die leichten Immunglobulin-Ketten (IgL) (8). Unreife B-Zellen exprimieren funktionelle Immunglobuline (IgM) an der Oberfläche und wandern aus dem Knochenmark in die Lymphknoten ein. Bei der anschließenden Reifung führt der Kontakt mit einem Antigen zur Proliferation und Differenzierung in Lymphoblasten. Diese entwickeln sich entweder zu kurzlebigen

Plasmazellen, die innerhalb von drei Tagen dem programmierten Zelltod erliegen oder wandern nach erneutem Kontakt mit einem Antigen in die Keimzentren der Lymphknoten ein. Hier findet die somatische Hypermutation der Ig-Gensequenzen und – durch den Antigenkontakt – eine positive Selektion Antigen-erkennender B-Zellklone statt. Diese positiv selektierten Zellen vollziehen anschließend einen Isotyp „switch“ der Immunglobulin-Schwerkette (IgH) und damit die Umstellung der Ig-Synthese von IgM auf IgG, IgD, IgA oder IgE. Diese so entstandenen Post-Keimzentrums-Plasmazellen wandern zurück ins Knochenmark und entwickeln sich unter dem Einfluss von Interleukin-6 (IL-6) und anderen Zytokinen des Knochenmarkmikromilieus zu langlebigen Ig-produzierenden Plasmazellen.

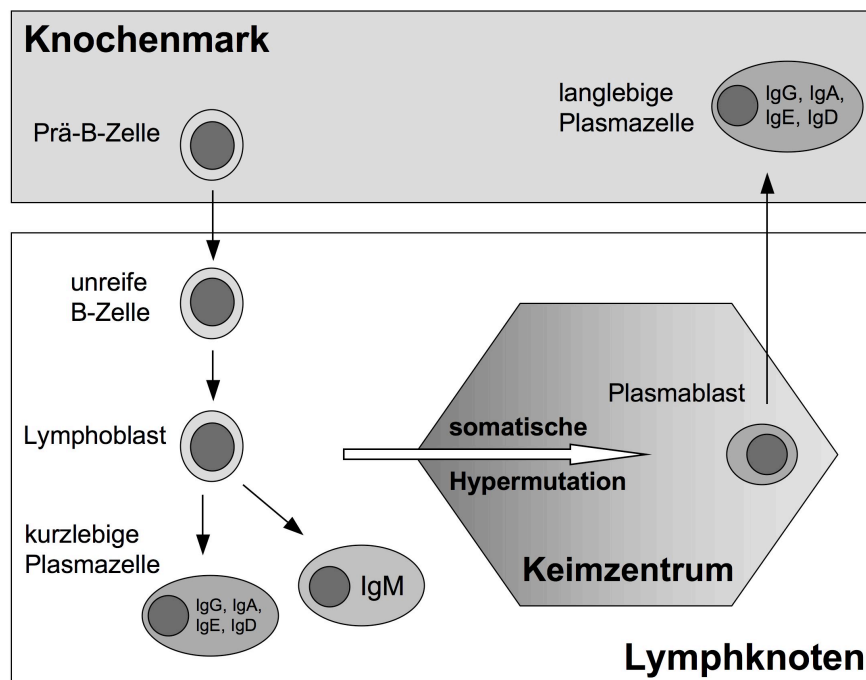


Abb. 1.1: Normale Plasmazell-Entwicklung. Die Prä-B-Zelle entsteht im Knochenmark aus einer hämatopoetischen $CD34^+$ Stammzelle und entwickelt sich über genetische Umstrukturierung zur unreifen B-Zelle, die in die Lymphknoten einwandert. Antigen-Kontakt führt dort zur Entwicklung eines Lymphoblasten, der zu einer kurzlebigen, IgM-sezernierenden Plasmazelle differenziert oder zur IgG-, IgA-, IgE- bzw. IgD-sezernierenden Plasmazelle. Alternativ durchläuft ein Teil der Lymphoblasten im Keimzentrum eine Hypermutation der Ig-Gene und wird positiv auf die Erkennung von Antigenen selektiert. Der entstandene Plasmablast absolviert den IgH „switch“ zu einem anderen Isotyp (IgG, IgA, IgD oder IgE), wandert ins Knochenmark aus und differenziert über Kontakt mit Stromazellen zur langlebigen, Ig-sezernierenden-Plasmazelle. (Abb. modifiziert nach Hallek *et al.* (6))

1.1.2.2. Entwicklung der malignen Plasmazelle

Es ist bisher nicht genau geklärt, in welchem Differenzierungsstadium sich die maligne Transformation ereignet, die der Entwicklung des MM zugrunde liegt. Da die rearrangierten Ig-Gene der malignen Plasmazellen somatisch hypermutiert sind, ist anzunehmen, dass die

onkogene Transformation direkt nach der Entwicklung des Plasmablasten im Keimzentrum der Lymphknoten stattfindet (6, 9, 10).

Der postulierte Mehrstufenprozess zur Entstehung des MM ist durch eine Vielzahl genetischer Läsionen gekennzeichnet, die von Patient zu Patient sehr unterschiedlich sind (2, 6) (Abb. 1.2). Mit der Progression der Erkrankung nehmen die chromosomalen Veränderungen zu, die zur Deregulation des Zellzyklus und Vermeidung des programmierten Zelltods (Apoptose) führen. Man differenziert hierbei zwischen primären, frühen genetischen Veränderungen und sekundären, späten Ereignissen (11).

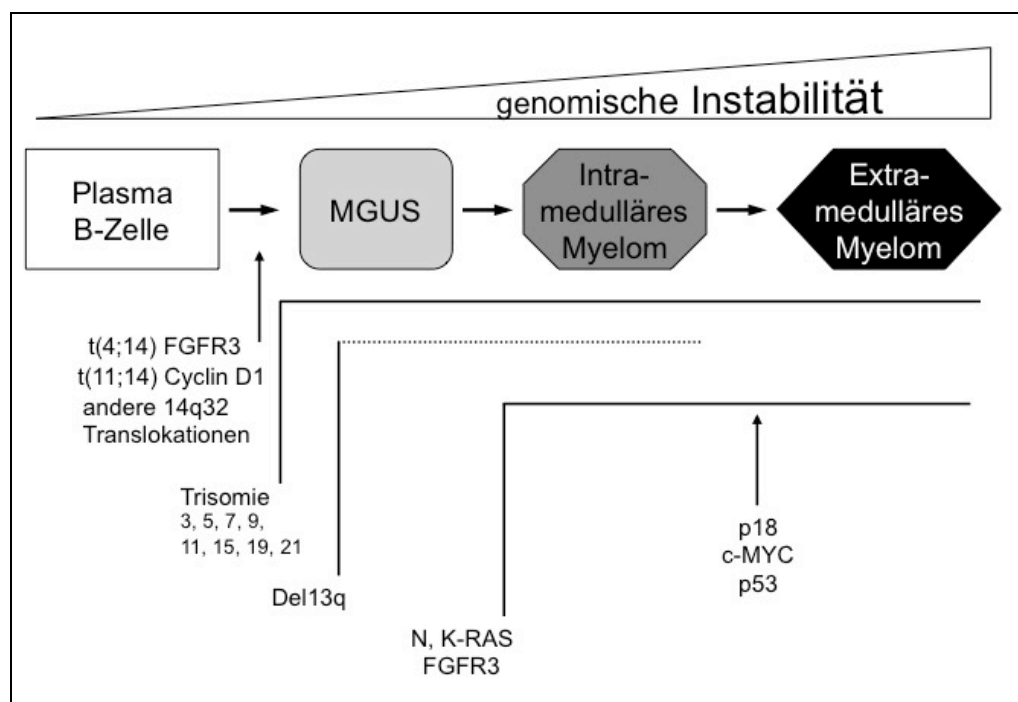


Abb. 1.2: Modell der molekularen Pathogenese des MM. Zusammenfassende Darstellung der möglichen zeitlichen Abfolge genetischer Ereignisse in Relation zum klinischen Fortschreiten des MM. Zu den frühesten Veränderungen, die auch schon in MGUS-Fällen gefunden werden, gehören die 14q32 Translokationen und karyotypische Instabilität (Trisomien). Zu den späteren genetischen Veränderungen gehören aktivierende N- / K-RAS- bzw. *FGFR3*-Mutationen, welche mit ansteigender Inzidenz ab dem Stadium des intramedullären Myeloms auftreten. Mutationen von *p53* und *p18* sowie *c-MYC*-Translokationen werden eher mit aggressiven, extramedullären Myelomen assoziiert. Zeichenerklärung: Pfeil - Ereignisse erfolgen zu einem bestimmten Zeitpunkt; Linie - Assoziation mit einem definierten klinischen Stadium; gestrichelte Linie - genauer Zeitpunkt des Auftretens ist unklar. (Abb. modifiziert nach Hallek *et al.* (6) und Hideshima *et al.* (2))

Zu den frühen Ereignissen zählen chromosomale Translokationen, deren Bruchpunkt oftmals in der Isotyp „switch“-Region des Immunglobulin-Schwerketten (IgH)-Genlokus von Chromosom 14 (14q32) zu finden ist (12-14). Dabei gelangen Proto-Onkogene auf den entsprechenden Partnerchromosomen unter den Einfluss von *Enhancern* der Ig-Gene, werden verstärkt aktiviert und damit zu Onkogenen. Beispiele hierfür sind 11q13 (Cyclin D1, 15%),

6p21 (Cyclin D3), 4p16 (*fibroblast growth factor receptor 3* [FGFR3] und *multiple myeloma SET domain* [MMSET], 15%), 16q23 (c-maf, 5%) und 20q11 (mafB, 2%) (15-19). Diese Ereignisse führen vermutlich zur Entstehung der immortalisierten MGUS-Zelle (20). Das MM ist infolge der starken genomischen Instabilität durch komplexe Karyotypen gekennzeichnet, die sich neben den strukturellen auch durch numerische chromosomale Veränderungen (Aneuploidie, >90% der MM-Fälle (21)) auszeichnen. Dazu gehören zum Beispiel bereits im prä-malignen MGUS-Stadium die Monosomie von Chromosom 13 oder 13q14 Deletionen (22, 23).

Zu den sekundären onkogenen Ereignissen gehören aktivierende *RAS* (*rat sarcoma viral oncogene homolog*)-Mutationen (24, 25), genetische Veränderungen im *MYC* (*myelocytomatosis viral oncogene homolog*)-Lokus (8q24) (26, 27) und die Inaktivierung von *p53* durch Deletion oder Mutation (28). Diese Veränderungen können nach dem postulierten Mehrstufenprozess die Transformation der MGUS-Zelle zur neoplastischen Plasmazytomzelle verursachen (2, 6).

1.1.3. Symptome, Diagnose und Klassifikation

Die klinische Symptomatik der frühen Krankheitsstadien ist uncharakteristisch. Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung treten Knochenschmerzen mit abnormer Frakturneigung, Kachexie (Gewichtsverlust), Infektanfälligkeit, Anämie und eine eingeschränkte Nierenfunktion als typische Symptome auf.

Die klinische Diagnostik des MM setzt sich aus folgenden Untersuchungen zusammen: Nachweis monoklonaler Immunglobuline im peripheren Blut, Konzentrationsbestimmung von Leichtketten im Urin, Knochenmarkpunktion vom Beckenkamm für die zytologische und histologische Diagnostik, Röntgen des Skeletts sowie Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT). Bei der konventionellen Röntgenuntersuchung werden Osteolysen bzw. ein Schwund der Knochendichte nachgewiesen. Die CT-Untersuchung dient der Beurteilung der Knochenstabilität, während mittels MRT die Plasmazell-Infiltration der Knochen relativ frühzeitig nachgewiesen werden kann.

Die Diagnose „Multiples Myelom“ gilt nach Ossermann als gesichert, wenn die Befunde zwei der folgenden Kriterien erfüllen:

- mehr als 10% Plasmazellen im Knochenmark-Ausstrich
- Nachweis monoklonaler Antikörper im Blut und Urin
- lytische Läsionen an mindestens drei Stellen des Skelettsystems oder verstärkte Knochendestruktionen (Osteoporose)
- die histologische Auswertung der Knochenmarkpunktion ergibt Plasmazellinfiltrate

Zur Einschätzung der Prognose und Festlegung der Behandlungsindikation des Plasmozytoms wurden im Wesentlichen drei Klassifikationssysteme entwickelt: die Klassifikation nach Durie und Salmon (29), die ISS-Klassifikation (*International Staging System* (30)) und die Einteilung der *International Myeloma Working Group* (IMWG).

Das Einteilungssystem von Durie und Salmon berücksichtigt klinische Parameter in Korrelation zur gemessenen Plasmozytomzellmasse (Gesamtzahl von Plasmozytomzellen im Körper). Die ISS-Klassifikation stellt für Patienten mit einem behandlungsbedürftigen Myelom eine prognostische Stratifikation dar, die auf den prognostisch relevanten Faktoren β_2 -Mikroglobulin und Albumin basiert. Bei der überwiegend verwendeten Einteilung der IMWG werden die nicht-behandlungsbedürftigen MGUS-Fälle und „smoldering“ MM vom symptomatischen, behandlungspflichtigen MM abgetrennt (Tab. 1.1). Für die Klassifikation ist das Vorhandensein von sogenannten Endorganschäden entscheidend. Diese umfassen die Parameter Serum-Kalzium (Hyperkalzämie), Niereninsuffizienz, Anämie und Knochenbeteiligung (Osteolysen), woraus eine Therapieindikation abgeleitet wird.

Tab. 1.1: Klassifikation der *International Myeloma Working Group*.

Bezeichnung	Kriterien
MGUS	- M-Protein im Serum < 30g/l - klonale Plasmazellen im Knochenmark < 10% - kein Gammopathie-assoziiertes Endorganschaden
„smoldering“ MM	- M-Protein im Serum \geq 30g/l - klonale Plasmazellen im Knochenmark \geq 10% - kein Myelom-assoziiertes Endorganschaden
symptomatisches MM	- M-Protein im Serum und/oder Urin - klonale Plasmazellen im Knochenmark - > 90% Plasmazellen mit aberrantem Phänotyp - Myelom-assoziiertes Endorganschaden

1.1.4. Therapie

Beim Plasmozytom handelt es sich um eine - mit bisherigen konventionellen Therapien - unheilbare Erkrankung, deren Behandlung im Wesentlichen auf eine Verlängerung des Überlebens und eine Verbesserung der Lebensqualität ausgerichtet ist.

Ab dem Auftreten von myelombedingten Endorganschäden, d.h. dem Übergang der Erkrankung in ein symptomatisches Stadium, wird unverzüglich die Behandlung eingeleitet. Hierfür stehen zwei Gruppen von Therapieoptionen zur Verfügung: Hochdosis-Chemotherapie (HDCT) mit unterstützender autologer Stammzelltransplantation und Chemotherapie in Standarddosierung, aktuell auch meist in Kombination mit neueren

Substanzen. Neu diagnostizierte Patienten unter 65 Jahre und Patienten über 65 Jahre mit einem guten Allgemeinzustand erhalten eine HDCT mit anschließender autologer Stammzelltransplantation, sofern keine Kontraindikation vorliegt. Es konnte gezeigt werden, dass dadurch das Überleben der Patienten gegenüber der konventionellen Chemotherapie signifikant verlängert wird (31-34).

Patienten, die für eine HDCT nicht in Frage kommen, werden nach dem klassischen Therapieschema mit Melphalan in Kombination mit dem Glucocorticoid Prednison behandelt (35, 36). Neuere nicht-genotoxische Substanzen wie Proteasominhibitoren (Bortezomib) oder immunmodulierende Substanzen (Thalidomid, Lenalidomid) wurden bereits in den letzten Jahren in die Therapie eingeführt und Patienten, bei denen die herkömmliche Behandlung nicht mehr wirkt, zeigen gute Ansprechraten (37).

1.1.5. *Prognose*

Die mittlere Überlebenszeit für MM-Patienten liegt untherapiert bei 6-12 Monaten und verlängert sich nach einer konventionellen Chemotherapie auf 19-50 Monate (38, 39). Mit einer Intensivierung der Therapie durch eine erhöhte Melphalan-Dosis oder die Kombination mit anderen Zytostatika wird die Remissionsrate, nicht aber die Überlebenszeit der Patienten verbessert (36, 39, 40). Fünf Jahre nach der initialen Chemotherapie befinden sich nur ca. 20% der Patienten in Remission, und auch nach einer erfolgreichen HDCT erreichen nur 20-40% eine komplette Remission (31). Ein Großteil erleidet im weiteren Verlauf einen Rückfall (Rezidiv) (41-43). Nach dem ersten Rezidiv oder bei einem progressiven Verlauf der Erkrankung liegt die Ansprechrate auf eine Chemotherapie bei 30-50%. Hierbei beträgt die Dauer der Remission oft weniger als ein Jahr und das mediane Überleben liegt bei 6-17 Monaten (44-46).

1.1.6. *Expression von Onkogenen beim MM*

Innerhalb des progressiven Verlaufs der Erkrankung akquirieren die transformierten Plasmazellen eine Reihe von genetischen Läsionen. Diese aktivieren zusammen mit den wachstumsstimulierenden Faktoren (Zytokinen etc.) des Knochenmarkmikromilieus Proteine und Signalwege, die das Überleben und die Proliferation von MM-Zellen fördern.

Zu den am häufigsten deregulierten Signalwegen beim MM gehören der *AKT*- und der *RAS/MAPK*-Signalweg. Ungefähr die Hälfte der primären MM-Proben weisen einen *AKT*-abhängigen, phospho *AKT*-positiven Phänotyp auf (47), der das Überleben der MM-Zellen entscheidend mitbestimmt (47, 48). Unabhängig vom *AKT*-Status treten aktivierende *RAS*-

Mutationen in 30-50% der primären MM auf (24, 25, 49), wobei eine *RAS*-Aktivierung mit einem aggressiven Phänotyp sowie einer schlechten Prognose assoziiert wird (24, 50-52).

In ca. der Hälfte der MM-Tumore führt eine primäre Chromosomentranslokation zur deregulierten Expression eines Onkogens und damit entweder direkt (11q13 - Cyclin D1, 6p21 - Cyclin D3) oder indirekt (4p16, 16q23 oder andere - Cyclin D2) zur aberranten Cyclin D-Expression. In der anderen Hälfte der Plasmozytome ist zumeist Cyclin D1 durch einen bisher unbekanntem Mechanismus überexprimiert (53). Die Cycline D1 bis D3 sind wichtige Zellzyklusregulatoren und bereits die Deregulation eines Cyclin D-Gens sensibilisiert die Zellen für proliferative Stimuli (2). Darüber hinaus führen die Translokationen t(8;14) von *c-MYC* und die t(4;14) von *FGFR3* ebenfalls zur verstärkten Onkogen-Expression und werden häufig mit dem MM assoziiert. Beide Proteine spielen bei der Zellproliferation und Differenzierung eine wichtige Rolle (6).

Die immunhistochemischen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass gerade in den fortgeschrittenen Stadien und in stark proliferierenden MM-Zellen ein weiteres potentielles Onkogen exprimiert wird - das Y-Box-bindende Protein 1 (YB-1) (54).

1.2. Das Y-Box-bindende Protein 1 (YB-1)

Das multifunktionelle Y-Box-bindende Protein 1 (YB-1) gehört zur Familie der Kälteschockproteine, die eine evolutionär stark konservierte Kälteschockdomäne besitzen. Diese Domäne wurde erstmals für prokaryotische Proteine beschrieben, die als Antwort auf einen Kälteschock induziert werden (55). Während Y-Box Proteine in anderen Bereichen keine signifikante Homologie besitzen, stimmen die Aminosäuresequenzen der Kälteschockdomänen verschiedener Spezies zu mehr als 90% überein (56-58). Kälteschockproteine weisen eine hohe Bindungsspezifität für die Y-Box-Sequenz (5'-CTGATTGG-3') auf, ein DNA-Motiv, das im Promotorbereich einer Vielzahl von unterschiedlichen Genen zu finden ist (59-63). Das humane YB-1 wurde erstmals 1988 isoliert und als Transkriptionsfaktor beschrieben, der an die Y-Box im Promotor des *major histocompatibility complex* (MHC)-Klasse-II Gens bindet (59). YB-1 besitzt zudem eine hohe RNA-Bindungsaffinität und wurde im Zytoplasma von Säugerzellen als Hauptbestandteil von *messenger ribonucleoprotein* (mRNP)-Komplexen identifiziert (64-66).

1.2.1. Genomische Organisation und YB-1-Gen-Regulation

Das humane *YB-1*-Gen ist auf Chromosom 1 (1p34) lokalisiert (67) und überspannt ca. 19 kb der genomischen DNA (68) (Abb. 1.3). Der *YB-1*-Gen-Promotor ähnelt strukturell Promotoren von *housekeeping* Genen. Er besitzt mehrere E-Boxen (5'-CATCTG-3') und CG-Wiederholungen, die für die *YB-1*-Transkription wichtig sind (67). Das *YB-1*-Gen weist 8 Exons auf, von denen die Exons 1-5 für die Kälteschockdomäne kodieren (68). Die reife *YB-1*-mRNA besitzt eine Länge von 1546 Nukleotiden mit einem kodierenden Bereich zwischen den Nukleotiden 172 und 1146 (NCBI Reference Sequence NM_004559.3).

Die genaue Ursache der *YB-1*-Expression in malignen Zellen ist noch nicht geklärt. Es gibt auch für das MM keine Hinweise auf chromosomale Aberrationen wie Gen-Amplifikationen oder Ähnliches (C. Langer, persönliche Mitteilung). Der Literatur nach wird bisher von einer transkriptionellen *YB-1*-Aktivierung ausgegangen. Zum Beispiel bindet der Transkriptionsfaktor GATA-1 in der 5'-nichttranslatierten Region (5'-NTR) des *YB-1*-Gens und aktiviert dadurch den *YB-1*-Promotor (69). Shiota *et al.* haben gezeigt, dass die Bindung des Transkriptionsfaktors Twist an E-Boxen im *YB-1*-Promotor seine Transkription stimuliert (70). Auch eine p73-vermittelte verstärkte Rekrutierung des c-Myc-Max-Komplexes an die E-Boxen kann die *YB-1*-Transkription aktivieren (71).

Die post-transkriptionelle Regulation der YB-1-Synthese erfolgt über die 5'- und 3'-NTR der *YB-1*-mRNA (72). So zeigten Skabkina *et al.* z.B., dass YB-1 selbst und das Poly(A)-

bindende Protein (PABP) ein ca. 80 Nukleotide langes Motiv in der 3'-NTR von *YB-1* binden. Sie konkurrieren dort um einen überlappenden Sequenzbereich. Bei einem PABP-Überschuss wird YB-1 vom 3'-Ende der mRNA verdrängt und die hemmende Wirkung auf die *YB-1*-Translation aufgehoben (73, 74).

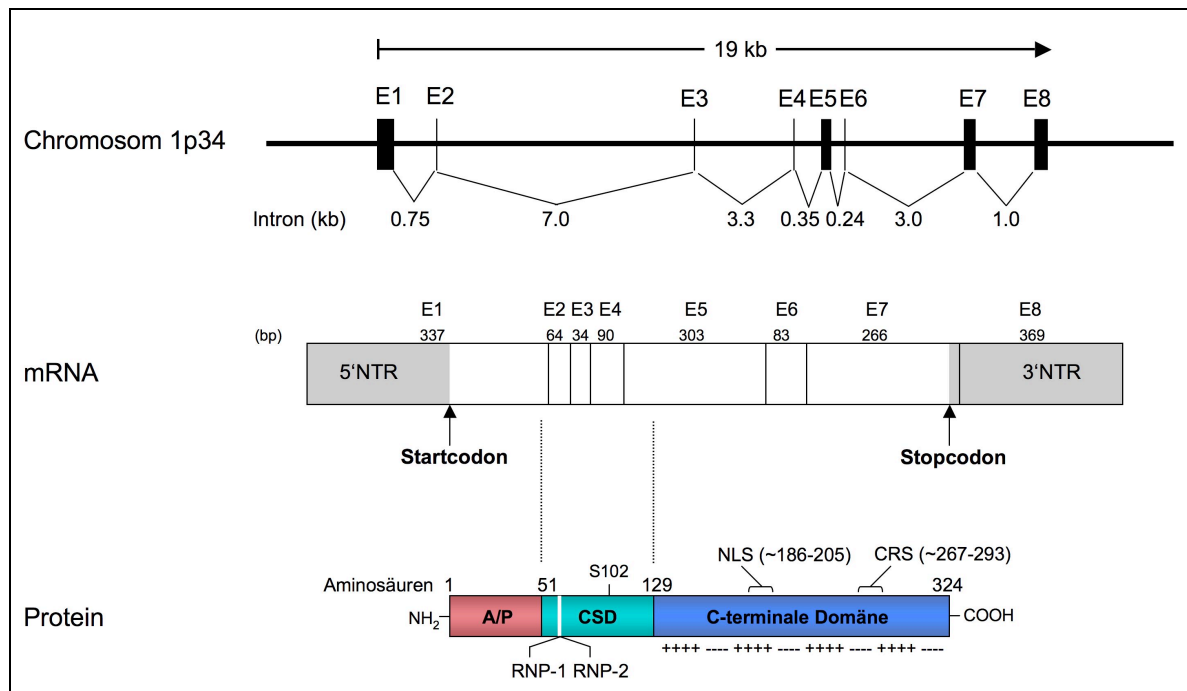


Abb. 1.3: Struktur der genomischen DNA, mRNA und des Proteinprodukts YB-1. Das *YB-1*-Gen auf Chromosom 1 ist 19 kb groß und besitzt acht Exons. Das *YB-1*-Protein besteht aus 324 Aminosäuren, die in drei Domänen unterteilt werden (A/P, CSD und CTD). In der CSD befinden sich die RNA-bindenden Motive RNP-1/2 und die Phosphorylierungsstelle Serin 102. Die CTD ist aus vier alternierenden Gruppen von positiv- und negativ-geladenen Aminosäureresten aufgebaut und enthält Sequenzen, die die Kern- bzw. Zytoplasma-Verteilung des Proteins beeinflussen (NLS, CRS). (modifiziert nach Kuwano *et al.* (75))

1.2.2. Proteinstruktur

Das humane *YB-1* besteht überwiegend aus den Aminosäuren Arginin (12%), Glycin (12%), Prolin (11%) sowie Glutaminsäure (8%) und migriert im SDS-Gel, trotz der berechneten molekularen Masse von 35,9 kDa, als Protein mit einer Masse von ca. 50 kDa.

YB-1 ist aus drei Domänen aufgebaut, die für unterschiedliche Funktionen des Proteins verantwortlich sind (Abb. 1.3).

Die variable N-terminale Domäne ist reich an den Aminosäuren Alanin und Prolin (A/P). Für diese Domäne wurde eine Interaktion mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts nachgewiesen (76), wodurch *YB-1* bei der Entstehung von numerischen Chromosomenaberrationen (Aneuploidie) eine Rolle spielen könnte (77).

Die Kälteschockdomäne (*cold shock domain*, CSD) von YB-1 bildet fünf antiparallele β -Faltblattstrukturen aus, die einen antiparallelen β -barrel und ein dreisträngiges β -Faltblatt formen (58). Die CSD ist für die Interaktion mit DNA (57, 78-81) bzw. RNA verantwortlich (81-83) und besitzt zwei RNA-bindende Motive – RNP-1 (84) und RNP-2 (58, 84). Die CSD besitzt eine Phosphorylierungsstelle an Serin 102 (S102) für Akt-Kinase und die p90 ribosomalen S6 Kinasen RSK1/2. Diese S102-Phosphorylierung interferiert mit der Cap-Bindungsfähigkeit von YB-1 und führt zur verstärkten Kernlokalisierung in Mamma- und Ovarialkarzinom-Zelllinien (85-89).

Die hydrophile C-terminale Domäne (CTD) begünstigt die DNA-/RNA-Bindung und ist an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt (58, 81, 90). Sie besteht aus vier alternierenden Gruppen von jeweils ca. 30 positiv- und negativ-geladenen Aminosäureresten (91). Diese Wiederholungen von basischen/sauren Aminosäuren sind ein gemeinsames Merkmal von Proteinen, die Ribonukleoprotein-Komplexe binden, und zwischen Kern und Zytoplasma pendeln (91). Die CTD besitzt zwischen den Aminosäuren 186 und 205 ein nicht-kanonisches *nuclear localization signal* (NLS) und eine *cytoplasmic retention site* (CRS) zwischen den Aminosäuren 267 und 293. Es wurde gezeigt, dass diese Sequenzen die Zellkern- und Zytoplasma-Verteilung von YB-1 regulieren (61, 92). Ein Großteil von YB-1 ist in der Regel im Zytoplasma lokalisiert, da die Effekte der CRS überwiegen. Vermutlich erfolgt eine Oligomerisierung von YB-1 über die Interaktion gegensätzlich geladener Aminosäure-Gruppen der CTDs mehrerer Proteinmoleküle. Dadurch können Oligomere mit einer Masse von bis zu 800 kDa entstehen (79, 93). Die CTD ist außerdem für die Bildung von mRNP-Komplexen zur Lagerung von mRNA verantwortlich (90).

1.2.3. Funktionen von YB-1

YB-1 kontrolliert abhängig von seiner intrazellulären Lokalisation die Proteinbiosynthese auf zwei Ebenen: im Zellkern die Transkription und im Zytoplasma die Translation.

1.2.3.1. Zellkern

Ein signifikanter Anteil von YB-1 kann als Antwort auf verschiedene intra- und extrazelluläre Signale in den Zellkern wandern. Diese Kerntranslokation von YB-1 ist z.B. Zellzyklus-abhängig oder wird durch UV-Strahlung, DNA-schädigende Substanzen, oxidativen Stress und Hyperthermie induziert (61, 94-97). Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie Interferon γ , begünstigen ebenfalls die Translokation von YB-1 in den Zellkern (87, 98). Dort fungiert es als Transkriptionsfaktor und reguliert die Expression von Genen mit Y-Boxen im Promotor (Tab. 1.2) (57, 59, 99, 100). In Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren wie p21,

activating protein 2 (AP2) und *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) wirkt es als Ko-Aktivator oder -Repressor (101-103). YB-1 ist über die Regulation der Genexpression an zellulären Prozessen wie der Zellteilung, Apoptose, Immunantwort, Multidrug-Resistenz, Stressantwort und dem Tumorwachstum beteiligt (97, 104-109). Es bindet neben der Y-Box auch andere DNA-Sequenzen und besitzt eine wesentlich höhere Affinität für Einzelstrang-DNA als für DNA-Doppelstränge (79, 80, 110, 111). Zudem kann YB-1 über die Interaktion mit *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), einem Bestandteil des Nukleotid-Exzisionsreparatur-Systems, bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielen (112-114) (Abb. 1.4). Seine Funktion bei der DNA-Replikation wird primär durch indirekte Daten gestützt, denn steigende YB-1-Level korrelieren mit einer erhöhten Expression von DNA-Topoisomerase II α und DNA-Polymerase α (107, 115).

Tab. 1.2: Transkriptionell regulierte YB-1 Zielgene.

Reguliertes Gen	Effekt auf die Transkription	Referenz
α -Aktin	Hemmung	(116)
MHC Klasse II	Hemmung	(59, 117-119)
Cyclin A und B1	Aktivierung	(61)
DNA-Polymerase α	Aktivierung	(107)
Matrix Metalloproteinase 2	Aktivierung	(102, 120)
MDR1 (<i>multiple drug resistance 1</i>)	Aktivierung	(60, 97, 104, 106, 121)
MRP-1 (<i>multi-drug resistance-related protein-1</i>)	Aktivierung	(97)
GRP78 (<i>glucose-regulated protein 78kDa</i>)	Hemmung	(122)
VEGF (<i>vascular endothelial growth factor</i>)	Hemmung	(123, 124)

1.2.3.2. Zytoplasma

RNA-Bindung: YB-1 ist im Zytoplasma der Hauptbestandteil von Ribonukleoprotein-Komplexen (125, 126) und damit ein wichtiges Verpackungsprotein für mRNAs (125, 127). Es reguliert ihre Stabilität (128, 129) und die Zugänglichkeit für den Translationsapparat (130, 131) (Abb. 1.4). YB-1 besitzt eine hohe Bindungsaffinität für eine Vielzahl von RNA-Sequenzen (72) und zeigt bei Homopolyribonukleotiden die höchste Affinität für poly(G), gefolgt von einer abnehmenden Bindungsaffinität für poly(U), poly(A) und poly(C) (125, 131). Im Gegensatz zu den bisherigen Daten, die 5'-UCCA(G/A)CAA-3' als YB-1-

Bindungsmotiv postulierten (74), hat eine aktuelle Publikation gezeigt, dass YB-1 bevorzugt eine komplexe Kombination der Ribonukleotide G, C und U bindet (132). Die Autoren verwendeten eine neue Methode zur systematischen Analyse der sequenzspezifischen RNA-Bindung von RNA-Bindungsproteinen (RBPs). In einer einzigen Bindungsreaktion kann damit die relative Präferenz von RBPs für kurze RNA-Nukleotide bestimmt werden. Die Ergebnisse dieser Veröffentlichung werden unter anderem durch Daten von Jenkins *et al.* und Evdokimova *et al.* gestützt (133, 134). Diese zeigten, dass YB-1 G/C-reiche Nukleotid-Cluster in der 5'-NTR der *TGF-β(1)*- bzw. *Snail 1*-mRNA bindet.

mRNA-Verpackung und -Stabilisierung: Die mRNAs im Zytoplasma von eukaryotischen Zellen liegen als mRNP-Partikel (mRNPs) vor, deren Hauptbestandteil neben PABP auch YB-1 ist (125, 127). Diese mRNPs enthalten eine Vielzahl von Proteinen, die bestimmte Sequenzen oder Elemente der Tertiärstruktur, zumeist in der 5'- und 3'-NTR, individueller mRNAs erkennen. Die Stabilisierung dieser mRNAs erfolgt vermutlich über die Blockade der 5'- und 3'-Enden, da diese innerhalb der gebildeten mRNPs unzugänglich für RNasen sind (126). Ein Beispiel dafür ist die YB-1-abhängige, erhöhte mRNA-Stabilität von *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Als Antwort auf Zytokin- und Hypoxie-induzierten Zellstress bindet YB-1 zusammen mit dem Polypyrimidintrakt-bindenden Protein 1 (PTB-1) an spezifische, überlappende Sequenzen in der 5'- und 3'-NTR der mRNA und steigert so die *VEGF*-Stabilität. Damit gewährleistet es bei der Angiogenese eine beständige VEGF-Proteinexpression (135).

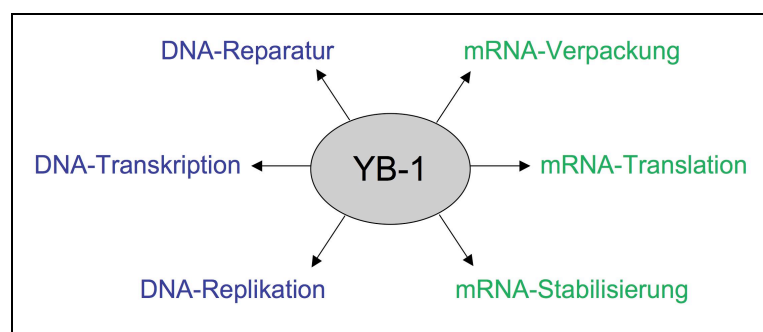


Abb. 1.4: Funktionen von YB-1 im Zellkern (blau) und Zytoplasma (grün) humaner Zellen. YB-1 kann sowohl DNA als auch RNA binden und reguliert abhängig von seiner Lokalisation in der Zelle verschiedene zelluläre Prozesse. Dazu zählen unter anderem die DNA-Reparatur, -Replikation und -Transkription im Zellkern sowie die mRNA-Verpackung, -Stabilisierung und -Translation im Zytoplasma.

mRNA-Translation: Die Ribonukleoprotein-Komplexe können anhand der gebundenen YB-1-Menge in zytoplasmatische, nicht-translatierte und polysomale, translatierte mRNPs eingeteilt werden. Bei polysomalen mRNPs liegt das YB-1:mRNA-Verhältnis bei ca. 2 mol Protein/mol mRNA (65, 131). Die YB-1-Menge in zytoplasmatischen mRNPs ist mindestens doppelt so hoch und liegt bei ca. 4:1 bis 6:1 (65, 125, 136). YB-1 kann die Proteinbiosynthese abhängig von diesem YB-1:mRNA-Verhältnis sowohl stimulieren (**A**) als auch inhibieren (**B**) (131, 137).

A) Ein niedriges YB-1:mRNA-Verhältnis in polysomalen mRNPs begünstigt die mRNA-Translation (65, 131, 138). YB-1 interagiert mit der mRNA als Monomer über die zwei RNA-bindenden Domänen CSD und CTD (126). Es ist in der Initiationsphase entweder für die Anlagerung der 60S ribosomalen Untereinheit oder für das vorherige Scannen der 5'-NTR durch den 43S prä-Initiationskomplex wichtig (65). Auf der einen Seite verhindert YB-1 vermutlich die unspezifische Bindung von eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren (eIFs) über die gesamte mRNA und reguliert so ihre Akkumulation an der Cap-Struktur und 5'-NTR (131, 139). Auf der anderen Seite erleichtert es anscheinend die Bewegung der kleinen ribosomalen Untereinheit entlang der 5'-NTR bis hin zum Startcodon. Hierzu katalysiert es die Öffnung der mRNA-Sekundärstruktur, indem es diese destabilisiert (65, 72, 93, 138). YB-1 wird aufgrund dieser Eigenschaft auch als RNA-Chaperon bezeichnet (140, 141). Die Chaperon-Wirkung von YB-1 ist außerdem bei der Cap-unabhängigen Translation über die *internal ribosome entry site* (IRES) spezifischer mRNAs von Bedeutung. Die IRES ist eine ausgeprägte Sekundärstruktur in der mRNA und ermöglicht bei der Translationsinitiation eine mRNA-Bindung der ribosomalen Untereinheit 40S unabhängig von der Cap-Struktur (142). Über IRES-Strukturen kann die selektive Synthese bestimmter Proteine in Stresssituationen erfolgen, wenn die Cap-abhängige Translation durch die zellstressbedingte Modifikation der eIFs und ihrem damit verbundenen Aktivitätsverlust beeinträchtigt ist (86, 143). Bei diesem Mechanismus der Translationsinitiation wird die 40S ribosomale Untereinheit direkt zur IRES und den dort gebundenen IRES *trans*-aktivierenden Faktoren (ITAFs) rekrutiert. YB-1 ist neben PTB-1 eins von vier weiteren ITAFs, das z.B. spezifisch mit der *MYC*-IRES interagiert und die mRNA-Translation stimuliert (144, 145). YB-1 reguliert außerdem die Translation von IRES-enthaltenen mRNAs wie *Snail 1*, *Twist* und *HIF1 α* , die bei der epithelialen-mesenchymalen Transition wichtig sind (134, 146, 147). Es trägt damit entscheidend zum metastatischen Tumorwachstum bei, denn es fördert so den Übergang von einem nicht-invasiven zu einem invasiven mesenchymalen Phänotyp beim Mammakarzinom (134).

B) Bei einem hohen YB-1:mRNA-Verhältnis (freie, zytoplasmatische mRNPs) begünstigt YB-1 die doppelsträngige RNA-Konformation (136) und hemmt damit die Proteinsynthese (148, 149). Die Hemmung erfolgt in der Phase der Initiation, indem die Translationsinitiationsfaktoren eIF4E und eIF4G von der mRNA verdrängt werden (86, 128, 148, 150). YB-1 interagiert mit der Cap-Struktur der mRNA bzw. mit benachbarten Bereichen hauptsächlich über die CSD, während die CTDs vermutlich miteinander interagieren. Dies führt zur Bildung von großen multimerischen YB-1/mRNA-Komplexen, die aus ca. 15-18 Proteinmolekülen bestehen und die mRNA-Enden unzugänglich für die Interaktion mit Proteinen des Translationsinitiationsapparates maskieren (126). Viele YB-1-assoziierte mRNAs, die im Pool translationell inaktiver mRNPs enthalten sind, kodieren für Proteine, die bei der Stressantwort eine Rolle spielen und das Überleben der Zellen sichern (86).

Zusätzlich zur globalen Beeinflussung der Proteinsynthese kann YB-1 die Translation auch selektiv hemmen, indem es RNA-Sequenzen in der 3'-NTR bindet (74). Ein Beispiel hierfür ist die Autoregulation der YB-1-Proteinsynthese, bei der ein Überschuss von YB-1 im Vergleich zur vorhandenen PABP-Menge am mRNA 3'-Ende die Translation inhibiert (73, 74).

1.2.4. YB-1-Expression in normalen und malignen Geweben

YB-1 und die orthologen Y-Box-bindenden Proteine anderer Eukaryoten werden entwicklungs- und gewebespezifisch unterschiedlich exprimiert (56, 57, 151) (Tab. 1.3). Das humane YB-2/Contrin ist hauptsächlich in den Keimzellen und in den frühen Entwicklungsstadien der Embryogenese exprimiert. Das Homolog FRGY2 von *Xenopus laevis* ist ebenfalls keimzellspezifisch und in adulten Tieren nur in den Ovarien und Testis nachweisbar (152). Neben dieser keimzellspezifischen Expression ist humanes YB-3 z.B. eher ubiquitär in adulten Geweben wie Herz, Muskel und Testis zu finden.

Tab. 1.3: Homologe Y-Box-bindende Proteine für Mensch, Maus und Frosch.

	YB-1	YB-2	YB-3
<i>Homo sapiens</i>	YBX1; dbpB; CsdA2; NSEP1	YBX2; Contrin; dbpC; CsdA3	dbpA; CsdA1; Zonab
<i>Mus musculus</i>	MSY-1; dbpB; EF1A; Nsep1	MSY-2	MSY-3/4; dbpA; csdA
<i>Xenopus laevis</i>	FRGY1	FRGY2; p54	YB-3

YB-1 wird in den Phasen erhöhter Proteinsynthese benötigt und ist wichtig für die zelluläre Antwort auf verschiedenste Stressfaktoren. Es wird daher verstärkt während der Embryogenese exprimiert und zeigt ein ubiquitäres Expressionsmuster in somatischen Zellen, primär jedoch in aktiv proliferierenden sowie malignen Geweben (153-155). Der *YB-1*-Genknockout in der Maus hat gezeigt, dass es essentiell für die normale Embryonalentwicklung ist, da YB-1-defiziente (*YB-1*^{-/-}) Mäuse spät in der Embryogenese (Embryonaltag 18.5) oder postnatal an Tag 1 sterben (156, 157). Auch das Maus-Homolog MSY4, das parallel zu YB-1 während der Embryogenese exprimiert wird, kann die YB-1-Knockout-induzierte Letalität nicht verhindern (156). MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) von *YB-1*^{-/-}-Mäusen sind wesentlich empfindlicher gegenüber oxidativem, genotoxischem und Onkogen-induziertem Stress (157). Hohe YB-1-Level sind typisch für alle Mausorgane, sowohl pränatal als auch in den frühen postnatalen Stadien. Die Proteinexpression verringert sich schrittweise mit zunehmendem Alter. Diese graduelle Abnahme der Expressionslevel von YB-1 wurde auch bei der Entwicklung leukämischer Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen beobachtet. YB-1 ist als Transkriptionsfaktor in den hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert und wird in den myeloiden Vorläuferzellen während der myeloiden Differenzierung wieder herunterreguliert (158).

Eine Re-Expression des Proteins wurde wiederholt für maligne Zellen dokumentiert. Es ist dort abhängig vom Tumormodell im Zytoplasma und/oder Zellkern nachweisbar. Inzwischen gilt YB-1 aufgrund der hohen mRNA- und Protein-Expression in malignen Geweben als wichtiger prognostischer Tumormarker (159-165). Zum Beispiel gehen beim Osteosarkom (166), Melanom (163), Prostata- (167), Ovarial- (168), Lungen- (169, 170) und Mammakarzinom (121, 162, 165, 171, 172) malignes Wachstum und der Krankheitsverlauf mit einer signifikant ansteigenden YB-1-Expression einher. In einem transgenen Mausmodell wurde zudem gezeigt, dass die YB-1-Überexpression mit einer Penetranz von 100% Mammakarzinome auslöst (77) und das Tumorstadium von Mammakarzinomzellen durch die ektopische YB-1-Expression stimuliert wird (85). Die YB-1-Überexpression wird deswegen nicht nur als Folge einer onkogenen Transformation betrachtet, sondern auch als eine mögliche Ursache dafür (134).

Die nukleäre Lokalisation von YB-1 ist ein Indikator von aggressiveren und fortgeschritteneren malignen Tumoren (160-163, 167, 169, 173-175), denn es reguliert im Zellkern die Expression verschiedener Proliferations- (**A**) und Tumorprogressions- (**B**) sowie Arzneimittelresistenz-vermittelnder (**C**) Gene. Diese können entscheidend zum Überleben und Wachstum der malignen Zellen beitragen.

A) Viele wachstumsassoziierte Gene enthalten Y-Box-Motive im Promotor, die YB-1 transkriptionell aktivieren kann. Dazu zählen die Gene für die Thymidinkinase (176, 177), das Protein PCNA (178, 179), den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors EGFR (62, 63) und die DNA-Polymerase α (180). YB-1 beeinflusst außerdem die Transkription von wichtigen Zellzyklus-Regulatoren wie Cyclin A und B1 (61, 181). Der Verlust von YB-1 wiederum hemmt die Cyclin D1-Expression (54, 163) und der Anteil von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus steigt (157, 182). Darüber hinaus korreliert die Kernlokalisierung von YB-1 mit der Expression von Proliferationsmarkern in klinischen Proben (153, 166).

B) YB-1 steigert die Aktivität der *membrane type 1-matrix metalloproteinase* (MT1-MMP) (159) und stimuliert die Transkription der Matrix Metalloproteinase 2 (102). Es wirkt sich daher positiv auf den Prozess der Metastasierung aus, da über Matrix-Metalloproteinasen die Invasion von Tumorzellen und die Zellmigration gefördert wird (159, 183). Andererseits ist bekannt, dass die Hemmung der *YB-1*-Expression in diversen Tumorzellen (Melanom, Glioblastom, Mammakarzinom) ihre Fähigkeit zur Migration und Invasion reduziert (163, 184, 185).

C) Bei der transkriptionellen Regulation von Arzneimittelresistenz-vermittelnden Genen durch YB-1 gibt es widersprüchliche Publikationen (60, 97, 105, 186-189). Allerdings ist belegt, dass die Expression von *YB-1* und *MDR1* durch Stressreize wie Chemotherapie, UV-Strahlung und die Behandlung mit Mitomycin C, Actinomycin D oder Cisplatin stimuliert wird (104, 105, 189-193). Das Produkt von *MDR1* – p-Glykoprotein – ist ein Transmembranprotein, das zur Familie der *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter gehört. Es ist in der Lage, hydrophobe Verbindungen aus den Zellen zu exportieren und vermittelt so eine Arzneimittelresistenz. Die YB-1/p-Glykoprotein Ko-Expression korreliert zudem mit einer negativen Prognose für Patienten mit Osteosarkom, Ovarial- und Mammakarzinom (121, 166, 168, 194, 195).

1.2.5. YB-1 und das Multiple Myelom

Die erste immunhistochemische Analyse der YB-1-Expression in primären Plasmazellen (PZ) hat gezeigt, dass es stark während der normalen B-Zellentwicklung in proliferierenden B-Blasten sowie in einer Untergruppe maligner PZ exprimiert ist. Die malignen PZ waren durch eine unreife Morphologie und einen stark proliferativen, Ki67-positiven Phänotyp gekennzeichnet. Alle im Western Blot getesteten humanen MM-Zelllinien (HMZL) sind zudem YB-1 positiv. HMZL repräsentieren späte, oftmals terminale Stadien des MM, da sie aus extramedullärem Patientenmaterial gewonnen werden (196). In normalen Knochenmark-PZ, prä-malignen PZ von MGUS-Patienten und terminal-differenzierten, nicht-proliferierenden PZ konnte YB-1 nicht nachgewiesen werden. Die YB-1-Expression wurde daher als spätes onkogenes Ereignis des MM und als Zeichen für einen progressiven Verlauf der Erkrankung gewertet. Darüber hinaus wurde mit Hilfe von Knockdown- und Überexpressionsversuchen *in vitro* gezeigt, dass YB-1 die Zellen vor genotoxischem Stress schützt und für das Überleben der malignen PZ von entscheidender Bedeutung ist (54).

Zielstellung

1. YB-1 ist ein DNA-/RNA-bindendes Protein aus der stark konservierten Familie der Kälteschockproteine. In Abhängigkeit von seiner Lokalisation beeinflusst es entweder die DNA-Transkription oder die mRNA-Translation. Erste Hinweise für eine überwiegend zytoplasmatische Expression von YB-1 lieferten die vorangegangenen Untersuchungen primärer Myelomzellen. Allerdings wurde auch eine schwache Kernlokalisation beobachtet. Daraus ergab sich zunächst die Zielstellung, die Expression und die genaue Lokalisation von YB-1 für die im Labor etablierten humanen Myelomzelllinien (HMZL) zu ermitteln.
2. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass YB-1 im Zytoplasma und nicht im Zellkern von HMZL exprimiert ist. Damit ist vermutlich seine Funktion als RNA-bindendes Protein von primärer Bedeutung für das MM. Es sollte daher untersucht werden, ob es in verschiedenen humanen und murinen MM-Modellen spezifische mRNAs bindet und dadurch die Translation dieser Kandidaten beeinflussen kann. Zudem sollte der zugrundeliegende Mechanismus dieser Regulation ermittelt werden.
3. Transiente Knockdown-Versuche haben gezeigt, dass YB-1 essentiell für das Wachstum und Überleben von HMZL ist. Im Verlauf dieser Arbeit sollte der molekulare Hintergrund der Apoptose-Induktion untersucht werden und inwiefern spezifische translationell YB-1-regulierte Proteine darauf einen Einfluss haben. Eine weitere Zielstellung bestand darin, die Bedeutung der Kandidaten für die Lebensfähigkeit von HMZL unabhängig von YB-1 zu analysieren und ihre klinische Relevanz in primären MM-Zellen zu ermitteln.
4. *MYC* wurde in der vorliegenden Arbeit als YB-1-regulierte mRNA validiert und es konnte gezeigt werden, dass die Viabilität der HMZL stark von der *MYC*-Expression abhängt. Zudem wurde beobachtet, dass der *MYC*-Knockdown mit einer Verringerung der YB-1-Expression auf der mRNA- und Proteinebene einhergeht. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob *MYC* direkt als Transkriptionsfaktor für YB-1 fungiert. Da die Expression von YB-1 und *MYC* in den HMZL einander bedingt, war ein weiteres Ziel der Arbeit beide Proteine getrennt voneinander zu analysieren und ihre spezifischen Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der HMZL zu ermitteln.

2. Material und Methoden

Bei der Verwendung von Kits wurden jeweils die Herstellerangaben befolgt und Abweichungen entsprechend benannt.

2.1. Zellbiologische Methoden

2.1.1. Kultivierung humaner Zelllinien

Alle Reagenzien für die Zellkultur wurden von der Firma Life Technologies bezogen.

Die humanen Myelomzelllinien MM.1S und AMO-1 wurden bei 37°C mit einem CO₂-Gehalt von 5% und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zelllinie MM.1S wächst semi-adhärenz, während AMO-1 eine Suspensionszelllinie ist. Das Kulturmedium RPMI 1640 enthielt bereits 2 mM L-Glutamin und wurde mit 10% (MM.1S) bzw. 20% (AMO-1) fötalem Rinderserum (FBS), 1 mM Natrium-Pyruvat, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (oder 100 µg/ml Gentamicin) versetzt.

Die Kultivierung von HEK293T zur Herstellung von lentiviralen Partikeln und der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 erfolgte in 10% FBS DMEM + GlutaMAX-I (4,5 g/l D-Glukose, 25 mM HEPES), 1 mM Natrium-Pyruvat und 50 U/ml Pen/Strep.

2.1.2. Kultivierung muriner Zelllinien

MOPC315.BM.Luc-Zellen wurden in 10% Hitze-inaktiviertem FBS DMEM + GlutaMAX-I (4,5 g/l D-Glukose, 25 mM HEPES), 1 mM Natrium-Pyruvat, 50 U/ml Pen/Strep, 50 µM β-Mercaptoethanol kultiviert. Die Zelllinie wurde von Prof. B. Bogen, Institut für Immunologie, Universität Oslo für die Versuche zur Verfügung gestellt.

Die embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) von homozygoten R26^{MER/MER}- und Wildtyp-Kontroll-Mäusen wurden wie in Murphy *et al.* beschrieben isoliert und in 10% FBS DMEM kultiviert (197). Zur Aktivierung von MYC wurden die Zellen über Nacht in Medium mit 0,2% FBS gehalten und anschließend für 2, 4 bzw. 24 h mit 100 nM 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT, Sigma-Aldrich) stimuliert (Kooperation mit Dr. D. Murphy, Theodor-Boveri-Institut, Universität Würzburg). Nach der entsprechenden Inkubationszeit mit 4-OHT wurden die Zellen 2x mit kaltem PBS gewaschen und bis zur RNA-Isolierung für die *real-time* PCR (siehe 2.3.2) bei -20°C als trockenes Zellpellet gelagert.

2.1.3. Herstellung der stabilen, Doxycyclin-induzierbaren Zelllinie AMO-1-tet

AMO-1-tet wurden mittels lentiviraler Transduktion des pTRIPZshRNA-YB-1-Konstrukts hergestellt, dass eine Doxycyclin-induzierbare shRNA gegen die Nukleotide 946-966 des

humanen YB-1 exprimiert (5'-GCAATGAAGAAGATAAAGA-3', V2HS_232997, Open Biosystem). Entsprechend der Herstellerangaben wurde die shRNA vom pSM2-Vektor in den lentiviralen pTRIPZ-Vektor subkloniert. Die lentiviralen Partikel wurden durch die liposomale Transfektion von HEK293T-Zellen mit den Plasmiden pTRIPZshRNA-YB-1, psPAX2 (Addgene Plasmid 12260) und pMD2.G (Addgene Plasmid 12259) mit Lipofectamin (nach Herstellerangaben, Life Technologies) hergestellt. Der virale Überstand wurde gesammelt und mittels PEG6000 aufkonzentriert. Exponentiell wachsende AMO-1-Zellen (250.000 Z/ml in 2 ml Medium) wurden in 6-*well*-Platten (BD) mit den pTRIPZshRNA-YB-1 Lentiviren in Gegenwart von 4 µg Polybrene transduziert und für 1 h bei 2000 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen über Nacht (ü.N.) im Brutschrank kultiviert und am nächsten Tag ein Mediumwechsel vorgenommen. Fünf Tage nach der Transduktion startete die Selektion der Zellen mit 3 µg/ml Puromycin. Nach 10 Tagen Antibiotikaselektion wurde die Puromycin-resistente Zellsuspension vereinzelt, um Einzelzellkolonien herzustellen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen für die Kultivierung in 96-*well*-Platten verdünnt, sodass in jedem 3. *well* eine AMO-1-Zelle zu einer Einzelzellkolonie heranwachsen kann. Nach 14 Tagen wurden diese Einzelzellkolonien für Western Blot-Analysen 96 h mit 0.75 µg/ml Doxycyclin (Sigma-Aldrich) behandelt und der induzierbare YB-1-Knockdown verifiziert. AMO-1-tet wurden wie AMO-1 in RPMI 1640 kultiviert, jedoch mit 20% Tetracyclin-negativem FBS (Bio&Sell).

2.1.4. *Transiente Transfektion von Myelomzelllinien mittels Elektroporation*

In Vorbereitung auf die transiente Transfektion wurden AMO-1- und MM.1S-Zellen für zwei Tage unter exponentiellen Wachstumsbedingungen kultiviert (max. 250.000 Z/ml). Die Zentrifugationsbedingungen für Waschschriffe etc. waren einheitlich 200 x g für 5 min bei Raumtemperatur (RT) mit maximaler Beschleunigung und Bremse, oder wie angegeben (Heraeus Multifuge 3 S-R). Am Tag der Transfektion wurden pro Ansatz insgesamt 4×10^7 Zellen mit PBS gewaschen und in 1,5 ml RPMI 1640-Medium ohne jegliche Zusätze aufgenommen. Die Konzentration der verwendeten Plasmide kann der Tabelle 2.1 entnommen werden. Da mittels Elektroporation nur ca. 25% der MM-Zellen transfiziert werden, erfolgte eine Ko-Transfektion mit pMACS-LNGFR (Miltenyi Biotec) zur Expression von trunkiertem humanen CD271 (LNGFR). In Vorversuchen wurde gezeigt, dass die transfizierten Zellen 20-24 h nach der Elektroporation LNGFR am stärksten auf der Oberfläche exprimieren, was für die Anreicherung der Zellen über paramagnetische MicroBeads genutzt wurde (MACSelect, Miltenyi Biotec) (siehe 2.1.5). Die Elektroporation von je 500 µl der homogenen DNA/Zellsuspension in 4 mm Küvetten (Bio-Rad) wurde mit

dem Elektroporator Cellject Duo (Thermo Scientific) bei einer konstanten Kapazität von 975 μF und 280 V (AMO-1) oder 300 V (MM.1S) durchgeführt (47). Direkt nach der Elektroporation wurden die Zellen in 50 ml vorgewärmtes Kulturmedium ohne Antibiotikum überführt und ü.N. im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Aufreinigung wie unter 2.1.5 beschrieben durchgeführt.

Tab. 2.1: Verwendete Plasmide und Konzentrationen für die Transfektionsversuche.

Versuchsziel	Kontrolle	Ansatz
YB-1-Knockdown	20 $\mu\text{g/ml}$ pSUPER 13,3 $\mu\text{g/ml}$ pMACS-LNGFR	20 $\mu\text{g/ml}$ pSUPER-YB-1 13,3 $\mu\text{g/ml}$ pMACS-LNGFR
MYC-Knockdown	20 $\mu\text{g/ml}$ pLKO.1 13,3 $\mu\text{g/ml}$ pMACS-LNGFR	20 $\mu\text{g/ml}$ pLKO.1-MYC 13,3 $\mu\text{g/ml}$ pMACS-LNGFR
TCTP-Knockdown	20 $\mu\text{g/ml}$ pSUPER 13,3 $\mu\text{g/ml}$ pMACS-LNGFR	20 $\mu\text{g/ml}$ pSUPER-TCTP 13,3 $\mu\text{g/ml}$ pMACS-LNGFR
YB-1-Expression	20 $\mu\text{g/ml}$ pFC8A 13,3 $\mu\text{g/ml}$ pMACS-LNGFR	20 $\mu\text{g/ml}$ pFC8A-YB-1 13,3 $\mu\text{g/ml}$ pMACS-LNGFR
YB-1-Knockdown -Rescue	1: 33,3 $\mu\text{g/ml}$ pSUPER 20 $\mu\text{g/ml}$ pBABE 10 $\mu\text{g/ml}$ pMACS-LNGFR 2: 13,3 $\mu\text{g/ml}$ pSUPER-YB-1 20 $\mu\text{g/ml}$ pFC8A 10 $\mu\text{g/ml}$ pMACS-LNGFR	13,3 $\mu\text{g/ml}$ pSUPER-YB-1 20 $\mu\text{g/ml}$ pBABE-c-Myc 10 $\mu\text{g/ml}$ pMACS-LNGFR
MYC-Knockdown -Rescue	1: 13,3 $\mu\text{g/ml}$ pLKO.1 20 $\mu\text{g/ml}$ pFC8A 10 $\mu\text{g/ml}$ pMACS-LNGFR 2: 13,3 $\mu\text{g/ml}$ pLKO.1-MYC 20 $\mu\text{g/ml}$ pFC8A 10 $\mu\text{g/ml}$ pMACS-LNGFR	13,3 $\mu\text{g/ml}$ pLKO.1-MYC 20 $\mu\text{g/ml}$ pFC8A-YB-1 10 $\mu\text{g/ml}$ pMACS-LNGFR

Das von Chatterjee *et al.* beschriebene Konstrukt pSUPER-YB-1 exprimiert eine *short hairpin* RNA (shRNA) gegen die Nukleotide (nt.) 1002-1020 der humanen *YB-1*-mRNA (54). Der Vektor pLKO.1-MYC exprimiert eine shRNA die gegen die nt. 1567-1585 der *MYC*-mRNA gerichtet ist und wurde von Dr. M. A. Nikiforov für die Versuche zur Verfügung gestellt (198). Für den transienten TCTP-Knockdown wurden im Rahmen der Doktorarbeit verschiedene shRNAs in den pSUPER-Vektor kloniert (siehe 2.4.2) und in Vorversuchen getestet. Die funktionelle *small interfering* RNA (siRNA) von pSUPER-TCTP richtet sich gegen die nt. 524-542 der humanen *TCTP*-mRNA (offizielles Gensymbol *TPTI*). Das Plasmid pBABE-c-Myc mit einem ATG-Startcodon zur artifiziellen MYC-Überexpression

wurde von Dr. D. Murphy (Theodor-Boveri-Institut, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

2.1.5. Magnetbasierte Aufreinigung von LNGFR-positiven Zellen

Nach der ü.N.-Inkubation wurden die Zellen pelletiert, in 4 ml Kulturmedium in einem 15 ml Tube (Greiner Bio-One) resuspendiert und für die Abtrennung toter Zellen bzw. Zellpartikel einer Dichtegradienten-Zentrifugation unterzogen. Hierzu wurde durch Zugabe von 1,2 ml OptiPrep-Lösung (Axis-Shield), eine homogen durchmischte Zellsuspension hergestellt, die eine höhere Dichte hat als lebende Zellen. Diese wurde mit 7 ml PBS überschichtet und für 5 min bei 1400 x g mit minimaler Beschleunigung und Bremse zentrifugiert. Der Ring an lebenden Zellen befindet sich an der Phasengrenze der OptiPrep-Medium-Suspension und dem PBS. Dieser Ring wurde vorsichtig abgenommen und mit 35 ml PBS gewaschen. Zusätzlich wurden 50 µl Suspension zur Zellzahlbestimmung (siehe 2.2.1) in ein FACS-Röhrchen (Sarstedt) mit 950 µl PBS überführt. Für die Aufreinigung wurde entsprechend dem *MACSelect Transfected Cell Selection*-Protokoll gearbeitet (Miltenyi Biotec) und max. 1×10^7 Zellen in 320 µl PBE aufgenommen, mit 80 µl MACSelect LNGFR-MicroBeads durch vortexen gemischt und 15 min bei 4°C inkubiert. Die Selektion der MicroBeads-markierten, LNGFR-positiven Zellen bis zu einer Reinheit von 95% erfolgte automatisiert mit dem AutoMacs System (Miltenyi Biotec). Bei Gerätestart wurde zunächst die Reinigungsroutine ausgeführt. Die Aufreinigung der Zellen erfolgte mit dem Programm „Posseld“, das eine positive Selektion der Zellen über beide im Gerät installierten Säulen vornimmt. Die LNGFR-positiven Zellen wurden im Anschluss in 20 ml Kulturmedium aufgenommen. Zwischen verschiedenen Aufreinigungen wurde das System gespült und war damit für die Selektion der nächsten Probe vorbereitet.

Lösungen für die magnetbasierte Aufreinigung mittels AutoMacs:

Laufpuffer (PBE)	1x	PBS (Life Technologies)
	2 mM	EDTA (Roth)
	0,5%	BSA (Roth)
Waschpuffer (PE)	1x	PBS (Life Technologies)
	2 mM	EDTA (Roth)

Im Anschluss an die Anreicherung wurden die Zellen für max. 96 h weiter kultiviert und für folgende Experimente verwendet:

1. Für *real-time* PCR-Experimente zur Validierung der mRNA-Expression beim transienten Knockdown wurden $0,5-1 \times 10^6$ Zellen 48 h nach der Transfektion (n.T.) mit PBS gewaschen, pelletiert und bis zur RNA-Isolierung bei -80°C gelagert (siehe 2.3.2).
2. Für Western Blot-Analysen zur Überprüfung der Proteinexpression nach einem Knockdown-Versuch wurden 5×10^6 Zellen 72 h n.T. mit PBS gewaschen, pelletiert und bei -20°C gelagert (siehe 2.3.1).
3. Für die Bestimmung der Viabilität, Caspase-Aktivität und des mitochondrialen Membranpotentials mittels FACS wurden 72 h bzw. 96 h n.T. 100 μl Zellsuspension aus der Kulturflasche entnommen und für die entsprechende FACS-Untersuchungen vorbereitet (siehe 2.2).

2.2. Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting* - FACS)

2.2.1. Zellzahlbestimmung

Eine 1 ml Probe einer homogenen Zellsuspension wurde aus der laufenden Kultur in ein 1,5 ml Tube und eine 1:20 Verdünnung auf 1 ml mit PBS in einem 3,5 ml FACS-Röhrchen (Sarstedt). Die Probe wurde durch vortexen gemischt und mit dem CyFlow SL (Partec) unter Verwendung der zelllinienspezifischen Einstellungen gezählt. Für die Berechnung der absoluten Zellzahl wurde der gemessene Wert aufgrund der Vorverdünnung mit 20 multipliziert.

2.2.2. Bestimmung der Zellviabilität

Die Diskriminierung viable und apoptotischer Zellen erfolgte anhand des FCS/SSC-Streudiagramms im FACS. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) hängt vom Volumen der Zelle ab, während das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter) von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns abhängig ist. Apoptotische Zellen zeigen eine Abnahme im FSC und einen Anstieg im SSC. Um zu überprüfen, ob auf diese Art eine zuverlässige Bestimmung apoptotischer Zellen erfolgen konnte, wurden in Vorversuchen viable und apoptotische Zellen nach dem Standardprotokoll mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid (PI; AppliChem) gefärbt. Während des Fortschreitens der Apoptose ist die Zellmembran durchlässig, PI dringt in die Zelle ein und interkaliert in die DNA. PI-positive Zellen können im FACS im Fluoreszenzkanal 3 detektiert werden. Die Vorversuche haben gezeigt, dass die apoptotischen Zellen des FSC/SSC-Streudiagramms mit den PI-positiven Zellen identisch sind, weshalb die Viabilität ohne PI-Färbung anhand der FSC/SSC-Messung erfolgte.

2.2.2.1. Statistische Auswertung

Für die statistischen Analysen wurde ein zweiseitiger Student-*t*-Test durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als signifikant angesehen mit $p < 0,05$. Die Berechnungen wurden mit der Software *Prism GraphPad 4.0c* (GraphPad Software) durchgeführt. Alle Werte werden im Ergebnisteil \pm Standardabweichung (SD, *standard deviation*) angegeben.

2.2.3. Bestimmung der Caspase-Aktivität

Der FITC-konjugierte zellpermeable Inhibitor VAD-FMK (*CaspACE FITC-VAD-FMK In Situ Marker*, Promega) bindet irreversibel an das katalytische Zentrum von aktivierten Caspase-Proteasen und kann durchflusszytometrisch detektiert werden. Hierzu wurden ca. 100.000 Zellen mit 10 μ M CaspACE in PBE-Puffer für 20 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS für die anschließende FACS-Analyse (Fluoreszenzkanal 1) aufgenommen.

2.2.4. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials

Die mitochondriale *permeability transition* ist ein wichtiger Schritt bei der Apoptose-Induktion. Während dieses Prozesses bricht der elektrochemische Gradient über der Mitochondrienmembran zusammen. Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ kann mit dem fluoreszenten FACS-Farbstoff JC-1 nachgewiesen werden. JC-1 ist ein kationischer, zellpermeabler Farbstoff und zeigt die mitochondriale Polarisation an. Während JC-1 in gesunden Mitochondrien akkumuliert und als Multimer rot fluoresziert (~ 590 nm), verbleibt es beim Verlust des mitochondrialen Membranpotentials als grün fluoreszierendes Monomer (~ 525 nm) im Zytoplasma. Diese Potential-sensitive Farbverlagerung kann durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Hierzu wurden ca. 100.000 Zellen pelletiert und mit 500 μ l einer 1x JC-1-Verdünnung (*Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit*, Stratagene) in Medium für 15 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS für die FACS-Analyse [Fluoreszenzkanal 1 (grün) und 2 (orange/rot)] aufgenommen.

2.3. Biologische und proteinbiochemische Methoden

2.3.1. Western Blot-Analyse

Für die Western Blot-Analyse wurde der in Tab. 2.2 detailliert dargestellte Arbeitsablauf befolgt. Dementsprechend wurden die vorbereiteten Zellpellets in kaltem Lysepuffer resuspendiert und lysiert (1). Nach der Abtrennung der Zelldebris durch Zentrifugation folgte

die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben (2). Anschließend wurden max. 30 µg Protein/Probe 1:1 mit Laemmli-Puffer gemischt und zur Denaturierung der Proteine aufgekocht. Mittels SDS-Gelelektrophorese auf 12 bzw. 15%igen Polyacrylamidgelen (12% für α-YB-1 und α-MYC; 15% für α-TCTP) wurden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt (3) und hinterher auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (4).

Tab. 2.2: Arbeitsablauf für die Western Blot-Analyse.

Arbeitsschritt	Bedingungen
1. RIPA-Lyse	- 50 µl RIPA Lysepuffer / 1,5x10 ⁶ Zellen - Inkubation: 15 min auf Eis - Zentrifugation: 10 min, 12.000 rpm, 4°C
2. Bestimmung der Protein-Konzentration	- Bio-Rad D _C Protein Assay (Bio-Rad) mit BSA-Standards von 0-10 µg/µl Protein - Inkubation: 15 min bei RT im Dunkeln - Messung: ELISA-Reader „sunrise“ (Tecan), Magellan Software V5.03
3. SDS-Gelelektrophorese	- 12-15% SDS-Gel mit 15-30 µg Protein/Tasche - 1:1 2x Laemmli, 5 min 95°C [Thermomixer compact (Eppendorf)] - 120 V, 1 h 30 min [Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad)]
4. Proteintransfer (Blotten)	- Nitrozellulosemembran (Protran; 0,45 µm; Whatman) - 1 mA/1 cm ² für 1 h 30 min [PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter (PeqLab)]
5. Blockieren	- 5% BSA in TBST für 10 min schütteln
6. Waschschrift 1	- 3x für 5 min mit TBST
7. Primärantikörper-Inkubation	- 1h bei RT oder ü.N. bei 4°C schütteln
8. Waschschrift 2	- 3x für 5 min mit TBST
9. Sekundärantikörper-Inkubation	- 1 h bei RT schütteln
10. Waschschrift 3	- 3x für 5 min mit TBST
11. ECL-Detektion	- je Membran 1 ml ECL-Lösung für 1 min - Röntgenfilm-Exposition für 30 s bis zu 30 min - Röntgenfilm-Entwicklung mit CP1000 Agfa

Die Western Blot-Inkubation nach dem Blockieren (5) erfolgte mit einem ersten Antikörper gegen das jeweilige Zielprotein (7) und anschließend mit einem zweiten HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppelten Antikörper (9), der den ersten Antikörper erkennt. Alle verwendeten Antikörper wurden in 5% BSA TBST entsprechend der Tab. 2.3 verdünnt. Die ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Detektion (11) beruht auf der Chemolumineszenz-Methode. Die Meerrettichperoxidase des HRP-konjugierten Sekundärantikörpers katalysiert hierfür eine chemische Reaktion bei der Lumineszenz-Licht emittiert wird. Die gewaschenen Membranen wurden zu diesem Zweck mit 1 ml frisch angesetzter ECL-Lösung für 1 min inkubiert, die

Röntgenfilme entsprechend der Reaktionsstärke belichtet und entwickelt. Jeder Blot wurde abschließend mit dem β -Aktin-HRP Antikörper inkubiert, um die gleichmäßige Proteinbeladung zu kontrollieren.

Tab. 2.3: Verwendete Antikörper und Verdünnungen.

Antikörpername	Verdünnung	Klon	Hersteller
YB-1	1:10000	#EP2708Y	Epitomics
MYC	1:500	#N-262	Santa Cruz Biotechnology
TCTP	1:10000	#ab37506	Abcam
β -Aktin-HRP	1:10000	#I-19	Santa Cruz Biotechnology
α -rabbit-HRP	1:10000	NA934V	GE Healthcare

Lösungen für die Western Blot-Analyse:

RIPA Lyse- und Extraktionspuffer	25 mM Tris pH 7,6 (Roth) 150 mM NaCl (Roth) 1% NP-40 (AppliChem) 1% Natriumdeoxycholat (Roth) 0,1% SDS (Roth) 0,004% NaN ₃ (Merck) 1x Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich)
Laemmli-Puffer (2x)	100 mM Tris pH 6,8 (Roth) 8% Glycerol (Roth) 2% SDS (Roth) 10% β -Mercaptoethanol (Roth) 0,1% Bromphenolblau (Roth)
12% Trenngel	4 ml Rotiphorese Gel 30 (Roth) 3,8 ml Tris pH 8,8 (Roth) 2,2 ml Aqua dest. 100 μ l 10% SDS (Roth) 100 μ l 10% APS (Sigma-Aldrich) 5 μ l TEMED (Sigma-Aldrich)
15% Trenngel	5 ml Rotiphorese Gel 30 (Roth) 3,8 ml Tris pH 8,8 (Roth) 1,2 ml Aqua dest. 100 μ l 10% SDS (Roth) 100 μ l 10% APS (Sigma-Aldrich) 5 μ l TEMED (Sigma-Aldrich)
SDS-Sammelgel	830 μ l Rotiphorese Gel 30 (Roth) 580 μ l Tris pH 6,8 (Roth) 3,5 ml Aqua dest. 50 μ l 10% SDS (Roth) 50 μ l 10% APS (Sigma-Aldrich)

	2,5 µl	TEMED (Sigma-Aldrich)
TGS-Puffer	25 mM	Tris pH 8,6 (Roth)
	192 mM	Glycin (Roth)
	0,1%	SDS (Roth)
Transferpuffer	25 mM	Tris (Roth)
	192 mM	Glycin (Roth)
	20%	Methanol (Sigma-Aldrich)
TBST-Puffer	20 mM	Tris pH 7,6 (Roth)
	130 mM	NaCl (Roth)
	0,1%	Tween 20 (Sigma-Aldrich)
ECL-Lösung	Lösung A:	
	0,1 M	Tris pH 8,6 (Roth)
	250 µg/ml	Luminol (AppliChem)
	Lösung B:	
	1,1 mg/ml	Para-Hydroxycoumarinsäure (Sigma-Aldrich)
	in DMSO (Roth)	
	30%	H ₂ O ₂ (Roth)
	vor jeder Entwicklung frisch ansetzen:	
	1 ml	Lösung A
	+ 0,3 µl	H ₂ O ₂
	+ 100 µl	Lösung B

2.3.2. Quantitative real-time PCR

Die Gesamt-RNA wurde 48 h n.T. von $0,5 \cdot 10^6$ gesorteten Zellen mit dem *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen) isoliert oder direkt von der Phenol-RNA-Extraktion (siehe 2.3.9) verwendet. Die cDNA wurde mit dem *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) synthetisiert. Die quantitative PCR wurde in Triplikaten (10 µl Ansätze/96-well) mit den *TaqMan Gene Expression Assays* für humanes *YB-1*, *MYC* und *TCTP* (HS00898625_g1, Hs99999003_m1, Hs02621289_g1) auf dem *ABI PRISM 7000 Sequence Detection Real-Time PCR System* mit dem Standardprotokoll des Herstellers durchgeführt (Applied Biosystems). Für die Berechnung der C_T (*cycle threshold*)-Werte wurde eine maximale Standardabweichung der Messwerte von 0,2 akzeptiert und der Hintergrundwert (*baseline*) automatisch von der Software ermittelt (7000 System Software v.1.2.3, Applied Biosystems). Die relative *YB-1*, *MYC* oder *TCTP*-mRNA-Expression wurde anhand der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode mit der DataAssist Software v.2.0 (Applied Biosystems) berechnet. Dafür wurde als endogene Kontrolle β -Aktin (*human beta-Actin* MGB #4352935E,

Applied Biosystems) verwendet und als Kalibrator diente die Kontrolltransfektion des Versuchs. Alle Werte dieser Versuche werden nachfolgend als Mittelwerte \pm SD angegeben.

2.3.3. Sequenzierung der MYC-IRES

Die Untersuchung des c.-141C>T-Genotyps wurde mit einem bidirektionalen Sequenzierungsansatz durchgeführt (Primer P5173: 5'-GTAATTCCAGCGAGAGGCAG-3' und P5554: 5'-CTGGTTTTCCACTACCCGAA-3'). Die verwendete DNA wurden aus CD138-aufgereinigten Plasmazellen von Patienten mit Multiplem Myelom isoliert. Als Keimbahnkontrollen diente die DNA von mononukleären Zellen (PBMC) aus dem Vollblut des jeweiligen MM-Patienten. Somit konnten probandenspezifisch somatische Mutationen nachgewiesen werden (Kooperation mit Dr. C. Langer, Universitätsklinikum Ulm).

2.3.4. Immunzytochemische Färbung von humanen Zelllinien

Für die Färbungen wurden Zytospins mit 60.000 Zellen/Spot der entsprechenden MM-Zelllinie angefertigt [10 min, 7.000 rpm; CellSpin I (Tharmac)] und 10 min in Telly's-Lösung fixiert. MDA-MB-231-Zellen wachsen adhärent und wurden am Vortag der Fixierung auf Poly-D-Lysin beschichteten Objektträgern ausgesät und im Brutschrank kultiviert. Die fixierten Zellen wurden mit 5% Ziegen Serum 1 h vorinkubiert (Blockierung) und dann für 1 h mit α -YB-1 (1:100; #EP2708Y, Epitomics) oder α -phospho-YB-1(S102) (1:50; #C34A2, Cell Signaling Technology) behandelt. Die Visualisierung der Färbungen erfolgte mit einem Cy2-markierten α -Kaninchen Sekundärantikörper für die HMZL und einem Cy3-markierten Antikörper für die MDA-MB-231-Zellen (Jackson Immuno Research Laboratories). Abschließend wurden die Zellkerne mit DAPI (Sigma-Aldrich) gegen gefärbt. Als Negativkontrolle wurde je ein Objektträger der fixierten Zellen ohne Primärantikörper inkubiert. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurden Isotyp-Kontrollen durchgeführt. Insgesamt konnte mit beiden Kontroll-Methoden die Eigenfluoreszenz der Zellen und unspezifische Antikörper-Bindungen eingeschätzt werden, die gering waren.

Lösungen für die Immunzytochemie:

Telly's (Tellyesniczky/Fekete)	70%	absolut Ethanol (Sigma-Aldrich)
	4%	Paraformaldehyd (Roth)
		pH 7,4 mit 100% Essigsäure (Roth)

2.3.5. Immunhistochemische Färbung primärer humaner MM-Proben

Das Primärmaterial für die Färbungen waren Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete

Knochenmarkbiopsien mit einer hohen MM-Zellinfiltration (n=20) und Gewebe von extramedullären Plasmozytomen (n=10) (archiviertes Material vom Institut für Pathologie der Universität Würzburg und Philipps-Universität Marburg). Die Knochenmarkstanzen wurden geschnitten, auf silanisierte Objektträger aufgezogen und über Nacht getrocknet. Die Schnitte wurden 2x in 100% Xylol (Roth) je 3 min entparaffinisiert und anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Dazu wurden die Schnitte für jeweils 3 min 2x in 100%-, 95%-, 80%-, 70%-, 50%-, 30%-iges Ethanol (Sigma-Aldrich) und dann in *Aqua dest.* getaucht. Anschließend wurden die Schnitte zur Antigen-Rückgewinnung im Dampfkochtopf je nach Antikörper gekocht (Tab. 2.4) und in PBS abgekühlt. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert und der Nachweis des Primärantikörpers erfolgte wie vom Hersteller beschrieben mit dem Advance™ HRP System (Dako) und 3,3-Diaminobenzidin (Dako) als Substrat. Abschließend wurde für 3 min eine Gegenfärbung mit Hämalaun (nach Meyer) durchgeführt (Kooperation mit Dr. A. Mottok, Pathologisches Institut, Universität Würzburg).

Tab. 2.4: Verwendete Antikörper und Verdünnungen.

Antikörper	Verdünnung	Klon	Hersteller	Puffer
YB-1	1:800; 1h	#EP2708Y	Epitomics	4 min; 10 mM Zitronensäure pH 7,0
MYC	1:100; 1h	#Y69	Epitomics	8 min; 10 mM Zitronensäure pH 6,0
TCTP	1:2000	#ab37506	Abcam	4 min; Target-Retrieval-Solution S1699 (Dako)
CD138	1:100	#MI15	BD	8 min; 10 mM Zitronensäure pH 6,0

Bei der Doppelfärbung der extramedullären Plasmozytome wurde mit dem CSA II Kit (Dako) zuerst MYC (1:1000) unter Verwendung der *Rabbit Link*-Lösung detektiert und anschließend YB-1 (1:100) mit der ABC-Methode gefärbt und AP-Blue visualisiert (Vector Laboratories). Die Abbildungen wurden mit dem Nikon Eclipse TE 2000-U Mikroskop und der DS-Qi1Mc (5.03) Digitalkamera für die Fluoreszenz-Färbungen sowie der Dxm1200 Digitalkamera für DAB- und AP-Blue-Färbungen aufgenommen (Software Nikon NIS-Elements BR Version 3.0).

2.3.6. Immunpräzipitation (IP) von YB-1

Für den prinzipiellen Versuchsablauf wurde das von Peritz *et al.* veröffentlichte IP-Protokoll befolgt (199). Hierzu wurden $1,5 \times 10^7$ Zellen (AMO-1, MM.1S oder MOPC) in 500 μ l frisch

angesetztem Lysepuffer resuspendiert, 15 min auf Eis lysiert und danach für 10 min bei 16000 x g, 4°C zentrifugiert (Hettich Mikro Rapid/K). Der sogenannte *preclearing*-Schritt wurde je Lysat 2x durchgeführt, um unspezifisch an die Agarose bindende Proteine vor der eigentlichen Inkubation mit dem YB-1-Antikörper abzureichern. Hierzu wurden 50 µl immobilisierte Protein G Agarose (Thermo Scientific, Pierce) 2x mit 100 µl Lysepuffer gewaschen und für 30 min mit dem Lysat inkubiert [4°C, 12 rpm mit MACSmix (Miltenyi Biotec)]. Anschließend wurde der Überstand (Lysat) in ein neues Tube überführt, mit 500 µl IP-Reaktionspuffer versetzt und zur Bildung der Antikörper-Antigen-Komplexe mit 2 µg des monoklonalen, C-terminal-spezifischen YB-1 Antikörpers (Klon #EP2708Y, Epitomics) inkubiert (ü.N., 12 rpm, 4°C). Die Immunpräzipitation der Antikörper-Antigen-Komplexe erfolgte mit 30 µl der Protein G Agarose (6 h, 12 rpm, 4°C), die zuvor 2x mit Lysepuffer gewaschen wurde. Nachdem sich die Agarose abgesetzt hat, wurde der Überstand verworfen und das Agarose-Pellet 4x mit 800 µl eiskaltem IP-Reaktionspuffer und 2x mit 800 µl Harnstoffpuffer gewaschen. Direkt vor der RNA-Isolation wurde ein Proteinverdau durchgeführt, indem die Agarose in IP-Reaktionspuffer resuspendiert wurde, der mit 0.1% SDS und 30 µg rekombinanter Proteinase K (Roche) versetzt war (55°C Wasserbad, 30 min). Die RNA wurde danach mit dem *RNeasy MinElute CleanUp Kit* nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen) aufgereinigt.

Für die YB-1-IP des Maus-PZT wurden 200 mg Tumor in 1,5 ml Lysepuffer aufgenommen und mit dem Dispergiersystem T8 Ultra-Turrax homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat mit weiteren 800 µl Lysepuffer versetzt und 15 min auf Eis vollständig lysiert. Nach der Zentrifugation wurden 200 µl Überstand für die Gesamt-RNA Kontrolle abgenommen und bei -80°C bis zur RNA-Extraktion aufbewahrt. Der PZT-Ansatz wurde auf 2x 1,5 ml Tubes aufgeteilt und wie oben für die Zelllinien beschrieben YB-1 immunpräzipitiert.

Lösungen für die Immunpräzipitation:

Lysepuffer	20 mM	HEPES pH 7,8 (Life Technologies)
	250 mM	KCl (Roth)
	5 mM	MgCl ₂ (Roth)
	2 mM	DTT (Fermentas)
	0.25%	Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich)
	10 µg/ml	Cycloheximid (Sigma-Aldrich)
	1x	Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich)
	1x	Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 (Sigma-Aldrich)
	1x	Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (Sigma-Aldrich)
	80 U	RNasin (Promega)
	80 U	Protector RNase Inhibitor (Roche)

IP-Reaktionspuffer (200)	50 mM	Tris pH 7,4 (Roth)
	150 mM	NaCl (Roth)
	1 mM	MgCl ₂ (Roth)
	0.05%	Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich)
	40U	RNasin (Promega)
	40U	Protector RNase Inhibitor (Roche)
	0.2%	Vanadyl-Ribonucleosid-Komplex (Sigma-Aldrich)
	1 mM	DTT (Fermentas)
	20 mM	EDTA (Roth)
Harnstoffpuffer	50 mM	Tris pH 7,4 (Roth)
	150 mM	NaCl (Roth)
	1 mM	MgCl ₂ (Roth)
	0.05%	Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich)
	1 M	Harnstoff (AppliChem)

2.3.7. *Microarray-Analyse der IPten mRNAs*

Die RNA-Qualität und mRNA-Anreicherung der IP-Proben wurde mit den Ergebnissen des Agilent 2100 Bioanalyser-Laufs beurteilt (Kooperation mit M. Göbel, Institut für Immunologie, Universität Würzburg).

Insgesamt wurden 150 ng der IP-ten RNA für die cDNA-Synthese, *in vitro* Transkription, Markierung und Fragmentierung entsprechend der Herstellerangaben des *GeneChip 3' IVT Express Kits* (Affymetrix) verwendet (Kooperation mit Dr. E. Leich, Pathologisches Institut, Universität Würzburg). Die Hybridisierung auf genomweiten Microarrays (*GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0* bzw. *Mouse Genome 430 2.0*) wurde ü.N. bei 45°C durchgeführt. Der Wasch- und Scanvorgang erfolgte mit dem *GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kit*, der *GeneChip Fluidics Station 450* und dem *GeneChip Scanner* (alles von Affymetrix). Die Proben für die PZT Gesamt-RNA und IP wurden parallel verarbeitet, genauso wie die HMZL-IP-Proben. Die Microarray-Daten wurden einer MAS5-Normalisierung unterzogen und nach ihrer Signalintensität absteigend sortiert. Zur Identifikation übereinstimmender Einträge aus diesen vier IP-Microarray-Ergebnissen wurde das Datenbankmanagementsystem Microsoft Access genutzt.

2.3.8. *Dichtegradienten-Zentrifugation*

Insgesamt wurden $1,5 \times 10^7$ AMO-1-tet-Zellen [Doxycyclin-behandelt (YB-1-Knockdown) und unbehandelt (Kontrolle)] mit eiskaltem PBS, dem 100 µg/ml Cycloheximid (Sigma-Aldrich) zugesetzt war, gewaschen, pelletiert (3 min, 2.000 rpm, 4°C) und in 400 µl Gradientenpuffer lysiert (Kooperation mit M. Küspert, Abteilung für Biochemie, Theodor-

Boveri-Institut, Universität Würzburg). Nach der Inkubation für 10 min auf Eis wurden die Zelldebris durch Zentrifugation pelletiert (10 min, 10.000 rpm, 4°C; Eppendorf Centrifuge 5415R). Anschließend wurde die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt und für insgesamt 300 µl des Lysats in beiden Proben die gleiche Proteinkonzentration eingestellt.

Für die Herstellung des 5-45% Saccharose-Gradienten wurde jeweils eine 5% und 45%-ige Saccharose-Lösung mit Gradientenpuffer (ohne Inhibitoren) hergestellt und sofort mit einem 20 µm Spitzenfilter steril filtriert. Der Dichtegradient wurde anschließend in Ultra Clear Tubes (Beckman Coulter, 14x89 mm) gebildet, indem die 45%-ige Saccharose-Lösung mit einer Spritze blasenfrei unter die 5%-Lösung geschichtet wurde. Nachdem die Tubes blasenfrei verschlossen waren, konnte mit dem GradientMate (Biocomp) der lineare Gradient „gemischt“ werden. Die Gradienten wurden nach einer Ruhezeit von 1 h bei 4°C mit 250 µl des zytosolischen Überstands von AMO-1-tet Kontrolle bzw. AMO-1-tet YB-1-Knockdown beladen und mittels Ultrazentrifugation aufgetrennt (Beckman Coulter Optima L-90K, Rotor SW41Ti, 2 h, 34.500 rpm, 4°C). Mit dem Gradientenfraktionierer PGFip (Biocomp) und dem Fraktionensammler Model 2110 (Bio-Rad) wurden anschließend insgesamt 21 Fraktionen mit je 500 µl in 1,5ml Tubes abgenommen. Dieser Vorgang wurde mit den ECONo UV Monitor (Bio-Rad) und der *Dataq Instruments* Software überwacht und das Polysomenprofil des Gradienten erstellt.

Die so gewonnenen Proben wurden anschließend für Western Blot-Analysen (siehe 2.3.1) und nach der Phenol-RNA-Extraktion (siehe 2.3.9) für *real-time* PCR-Versuche (siehe 2.3.2) verwendet. Für den Western Blot wurden je zwei benachbarte Fraktionen des Gradienten vereint. Außerdem wurden hier insgesamt 23 Fraktionen analysiert. Die 22. Fraktion entspricht dem verbliebenen Gradienten im Probenschlauch und die 23. Fraktion dem restlichen Volumen im Zentrifugenröhrchen. Es wurden 50 µl der vereinten Fraktionen in Laemmli-Puffer aufgekocht und direkt auf das SDS-Gel geladen.

Lösungen für die Dichtegradienten-Zentrifugation:

Gradientenpuffer (Lyse)	20 mM	Tris pH 7,5 (Roth)
	100 mM	KCl (Roth)
	5 mM	MgCl ₂ (Roth)
	100 µg/ml	Cycloheximid (Sigma-Aldrich)
	0,5%	NP-40 (AppliChem)
	10 U	RNasin (Promega)
	0,8 µM	Aprotinin (Sigma-Aldrich)
	100 µM	Leupeptin (Sigma-Aldrich)
	100 µM	AEBSF (Sigma-Aldrich)
	100 µM	PMSF (Sigma-Aldrich)
	1 mM	DTT (Fermentas)

Gradientenpuffer (Gradient)	100 mM	KCl (Roth)
	20 mM	Tris pH 7,5 (Roth)
	5 mM	MgCl ₂ (Roth)
		Saccharose (Merck)

2.3.9. Phenol-RNA-Extraktion

Zur Isolation der Gesamt-RNA für die *real-time* PCR wurden je 50 µl der Fraktionen 1-10 und 11-23 vereint und einer Phenol-Extraktion mit anschließender Isopropanol-Fällung unterzogen. Die Fraktionen 1-10 wurden 2:1 mit RNase-freiem *Aqua dest.* und 11-23, aufgrund des höheren Saccharose-Gehalts, 1:2 mit RNase-freiem *Aqua dest.* verdünnt, 1:1 mit Roti-Aqua-Phenol zur RNA-Extraktion (Roth) für 5 min bei 1.000 rpm gemischt und bei 16.000 x g für 5 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Tube überführt und mit 0,1 Volumen 5 M Ammoniumacetat sowie 10 µg/ml linearem Acrylamid (Ambion) als Fällhilfe versetzt. Die RNA-Präzipitation erfolgte mit einem Volumen eiskaltem Isopropanol (Sigma-Aldrich) über Nacht bei -20°C. Das RNA-Pellet wurde nach der Zentrifugation (30 min, 13.000 rpm, 4°C) mit 80% Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl RNase-freiem *Aqua dest.* gelöst.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Konstruktion des Expressionsplasmids pFC8A-YB-1

Für die Klonierung der kodierenden Sequenz von YB-1 in den pFC8A (HaloTag) CMV Flexi Vektor (Promega) wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Hierzu wurde zunächst eine PCR (Tab. 2.5) zur Erzeugung des *Inserts* mit dem *Xba* I-linearisierten Template pCMV6-XL5 (OriGene) und den spezifischen Primern YB-1pFC8A_SgfI [5'-(AGCT)(AGCT)(AGCT)GCGATCGCCATGAGCAGCGAGGCCGAGACCC-3'] sowie YB-1pFC8A_PmeI [5'(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGCT)GTTTAAACCTCAGCCCCGCCCTGCTCAGCCTCGGG-3'] mit der *AccuPrime GC-rich DNA Polymerase* (Life Technologies) und Puffer A durchgeführt.

Tab. 2.5: PCR-Bedingungen für die Amplifikation von YB-1.

PCR-Programm		
	initiale Denaturierung	95°C 5 min
30 Zyklen	Denaturierung	95°C 30 s
	Primer Annealing	60°C 30 s
	Elongation	72°C 1 min
	finale Elongation	72°C 2 min

Die PCR-generierten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *SgfI* und *PmeI* ermöglichten die Klonierung in den pFC8A-Vektor für die Expression eines YB-1-Proteins mit C-terminalem HaloTag. Das PCR-Produkt wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese [100 V, 30 min, 1% Agarose (Bio&Sell) in TBE-Puffer] über ein präparatives Gel aufgereinigt [*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega)] und dann mit den Restriktionsenzymen *SgfI/PmeI* (Promega) in einem 20 µl-Ansatz verdaut. Der pFC8A-Vektor wurde mit *SgfI* und *EcoICRI* linearisiert und in der Ligationsreaktion [(*Quick Ligation Kit* (NEB))] mit dem geschnittenen *Insert* zu einem zirkulären Vektor verbunden. Ein Aliquot der Ligationsreaktion wurde in kompetente *E. coli* [*One Shot TOP10* (Life Technologies)] transformiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (Amp) als Selektionsantibiotikum ausplattiert. Nach der Inkubation ü.N. bei 37°C wurden Einzelkolonien gepickt und 3 ml Amp-haltiges (50 µg/ml) LB-Medium für die Plasmidaufreinigung [*GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas)] angeimpft (Schüttler 37°C, 8 h). Über ein analytisches Agarosegel wurden Plasmide mit der richtigen Größe (*Insert* + pFC8A) identifiziert, anschließend sequenziert (*Genotyping services*, LGC Genomics) und mehrere µg des verifizierten pFC8A-YB-1-Klons über einen Plasmid-Maxi [*NucleoBond Xtra Maxi EF* (Macherey-Nagel)] für die Verwendung in der Zellkultur (siehe 2.1.4) aufgereinigt.

2.4.2. Konstruktion des shRNA-Expressionsplasmids gegen TCTP

Für die spezifische Reduktion der TCTP-Expression mittels RNA-Interferenz (RNAi), wurde das Vektorsystem pSUPER (*SUPpression of Endogenous RNA*) verwendet. Die exprimierte shRNA wird von der Zelle zur funktionellen siRNA gespalten, reduziert die mRNA-Expression und damit die Synthese des Zielproteins.

Es wurden insgesamt vier verschiedene shRNAs für den TCTP-Knockdown entworfen. Hierzu wurde die kodierende Sequenz von TCTP nach 19 Basen langen Abschnitten durchsucht, die die folgenden Kriterien erfüllen: (1) 50-80% Guanin/Cytosin-Anteil; (2) Adenin an den Positionen -1 und -2; (3) idealerweise ein Guanin an Position 19; (4) weniger als vier Adenin- oder Thymidin-Basen hintereinander. Die Synthese der Oligonukleotide [Abb. 2.1 a)] wurde bei Sigma-Aldrich in Auftrag gegeben. Das gelieferte Lyophilisat wurde mit *Aqua dest.* auf eine Konzentration von 3 mg/ml eingestellt. Bei der Klonierung des pSUPER-TCTP Vektors über die *BglII* / *HindIII*-Schnittstellen wurde das Protokoll *pSUPER RNAi System* befolgt (OligoEngine). Die verwendeten Enzyme wurden von Fermentas bezogen. Die Abb. 2.1 b) zeigt die Sequenz der funktionellen siRNA, die in den Zellkultur-Versuchen das beste Knockdown-Ergebnis gezeigt hat und TCTP effizient sowie spezifisch

herunterregulierte. Die siRNA zielt auf die Basen 524-542 der TCTP-mRNA und ist eine Ableitung eines 23-Oligomers der Firma OriGene.

a) 60-nt Oligo

(*Bgl* II) Ziel-Sequenz: sense (Hairpin) Zielsequenz: antisense
 5' -GATCCCCGCATGGTTGCTCTATTGGATTCAAGAGATCCAATAGAGCAACCATGCTTTTAA-3'
 3' -GGGCGTACCAACGAGATAACCTAAGTTCTCTAGGTTATCTCGTTGGTACGAAAATTCTGA-5'
 (*Hind* III)

b) Funktionelle TCTP-siRNA

GCAUGGUUGCUCUAUUGGAUU
 UUCGUACCAACGAGAUAAACCU

Abb. 2.1: Oligo-Design für die pSUPER-Klonierung. a) shRNA-Oligonukleotid für den TCTP-Knockdown mit den Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bgl* II / *Hind* III und der TCTP-Zielsequenz. b) Darstellung der funktionellen siRNA gegen die nt. 524-542 der TCTP-mRNA.

Lösungen für die molekularbiologischen Methoden:

TBE-Puffer	89 mM	Tris (Roth)
	89 mM	Borsäure (Roth)
	2 mM	EDTA pH 8,0 (Roth)
LB-Medium pH 7,5	5 g/l	Hefeextrakt (Roth)
	10 g/l	Bacto-Trypton (Roth)
	10 g/l	NaCl (Roth)
LB-Agar mit Ampicillin	250 ml	LB-Medium
	7,5 g	Agar (AppliChem)
	100 µg/ml	Ampicillin (Roth)

2.5. Hersteller

Abcam	Cambridge, Großbritannien
Addgene	Cambridge, MA, USA
Affymetrix	Santa Clara, CA, USA
Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Ambion (Life Technologies)	Darmstadt, Deutschland
Amersham	Braunschweig, Deutschland
Antibodies-Online	Aachen, Deutschland
AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Applied Biosystems (Life Technologies)	Darmstadt, Deutschland
Axis-Shield	Oslo, Norwegen
BD (Becton Dickinson)	Heidelberg, Deutschland
Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
Bio&Sell	Feucht, Deutschland
Biocomp	Fredericton, NB, Kanada
Bio-Rad	München, Deutschland
Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Dako	Hamburg, Deutschland
Epitomics	Burlingame, CA, USA
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Fermentas (Thermo Scientific)	St. Leon-Rot, Deutschland
GE Healthcare	Little Chalfont, Großbritannien
GraphPad	La Jolla, CA, USA
Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Hettich	Tuttlingen, Deutschland
Jackson Immuno Research Laboratories	West Grove, PA, USA
LGC Genomics	Berlin, Deutschland
Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
New England Biolabs (NEB)	Ipswich, MA, USA
Nikon	Düsseldorf, Deutschland
OligoEngine	Seattle, WA, USA

Open Biosystems (Thermo Scientific)	St. Leon-Rot, Deutschland
OriGene	Rockville, MD, USA
Partec	Münster, Deutschland
Peqlab	Erlangen, Deutschland
Promega	Mannheim, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, Deutschland
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Stratagene (Agilent Technologies)	Waldbronn, Deutschland
Tecan	Männedorf, Schweiz
Tharmac	Waldsolms, Deutschland
Thermo Scientific	Oberhausen, Deutschland
Vector Laboratories	Burlingame, CA, USA
Whatman	Dassel, Deutschland

3. Ergebnisse

3.1. Expression, Lokalisation und posttranslationale Modifikation von YB-1 in humanen Myelomzelllinien

3.1.1. YB-1-Expression im Zytoplasma von humanen Myelomzelllinien

Zu Beginn der Arbeit wurden die Expression, die Lokalisation und die Bedeutung der S102-Phosphorylierung für YB-1 in verschiedenen humanen Myelomzelllinien (HMZL) ermittelt. Für die Untersuchung der YB-1-Expression wurden Western Blots von Gesamtzellextrakten exponentiell wachsender HMZL angefertigt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Chatterjee *et al.* ist YB-1 in jeder der getesteten HMZL annähernd gleich stark exprimiert (54) (Abb. 3.1).

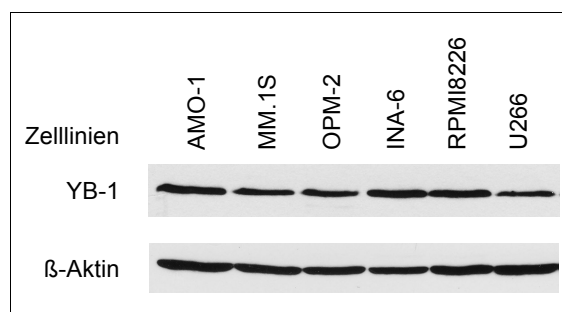


Abb. 3.1: YB-1-Proteinexpression in humanen Myelomzelllinien. Für die Western Blot-Analyse wurden je Zelllinien-Lysat 30 μ g Protein im SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die YB-1-Proteinexpression wurde mit dem monoklonalen YB-1-Antikörper Klon #EP2708Y detektiert. Mit Hilfe des β -Aktin-Antikörpers wurde die gleichmäßige Proben-beladung kontrolliert.

Aus der Literatur war bekannt, dass die subzelluläre Verteilung von YB-1 zwischen Zytoplasma und Zellkern variabel ist und vom untersuchten Tumormodell abhängt (59, 61, 166). Die immunhistochemische Analyse der ersten primären MM-Fälle zeigte neben der guten YB-1-Expression im Zytoplasma auch eine schwache Nukleus-Lokalisation des Proteins (54). Demnach könnte YB-1 in den MM-Zellen parallel die Translation im Zytoplasma und die Transkription im Zellkern beeinflussen. Um die Bedeutung dieser beiden entgegengesetzten YB-1-Funktionen zu bestimmen, wurde die Proteinlokalisierung in den HMZL untersucht. Hierzu wurden immunzytologische YB-1-Färbungen der Linien AMO-1, MM.1S und INA-6 angefertigt. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der YB-1-behandelten Proben belegt die zytoplasmatische Proteinexpression (grün) in den HMZL (Abb. 3.2). Eine direkte Kern-Lokalisation von YB-1 konnte nicht gezeigt werden.

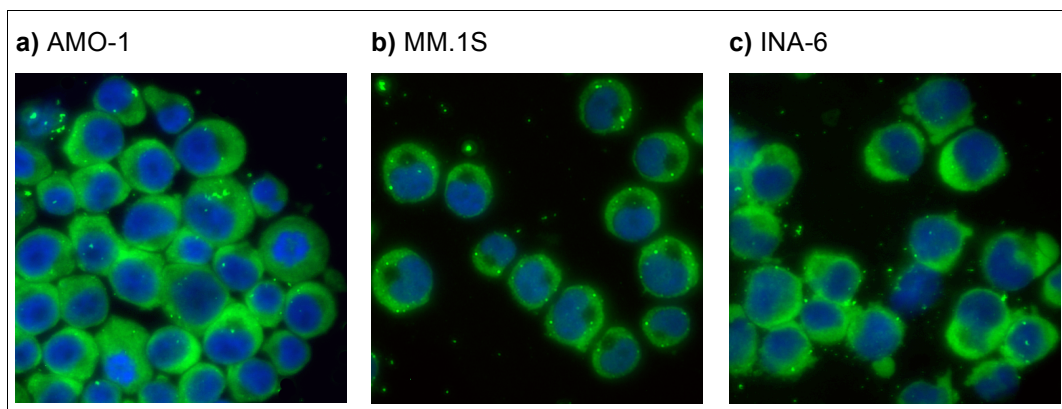


Abb. 3.2: Zytoplasmatische Lokalisation von YB-1. Für jede der abgebildeten Zelllinien wurden Zytospins mit 60.000 Zellen/Spot angefertigt. Zur Immunfluoreszenzanalyse auf YB-1 wurden die fixierten Zellen mit dem YB-1 Antikörper Klon #EP2708Y in einer Verdünnung von 1:100 und einem Cy2-markierten Sekundärantikörper inkubiert (YB-1 = grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI gegen gefärbt (Nukleus = blau).

Da die Kernlokalisierung von YB-1 in anderen Tumormodellen direkt mit der Phosphorylierung an Serin 102 in der Kälteschockdomäne assoziiert wird (85, 87, 88), sollte YB-1 im nächsten Schritt mit einem phospho(S102)-spezifischen YB-1-Antikörper im Zellkern detektiert werden.

3.1.2. Humane Myelomzelllinien sind phospho-YB-1 negativ

Die Translokation von YB-1 in den Zellkern kann durch eine S102-Phosphorylierung des Proteins induziert werden, da diese mit der Cap-Bindungsfähigkeit von YB-1 interferiert (86). Mit einem S102-spezifischen phospho(YB-1)-Antikörper (pYB-1-S102) wurde daher in immunzytologischen Färbungen die Kernexpression von YB-1 für die HMZL AMO-1 und MM.1S überprüft. Die Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 diente für diese Versuche als Positivkontrolle, da sie stark phospho-YB-1-positiv ist und bekannt war, dass S102-phosphoryliertes YB-1 im Kern exprimiert wird (201) [Abb. 3.3 c)]. Wie aus Abb. 3.3 ersichtlich wird, sind die HMZL AMO-1 (a) und MM.1S (b) im Vergleich zu MDA-MB-231-Zellen (c) negativ für die S102-Phosphorylierung des YB-1-Proteins. Damit konnte gezeigt werden, dass weder die Kernlokalisierung noch die S102-Phosphorylierung von YB-1 beim MM eine signifikante Rolle spielt. Die starke YB-1-Expression im Zytoplasma wurde als Hinweis für eine Funktion des Proteins im Zytoplasma interpretiert und nachfolgend genauer untersucht.

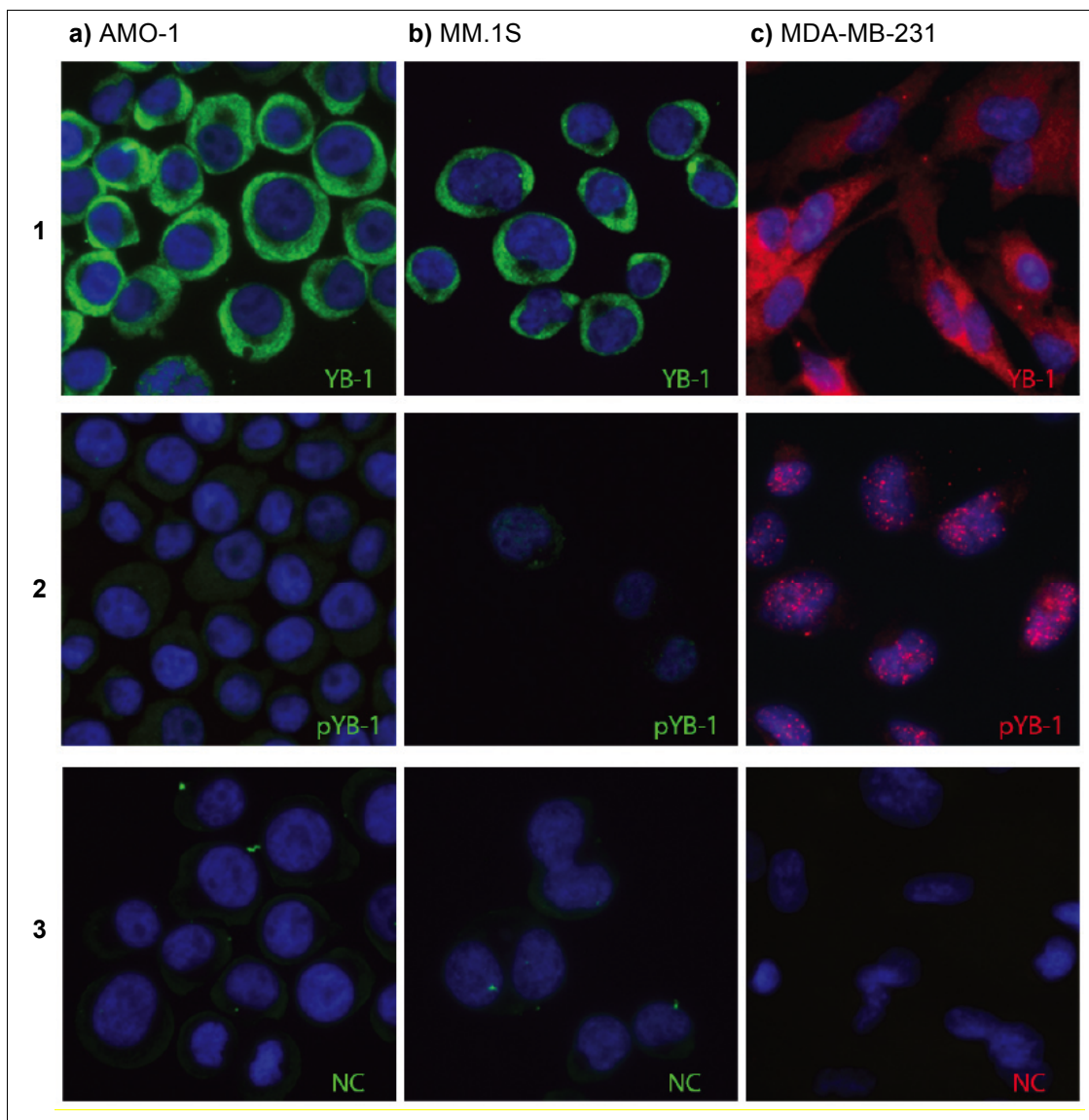


Abb. 3.3: Expression von YB-1 bzw. phospho-YB-1 in HMZL und MDA-MB-231. Zum Nachweis von pYB-1 (2) wurden die Zellen mit anti-pYB-1-S102 (1:50) für 1 h inkubiert und für AMO-1 (a) und MM.1S (b) mit einem Cy2-markierten Sekundärantikörper detektiert. Für die Positivkontrolle MDA-MB-231 wurden ein Cy3-markierter Sekundärantikörper verwendet. Zur Kontrolle wurden die drei Zelllinien mit YB-1 (1:100) (1) und ohne Antikörper (Negativkontrolle, NC) (3) gefärbt. Beide HMZL sind pYB-1 negativ. Die positive Färbung der Kontrollzelllinie MDA-MB-231 zeigt die pYB-1 im Nukleus.

3.2. Identifizierung YB-1-gebundener mRNAs im Zytoplasma von MM-Zellen

3.2.1. MYC und TCTP sind YB-1-gebundene mRNAs in malignen Plasmazellen

Aus der Literatur war bekannt, dass YB-1 als RNA-bindendes Protein im Zytoplasma funktionell die mRNA-Translation beeinflussen kann (134, 137, 145). Für eine umfassende Charakterisierung dieser Funktion beim MM wurden YB-1-Immunpräzipitationen (IP) und Genexpressionsanalysen zur Identifizierung potentiell regulierter mRNAs durchgeführt. Für diese Versuche wurden die humanen Myelomzelllinien AMO-1 und MM.1S, die murine Plasmazytom-Zelllinie MOPC-315.BM.Luc (MOPC) und ein primärer Plasmazelltumor (PZT) von transgenen iMyc Δ E μ -Mäusen verwendet. Sowohl in MOPC-Zellen als auch beim primären iMyc Δ E μ -Maustumor wurde die YB-1-Expression zuvor im Western Blot nachgewiesen (ohne Abb.). Es wurde in der Arbeit bewusst auf humane und murine Modellsysteme für das MM zurückgegriffen, um Modell-unabhängig, übereinstimmende YB-1-gebundene mRNAs zu ermitteln. Neben den Zelllinien wurde auch primäres Tumormaterial für die Versuche verwendet, da so Linien-bedingte Effekte eliminiert werden konnten.

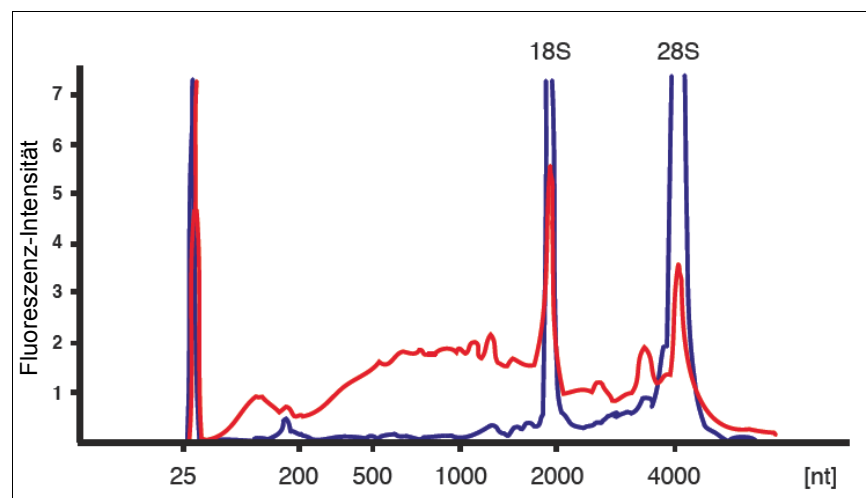


Abb. 3.4: RNA-Qualität vor und nach der YB-1-IP des primären PZT. Das Elektropherogramm zeigt die Ergebnisse des Bioanalyzer-Laufs mit den RNA-Proben des primären iMyc Δ E μ -Plasmazelltumors. Der als Kontrolle mitgeführte Marker zeigt einen Peak bei 25 nt. Bei der Gesamt-RNA Probe (blau) sind zwischen dem Marker-Peak und der 200 nt Region die kleinen 5S, 5.8S und tRNAs zu erkennen, anschließend folgen die zwei ribosomalen Peaks der 18S und 28S rRNA. Die *RNA integrity number* (RIN) betrug 9,7, auf einer Skala von 1-10, und bestätigt die hohe RNA-Qualität nach der Tumor-Lyse. Die IP-Probe (rot) zeigt eine Anreicherung für kleinere RNAs zwischen 200 und 2000 nt, z.B. mRNAs.

YB-1 wurde aus den vorbereiteten zytosolischen Extrakten mit dem C-terminal spezifischen monoklonalen YB-1-Antikörper immunpräzipitiert. Dieser konkurriert nicht mit der mRNA-Bindung von YB-1, die überwiegend für die Kälteschockdomäne des Proteins postuliert

wurde (81, 82, 128, 150). Die YB-1-gebundenen RNAs wurden nach der IP aufgereinigt und die RNA-Qualität sowie mRNA-Anreicherung mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer überprüft (Kooperation M. Göbel, Institut für Immunologie, Universität Würzburg). Abb. 3.4 zeigt beispielhaft das Elektropherogramm für den primären PZT. Die Anreicherung kleinerer RNAs, wie mRNAs, nach der YB-1-IP ist im Bereich von 200 bis 2000 Nukleotiden ersichtlich (roter Graph). Der RIN (*RNA integrity number*)-Wert des PZT-Lysats vor der IP lag bei 9,7 und bestätigte damit die sehr gute RNA-Integrität (blauer Graph). Der RIN-Wert wird vom Bioanalyzer mit einem System-spezifischen Algorithmus berechnet und bewertet mit einem maximal erreichbaren Wert von 10 intakte, nicht degradierte und nicht fragmentierte RNA.

Anschließend wurden die RNA-Proben auf genomweiten Microarrays (*GeneChip Human Genome UI33 Plus 2.0* bzw. *Mouse Genome 430 2.0*) analysiert (Kooperation mit Dr. E. Leich, Pathologisches Institut, Universität Würzburg). Die RNA des murinen PZTs (Gesamt-RNA und IPte RNA) sowie die Proben für die Zelllinien AMO-1, MM.1S und MOPC wurden parallel verarbeitet. Durch diese Vorgehensweise wurden Abweichungen in der Probenpräparation reduziert und der direkte Vergleich der Microarray-Daten miteinander ermöglicht.

Für die Auswertung der Microarrays wurden zunächst die Genexpressionsdaten des murinen PZTs – Gesamt-RNA (vor der IP) und IP-RNA (YB-1-gebundene mRNAs) – analysiert. Die YB-1-gebundenen mRNAs wurden durch die IP potentiell angereichert und sollten im Vergleich zur Gesamt-RNA im Microarray höhere Signalstärken aufweisen. Nicht-YB-1-gebundene RNAs wurden tendenziell entfernt und weisen so niedrigere Signale im Vergleich zur Gesamt-RNA Probe auf. Indem die Differenz der Genexpressionssignale beider Microarrays (IP vs. Gesamt-RNA) gebildet wurde, konnten die angereicherten RNAs der IP-Probe gezielt selektiert werden. Anschließend wurden die ersten 1000 mRNA-Einträge ausgewählt, da die Signalintensitäten signifikant über dem Signalhintergrund der Microarrays lagen. Es wurden mehrfach aufgeführte mRNAs (verschiedene *probe sets* für unterschiedliche Bereiche eines Gens) auf einen Eintrag reduziert sowie unbekannte oder nicht definierte Einträge entfernt. Somit verblieben für die PZT-IP 678 mRNAs, die für die nachfolgenden Analysen verwendet wurden. Die Genexpressionsdaten für AMO-1, MM.1S und MOPC wurden entsprechend ihrer Signalintensität absteigend sortiert, wie oben beschrieben die ersten 1000 Einträge selektiert und im Anschluss auf einmalige sowie eindeutig definierte mRNAs reduziert. Für AMO-1 verblieben bei dieser Strategie 692 mRNAs, bei MM.1S 706 und bei MOPC 638 mRNAs. Diese Datensätze wurden untereinander und mit den 678

mRNAs aus der PZT-IP verglichen, um identische mRNAs zwischen den Proben zu ermitteln. Aufgrund der nahezu übereinstimmenden Anzahl der verbliebenen Kandidaten, war der *Input* für die anschließenden Analysen ungefähr gleich. Die Auswertung der, wie oben beschrieben, vorgefilterten Genexpressionsdaten wird in Abb. 3.5 und 3.6 mit Hilfe von Venn-Diagrammen graphisch sowie in Tab. 3.1 tabellarisch dargestellt.

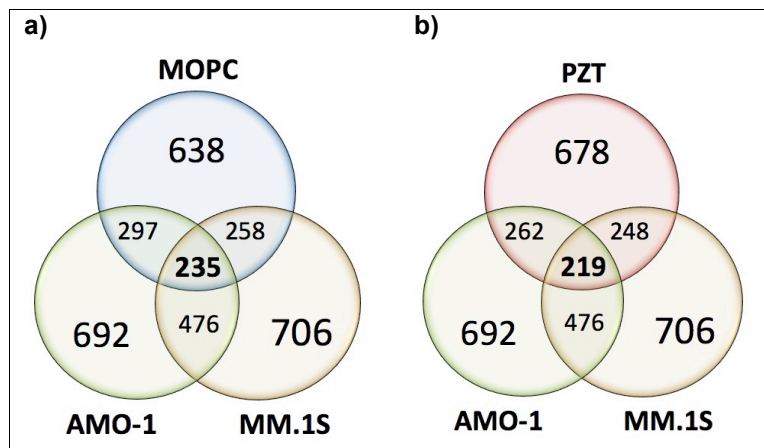


Abb. 3.5: Identische mRNAs der Immunpräzipitationen von YB-1. Mit Hilfe von Venn-Diagrammen werden übereinstimmende mRNAs der Microarray-Daten zwischen AMO-1, MM.1S und MOPC **(a)** bzw. dem primärem Plasmazelltumor (PZT) **(b)** graphisch veranschaulicht. Überlappende Bereiche und die darin enthaltenen Zahlen weisen auf die mRNAs hin, die die Proben gemeinsam haben.

Anhand der Venn-Diagramme wird für die verschiedenen Proben die Anzahl der initial miteinander verglichenen (*Input*) mRNAs und der Ergebnisse dieser Untersuchungen bildlich dargestellt. Die Übereinstimmung zwischen den humanen Zelllinien AMO-1 und MM.1S beträgt ca. 70% (476 mRNAs) und ist damit bei annähernd gleichem *Input* am Größten. Beim Vergleich von AMO-1 bzw. MM.1S mit der murinen Plasmazytom-Zelllinie MOPC sind knapp die Hälfte der mRNAs identisch [Abb. 3.5 a)]. Insgesamt sind ca. ein Drittel der mRNAs (235 Stück) zwischen den drei IPs von AMO-1, MM.1S und MOPC gleich. Bei einem Vergleich der humanen Zelllinien mit dem murinen PZT wurden jeweils ca. 40% übereinstimmende mRNAs mit AMO-1 und MM.1S ermittelt [Abb. 3.5 b)]. Diese drei Datensätze haben jeweils auch ein Drittel der mRNAs (219 Stück) gemeinsam.

Die Übersicht in Tab. 3.1 zeigt außerdem, dass die Kongruenz unter den humanen Zelllinien (AMO-1 vs. MM.1S) bzw. unter Mausproben (MOPC vs. PZT) größer ist, als beim Vergleich der MM-Modelle miteinander.

Tabelle 3.1: Übereinstimmende mRNAs der YB-1-IP-Experimente.

Kombinierte Datensätze	identische mRNAs
AMO-1 vs. MM.1S	476 (70%)
AMO-1 vs. MOPC	297 (45%)
MM.1S vs. MOPC	258 (40%)
AMO-1 vs. PZT	262 (38%)
MM.1S vs. PZT	248 (36%)
MOPC vs. PZT	313 (48%)
AMO-1 vs. MM.1S vs. MOPC	235 (35%)
AMO-1 vs. MM.1S vs. PZT	219 (32%)
AMO-1 vs. MOPC vs. PZT	208 (31%)
MM.1S vs. MOPC vs. PZT	187 (28%)
AMO-1 vs. MM.1S vs. MOPC vs. PZT	176 (25%)

Zusammenfassung des Vergleichs der Microarray-Datensätze. Die Zahlen- und Prozentwerte in der zweiten Spalte repräsentieren die übereinstimmenden mRNAs der kombinierten Datensätze aus der ersten Spalte.

Abschließend wurden alle vier Datensätze verglichen und 176 mRNAs identifiziert (s. Anhang A1), die in humanen Zelllinien und den Mausmodellen für das MM an YB-1 gebunden vorliegen (Abb. 3.6). Dies entspricht ca. 25% des verwendeten mRNA-Inputs.

Unter den 176 identifizierten mRNAs sind bekannte YB-1 Zielstrukturen wie der eukaryotische Translation Elongationsfaktor 2 (*EEF2*), das ribosomale Protein P2 (*RPLP2*), α -Tubulin und Ubiquitin C (*UBC*) (74, 202, 203). Außerdem ist YB-1 (Genbezeichnung *YBX1*) selbst in der Liste, von dem bekannt ist, dass es die eigene Proteinsynthese über diese mRNA-Bindung regulieren kann (72, 74). Diese Übereinstimmungen bestätigen den IP-Ansatz der vorliegenden Arbeit.

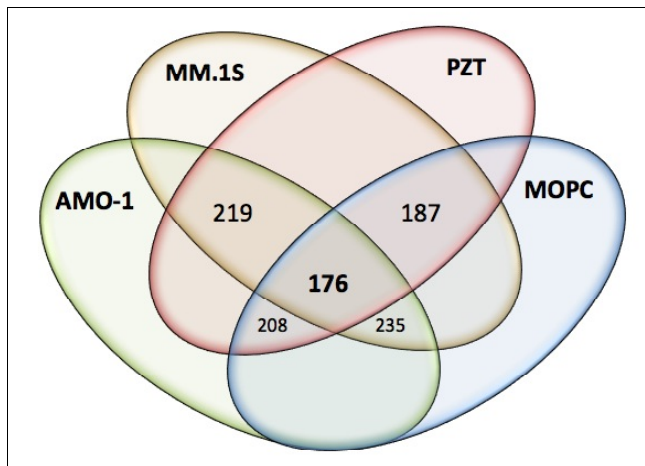


Abb. 3.6: Graphische Darstellung der identischen mRNAs aller YB-1 IPs. Dieses Venn-Diagramm mit vier Ellipsen zeigt die Übereinstimmungen zwischen drei bzw. vier miteinander verglichenen mRNA-Listen. Überlappende Bereiche und die darin enthaltenen Zahlen weisen auf die mRNAs hin, die die Proben gemeinsam haben.

Aus den vorangegangenen Untersuchungen zur Rolle von YB-1 beim MM war bekannt, dass die Reduktion der YB-1-Expression in den HMZL Apoptose und Zellzyklus-Arrest auslösen kann (54). Die genauen Ursachen dieser beobachteten Effekte sind unbekannt und können durch Untersuchungen der zytoplasmatischen Funktion von YB-1 besser verstanden werden. Vor diesem Hintergrund waren zwei der interessantesten mRNA-Kandidaten das *translationally controlled tumor protein (TCTP)* und das *myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) (MYC)*.

TCTP ist ein stark konserviertes und ubiquitär exprimiertes Protein, dessen Aktivität für biologische Prozesse wie Zellzyklusprogression (204), Wachstum, maligne Transformation, Apoptose und Regulation von Pluripotenz beschrieben wurde (für Übersicht siehe (205)). Die TCTP-Proteinsynthese unterliegt vermutlich einer starken translationellen Kontrolle, denn große Mengen der mRNA sind in nicht-translatierten mRNP-Komplexen verpackt (206). Die mRNA besitzt außerdem einen 5'-terminalen Oligopyrimidin-Trakt (5'TOP) sowie eine CG-reiche, stark ausgeprägte Sekundärstruktur (207). TCTP ist präferentiell in Tumorgewebe exprimiert (208-210) und wird beim Prozess der Tumorreversion herunterreguliert (211). Die Interaktion mit den Bcl-2-Familiengliedern Mcl-1 bzw. Bcl-X_L ist für seine anti-apoptotische Wirkung essentiell (212, 213). Seine Bedeutung für das Wachstum und Überleben maligner Plasmazellen war unbekannt. Es wurde für die funktionellen Experimente ausgewählt, weil die TCTP-mRNA in den YB-1-IPs jeweils unter den ersten 15, am stärksten angereicherten mRNAs vertreten war, in der Literatur eine starke translationelle Kontrolle postuliert wird und seine anti-apoptotische Wirkung die Viabilität von MM-Zellen positiv beeinflussen könnte. Die Western Blot-Analyse zeigte zudem, dass TCTP in den YB-1-positiven HMZL exprimiert ist (Abb. 3.7).

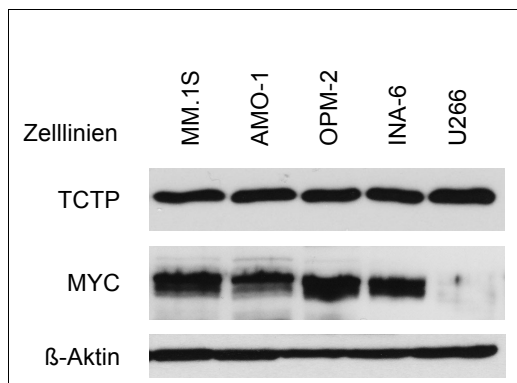


Abb. 3.7: TCTP- und MYC-Expression in humanen Myelomzelllinien. Für die Western Blot-Analyse wurden 30µg Protein je Gesamtzellextrakt verwendet. Die Expression in fünf verschiedenen HMZL wurde mit Proteinspezifischen Antikörpern TCTP (1:2000, 1h) und MYC (1:500 ü.N.) nachgewiesen. Mit β-Aktin wurde die gleichmäßige Probenbeladung überprüft.

Der zweite Kandidat, das Protoonkogen c-Myc (MYC), ist ein Mitglied der Familie von MYC-Proteinen (N-Myc, L-Myc, S-Myc und B-Myc) und reguliert als Transkriptionsfaktor vor allem die Zellproliferation (198, 214). Seine Aktivität als Onkogen beruht auf der gesteigerten Expression, die durch eine Genamplifikation, erhöhte Transkription oder Translation seiner mRNA verursacht wird (215). In ca. einem Drittel humaner Tumorerkrankungen ist die *MYC*-Expression durch komplexe Translokationen dereguliert (216). Beim humanen MM treten karyotypische Veränderungen von *MYC* nur bei ca. 15% der Patienten auf (217-219). Komplexe Anomalien von *MYC* sind späte sekundäre Ereignisse in der MM-Progression und korrelieren daher stärker mit fortgeschrittenen MM-Tumoren (ca. 40%) und zu über 90% mit HMZL (26, 27). Es ist außerdem bekannt, dass die MYC-Proteinexpression in malignen Plasmazellen (220) und HMZL häufig erhöht ist (221). Die MYC-Translation kann über Cap-abhängige sowie -unabhängige Mechanismen initiiert werden (222), da die 5'-NTR der *MYC*-mRNA eine funktionelle IRES-Struktur enthält (223, 224). Die *MYC*-mRNA ist in den Microarray-Datensätzen der YB-1-IPs jeweils unter den ersten 100 Einträgen vertreten. Die Analyse der Proteinexpression der im Labor etablierten Zelllinien zeigt das vier der fünf untersuchten HMZL MYC-positiv sind (Abb. 3.7). Es ist bekannt, dass die MYC-negative Zelllinie U266 keine *MYC*-mRNA exprimiert (26, 221), womit die Western Blot-Ergebnisse indirekt bestätigt wurden.

Cobbold *et al.* zeigten, dass YB-1 einer von fünf bekannten IRES-*trans*-aktivierenden Faktoren (ITAFs) ist, die die *MYC*-Translation beeinflussen können (144, 145). Den Autoren zufolge trägt eine Punktmutation in der IRES-Sequenz entscheidend zur Deregulation von MYC beim MM bei (145, 225). Die postulierte *MYC* IRES-Mutation wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in einem unabhängigen Patientenkollektiv sequenziert um ihre Bedeutung beim MM zu validieren.

3.2.2. Die MYC-IRES ist nicht mutiert beim Multiplen Myelom

Cobbold *et al.* haben gezeigt, dass YB-1 und das Polypyrimidintrakt-bindende Protein-1 (PTB-1) die MYC-mRNA-Translation in einem Cap-unabhängigen Verhalten *in vitro* verstärken (145). Die heterozygote Punktmutation in der MYC-IRES-Sequenz, speziell im Exon 1 des MYC-Gens (ein C zu T Austausch an Position 5429, RefSeqGene NG_007161.1), führt zur Verstärkung der YB-1/PTB-1-Bindung an die IRES und steigert dadurch die MYC-Proteinsynthese (225, 226) Diese Mutation wurde in 42% (n=19) der analysierten MM-Fälle und 20% (n=10) der getesteten MGUS-Fälle detektiert (225, 226).

MYC wurde in der vorliegenden Arbeit übereinstimmend in allen IP-Proben als YB-1-gebundene mRNA identifiziert. Um die Relevanz der MYC-IRES Punktmutation zu ermitteln, wurden 88 primäre MM-Proben, die unterschiedliche genetische MM-Subgruppen abdeckten (IgH-Translokation, hyperdiploide Fälle, 13q und 17p Deletionen), auf diese Mutation hin untersucht (Kooperation mit Dr. C. Langer, Universitätsklinikum Ulm). Der beschriebene MYC-Genabschnitt wurde mit einem bidirektionalen Ansatz sequenziert. Für insgesamt 87 Fälle konnte nur die Wildtyp MYC-Sequenz detektiert werden. Eine einzige Patientenprobe hatte die C/T-Punktmutation, aber diese konnte ebenfalls in der Keimbahnkontrolle nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Sequenzierung (C/C=0,989 und C/T=0,011) stimmen mit dem bekannten *single nucleotide polymorphism* (SNP) für diese Region (rs4645949) überein. Dieser hat eine Genotypfrequenz von C/C=0,988 und C/T=0,012 in der NIH PDR90 Bevölkerungsgruppe.

Dieser MYC-Genabschnitt wurde zusätzlich auch in den MYC- und YB-1-positiven HMZL AMO-1 und MM.1S sequenziert und die beschriebene C/T-Punktmutation konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse implizieren, dass die MYC-mRNA unabhängig von der veröffentlichten IRES-Mutation translatiert werden kann.

3.3. Expression von YB-1, TCTP und MYC in primären Plasmazytomzellen

3.3.1. Primäre MM-Zellen sind TCTP- und MYC-mRNA-positiv

Die vorangegangenen Experimente gezeigt haben, dass *TCTP* und *MYC* YB-1-gebundene mRNAs sind, die YB-1-positiven Linien *TCTP* exprimieren und – bis auf U266 – *MYC*-positiv sind. Um die Bedeutung von *TCTP* und *MYC* im primären Kontext zu ermitteln, wurden maligne Plasmazellen von MM-Patienten in die Untersuchungen eingeschlossen. Als erstes wurde die mRNA-Expression von *TCTP*, *MYC* und *YB-1* (Abb. 3.8) mittels *real-time* PCR in CD138-aufgereinigten Plasmazellen von diagnostischen Knochenmarkpunktionen (Kooperation Dr. C. Langer, Universitätsklinikum Ulm) bestimmt (n=5).

Eine akzeptierte Methode zur Korrektur von Störfaktoren, die jede *real-time* PCR beeinflussen, ist die Normalisierung der Expression des Zielgens (*TCTP*, *MYC* oder *YB-1*) zur Expression eines Referenzgens (Aktin). Dazu wurden in derselben Probe die Expression des Zielgens und des Referenzgens parallel erfasst. Für jede Patientenprobe wurde der C_t -Wert des Referenzgens (Aktin) vom C_t -Wert des Zielgens subtrahiert (ΔC_t). Die mRNA-Expression der Zelllinien AMO-1 (a) und MM.1S (b) bzw. von normalen Plasmazellen (PZ) (c) diente bei der Auswertung als Kalibrator (gestrichelte Linie in Abb. 3.8). Mit Hilfe dieser Kalibratoren wurde das „ $\Delta\Delta C_t$ “-Berechnungsmodell angewandt, indem vom ΔC_t -Wert der Patientenprobe der ΔC_t -Wert des Kalibrators (AMO-1, MM.1S oder normale PZ) abgezogen wurde. Aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ergibt sich der relative Expressionsunterschied (*fold change*) der Probe zwischen dem Patienten und dem Kalibrator, normalisiert auf das Referenzgen (Aktin). Aus Abb. 3.8 a) und b) wird ersichtlich, dass die *TCTP*-mRNA im Vergleich zu den HMZL in den fünf getesteten Patienten stark exprimiert ist (*fold change* = 1,5 - 6). Über die potentielle Ursache der deutlichen *TCTP*-Expression gibt es bisher keine Hinweise aus der Literatur.

Die *YB-1*- und *MYC*-mRNA-Expression ist ca. vergleichbar mit den Leveln von AMO-1, liegt jedoch insgesamt unter den *TCTP*-Leveln. Im Vergleich zu MM.1S ist die *YB-1*- und *MYC*-mRNA in den Patientenproben schwächer exprimiert. Um diese Ergebnisse besser deuten zu können, wurden CD138⁺-PZ von gesunden Probanden in die Experimente mit einbezogen [Abb. 3.8 c)]. Die Grafik zeigt, dass die *YB-1*-mRNA-Level, Patient 3 ausgenommen, ungefähr denen von normalen PZ entsprechen (*fold change* = 0,8 - 2,5). Es gibt bisher aus der Literatur (227) und von *in situ* FISH-Analysen primärer MM-Fälle (persönliche Mitteilung Dr. C. Langer) keine Hinweise auf eine verstärkte *YB-1*-Expression durch genomische Aberrationen des *YB-1*-Genlokus. Die Daten hier zeigen, dass die *YB-1*-Transkription insgesamt vermutlich kaum dereguliert ist.

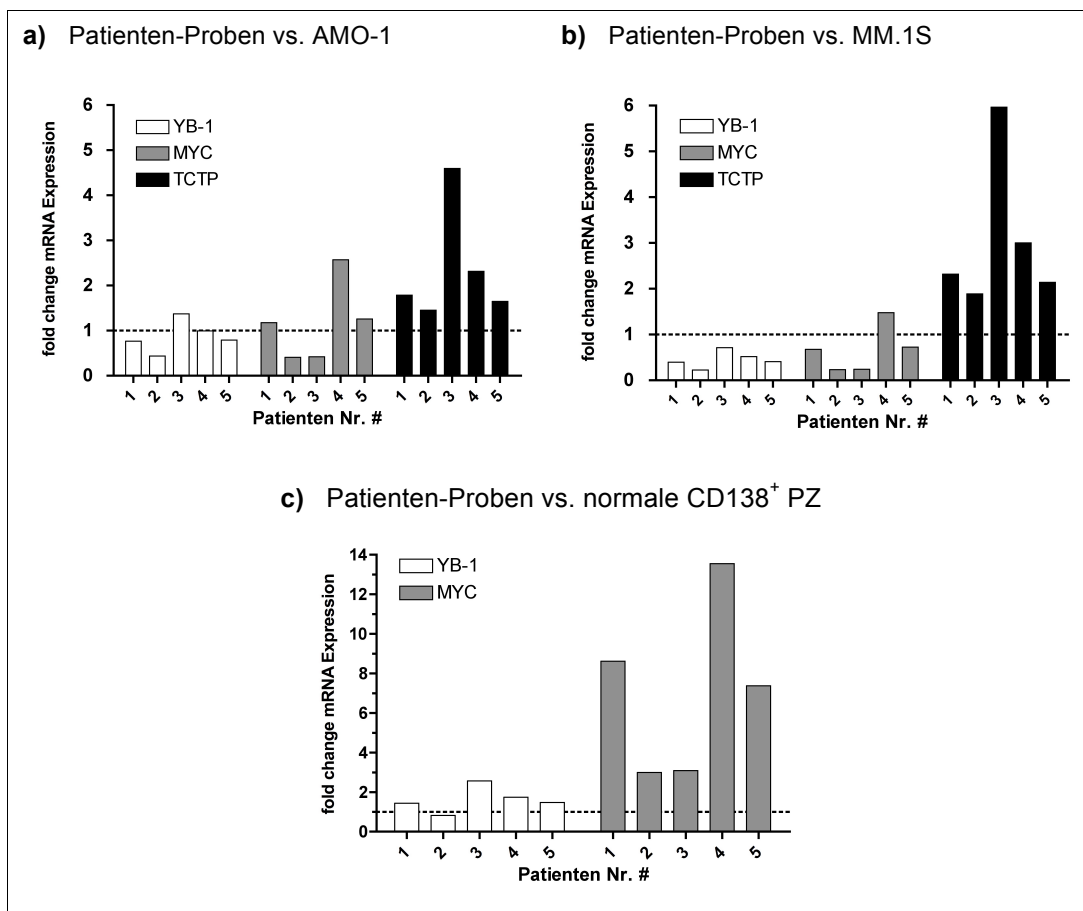


Abb. 3.8: mRNA-Expression von YB-1, MYC und TCTP in primären MM-Zellen. Mittels *real-time* PCR wurde die YB-1-, MYC- und TCTP-Expression bestimmt. **a)** Das Diagramm zeigt die mRNA-Expression von fünf Patientenproben relativ zur Expression in der AMO-1 Zelllinie, die hier als Kalibrator fungiert (gestrichelte Linie, *fold change* = 1). **b)** Analog zu a) diente die Zelllinie MM.1S als Kalibrator, um die mRNA-Expression relativ zu den Patientenproben zu veranschaulichen. **c)** CD138⁺ Plasmazellen gesunder Spender wurden analysiert, um die YB-1 und MYC-Expression relativ zu den MM-Patienten zu verdeutlichen.

Der relative Expressionsunterschied von *MYC* im Vergleich zu normalen PZ beträgt mindestens 3-fach (Patient 2 und 3) bis maximal 13,5-fach (Patient 4). Diese deutliche Aktivierung von *MYC* kann beim MM durch genetische Veränderungen wie Chromosomen-Translokationen oder Amplifikationen des *MYC*-Genlokus erfolgen (6, 11). Auch die Variabilität der *MYC*-Expression von wenig bis stark erhöht ist bekannt (228, 11). Für drei der Patienten lagen Daten zur strukturellen Variation des Erbgutes vor (*copy number variants*). Demnach hat Patient 1 einen Zugewinn auf Chromosom 8q und somit auch *MYC*. Die Patienten 2 und 5 haben diesbezüglich keine Zugewinne oder Verluste. Die Ergebnisse der *real-time* PCR belegen die mRNA-Expression der Kandidaten in malignen Plasmazellen von MM-Patienten. Nachfolgend wurde die Proteinexpression von TCTP und MYC im Vergleich zur YB-1-Expression in Primärmaterial bestimmt.

3.3.2. *Heterogene MYC-Expression in primären, intramedullären MM-Zellen*

Die Proteinexpression von MYC und YB-1 bzw. TCTP und YB-1 in Primärmaterial ist für die Einschätzung einer klinischen Relevanz der bisherigen Daten von großer Bedeutung (Kooperation mit Dr. A. Mottok, Pathologisches Institut, Universität Würzburg).

Aus diesem Grund wurden 20 diagnostische Knochenmarkbiopsien von MM-Patienten mit einer hohen Infiltration CD138⁺-PZ auf YB-1, MYC und TCTP immunhistochemisch untersucht (s. Anhang A2).

Beispielhaft werden in Abb. 3.9 zwei Fälle dieser immunhistochemischen Untersuchungen präsentiert. Die hohe Infiltration der Biopsien mit MM-Zellen wird durch die Färbung maligner Plasmazellen mit dem spezifischen Oberflächenmarker CD138 sichtbar. Die beiden stark CD138⁺-Fälle weisen auch eine deutliche YB-1-Expression im Zytoplasma auf (#2 100%, #13 95%). Die MYC-Färbung im Zellkern der MM-Zellen schwankt trotz der guten YB-1-Expression stark zwischen beiden Fällen (#2 80%, #13 5%). TCTP hingegen zeigt eine gute Ko-Expression in den YB-1⁺-Fällen (#2 90%, #13 80%)

Insgesamt betrachtet liegt die Anzahl der Fälle, die jeweils einen Anteil positiver Zellen von $\geq 20\%$ aufweisen, für YB-1 bei 90%, für MYC bei 60% und für TCTP bei 85% [siehe auch Tab. 3.2 a)]. Dabei gibt es eine potentielle Ko-Expression, d.h. eine Überlappung der Proteinexpression von mindestens $\geq 20\%$, für TCTP und YB-1 in 75% (15/20 Fälle), und für MYC und YB-1 in 30% (6/20 Fälle) aller Fälle.

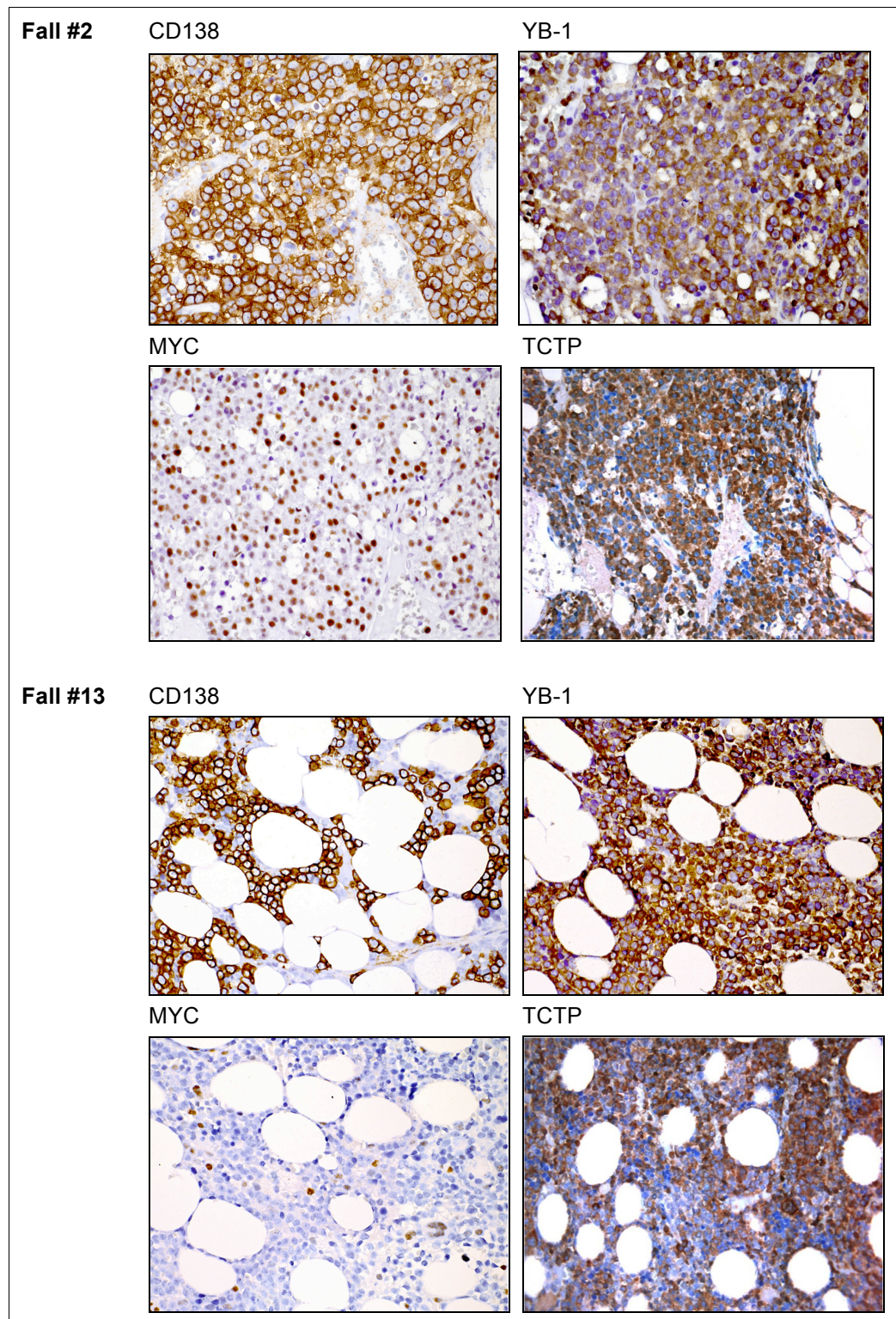


Abb. 3.9: Immunhistochemische Färbungen intramedullärer MM-Fälle. Exemplarisch für die angefertigten IHC-Färbungen (n=20) sind hier zwei MM-Fälle (#2, #13) abgebildet. Die Paraffinschnitte wurden nach der Antigen-Rückgewinnung für 1h mit den Antikörpern CD138 (1:100), YB-1 (1:800), MYC (1:100) oder TCTP (1:2000) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung mit α -CD138 (oben links) markiert die Plasmazellen in der Patientenprobe und veranschaulicht die hohe Plasmazellinfiltration im Beckenkamm der Patienten. Für die Detektion des Primärantikörpers wurde das Peroxid-basierte Advance™ HRP System (DAKO) verwendet. Beide MM-Fälle zeigen eine starke YB-1- und TCTP-Expression, während der Anteil MYC-positiver Zellen zwischen den Proben stark schwankt. Die Zellkerne wurden routinemäßig mit Hämalaun blau gefärbt.

Um die gesamte pathologische Auswertung der immunhistochemischen Analyse zu veranschaulichen wurde ein Streudiagramm angefertigt (Abb. 3.10 a); s. Anhang A2). Es zeigt die prozentuale Verteilung der YB-1-, MYC- oder TCTP-gefärbten Zellen in den 20 untersuchten Fällen. Anhand dieses Diagramms wird erneut das oben beschriebene Expressionsmuster mit einem geringeren Anteil MYC-positiver Zellen verdeutlicht, die im Median ca. 20% der MM-Zellen ausmachen, während die YB-1-Expression bei 85% und die von TCTP bei 60% liegt.

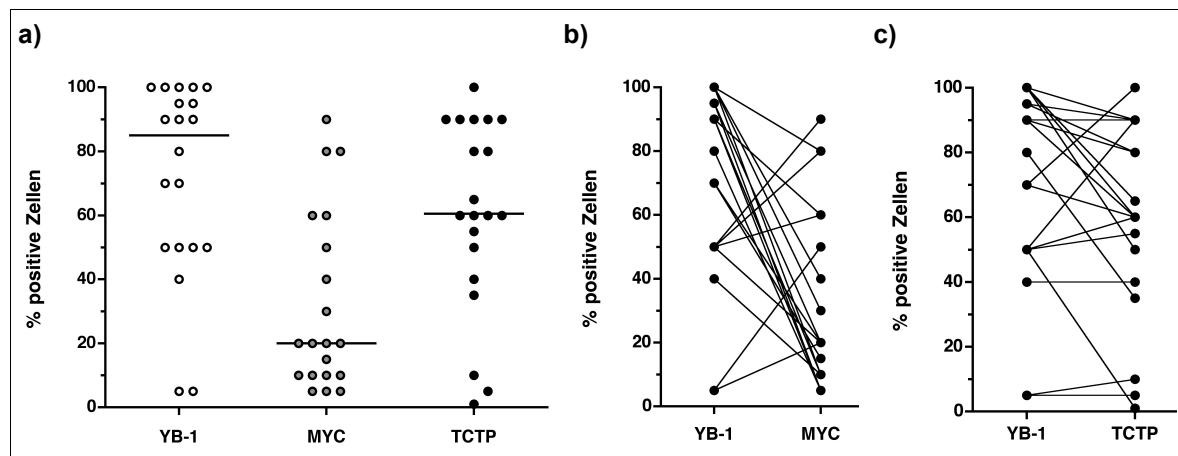


Abb. 3.10: Auswertung der immunhistochemischen Färbungen intramedullärer MM-Fälle. a) Für jede IHC-gefärbte Patientenprobe wurde der Anteil von YB-1-, MYC- und TCTP-positiven Zellen geschätzt (n=20). Die horizontalen Balken markieren den Median des Positiv-Anteils in % für die jeweilige Färbung. b) Korrelation des Anteils YB-1 und MYC-positiver Zellen in den untersuchten MM-Fällen, die laut statistischer Analyse nicht signifikant ist. c) Die Korrelation des Anteils YB-1- und TCTP-positiver Zellen zeigt eine statistisch signifikante Paarung von YB-1 und TCTP in den gefärbten MM-Fällen ($p < 0.001$).

Darüber hinaus wurde die Korrelation der YB-1-Expression mit MYC (b) bzw. mit TCTP (c) untersucht (Abb. 3.10). Bei YB-1 und MYC korreliert die hohe YB-1-Expression nicht mit einer hohen MYC-Expression. Auch die statistische Auswertung mit dem gepaarten t-Test belegt dies, denn der Versuch einer Paarung beider Färbungen war statistisch nicht signifikant ($p = \text{n.s.}$). Dies zeigt, dass YB-1⁺-Zellen nur begrenzt gleichzeitig MYC⁺ sind, und auch eine hohe YB-1-Expression nicht mit einer hohen MYC-Expression einhergeht. Für YB-1 und TCTP hingegen ergab der gepaarte t-Test eine statistisch signifikante Paarung ($p < 0.001$) der Expression, d.h. hohe YB-1-Level korrelieren sehr gut mit einer hohen TCTP-Expression.

3.3.3. Erhöhte Korrelation zwischen YB-1 und MYC in extramedullären Myelomen

Im Vergleich zu den HMZL ist die YB-1/MYC-Ko-Expression der intramedullären MM-Fällen heterogen. Da HMZL vornehmlich von extramedullären Plasmozytomen etabliert wurden und damit in der Progression der Erkrankung ein späteres MM-Stadium repräsentieren, wurde die Ko-Expression der Proteine zusätzlich in 10 extramedullären Fällen immunhistochemisch untersucht (Abb. 3.11). Hierbei konnte insgesamt eine stärkere Ko-Expression von YB-1 und MYC nachgewiesen werden. Alle analysierten Fälle exprimieren YB-1 und 70% (7/10 Fälle) zeigen eine Ko-Expression von MYC ($\geq 20\%$ MYC-positive Zellen) [Tab. 3.2 b)]. Damit steigt während der Tumorprogression die Wahrscheinlichkeit der Deregulation beider Proteine.

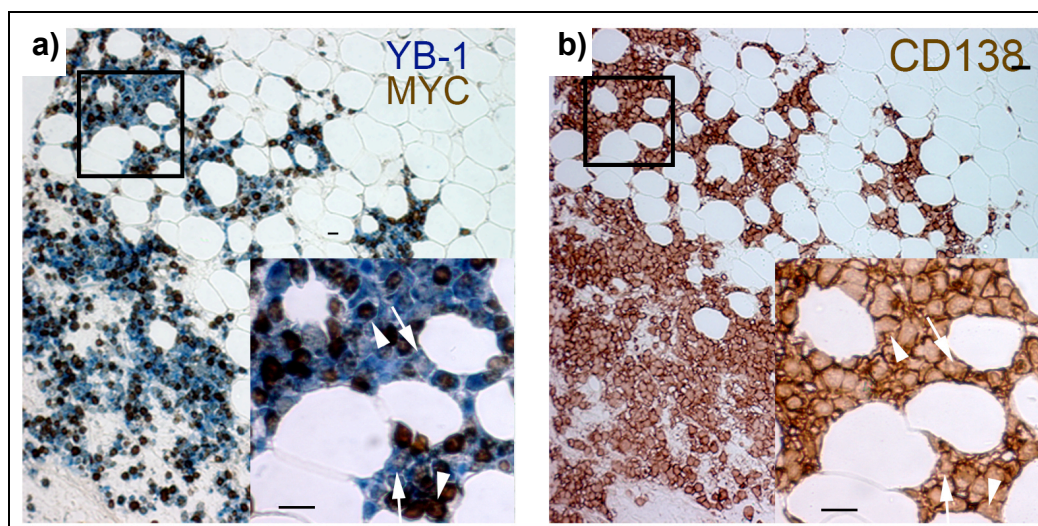


Abb. 3.11: Immunhistochemische Färbung extramedullärer MM-Fälle. Beispielhaft ist hier die Färbung eines extramedullären Plasmozytoms dargestellt, das eine starke Plasmazellinfiltration zeigt (n=10). Der markierte Bereich ist als Ausschnitt unten rechts vergrößert dargestellt. Unter **a)** ist die Expression von MYC (braun) und YB-1 (blau) erkennbar. Hierbei markieren die Pfeile Zellen, die YB-1 exprimieren, Pfeilspitzen zeigen Zellen, die YB-1 und MYC ko-exprimieren. **b)** Die CD138-Färbung verdeutlicht, dass CD138⁺-Zellen YB-1 exprimieren, aber nur ein Teil exprimiert auch MYC. (Skalierung = 20µm)

Tab. 3.2: Zusammenfassende Auswertung der Immunhistochemie primärer Fälle.

a) intramedulläre MM-Fälle			b) extramedulläre MM-Fälle		
Fall #	MYC % positive Tumorzellen	YB-1 % positive Tumorzellen	Fall #	MYC % positive Tumorzellen	YB-1 % positive Tumorzellen
1	90	50	21	100	100
2	80	100	22	90	100
3	60	90	23	90	100
4	20	95	24	90	100
5	5	80	25	80	100
6	20	70	26	60	100
7	10	90	27	40	100
8	60	50	28	5	100
9	80	50	29	5	100
10	20	5	30	0	100
11	10	40			
12	50	5			
13	5	95			
14	5	90			
15	15	70			
16	20	50			
17	30	100			
18	40	100			
19	10	100			
20	10	100			

Fälle mit einer errechneten minimalen YB-1/MYC-Doppelpositivität von $\geq 20\%$ sind gelb hervorgehoben.

3.4. Funktionelle Charakterisierung von YB-1 im Zytoplasma humaner Myelomzelllinien

3.4.1. Abnahme der MYC- und TCTP-Expression infolge des YB-1-Knockdowns

Wie die vorangegangenen Abschnitte zeigen, haben die HMZL eine Wildtyp *MYC*-IRES Sequenz und YB-1 bindet die *MYC* und *TCTP* mRNA. Für die weitere funktionelle Charakterisierung der Translationskontrolle durch YB-1, wurden shRNA-vermittelte YB-1-Knockdown Experimente in den YB-1-, MYC- und TCTP-positiven Zelllinien AMO-1 und MM.1S durchgeführt. Nach der Ko-Elektroporation der YB-1-shRNA und dem LNGFR-Oberflächenmarker wurden die transfizierten Proben nach 24 h mittels Magnetseparation auf LNGFR⁺-Zellen selektiert und für die anschließenden Analysen des YB-1-Knockdowns bis zu 96 h kultiviert. Für AMO-1 und MM.1S wurde bereits 72 h nach der Transfektion (n.T.) die Proteinexpression mittels Western Blot kontrolliert [Abb. 3.12 a)]. Der Nachweis mit dem YB-1-Antikörper zeigt für beide HMZL nach 72 h signifikant reduzierte YB-1-Proteinlevel in den shRNA-behandelten Proben. Darüber hinaus sinkt die Proteinexpression von MYC und TCTP im Vergleich zur Kontroll-Transfektion.

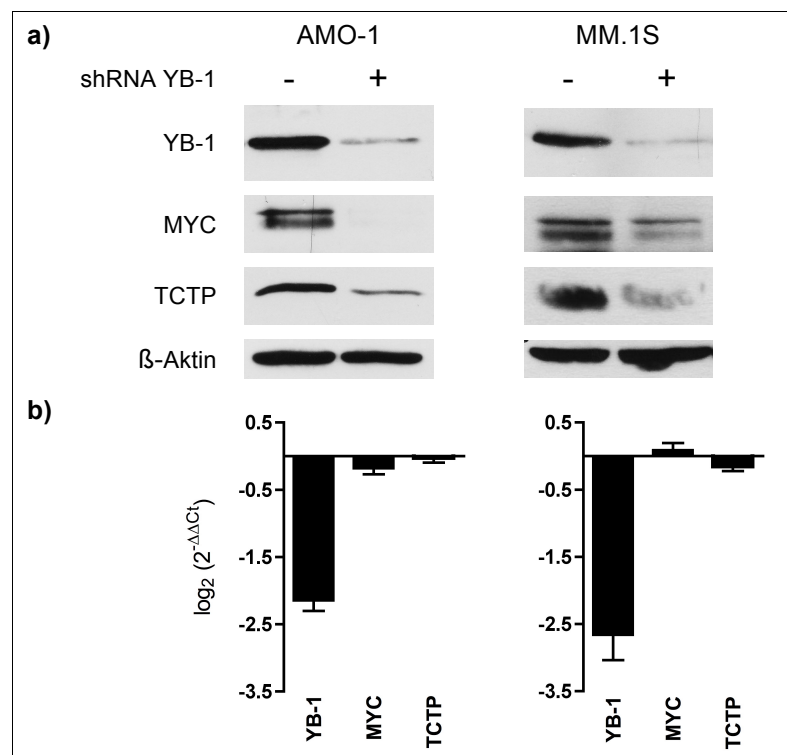


Abb. 3.12: Transienter YB-1-Knockdown in AMO-1 und MM.1S. a) Der Western Blot veranschaulicht den shRNA-vermittelten Knockdown der YB-1 Expression 72 h n.T. Im Vergleich zur Kontroll-Transfektion ist zudem die Reduktion der MYC- und TCTP-Proteinexpression in beiden Zelllinien erkennbar. Die β -Aktin-Detektion diente als Ladekontrolle. b) Die *real-time* PCR Analyse der mRNA-Expression 48 h nach der YB-1 shRNA-Transfektion zeigt reduzierte YB-1 mRNA-Level für AMO-1 und MM.1S, während die Expression von MYC und TCTP unverändert ist, $n \geq 4$.

Die Abnahme der MYC- und TCTP-Expression infolge des YB-1-Knockdowns weist auf eine YB-1-abhängige Regulation der Proteine in den HMZL hin. Diese Reduktion der Expression kann durch eine Verringerung der mRNA-Translation oder -Transkription verursacht werden. Um den verantwortlichen Mechanismus zu identifizieren, wurde 48 h nach der YB-1-shRNA-Transfektion die mRNA-Expression von *MYC* und *TCTP* mittels *real-time* PCR bestimmt. Für die Berechnung des *fold change* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) wurden die Kontroll-transfizierten Zellen als Kalibrator verwendet und die Aktin-mRNA diente als endogene Kontrolle. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.12 b) zur besseren Veranschaulichung logarithmisch (\log_2) dargestellt. Es wird deutlich, dass die *MYC*- und *TCTP*-Expression durch den YB-1-Knockdown nicht beeinflusst wird (AMO-1 $\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct} MYC = -0.18 \pm 0.19$, $TCTP = -0.03 \pm 0.14$; MM.1S $\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct} MYC = 0.09 \pm 0.11$, $TCTP = -0.09 \pm 0.07$), während die *YB-1*-mRNA selbst herunterreguliert ist (AMO-1 $\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct} YB-1 = -1.9 \pm 0.46$; MM.1S $\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct} YB-1 = -2.7 \pm 0.38$). Diese Ergebnisse zeigen, dass die reduzierte Proteinexpression von MYC und TCTP nicht durch die Abnahme der mRNA-Expression bedingt ist und vermutlich auf der Translationsebene reguliert wird.

3.4.2. *YB-1 kontrolliert die Verfügbarkeit der MYC-mRNA für den Translationsapparat*

Für die weitergehende Charakterisierung des potentiellen Mechanismus der beim YB-1-Knockdown zur Hemmung der mRNA-Translation führt, wurde eine stabile AMO-1 Zelllinie hergestellt, die eine Doxycyclin-induzierbare YB-1-shRNA exprimiert (AMO-1-tet). Der Vorteil gegenüber der transienten Transfektion ist die Minimierung versuchsbedingter Schwankungen in der Knockdown-Effizienz. Der Western Blot in Abb. 3.13 zeigt die Abnahme der YB-1, MYC und TCTP Proteinexpression 72 und 96 h nach der Doxycyclin-Behandlung analog zur Proteinreduktion der transienten Knockdown-Versuche nach 72 h (Abb. 3.12).

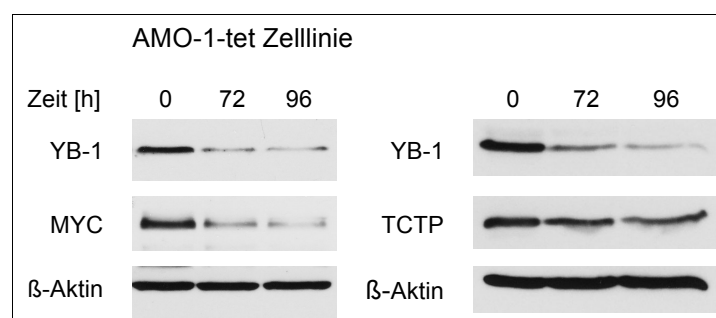


Abb. 3.13: Stabiler YB-1 Knockdown in AMO-1-tet Zellen. Bei den MM-Zellen der Linie AMO-1-tet wird durch Doxycyclin-Gabe die Expression der YB-1-shRNA induziert. Die Western Blot-Analyse Doxycyclin-behandelter (750 ng/ml) AMO-1-tet Zellen zeigt die Reduktion der YB-1-Expression nach 72 und 96 h. Zugleich ist auch die Abnahme der MYC- bzw. TCTP-Proteinexpression nachweisbar.

Mit der stabilen Zelllinie AMO-1-tet wurden Dichtegradienten-Zentrifugationen durchgeführt (Kooperation mit M. Küspert, Abteilung für Biochemie, Theodor-Boveri-Institut, Universität Würzburg). Ziel der Versuche war es, ein Polysomenprofil von unbehandelten und Doxycyclin-behandelten AMO-1-tet Zellen zu erstellen, um YB-1-Knockdown-induzierte Unterschiede z.B. in der Konzentration einzelner Ribosomen-Untereinheiten und den Polysomen festzustellen, und die darin enthaltene mRNA-Menge zu bestimmen. Hierfür wurden zytosolische Extrakte der Doxycyclin-behandelten (96 h) und unbehandelten AMO-1-tet Zellen unter Verwendung eines 5 - 45% (w/v) Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt (Abb. 3.14).

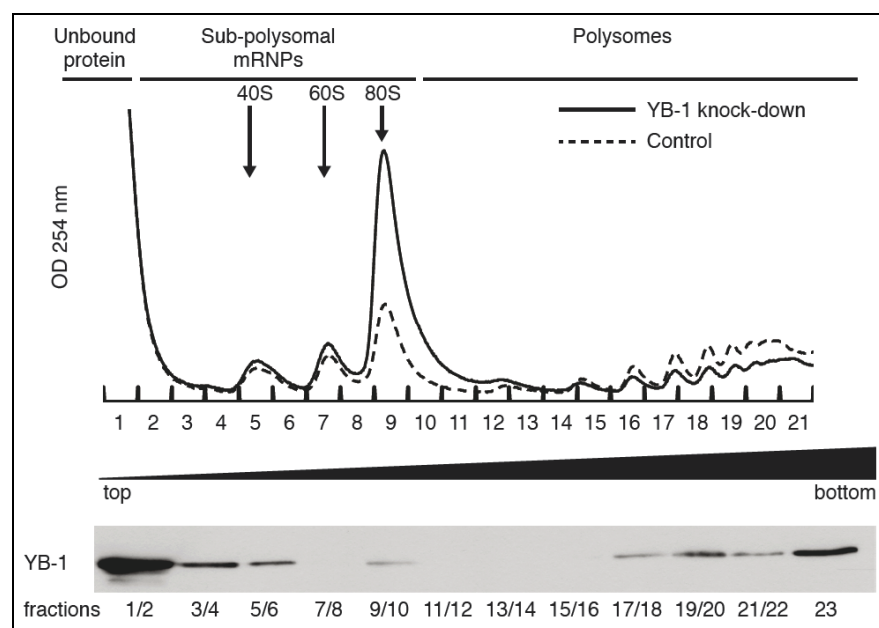


Abb. 3.14: Polysomenprofil und Western Blot-Analyse von AMO-1-tet Zellen. Zytosolische Zellextrakte wurden mittels Ultrazentrifugation in einem Saccharose-Dichtegradienten [5 - 45% (w/v)] aufgetrennt. Es wurden insgesamt 21 Fraktionen automatisiert gesammelt und für das Polysomenprofil zeitgleich die optische Dichte des Gradienten bei 254 nm bestimmt. Die gestrichelte Linie im Diagramm zeigt das charakteristische Polysomenprofil von unbehandelten AMO-1-tet Zellen. Die kleinen Peaks in den Fraktionen 14-21 repräsentieren die translationell aktiven Polysomen. Im Vergleich dazu zeigt die durchgehende Linie das Polysomenprofil der YB-1-Knockdown AMO-1-tet Zellen nach 96 h mit Doxycyclin (750 ng/ml). Der YB-1-Knockdown führt zu einem Anstieg der translationell inaktiven, freien 80S Ribosomen und einer Abnahme der Polysomen. Für die Western Blot-Analyse wurden je zwei benachbarte Fraktionen des Gradienten von unbehandelten AMO-1-tet Zellen vereint. Es wurden insgesamt zwei Fraktionen mehr analysiert, die im Polysomenprofil nicht abgebildet werden konnten. Dabei entspricht Nr. 22 dem Restvolumen im Aufnahme-Schlauch des Fraktionensammlers und Nr. 23 dem verbliebenen Gradienten im Zentrifugenröhrchen. Der Western Blot für YB-1 zeigt die sub-polysomale- sowie Polysomen-Assoziation des Proteins.

Das Profil zeigt für beide Proben in den Fraktionen 5 bis 8 die kleine 40S- und die große 60S-Ribosomenuntereinheit, die einen Teil der sub-polysomalen *messenger ribonucleoprotein particles* (mRNPs) repräsentieren. Der Peak bei den Fraktionen 9 und 10 entspricht den freien

80S Ribosomen und die kleineren Peaks ab Fraktion 14 repräsentieren die translationell aktiven Polysomen. Der direkte Vergleich des Fraktionierungsprofils unbehandelter (gestrichelte Linie) und Doxycyclin-behandelter AMO-1-tet Zellen (durchgehende Linie) zeigt den Anstieg in der sub-polysomalen mRNPs, vor allem der freien 80S Ribosomen, und eine Abnahme der Polysomen infolge des YB-1-Knockdowns.

Zur Überprüfung der Polysomen-Assoziation von YB-1 wurden die Fraktionen der unbehandelten AMO-1-tet Zellen im Western Blot analysiert (Abb. 3.14). Ein Großteil von YB-1 ist hierbei als ungebundenes Protein in der leichten Fraktion des Gradienten nachweisbar (Fraktion 1-4). Darüber hinaus wird die Assoziation von YB-1 mit der 40S-Ribosomenuntereinheit (Fraktionen 5/6), den freien 80S Ribosomen (Fraktionen 9/10) und den translationell aktiven Fraktionen – den Polysomen – sichtbar.

In diesem Abschnitt wurde bisher gezeigt, dass der YB-1-Knockdown zu einer Abnahme der MYC- und TCTP-Proteinexpression führt, während die dazugehörigen mRNA-Level stabil bleiben. Die deutliche Verschiebung des Polysomenprofils hin zu den sub-polysomalen mRNPs könnte die reduzierte MYC- und TCTP-Proteinsynthese erklären. Hierbei könnte durch die Verlagerung der mRNA in diese translationell inaktiven Fraktionen die Hemmung der Translation erfolgen. Im Anschluss an die Dichtegradienten-Zentrifugation wurden deshalb die gesammelten Fraktionen 1-10 (sub-polysomale mRNPs) und 11-23 (Polysomen) mittels *real-time* PCR analysiert. Stellvertretend für beide Kandidaten wurde die *MYC*-mRNA in den vereinten Fraktionen 1-10 und 11-23 quantifiziert. Der YB-1-Knockdown führt zu einer 16%igen Reduktion der *MYC*-mRNA in den Polysomen (Fraktionen 11-23) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n=2). Darüber hinaus konnte ein Anstieg der *MYC*-mRNA von 42% in den sub-polysomalen mRNPs nachgewiesen werden (n=2). Diese Ergebnisse zeigen, dass die *MYC*-mRNA die translationell aktiven Polysomen nicht mehr erreicht und vermehrt im Bereich der sub-polysomalen mRNPs lokalisiert ist.

Anhand von Polysomen-Gradienten konnte der zugrunde liegende Mechanismus der reduzierten Proteinsynthese nach einem YB-1-Knockdown ermittelt werden. Nur in Gegenwart von YB-1 werden mRNAs wie *MYC* aktiv in die Polysomen transportiert und effizient translatiert.

3.4.3. Der YB-1-Knockdown aktiviert Caspasen und induziert Apoptose

Neben den mechanistischen Untersuchungen zur YB-1-vermittelten Translation wurden die Auswirkungen des YB-1-Knockdowns auf die Lebensfähigkeit der HMZL genauer untersucht und der molekulare Hintergrund der Apoptose-Induktion bestimmt. Zu diesem Zweck wurde die Zellviabilität, Caspase-Aktivität und das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) der HMZL 72 h nach der shRNA-Transfektion ermittelt.

Die Abb. 3.15 a) zeigt die Auswertungen der Durchflusszytometrie (FACS)-Messungen zur Bestimmung des viablen Zellanteils für AMO-1 ($53 \pm 3\%$) und MM.1S ($56 \pm 6\%$) relativ zur jeweiligen Kontroll-Transfektion. Die viable Zellfraktion ist durch den YB-1-Knockdown und der damit einhergehenden Abnahme der MYC- bzw. TCTP-Expression signifikant reduziert.

Mit dem zellpermeablen *in situ* Marker für Apoptose – FITC-VAD-FMK – wurde eine erhöhte Caspase-Aktivität um durchschnittlich 40% in den Zellen 72 h (AMO-1) bzw. 96 h (MM.1S) nach der Transfektion nachgewiesen [Abb. 3.15 b)]. Für MM.1S wurde bei diesen Analysen einheitlich Zellen 96 h n.T. verwendet, weil diese Zelllinie zunächst einen Zellzyklusarrest durchläuft und demzufolge später Apoptose ausgelöst wird (54).

Der Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ ist eine der ersten intrazellulären Veränderungen nachdem das Apoptose-Programm ausgelöst wurde. Apoptotische Zellen können durch die Färbung mit dem Farbstoff JC-1 anhand ihrer grünen Fluoreszenz (niedriges Membranpotential) leicht von gesunden Zellen unterschieden werden, die primär rot fluoreszieren. Wie die Abb. 3.15 c) zeigt, wurden Mitochondrien mit niedrigem Membranpotential in ca. 71% der AMO-1 (72 h) und 52% der MM.1S (96 h) Zellen nachgewiesen.

Die Induktion von Apoptose infolge des YB-1-Knockdowns konnte durch die Abnahme der Zellviabilität, die Zunahme der Caspase-Aktivität und dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials gezeigt werden. Bisher war jedoch unklar wie MYC und TCTP im einzelnen, also unabhängig vom YB-1-Knockdown, das Überleben der HMZL beeinflussen. Dies wurde mit Hilfe der nachfolgenden TCTP- und MYC-Knockdown-Experimente untersucht.

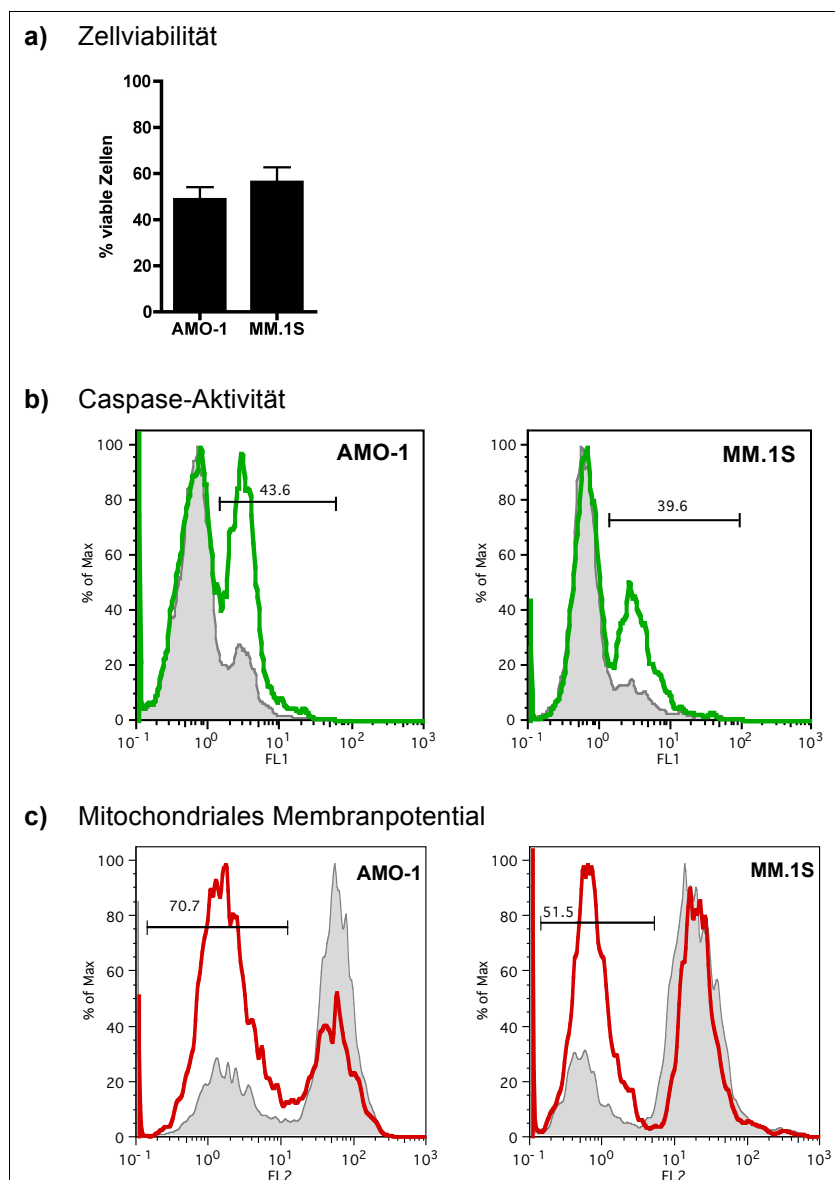


Abb. 3.15: YB-1-Knockdown induziert Apoptose in AMO-1 und MM.1S. **a)** Der Anteil viable Zellen beim YB-1-Knockdown ist in AMO-1 ($53 \pm 3\%$, $p < 0.01$) und MM.1S ($56 \pm 6\%$, $p < 0.001$) im Vergleich zu den Kontrollen 72 h n.T. reduziert, $n=4$. **b)** Mit dem *in situ* FACS-Assay CaspACE (FITC-VAD-FMK) wurde für AMO-1 (72 h) und MM.1S (96 h) eine erhöhte Caspase-Aktivierung in YB-1-Knockdown-Zellen nachgewiesen (grüner Graph: shRNA-behandelte Zellen; graues Histogramm: Kontrollzellen). **c)** Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials mittels JC-1-Färbung zeigt eine Zunahme depolarisierter Mitochondrien, da sich der Fluoreszenz-Farbstoff hier nicht anreichern kann. Dies wird deutlich anhand des Peaks (rot) mit reduzierter Fluoreszenz im Bereich von 10^{-1} bis 10^1 des Histogramms für AMO-1 (72 h) und MM.1S (96 h) im Vergleich zur Kontrolle (grau). Für b) und c) wurde jeweils ein repräsentatives Beispiel aus den Versuchen abgebildet ($n=4$).

3.5. Funktionelle Bedeutung von TCTP und MYC im Multiplen Myelom

3.5.1. Der TCTP-Knockdown hat keinen Einfluss auf die Viabilität von HMZL

Die TCTP-Knockdown-Versuche wurden mit einer zuvor validierten TCTP-shRNA in AMO-1 und MM.1S analog zum YB-1-Knockdown durchgeführt. Der Western Blot in Abb. 3.16 a) zeigt die signifikante Reduktion der TCTP-Expression in beiden HMZL im Vergleich zur Kontroll-Transfektion nach 72 h. Die Auswirkung des TCTP-Knockdowns auf das Überleben der MM-Zellen wurde ebenfalls 72 h n.T. im FACS analysiert. Das Diagramm in Abb. 3.16 b) zeigt die Auswertung der FACS-Analyse mit einem prozentualen Anteil viabler Zellen vergleichbar zur Kontroll-Transfektion (AMO 1 = $108 \pm 10\%$, MM.1S = $95 \pm 12\%$). Zusätzlich waren die HMZL negativ für aktivierte Caspasen und auch 5 Tage nach der Transfektion konnte keine signifikante Abnahme der Zellviabilität gemessen werden (ohne Abb.). Diesen Ergebnissen zufolge hat der TCTP-Knockdown allein keinen messbaren Einfluss auf die Lebensfähigkeit von AMO-1- und MM.1S-Zellen.

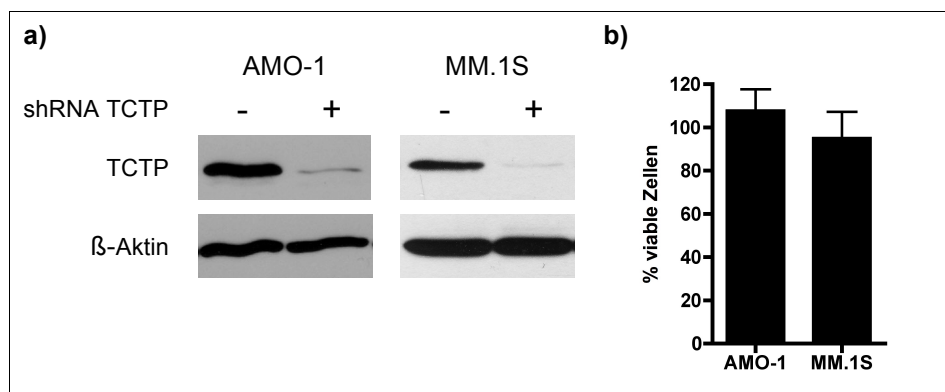


Abb. 3.16: Transienter TCTP-Knockdown in AMO-1 und MM.1S. a) Die TCTP-Proteinexpression in AMO-1 und MM.1S wurde 72 h nach der shRNA-Transfektion mit dem TCTP-Antikörper detektiert und zeigt den Protein-Knockdown, während die gleichmäßige Beladung mit einem β -Aktin-Antikörper kontrolliert wurde. b) Der Anteil viabler Zellen liegt für die Linien AMO-1 ($108 \pm 10\%$) und MM.1S ($95 \pm 12\%$) 72 h n.T. ungefähr auf dem Niveau der Kontroll-Transfektion, $n=3$. Der TCTP-Knockdown hat damit keinen Effekt auf die Zellviabilität der HMZL.

3.5.2. Reduktion der YB-1-Protein- und mRNA-Expression infolge des MYC-Knockdowns

Analog zu den Versuchen für YB-1 und TCTP wurden die MYC-Knockdown-Experimente in den HMZL AMO-1 und MM.1S durchgeführt. Die Western Blot-Analyse in Abb. 3.17 a) zeigt die MYC- und YB-1 Expression 72 h n.T. mit der MYC shRNA. Dabei wird deutlich, dass neben der direkt durch die shRNA betroffenen MYC-Expression auch die YB-1 Proteinexpression in den HMZL abnimmt.

Die reduzierte YB-1-Expression infolge des MYC-Knockdowns kann aufgrund einer veränderten mRNA-Translation oder -Transkription zustande kommen. Aus der Literatur gab es jedoch bereits Hinweise, dass der Transkriptionsfaktor MYC die *YB-1* mRNA-Expression reguliert (71, 227, 229). Mittels *real-time* PCR wurden daher die mRNA-Level 48 h nach der shRNA-Transfektion bestimmt.

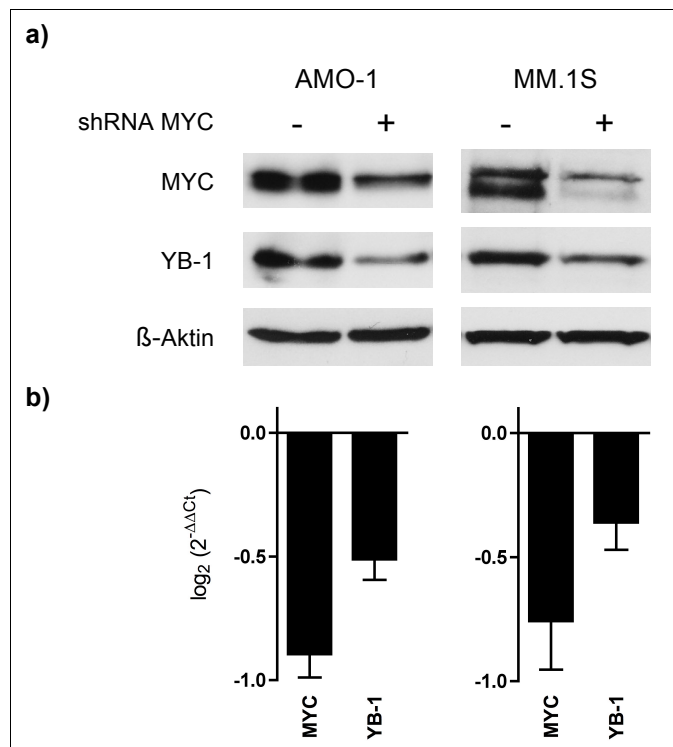


Abb. 3.17: Transienter MYC-Knockdown in AMO-1 und MM.1S. a) Der Western Blot zeigt den shRNA-vermittelten Knockdown der MYC-Expression 72 h n.T. Im Vergleich zur Kontroll-Transfektion ist zudem die Reduktion der YB-1-Proteinexpression in beiden Zelllinien erkennbar. b) Die *real-time* PCR Analyse der mRNA-Expression 48 h nach der MYC shRNA-Transfektion zeigt reduzierte *MYC* mRNA-Level für AMO-1 und MM.1S und eine Abnahme der *YB-1* mRNA, n=5.

Wie in Abb. 3.17 b) graphisch dargestellt, wurde neben dem Knockdown der *MYC* mRNA auch die Abnahme der *YB-1* Expression für beide Zelllinien nachgewiesen (AMO-1 $\log_2 2^{-\Delta\Delta C_t} MYC = -0.96 \pm 0.09$, $YB-1 = -0.65 \pm 0.17$; MM.1S $\log_2 2^{-\Delta\Delta C_t} MYC = -0.75 \pm 0.27$, $YB-1 = -0.41 \pm 0.06$). Diese Daten belegen den potentiellen Einfluss von MYC auf die Transkription der *YB-1*-mRNA.

3.5.3. Caspase-Aktivierung und der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials induziert Apoptose in MYC-Knockdown-Zellen

Die MYC-Knockdown-induzierten Effekte auf die Zellviabilität wurden, wie zuvor bereits beschrieben, anhand von FACS-Analysen bestimmt. Die Abb. 3.18 a) zeigt, dass mit der Reduktion der MYC- und YB-1-Expression auch die viable Zellpopulation von AMO-1 auf

$38 \pm 9\%$ und MM.1S auf $27 \pm 12\%$ sinkt. Zudem ist durch den MYC- und YB-1-Verlust die Caspase-Aktivität in AMO-1 (61%) und MM.1S (46%) erhöht [Abb. 3.18 b)]. Ein weiteres Indiz für die Initiation des Apoptose-Programms ist die JC-1 Färbung, die den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials in 71% der AMO-1 und 58% der MM.1S Zellen [Abb. 3.18 c)] zeigt.

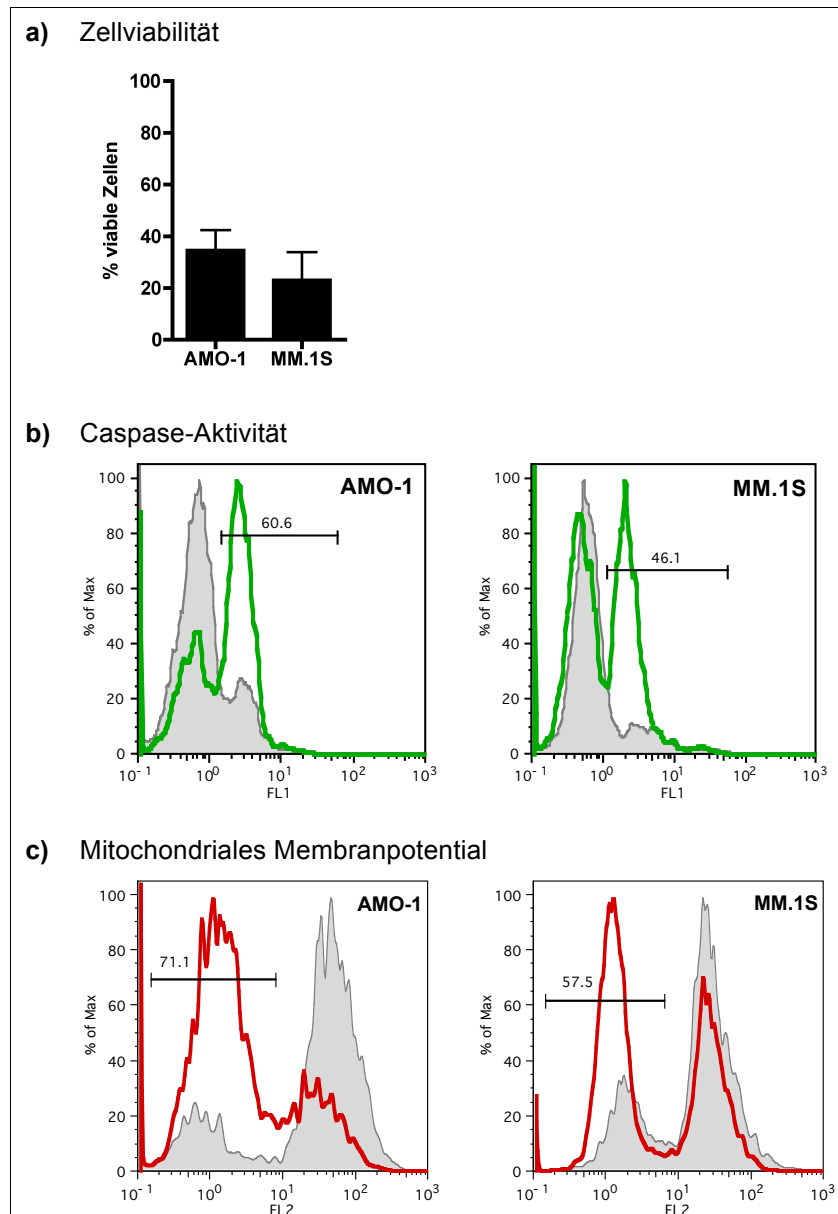


Abb. 3.18: MYC-Knockdown induziert Apoptose in AMO-1 und MM.1S. a) Der Anteil lebender Zellen beim MYC-Knockdown ist in AMO-1 ($38 \pm 8\%$, $p < 0.001$) und MM.1S ($27 \pm 12\%$, $p < 0.001$) im Vergleich zu den Kontrollen 72 h n.T. reduziert, $n=5$. b) Mit dem CaspACE *in situ* FACS-Assay wurde eine erhöhte Caspase-Aktivierung in MYC-Knockdown Zellen nachgewiesen (grüner Graph: shRNA-behandelte Zellen; graues Histogramm: Kontrollzellen). c) Die Störung des mitochondrialen Membranpotentials für 71% der AMO-1 (72 h) und 58% der MM.1S (96 h) Zellen im Vergleich zur Kontrolle (grau) ist mit JC-1 detektierbar. Für b) und c) wurde jeweils ein repräsentatives Beispiel aus den Versuchen abgebildet ($n=5$).

Zusammengefasst wird anhand dieser Knockdown-Experimente deutlich, dass MYC die *YB-1* mRNA-Expression in dem HMZL beeinflusst. Überdies induziert der Rückgang der MYC- und YB-1-Proteinexpression das Apoptose-Programm in den getesteten Linien.

3.5.4. Die YB-1-Überexpression schützt zum Teil vor MYC-Knockdown-induzierter Apoptose

Wie die Daten bislang zeigen, regulieren YB-1 und MYC ihre Expression wechselseitig auf der Translations- bzw. Transkriptionsebene. Dabei limitiert YB-1 die *MYC*-mRNA-Translation und MYC reguliert die Transkription der *YB-1*-mRNA. Aus diesem Grund war es mit den bisherigen YB-1- und MYC-Knockdown-Versuchen nicht möglich, den Einfluss der Proteine getrennt voneinander auf die Zellviabilität zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden sogenannte *Knockdown-Rescue*-Experimente durchgeführt. Hierfür wird beim Knockdown des einen Proteins durch Ko-Transfektion mit einem Expressionsplasmid die Überexpression des anderen Proteins angestrebt.

Zur artifiziellen MYC-Überexpression wurde das ATG-getriebene MYC-Konstrukt pBABC-Myc verwendet, da die MYC-Translation über die IRES-Struktur in der 5'-NTR YB-1-abhängig reguliert wird. Die Etablierung der MYC-Überexpression in den HMZL AMO-1 und MM.1S war jedoch nicht erfolgreich. Die ATG-getriebene MYC-Expression mit dem pBABC-Vektor konnte weder im Western Blot auf Proteinebene noch mittels *real-time* PCR auf mRNA-Ebene detektiert werden (ohne Abb.).

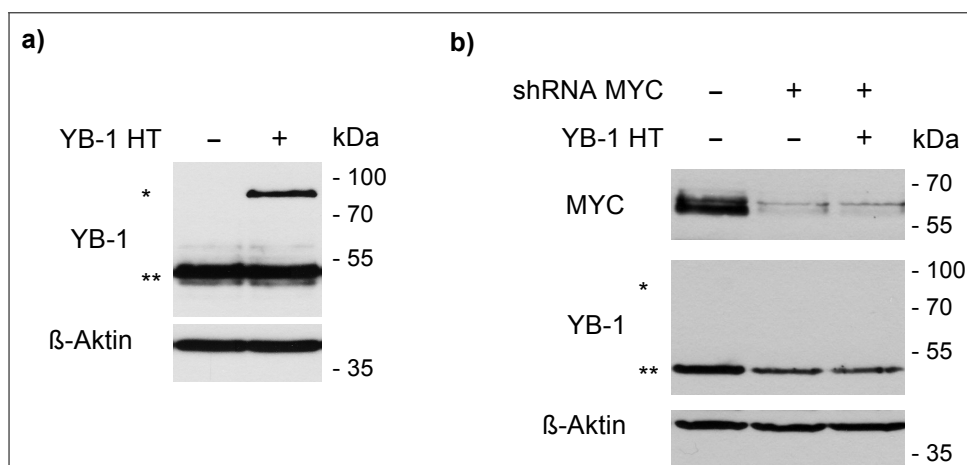


Abb. 3.19: Exogene YB-1 HaloTag-Expression (a) und MYC-Knockdown-Rescue Versuch (b). a) Nachweis der YB-1 HaloTag (*) Expression 72 h n.T. mit pFC8A-YB-1 in AMO-1 Zellen. Das ca. 80 kDa große Fusionsprotein ist leicht vom endogenen YB-1 (**) zu unterscheiden. b) Nachweis der MYC- und YB-1-Expression 72 h n.T. in MM.1S. Die MYC-Expression ist in den shRNA-behandelten Proben schwächer, gleichzeitig sind die endogenen YB-1-Level (**) im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Die Expression des exogenen YB-1 HaloTag (*) konnte mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

Im Anschluss wurde deshalb der MYC-Knockdown-*Rescue* durch eine YB-1-Überexpression mit dem Plasmid pFC8A-YB-1 getestet. YB-1 wird von diesem Plasmid als Fusionsprotein mit einem C-terminalen HaloTag synthetisiert, das durch seine Größe leicht vom endogenen YB-1 zu unterscheiden ist [Abb. 3.19 a)].

Die transiente Transfektion von AMO-1 zur Etablierung der YB-1-Überexpression mittels pFC8A-YB-1 erfolgte zusammen mit dem LNGFR-Oberflächenmarker für die magnetbasierte Aufreinigung transfizierter Zellen nach 24 h. Der Nachweis mit dem YB-1-Antikörper im Western Blot zeigt die Expression von YB-1 HaloTag (*) in der mit pFC8A-YB-1 HaloTag transfizierten Probe im Vergleich zur Kontrolle, bei der nur die endogene YB-1 Expression (***) nachweisbar ist [Abb. 3.19 a)]. Bei der Etablierung des *Knockdown-Rescue* wurde zudem darauf geachtet, dass die DNA-Konzentration bei der Ko-Transfektion (LNGFR-Selektionsmarker, MYC-Knockdown- und YB-1-Expressionsplasmid) insgesamt 65 µg Plasmid-DNA pro 3×10^7 Zellen nicht übersteigt, um zytotoxische Effekte zu vermeiden.

Der Western Blot in Abb. 3.19 b) zeigt den MYC-Knockdown in MM.1S für die shRNA-transfizierten Proben (shRNA MYC +). Gleichzeitig kommt es – wie erwartet – zur Reduktion der endogenen YB-1 Expression (**). Im Rahmen dieser *Rescue*-Experimente war es jedoch nicht möglich, die Überexpression von YB-1 HaloTag (*) im Western Blot darzustellen. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die mRNA-Expression 48 h n.T. untersucht.

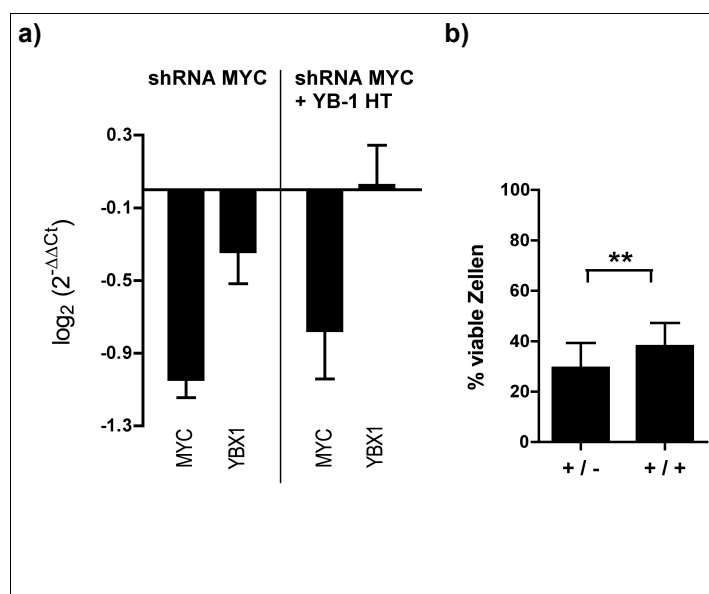


Abb. 3.20: mRNA-Expression und Zellviabilität beim MYC-Knockdown-*Rescue*. a) Die *real-time* PCR zur Kontrolle der MYC und YB-1 mRNA-Level 48 h n.T. zeigt eine Reduktion von MYC und YB-1 beim MYC-Knockdown. Die zusätzlich mit YB-1 HT transfizierten Proben haben im Vergleich dazu eine höhere YB-1-Expression, die insgesamt ca. den Leveln der Transfektionskontrolle entspricht, n=2. b) FACS-Analyse zur Ermittlung der viablen Zellpopulation (72 h n.T.) in MYC-Knockdown und *Knockdown-Rescue* Proben. Beim MYC-Knockdown (+ / -) liegt der Anteil viabler Zellen bei $29 \pm 10\%$ und beim *Knockdown-Rescue* Versuch (+ / +) bei $38 \pm 9\%$, n=3.

Aus Abb. 3.20 a) geht hervor, dass der MYC-Knockdown allein, wie zuvor gezeigt [Abb. 3.17 b)], zum Rückgang der MYC- und YB-1-Expression führt ($\log_2 2^{-\Delta\Delta C_t} MYC = -1.04 \pm 0.10$, $YB-1 = -0.34 \pm 0.18$). Bei der Ko-Transfektion mit YB-1 HaloTag bleiben die YB-1-Level konstant, es wird jedoch keine signifikante Überexpression der YB-1-mRNA erreicht

($\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ MYC} = -0.78 \pm 0.27$, $\text{YB-1} = 0.02 \pm 0.22$). Damit ist die exprimierte mRNA-Menge zu gering, um die YB-1 HaloTag-Proteinexpression im Western Blot nachweisen zu können.

Anschließend wurde der Frage nachgegangen, ob der Erhalt der *YB-1*-mRNA-Expression ausreicht, um die Viabilität der MM.1S-Zellen positiv zu beeinflussen. Hierzu wurde der Anteil viabler Zellen der MYC-Knockdown (+/-) und *Knockdown-Rescue* (+/+) Versuche mittels FACS-Analyse bestimmt. Im Vergleich zum MYC-Knockdown allein (+/-) mit $29 \pm 10\%$ ergibt sich ein Anstieg der viablen Zellpopulation auf $38 \pm 9\%$ beim *Knockdown-Rescue* (+/+). Die statistische Analyse der Daten ergab zudem, dass der Unterschied zwischen beiden Wertepaaren hoch-signifikant ist ($p < 0.01$). Damit wird deutlich, dass die Apoptose-Induktion infolge eines MYC-Knockdowns durch den Erhalt der YB-1-Expression zum Teil verhindert werden kann.

3.5.5. MYC reguliert direkt die YB-1-Transkription *in vitro*

In den vorgestellten MYC-Knockdown-Versuchen wurde die Abnahme der *YB-1*-mRNA-Expression durch die Reduktion der MYC-Proteinexpression in den HMZL ausgelöst. Um direkt eine Transkriptionsfaktor-Aktivität von MYC für *YB-1* nachzuweisen, wurden nicht-maligne embryonale Mausfibroblasten (MEFs) von R26^{MER} Mäusen verwendet, die eine regulierbare 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT)-abhängige MYC-Variante (MycER^{T2}) exprimieren (Kooperation mit Dr. D. Murphy, Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie, Theodor-Boveri-Institut, Universität Würzburg). Nach der Bindung von 4-OHT transloziert MycER^{T2} schnell in den Kern und aktiviert dort die mRNA-Transkription (197, 230). Mittels *real-time* PCR wurde die *YB-1*-mRNA-Expression in Wildtyp und homozygoten MycER^{T2} MEFs nach 2 h, 4 h und 24 h mit 4-OHT bestimmt (Abb. 3.21).

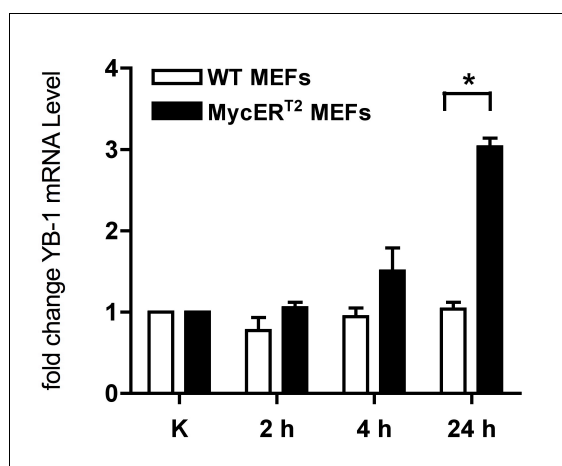


Abb. 3.21: Analyse der YB-1-Expression in Wildtyp (WT) und MycER^{T2} MEFs. MEFs aus MycER^{T2} transgenen Mäusen wurden für verschiedene Zeiträume mit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) behandelt, um anschließend mittels *real-time* PCR die mRNA-Expression von *YB-1* zu bestimmen. 4-OHT induziert die transkriptionelle MYC-Aktivität und führt zu einem 1.5-fachen Anstieg (*fold change*) der *YB-1* mRNA-Expression nach 4 h, mit einem signifikanten Anstieg auf 2.9-fach nach 24 h in homozygoten MycER^{T2} im Vergleich zu 4-OHT-behandelten Wildtyp-MEFs ($p < 0.01$, $n=2$).

Die Ergebnisse der *real-time* PCR für Wildtyp und homozygote MycER^{T2} MEFs werden in Abb. 3.21 als *fold change* der *YB-1*-Expression dargestellt. Die Behandlung mit 4-OHT führt nach 4 h in den MycER^{T2}-homozygoten MEFs zu einem 1.5-fachen Anstieg der *YB-1*-mRNA, nicht aber in den dazugehörigen Wildtyp MEFs. Nach 24 h steigt die *YB-1*-Expression im Vergleich zu den 4-OHT-behandelten Wildtyp MEFs signifikant auf 2.9-fach ($p < 0.01$, $n=2$). Diese Daten belegen die direkte Verbindung zwischen der transkriptionellen Aktivität von MYC und seiner Kerntranslokation zur Regulation der *YB-1*-mRNA-Expression.

3.6. Web-basierte Kategorisierung YB-1-gebundener mRNAs

3.6.1. Eine Vielzahl YB-1-gebundener mRNAs werden funktionell dem Translationsapparat zugeordnet

Neben der Bindung einzelner, funktionell bedeutender mRNAs, wie z.B. *MYC* war außerdem von Interesse, ob YB-1 bestimmte Gruppen von mRNAs bindet, die den gleichen Signalwegen angehören, analoge Funktionen haben oder übereinstimmende Sequenzmotive besitzen. Um sich auf YB-1-gebundene mRNAs aller IP-Proben zu beschränken, gingen in die biostatistische Auswertung deshalb nur die 176 übereinstimmenden mRNAs ein.

Erste Anhaltspunkte für eine verwandte Funktion mehrerer Kandidaten ergaben sich mit Blick auf die vollständigen Gennamen der mRNAs. Unter den 176 Kandidaten befinden sich insgesamt 10 eukaryotische Translationsfaktoren und diverse ribosomale Proteine (74 Stück), die Bestandteil des Translationsapparates sind oder die Proteintranslation beeinflussen können.

Die vollständige Analyse der mRNAs erfolgte mittels *Gene set enrichment analysis* (GSEA) unter Verwendung von Online-Datenbanken, über die universell sowohl gesamte als auch vorgefilterte Microarray-Datensätze untersucht werden können. Es wurde dafür mit zwei Webseiten gearbeitet, die jeweils eine unterschiedliche Kategorisierung der 176 mRNAs ermöglichen. Die Abkürzung der ersten Internetseite „WebGestalt“ steht für *Web-based gene set analysis toolkit* (231, 232) und die der zweiten „GSEA-MSigDB“ für *Gene set enrichment analysis – Molecular signatures database* (233, 234). Beide Webseiten integrieren Datenbank-Informationen von unterschiedlichen öffentlichen Quellen. Mit WebGestalt wurde eine *Gene Ontology* (GO)-Analyse und eine *WikiPathway*-Analyse der mRNAs durchgeführt. Bei der GO-Analyse wurden die 176 mRNAs auf eine Ansammlung von Kandidaten aus bestimmten GO-Gruppen untersucht. Dies erfolgte im direkten Vergleich zu allen Genen auf dem verwendeten Microarray, der als Referenz angegeben wurde. Die Anzahl der zugeordneten, eigenen mRNAs wird mit der Gesamtzahl der Gene aus dieser GO-Gruppe

verglichen. Mit Hilfe eines statistischen Algorithmus (hypergeometrischer Test) wird dann berechnet, ob es sich um eine signifikante Häufung der mRNAs in der entsprechenden GO-Gruppe handelt oder ob diese Verteilung zufällig ist. Die thematische Klassifizierung bei der GO-Analyse erfolgte nach verschiedenen Kriterien, wie der Zugehörigkeit zu biologischen Prozessen, zellulärem Bestandteil und der molekularen Funktion (s. Anhang A3). In dem verwendeten Datensatz konnte mit GSEA eine signifikante Anhäufung von 85 mRNAs identifiziert werden, die dem GO-Begriff „Translation“ zugeordnet werden (biologischer Prozess). Außerdem zeigte dieser Datensatz eine erhöhte Expression von mRNAs der GO-Kategorie „kleine (30 Gene) bzw. große (32 Gene) ribosomale Untereinheit“ (zellulärer Bestandteil). Diese Kandidaten sind demnach Bestandteile des Translationsapparates und könnten durch YB-1 translationell reguliert werden. Es ist aber bereits bekannt, dass YB 1 vermutlich nicht die grundsätzliche Zusammensetzung des Translationsapparates beeinflusst (235). Diese Gruppierung der mRNAs liefert vorerst nur einen Überblick über die Zugehörigkeit zu biologischen Prozessen und molekularer Funktion. Noch aufschlussreicher ist, wie sich die mRNAs auch funktionell regulatorischen Netzwerken oder Signalwegen zuordnen lassen, und ob eine Häufung in einer bestimmten Kategorie auftritt.

Tabelle 3.3: Ergebnisse der WebGestalt GSEA mit der WikiPathways Datenbank.

	Name des angereicherten Gensets	# Entrez IDs
1	Zytoplasmatische ribosomale Proteine	73
2	Translationsfaktoren	9
3	TNF-alpha/NF-kB Signalweg	10
4	Glykolyse und Glukoneogenese	5
5	Elektronentransportkette	6
6	Proteasomale Degradation	4
7	Täglich regulierte Gene mit zyklischen Orthologen	3
8	Myometrialer Lockerungs- und Kontraktionsweg	5
9	TGF-beta Rezeptor-Signalweg	5
10	Östrogenstoffwechsel	3

Die Klassifizierung der 176 mRNAs anhand der *WikiPathways* Datenbank ist hier auszugsweise dargestellt (nach p-Wert aufsteigend sortiert).

Bei der *WikiPathway* Analyse mit WebGestalt wurden die mRNAs biologischen Signalkaskaden zugeordnet und geben Aufschluss über die Funktion der mRNAs in einem regulatorischen Netzwerk (Tab. 3.3). So fällt zum Beispiel erneut auf das insgesamt 73 der 176 mRNAs zytoplasmatisch-lokalisiereten ribosomalen Proteinen (1) zugeordnet werden können. Des Weiteren sind insgesamt 9 Translationsfaktoren (2) und 10 Gene des TNF-

alpha/NF-kB Signalwegs (3) angereichert. Außerdem scheint YB-1 eine Reihe von mRNAs der Glykolyse und Glukoneogenese (4) bzw. der Elektronentransportkette (5) zu beeinflussen, die beim Stoffwechsel der malignen Plasmazelle von Bedeutung sind. Zusammen mit den oben genannten Ergebnissen aus der GO-Analyse bestärkt dies die Hypothese, dass YB-1 über die Bindung spezifischer mRNAs des Translationsapparates den Prozess der Translation beeinflussen könnte.

3.6.2. *Signifikante Anhäufung von MYC-Zielgenen unter den YB-1-gebundenen mRNAs*

Mit GSEA-MSigDB erfolgte anschließend die Kategorisierung nach spezifischen Genfamilien (Tab. 3.4). Insgesamt sind in dieser Datenbank 3800 Gene aus den MSigDB Gen-Gruppen hinterlegt, die einer kleinen Anzahl ausgewählter Genfamilien (Tumorsuppressor, Onkogene, Proteinkinasen etc.) zugeordnet wurden. Die Mitglieder gleicher Genfamilien haben ähnliche Charakteristika wie Homologie oder biochemische Aktivität. Darauf basierend wurden die 176 eigenen mRNAs eingeteilt. MYC wurde z.B. drei Kategorien – den Onkogenen, translozierten Genen und Transkriptionsfaktoren – zugeordnet. Ebenfalls als Transkriptionsfaktor gelistet ist YB-1 selbst, mit der Genbezeichnung *YBX1*. Insgesamt wurden aus der Liste mit den 176 Genen fünf Onkogene identifiziert und jeweils vier translozierte Gene bzw. Transkriptionsfaktoren.

Tabelle 3.4: Ergebnisse der Kategorisierung nach Genfamilien mit GSEA-MSigDB.

Onkogene	Translozierte Gene	Transkriptionsfaktoren	Zytokine / Wachstumsfaktoren
MYC	MYC	CSDA	HDGF
NACA	NACA	MYC	MIF
NPM1	NPM1	TAF9	
RPL22	RPL22	YBX1	
GNAS			

Die Gruppierung der 176 mRNAs erfolgte mit der MSigDB-Datenbank „Genfamilien“ und ist hier auszugsweise dargestellt.

Zuletzt erfolgte mit Hilfe von GSEA-MSigDB eine Kategorisierung nach der Gengruppe „*chemical and genetic perturbation*“ (CGP) aus der Gengruppen-Sammlung C2. Hier sind Gene mit Genexpressionssignaturen hinterlegt, die bei genetischen bzw. chemischen Störungen auftreten. Insgesamt enthält diese Gengruppen-Sammlung 22007 Einträge, wobei Gene auch mehr als ein Mal, dann jedoch nur in verschiedenen Kategorien (2392 Gengruppen in der Sammlung), vorkommen können. Diese wurden bei MSigDB mit 168 der 176 geladenen mRNAs verglichen und die ersten 10 Treffer anschließend tabellarisch ausgegeben.

Die Tab. 3.5 zeigt, dass die Transkriptionsfaktoren MYC und MYC/MAX eine ganze Reihe der 168 analysierten mRNAs direkt oder indirekt beeinflussen, was anhand der Zuordnung zu den zwei Gengruppen „Benporath MYC MAX Targets“ (3) und „Dang bound by MYC“ (4) deutlich wird.

Diese erneute Assoziation der mRNAs mit MYC und MYC-Signalwegen stützt die funktionellen Daten aus den YB-1- und MYC-Knockdown-Versuchen. Die Web-basierte Signalweg-Analyse des Datensatzes lieferte neue Erkenntnisse über gleichermaßen YB-1-regulierte Gengruppen bzw. regulatorische Netzwerke. Direkt oder indirekt über MYC bzw. YB-1 reguliert, ergibt sich demnach ein enges Netzwerk aus Zielstrukturen, die das Wachstum und Überleben von malignen Plasmazellen entscheidend mitbestimmen können.

Tabelle 3.5: Klassifizierung anhand der MSigDB Gen-Gruppensammlung „C2“ in der Gen-Gruppe „chemical and genetic perturbation“ (CGP).

	GensetName	#Gene Genset	#Gene Overlap	Beschreibung (in Englisch)
1	PUJANA ATM PCC NETWORK	1461	60	Genes constituting the ATM-PCC network of transcripts whose expression positively correlated (Pearson correlation coefficient, PCC \geq 0.4) with that of ATM [Gene ID=472] across a compendium of normal tissues.
2	PUJANA BRCA1 PCC NETWORK	1671	80	Genes constituting the BRCA1-PCC network of transcripts whose expression positively correlated (Pearson correlation coefficient, PCC \geq 0.4) with that of BRCA1 [Gene ID=672] across a compendium of normal tissues.
3	BENPORATH MYC MAX TARGETS	775	38	Set 'Myc targets2': targets of c-Myc [Gene ID=4609] and Max [Gene ID=4149] identified by ChIP on chip in a Burkitt's lymphoma cell line; overlap set.
4	DANG BOUND BY MYC	1053	52	Genes whose promoters are bound by MYC [Gene ID=4609], according to MYC Target Gene Database.
5	LOPEZ MBD TARGETS	873	44	Genes up-regulated in HeLa cells (cervical cancer) after simultaneous knockdown of all three MBD (methyl-CpG binding domain) proteins MeCP2, MBD1 and MBD2 [Gene ID=4204, 4152, 8932] by RNAi.
6	PUJANA CHEK2 PCC NETWORK	782	40	Genes constituting the CHEK2-PCC network of transcripts whose expression positively correlates (Pearson correlation coefficient, PCC \geq 0.4) with that of CHEK2 [Gene ID=11200].
7	SPIELMAN LYMPHOBLAST EUROPEAN VS ASIAN_UP	489	30	Genes up-regulated in lymphoblastoid cells from the European population compared to those from the Asian population.
8	CAIRO HEPATOBLASTOMA CLASSES_UP	611	38	Genes up-regulated in robust Cluster 2 (rC2) of hepatoblastoma samples compared to those in the robust Cluster 1 (rC1).
9	ENK UV RESPONSE KERATINOCYTE_UP	537	36	Genes up-regulated in NHEK cells (normal epidermal keratinocytes) after UVB irradiation.
10	YAGI AML WITH INV 16 TRANSLOCATION	429	29	Genes specifically expressed in samples from patients with pediatric acute myeloid leukemia (AML) bearing inv(16) translocation.

3.6.3. *YB-1-gebundene mRNAs enthalten präferentiell TOP-Motive in ihrer 5'-NTR*

Im Anschluss erfolgte die Analyse der 176 mRNAs nach regulierenden Elementen wie IRES-Strukturen und terminalen Oligopyrimidin (TOP)-Motiven in der 5'-NTR.

Eine IRES wird bisher ausschließlich über funktionelle Kriterien definiert und kann nicht durch die Gegenwart von charakteristischen RNA-Sequenzen oder Strukturmotiven vorhergesagt werden. Daher wurde für die Ermittlung von IRES-Elementen die Webseite IRESite.org genutzt, eine Datenbank in der alle experimentell verifizierten IRES-Strukturen (115 Stück, Stand 08. April 2011) hinterlegt sind (236). Von den 176 Kandidaten enthalten vier mRNAs in ihrer 5'-NTRs eine funktionelle IRES: die bekannten mRNAs *MYC* und *YB-1* sowie der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor *EIF4G2* und die Ornithin-Decarboxylase *ODCI* (237, 238). *EIF4G2* wirkt als genereller Repressor der Translation indem translationell inaktive Komplexe, wie z.B. mRNPs gebildet werden (239). *ODC* ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Polyamin-Syntheseweges, dessen Aktivität als Antwort auf wachstumsfördernde Stimuli stark schwankt. Polyamine spielen eine wichtige Rolle bei Kontrolle des Zellzyklus, der Zellproliferation und Differenzierung sowie dem programmierten Zelltod (240).

Funktionelle 5'TOP-Motive werden anders als IRES-Elemente direkt über die Nukleotid-Sequenz in der 5'-NTR definiert. Eine mRNA enthält ein TOP-Motiv, wenn das erste Nukleotid ein Cytosin ist, dem anschließend mindestens vier Pyrimidine folgen. Über TOP-Motive wird die Translation kontrolliert und TOP-mRNAs kodieren oftmals selbst für Proteine die bei der Proteinbiosynthese eine Rolle spielen (241, 242). Eine Liste von mRNAs mit bekannten 5'TOP-Motiven wurde im Anhang der Publikation von Thoreen *et al.* veröffentlicht (238). Anhand dieser Liste wurden die 176 mRNAs der vorliegenden Arbeit analysiert. Erstaunlicherweise stimmen ca. ein Drittel der mRNAs (59 Stück) mit den gelisteten 5'TOP-mRNAs von Thoreen *et al.* überein (s. Anhang A1). Darunter ist auch, dass in der vorliegenden Arbeit funktionell untersuchte TCTP. *YB-1* besitzt demnach vermutlich eine erhöhte Präferenz für das 5'TOP-Sequenzmotiv.

4. Diskussion

YB-1 wird in der Literatur als Translations- und Transkriptionsfaktor beschrieben, was auf eine entgegengesetzte subzelluläre Lokalisation des Proteins hindeutet. Eine überwiegende Kernexpression von YB-1 wurde vor allem für maligne Gewebe epithelialen Ursprungs, wie für das Prostata-, Ovarial-, Lungen- und Mammakarzinom dokumentiert (159-165). Jürchott *et al.* beschreiben YB-1 hingegen als zellzyklusregulierten Transkriptionsfaktor, da die Lokalisation in kultivierten HeLa-Zellen vom Verlauf des Zellzyklus abhängig ist (61). Darüber hinaus wurde jedoch in jeder Phase des Zellzyklus eine starke YB-1-Expression im Zytoplasma beobachtet. Für primäre Plasmazytomzellen wurde, neben der Ko-Lokalisation mit transkriptionell aktivem Euchromatin im Zellkern, eine starke und überwiegende Zytoplasma-Expression nachgewiesen (54). Chatterjee *et al.* deuteten die schwache Kern-Lokalisation von YB-1 als Zeichen seiner transkriptionellen Aktivität in malignen Plasmazellen. In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss von YB-1 auf das Wachstum und die erhöhte Medikamenten-Resistenz der MM-Zellen auf seine Kernfunktion zurückgeführt.

Grundsätzlich kann jedoch die translationelle Aktivität von YB-1, auch aufgrund der vorherrschenden zytoplasmatischen Lokalisation, für maligne Plasmazellen ebenso bedeutend sein. Eine wichtige Voraussetzung für die funktionelle Charakterisierung von YB-1 in der vorliegenden Arbeit, war daher die eindeutige Aufklärung der Expression und Lokalisation von YB-1 in dem verwendeten *in vitro* Modell – den humanen Myelomzelllinien (HMZL). HMZL werden für die molekularbiologische Erforschung des Plasmazytoms verwendet und repräsentieren späte Stadien der progressiv verlaufenden Erkrankung, da sie hauptsächlich von extramedullären MM etabliert wurden (196).

Mit den ersten Experimenten wurde gezeigt, dass YB-1 in den sechs HMZL (AMO-1, MM.1S, OPM-2, INA-6, RPMI8226, U266) ungefähr gleich stark exprimiert ist (Abb. 3.1). In der Immunfluoreszenz mit einem monoklonalen YB-1-Antikörper konnte die Expression im Zytoplasma, nicht aber im Zellkern von HMZL nachgewiesen werden (Abb. 3.2). Bei Chatterjee *et al.* (54) wurden die immunhistochemischen Färbungen der primären MM-Proben mit einem konfokalen Mikroskop ausgewertet. Im Vergleich zu der hier verwendeten Fluoreszenzmikroskopie ist dies das sensitivere Detektionsverfahren. Um auszuschließen, dass YB-1 durch diese eingeschränkte Sensitivität nicht im Nukleus detektiert werden konnte, wurden immunzytochemische Färbungen mit dem phospho-YB-1(S102)-spezifischen Antikörper angefertigt. Aus Veröffentlichungen ist bekannt, dass die YB-1-Phosphorylierung an S102 in der CSD mit der YB-1-Translokation in den Zellkern einher geht (89, 201). Dies konnte für die pYB-1-positive Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 gezeigt werden, die

bei dem Versuch als Positivkontrolle diente (Abb. 3.3 c)). Trotz der eindeutigen Färbung in MDA-MB-231-Zellen war für die HMZL keine Phosphorylierung an S102 und damit auch nicht die postulierte Kern-Expression nachweisbar (Abb. 3.3).

Damit stand die zytoplasmatische Funktion von YB-1 im Mittelpunkt der nachfolgenden Untersuchungen, denn die Kernexpression scheint in den HMZL keine signifikante Rolle zu spielen. YB-1 gehört zu den sogenannten *trans*-wirkenden Faktoren, die die mRNA-Translation unter den verschiedensten physiologischen Bedingungen wie der Oogenese, Spermatogenese, Entwicklung und Differenzierung kontrollieren (153-155, 243). Aus der Literatur war bekannt, dass es über die Bindung der 5'- bzw. 3'-NTR die Verfügbarkeit von mRNAs für den Translationsapparat regulieren kann. Damit trägt YB-1 entscheidend zur Regulation der Proteinbiosynthese bei und ist ein wichtiger Bestandteil der Stressantwort maligner Zellen (85, 86, 131, 144). Interessanterweise wird die Neuprogrammierung der Translation als ein gemeinsames Merkmal von gestressten oder malignen Zellen beschrieben (143). Zellstress wird beispielsweise durch eine verstärkte Proliferation oder bei der Umstellung auf den onkogenen Stoffwechsel ausgelöst. Wie bei YB-1-Knockout-Versuchen gezeigt wurde, ist die Stressresistenz YB-1-defizienter MEFs vermindert und als Antwort wird vorzugsweise Apoptose oder Seneszenz induziert (157). Die Anpassung der Translationskontrolle über YB-1 ist demnach ein adäquater Mechanismus, um nachteilige Auswirkungen dieser Art zu vermeiden. Die Daten von Hsieh *et al.* bestärken diese These zusätzlich (244). Die *mammalian target of rapamycin* (mTOR)-Kinase reguliert die Aktivität wichtiger Translationsfaktoren und ist in transformierten Zellen häufig dereguliert. Die Aktivierung des mTOR-Signalweges führt daher zu Veränderungen in der Translationskontrolle und die YB-1-Expression ist davon direkt betroffen (244). Zudem wird mTOR durch den PI3K/AKT-Signalweg reguliert, der in 50% der primären MM-Fälle aktiviert ist (47).

Es war bisher nicht bekannt welche mRNAs YB-1 in malignen Plasmazellen bindet und potentiell translationell reguliert. Darüber hinaus waren der zugrunde liegende Mechanismus dieser Regulation und der Einfluss auf die Zellviabilität, Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit.

Zur Bestimmung YB-1-gebundener mRNAs im Zytoplasma von MM-Zellen, wurden Immunpräzipitationen und Microarray-Analysen mit genomweiten GeneChips von Affymetrix durchgeführt. Da für diese Art von Versuchen humanes Primärmaterial nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung steht, wurden die Experimente mit HMZL durchgeführt. Die genetische Übereinstimmung der Genexpressionsprofile von neu

diagnostizierten Plasmozytomen und HMZL bestätigt unter anderem ihre Eignung als Modell für das MM (228). Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Versuche YB-1-Immunpräzipitationen mit der BALB/c-Plasmozytom-Zelllinie MOPC-315.BM.Luc (MOPC) (245) und einem extramedullären Plasmazelltumor von iMyc Δ E μ -Mäusen durchgeführt. Extramedulläre Maus-Plasmozytome sind spontane Neoplasien, die jedoch in iMyc Δ E μ -Mäusen durch die Behandlung mit Pristan induziert werden können, da die Mäuse infolge der Entzündungsreaktion peritoneale Granulome entwickeln (246). Die Einbindung der Mausproben in die IP-Versuche brachte zwei wesentliche Vorteile mit sich. Auf der einen Seite ermöglichte diese Herangehensweise den direkten Vergleich von YB-1-gebundenen mRNAs zwischen zwei Modellsystemen für das humane MM. Auf der anderen Seite konnte dadurch primäres Tumormaterial untersucht und allein zelllinienbedingte Effekte ausgeschlossen werden.

Um gleichermaßen gebundene mRNAs der vier analysierten Proben zu identifizieren, wurden die Microarray-Datensätze miteinander verglichen und 176 übereinstimmende mRNAs ermittelt (Tab. 3.1, Abb. 3.6, Anhang A1). Eine zusätzliche Verifikation dieser 176 mRNAs erfolgte durch einen Vergleich mit bereits publizierten YB-1-Zielgenen anderer Tumormodelle. Dazu gehören die mRNAs *EEF2*, *RPLP2*, *UBC*, *TUBA1B*, *MYC* und *YB-1* selbst (72, 145, 202, 203). Aber die überwiegende Mehrheit der hier ermittelten mRNAs wurden bisher nicht als YB-1-gebundene Zielstrukturen beschrieben.

Für einen ersten Überblick wurden die 176 YB-1-gebundenen mRNAs bezüglich übereinstimmender Funktionen und Sequenzmotive analysiert. Die Klassifizierung mit Hilfe von Online-Datenbanken wie GSEA *WikiPathways* zeigte, dass knapp die Hälfte der mRNAs (82 von 176) funktionell der Translation zugeordnet werden können (Tab. 3.3). Darunter sind Translationsfaktoren sowie zytoplasmatische ribosomale Proteine, die am Aufbau und der enzymatischen Aktivität des Ribosoms beteiligt sind. Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass die aberrante Ribosomenfunktion und mRNA-Translation Neoplasien verursachen kann (247, 248). Zusätzlich geht eine gesteigerte Proteinsynthese-Rate (249) und eine höhere Ribosomen-Zahl mit einem Proliferationsanstieg in Tumorzellen einher (250). Auch die YB-1-Expression korreliert positiv mit Proliferationsmarkern wie Ki67 (54) und erhöhten Wachstumsraten in Tumorzellen (153, 155). Wie die Daten hier zeigen, bindet YB-1 eine ganze Reihe von mRNAs, die potentiell am Aufbau bzw. der Funktionsweise des Translationsapparates beteiligt sein können. Somit könnte YB-1 über die Kontrolle der mRNA-Translation eine wichtige Facette der Tumorpheriferation und -progression modulieren (247).

Bei der Suche nach potentiell übereinstimmenden Sequenzmotiven zeigte sich, dass ca. ein Drittel der mRNAs (59 von 176) sogenannte terminale Oligopyrimidin (TOP)-Motive in der 5'-NTR besitzt (Anhang A1). Diese können die mRNA-Translation beeinflussen und die kodierten Proteine sind häufig direkt an der Proteinbiosynthese beteiligt (241, 242). Damit ergibt sich womöglich ein neuer Anhaltspunkt für bevorzugte YB-1-Bindungspartner. Diese Beobachtung wird durch mehrere aktuelle Publikationen bestärkt. TOP-Motive sind relativ G-C-reich und YB-1 bindet vorzugsweise Sequenzen mit einer komplexen Kombination der Ribonukleotide G, C und U (5'-cCUGCg-3') (132). Matsumoto *et al.* stellten in eigenen IP-Versuchen fest, dass auffallend viele der YB-1-gebundenen mRNAs einen hohen G-C-Gehalt aufweisen (235). Darüber hinaus besitzen bekannte YB-1-*targets* wie die *TGF-β(1)*-mRNA oder die *Snail 1* 5'-NTR mehrere hochkonservierte G-C-reiche Nukleotid-Cluster (133, 134).

Die ersten YB-1-Knockdown-Experimente in den HMZL INA-6 und MM.1S hatten gezeigt, dass YB-1 für das maligne Wachstum und Überleben essentiell ist (54). Aufgrund der fehlenden Kernexpression ist vermutlich die zytoplasmatische Funktion von YB-1 dafür von Bedeutung. Für die Beantwortung der funktionellen Fragestellung wurde die Liste der YB-1-gebundenen mRNAs deshalb nach Kandidaten durchsucht, die bereits im Hinblick auf Apoptose oder Viabilität von Tumorzellen beschrieben wurden. Trotz der Annahme, dass eine ganze Reihe von deregulierten Proteinen und Signalwegen zusammen spielen müssen um Apoptose auszulösen, war von Interesse, ob und wie einzelne YB-1-Zielgene das Überleben von MM-Zellen beeinflussen können. Im Rahmen dieser Dissertation wurden die zwei Kandidaten – TCTP und MYC – in primären Zellen sowie funktionell genauer untersucht.

Für *MYC* war bereits bekannt, dass YB-1 als eines von vier ITAFs zusammen mit PTB-1 die mRNA im Bereich der IRES bindet und darüber die Translation von MYC reguliert (144, 145, 251). Da die IRES-vermittelte Translationsinitiation grundsätzlich strikt von der strukturellen Integrität der IRES abhängt, können Punktmutationen ihre Aktivität empfindlich reduzieren bzw. verstärken. Nachdem in Zelllinien von MM-Patienten die aberrante translationelle Regulation von MYC mit einer C/T-Punktmutation in der *MYC*-IRES korreliert werden konnte (226), wurde diese Mutation auch in MM-Patienten (42%, n=19) und MGUS-Fällen (20%, n=10) nachgewiesen (225). Mit *MYC* unter den YB-1-gebundenen mRNAs der vorliegenden Arbeit und einer *MYC*-Aktivierungssignatur in 60% der MM-Patienten (252-254), wurde das Vorhandensein dieser Punktmutation in einem unabhängigen Patientenkollektiv kontrolliert. Überraschenderweise war die beschriebene C/T-Transition nur in einem der 88 sequenzierten MM-Fälle nachweisbar. Dies entspricht der Mutationsfrequenz gesunder Menschen, da in der NCBI Datenbank für die NIH PDR90 Bevölkerungsgruppe

(168 Personen) ein *single nucleotide polymorphism* (SNP) hinterlegt ist. Der Widerspruch zwischen den hier erhaltenen Daten und der publizierten Mutationshäufigkeit kann wahrscheinlich auf die verwendeten Kontrollen zurückgeführt werden. Chappell *et al.* (225) verwendeten gesunde CD138⁺-Plasmazellen von alterskorrelierten Probanden, während in der vorliegenden Arbeit direkt eine Keimbahnkontrolle des analysierten MM-Patienten sequenziert wurde. Insgesamt ist durch die Ergebnisse der Sequenzierung eine Assoziation der C/T-Transition mit dem MM unwahrscheinlich, was auf eine mutationsunabhängige Translation von MYC hindeutet.

YB-1 besitzt das Potential die Proteinsynthese von mRNAs sowohl zu hemmen als auch zu stimulieren. Daher erlaubt eine YB-1/mRNA-Bindung, wie für *TCTP* oder *MYC*, noch keine Aussage über die regulatorische Wirkung auf der Translationsebene. Zum Beispiel aktiviert YB-1 selektiv die Cap-unabhängige Translation spezifischer mRNAs, wie *Snail 1*, während über 80% der gebundenen mRNAs translationell durch YB-1 gehemmt werden (134). Die translationelle Regulation von *TCTP* und *MYC* wurde vor diesem Hintergrund anhand von YB-1-Knockdown-Experimenten analysiert. Es stellte sich heraus, dass beide mRNAs nach der Reduktion der YB-1-Expression nicht mehr effizient translatiert werden, da trotz gleichbleibender mRNA-Level die Proteinexpression abnahm (Abb. 3.12). Interessanterweise wird nach der fehlenden Kernexpression von YB-1, mit den Daten hier erneut die Transkriptionsfaktor-Aktivität von YB-1 in den HMZL widerlegt. Kolluri *et al.* hatten gezeigt, dass YB-1 die *MYC*-Expression reguliert indem es CT-reiche-Elemente im *MYC*-Promotor bindet (255, 256). Die stabilen mRNA-Level von *MYC* zeigen, dass YB-1 beim MM die Transkription des *MYC*-Gens nicht beeinflusst.

Um den Mechanismus der YB-1-kontrollierten mRNA-Translation aufzuklären, wurden Polysomenprofile von YB-1-Knockdown sowie Kontrollzellen erstellt. Wie der direkte Vergleich dieser Profile zeigte (Abb. 3.14), führt die Reduktion der YB-1-Proteinexpression zu einer Anreicherung sub-polysomaler mRNPs. Die mRNA-Quantifizierung mittels *real-time* PCR bestätigte, dass es in diesem Zusammenhang zu einem Anstieg der *MYC*-mRNA in diesen translationell inaktiven mRNPs kommt. Somit kontrolliert YB-1 die Proteinsynthese von *MYC* und vermutlich auch *TCTP*, indem es die Verteilung der mRNAs zwischen translationell aktiven Polysomen und inaktiven mRNPs reguliert. Damit unterliegt die Initiationsphase, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Translation, der Kontrolle durch YB-1 und nicht die Elongation oder Termination (248). Eine zusätzliche Bestätigung dieser Bedeutung bei der Translationsinitiation liefern die Daten von Evdokimova *et al.* (65). Anhand von YB-1-Immunpräzipitationen aus Kaninchen-Retikulozytenlysaten wurde gezeigt,

dass die Abnahme der YB-1-Konzentration einen Polysomen-Zerfall verursacht und sich der 48S prä-Initiationskomplex anreichert.

Neben der hier gezeigten stimulierenden Wirkung von YB-1 auf die Translation spezifischer mRNAs, werden oftmals auch inhibitorische Effekte für YB-1-regulierte mRNAs beschrieben (235). Bei der Interpretation dieser konträren Proteineigenschaften sind mehrere Erklärungsansätze denkbar. Generell kann die Translation zweier mRNAs, trotz gleicher Mengen im Zytoplasma, unterschiedlich effizient sein, da auf der einen Seite die gemeinsame Wirkung einer großen Anzahl eukaryotischer Translationsinitiationsfaktoren (eIF) erforderlich ist (257). Auf der anderen Seite könnte das von Evdokimova *et al.* (65) beschriebene YB-1:mRNA-Verhältnis über die Translationseffizienz einzelner mRNAs entscheiden und für verschiedene mRNAs unterschiedlich sein. Ein weiterer wichtiger Aspekt sind die *cis*-wirkenden Elemente in der 5'-NTR einer mRNA an die *trans*-wirkende Faktoren wie YB-1 binden können. Über die Effizienz der Translation entscheidet somit auch die An- oder Abwesenheit dieser präferierten RNA-Sequenzen oder Sekundärstrukturen im nicht-translatierten Bereich der mRNA.

MYC und TCTP sind potentielle anti-apoptotische und proliferationsfördernde Proteine in HMZL. Um ihre klinische Relevanz besser einschätzen zu können, wurde der Expressionsstatus in Korrelation zur YB-1-Expression in humanem Primärmaterial ermittelt (Anhang A2). Bei der immunhistochemischen Untersuchung von intramedullären MM-Fällen (n=20) zeigte sich eine hohe YB-1-Expression in über 90% der Proben ($\geq 20\%$ positive Tumorzellen). Die hohe YB-1-Expression korrelierte zudem mit hohen TCTP-Leveln (85% der Fälle, $\geq 20\%$ positive Tumorzellen) und in 75% der Fälle sind YB-1 und TCTP ko-exprimiert (Abb. 3.9 und 3.10).

Die mRNA-Quantifizierung von *TCTP*, *YB-1* und auch *MYC* in CD138⁺ MM-Zellen (n=5) zeigte relativ heterogene Expressionslevel zwischen den Patienten [Abb. 3.8 a) und b)] mit einer deutlichen *TCTP*-Überexpression. Im Vergleich zu normalen CD138⁺-Plasmazellen gesunder Probanden war eine Deregulation der *MYC*-Expression (3-13,5x erhöht) nachweisbar [Abb. 3.8. c)]. Aus Veröffentlichungen ist bekannt, dass die *MYC*-Level von wenig bis zu stark erhöht variieren können, selbst wenn die *MYC*-Proteinexpression in den MM-Proben überwiegend hoch war (11, 228).

Bei der immunhistochemischen Untersuchung von *MYC* in den 20 intramedullären Plasmozytomen bestätigte sich jedoch das heterogene Expressionsmuster der mRNA-Quantifizierung (Abb. 3.10). Der Anteil *MYC*-positiver Zellen in den Proben lag im Median bei ca. 20%, im Vergleich zur deutlichen YB-1-Überexpression (85% positive Tumorzellen).

Die Analyse extramedullärer MM-Proben (n=10) zeigte dann, dass es zu einem signifikanten Anstieg der MYC-Expression in den späteren Stadien des Plasmozytoms kommt (Abb. 3.11). Zudem erhöhte sich die YB-1/MYC-Ko-Expression von zuvor 30% (6/20 Fälle) auf 70% (7/10 Fälle) der untersuchten Fälle (Tab. 3.2).

Bisher wurde die MYC-Expression mit genetischen Aberrationen (IgH-MYC-Translokation) assoziiert und als spätes Ereignis des MM betrachtet (26, 27). YB-1 kann jedoch die MYC-Proteinexpression unabhängig von genomischen Translokationen steigern. Diese Beobachtung stimmt mit den Daten von Chng *et al.* und Kuehl *et al.* überein, die eine MYC-Aktivierung unabhängig von MYC-Translokationen beobachtet haben (217, 252). Vermutlich fördert YB-1 die MYC-Translation beim MM und genetische Aberrationen des MYC-Genlokus werden erst im weiteren Verlauf der Erkrankung akquiriert.

Der YB-1-Knockdown kann in Tumorzellen abhängig vom Zelltyp unterschiedliche Auswirkungen haben. Diese reichen von einer herabgesetzten Proliferation, über Zellzyklusarrest, Sensibilisierung gegenüber Arzneistoffen bis hin zur Induktion von Apoptose (54, 109, 158, 258).

Mit den Experimenten der vorliegenden Arbeit sollte das Verständnis für die zugrundeliegende Ursache der Apoptose-Induktion in den HMZL auf molekularer Ebene verbessert werden. Die YB-1-Knockdown-Versuche wurden daher für MM.1S wiederholt und auf eine weitere HMZL – AMO-1 – ausgeweitet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Reduktion der YB-1-Expression zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und einer erhöhten Caspase-Aktivität in den HMZL führt (Abb. 3.15). Demnach bricht der elektrochemische Gradient über der Mitochondrienmembran infolge der Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges zusammen. Daraufhin bilden sich z.B. durch die Dimerisierung von Bax – einem Mitglied der pro-apoptotischen Bcl-2-Familie – Poren in der Mitochondrienmembran und Cytochrom C wird ins Zytoplasma freigesetzt. Dies führt wiederum zur Aktivierung von Caspasen wie der Effektor-Caspase 3 und der programmierte Zelltod (Apoptose) ist eingeleitet.

Zusätzlich wurde unabhängig von YB-1 durch MYC- bzw. TCTP-Knockdown-Versuche der Einfluss, den jedes Protein einzeln auf die Viabilität der HMZL hat, ermittelt. Nachdem im Rahmen dieser Versuche für TCTP keine signifikanten Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit oder Proliferation von AMO-1 sowie MM.1S nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.16), ist die anti-apoptotische Wirkung von TCTP in den HMZL fraglich. Möglicherweise spielt es eine entscheidendere Rolle bei der Entstehung von malignen Plasmazellen oder in der frühen Tumorprogression. Damit könnte seine starke Expression in

HMZL und den primären Fällen (Abb. 3.7 und 3.9) ein Überrest seiner Funktion bei der Tumorentwicklung sein.

Im Gegensatz zu TCTP, ist die MYC-Expression essentiell für das Wachstum und die Viabilität der HMZL. Der MYC-Knockdown induziert wie zuvor der YB-1-Knockdown Apoptose in den getesteten Linien (Abb. 3.18). Aus der Literatur gibt es bisher nur Hinweise darauf, dass die Abnahme der MYC-Expression in Tumorzellen die Zellproliferation beeinflusst, da der MYC-Verlust mit einem Zellzyklusarrest in der S- oder G2/M-Phase einhergeht (198, 259, 260). Diese Auswirkungen des MYC-Knockdowns in AMO-1 und MM.1S zeigen wie entscheidend MYC das Überleben der MM-Zellen mitbestimmt. Anhand der Western Blot-Analysen zur Proteinexpression wurde außerdem deutlich, dass neben der Abnahme von MYC infolge des Knockdowns auch die YB-1-Expression sinkt [Abb. 3.17 a)]. Die Ursache dafür konnte auf der Ebene der mRNA-Expression nachgewiesen werden, denn neben der *MYC*-mRNA, die direkt durch die shRNA betroffen ist, verringern sich ebenfalls die *YB-1*-Level [Abb. 3.17 b)]. Die MYC-Knockdown-induzierte Abnahme der *YB-1*-mRNA lieferte somit einen mittelbaren Hinweis auf eine Transkriptionsfaktor-Aktivität von MYC für *YB-1* beim MM. Darüber hinaus ist die E-Box-Sequenz das DNA-Erkennungsmotiv von MYC und *YB-1* besitzt mehrere E-Boxen im Promotor (67, 261, 262). Einen weiteren Anhaltspunkt ergab die Sequenzanalyse der ersten -2kb des *YB-1*-Gens von Wu *et al.* (227). Dieser Bereich enthält potentielle regulatorische Elemente für die Transkriptionsfaktoren MAX, ARNT, SNAIL und N-MYC, das sich im Vergleich zu c-MYC nur durch ein anderes gewebespezifisches Expressionsmuster auszeichnet. Während Uramoto *et al.* (71) erste direkte Beweise für eine MYC-regulierte *YB-1*-Expression erbrachten, wurde in unabhängigen Experimenten einer anderen Arbeitsgruppe diese Funktion für SNAIL widerlegt (134).

In Bezug auf die vorliegende Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob der Transkriptionsfaktor MYC effektiv die *YB-1*-Expression reguliert. Unter Verwendung von MycER^{T2} embryonalen Mausfibroblasten wurde daher die Translokation von MYC mittels 4-Hydroxytamoxifen in den Kern induziert und gezeigt, dass *YB-1* ein direktes Zielgen des Transkriptionsfaktors MYC ist (Abb. 3.21). Eine zusätzliche Bestätigung dieser Ergebnisse lieferten Fan *et al.* (229), die mit Hilfe des Burkitt Lymphom-Modells P493-6 und einem *Array*-basierten *Nuclear Run-On Assay*, die beginnende Gentranskription im Zellkern gemessen haben. Die P493-6-Zelllinie trägt ein konditionelles MYC-Allel, das durch Tetracyclin-Gabe aktiviert wird (259). Der Induktion von MYC folgen mehrere Wellen transkriptioneller Aktivität und *YB-1* wurde als MYC-reguliertes Zielgen identifiziert.

Diese übereinstimmende Regulation in unterschiedlichen Modellsystemen spricht dafür, dass es sich um einen universellen Mechanismus handelt und die Wahrscheinlichkeit ist hoch, dass MYC-getriebene Tumore auch YB-1 exprimieren. Die klinische Relevanz dieser Ko-Expression wird zudem durch YB-1-Färbungen im klassischen MYC-getriebenen Burkitt Lymphom gestützt (persönliche Mitteilung Dr. A. Mottok). Da in den primären MM-Proben dennoch eine MYC-unabhängige Expression von YB-1 gezeigt werden konnte, spielen andere Transkriptionsfaktoren erwartungsgemäß ebenfalls eine Rolle. Twist1 wurde zum Beispiel bereits in anderen Tumoren identifiziert und interessanterweise reguliert YB-1 umgekehrt die *Twist*-Translation über die Bindung der 5'-NTR (70, 146, 147).

Vom therapeutischen Standpunkt aus betrachtet, ist die Behandlung des MM mit neuen Pharmawirkstoffen wie z.B. JQ1 vermutlich nicht sehr effizient. JQ1 hemmt über BET-Bromodomänen-Proteine indirekt die Transkription von *MYC* und induziert in MM1.S Zellzyklusarrest und Seneszenz (254). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass nur ein Teil der MM-Zellen tatsächlich MYC exprimiert. Möglicherweise ist YB-1 in diesem Zusammenhang die bessere therapeutische Zielstruktur, da es von der Mehrzahl der malignen Plasmazellen exprimiert wird. Zudem könnte eine Störung der YB-1/mRNA-Interaktion als Grundlage für die Entwicklung einer innovativen Behandlungsstrategie beim MM verwendet werden.

Mit den hier durchgeführten YB-1- und MYC-Knockdown-Versuchen ist es nicht gelungen, die Proteine getrennt voneinander zu analysieren und ihren Einfluss auf die Zellviabilität zu ermitteln. Der Knockdown-*Rescue* durch eine artifizielle YB-1-Überexpression lieferte erste Hinweise, dass die Zellen auf diese Weise womöglich vor Apoptose geschützt werden können (Abb. 3.20). Allerdings war die Stärke der exogenen YB-1-Expression nicht zufriedenstellend und auch eine MYC-Überexpression scheiterte vermutlich an der transienten Transfektionsmethode. Für beide Knockdown-*Rescue*-Ansätze könnte ein lentiviraler Versuchsaufbau zur signifikanten Expression von YB-1 oder MYC genutzt werden.

Insgesamt wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch deutlich, dass beide Proteine für die Viabilität der HMZL essentiell sind. Es wurde ein gegenseitiges, regulatorisches Netzwerk zwischen der YB-1- und MYC-Expression identifiziert. Während beim YB-1-Knockdown aufgrund der fehlenden Translationskontrolle die MYC-Expression abnimmt, sinkt beim MYC-Knockdown aufgrund der fehlenden Transkriptionskontrolle die *YB-1*-mRNA-Expression. Darüber hinaus sollte jedoch berücksichtigt werden, dass sowohl auf der Translations- als auch Transkriptionsebene vielfältige Wechselwirkungen zwischen multiplen regulatorischen Faktoren und intrazellulären Signalwegen existieren. Die

Ergebnisse zur Rolle von YB-1 und MYC in HMZL geben einen Einblick in einen Teil dieses onkogenen Netzwerkes. Zusätzliche Hinweise auf ein weitverzweigtes, aber inhaltlich eng verbundenes Netz liefern die analysierten YB-1-IP-Daten. Neben der Häufung von mRNAs die funktionell der Translation zugeordnet werden, gibt es unter ihnen eine signifikante Anreicherung von MYC-Zielgenen. Demnach beinhaltet der aufgezeigte regulatorische Kreislauf nicht allein YB-1 und MYC, sondern geht weit über diese direkten Zielstrukturen hinaus.

Literaturverzeichnis

1. Kyle RA. Multiple myeloma: review of 869 cases. *Mayo Clinic proceedings* 1975;50(1):29-40.
2. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004;104(3):607-18.
3. Harousseau JL, Moreau P. Autologous hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *The New England journal of medicine* 2009;360(25):2645-54.
4. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, *et al.* A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *The New England journal of medicine* 2002;346(8):564-9.
5. Cohen HJ, Crawford J, Rao MK, Pieper CF, Currie MS. Racial differences in the prevalence of monoclonal gammopathy in a community-based sample of the elderly. *The American journal of medicine* 1998;104(5):439-44.
6. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998;91(1):3-21.
7. Kyle RA, Lust JA. Monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Seminars in hematology* 1989;26(3):176-200.
8. Brack C, Hiramama M, Lenhard-Schuller R, Tonegawa S. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 1978;15(1):1-14.
9. Bakkus MH, Van Riet I, Van Camp B, Thielemans K. Evidence that the clonogenic cell in multiple myeloma originates from a pre-switched but somatically mutated B cell. *British journal of haematology* 1994;87(1):68-74.
10. Vescio RA, Cao J, Hong CH, *et al.* Myeloma Ig heavy chain V region sequences reveal prior antigenic selection and marked somatic mutation but no intraclonal diversity. *J Immunol* 1995;155(5):2487-97.
11. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, *et al.* Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer research* 2004;64(4):1546-58.
12. Calasanz MJ, Cigudosa JC, Odero MD, *et al.* Cytogenetic analysis of 280 patients with multiple myeloma and related disorders: primary breakpoints and clinical correlations. *Genes, chromosomes & cancer* 1997;18(2):84-93.
13. Bergsagel PL, Chesi M, Nardini E, Brents LA, Kirby SL, Kuehl WM. Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93(24):13931-6.
14. Bergsagel PL, Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 2001;20(40):5611-22.
15. Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, *et al.* Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* 2002;99(6):2185-91.
16. Chesi M, Bergsagel PL, Brents LA, Smith CM, Gerhard DS, Kuehl WM. Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood* 1996;88(2):674-81.
17. Chesi M, Bergsagel PL, Shonukan OO, *et al.* Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* 1998;91(12):4457-63.

18. Chesi M, Nardini E, Brents LA, *et al.* Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nature genetics* 1997;16(3):260-4.
19. Chesi M, Nardini E, Lim RS, Smith KD, Kuehl WM, Bergsagel PL. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood* 1998;92(9):3025-34.
20. Rasmussen T, Theilgaard-Monch K, Hudlebusch HR, Lodahl M, Johnsen HE, Dahl IM. Occurrence of dysregulated oncogenes in primary plasma cells representing consecutive stages of myeloma pathogenesis: indications for different disease entities. *British journal of haematology* 2003;123(2):253-62.
21. Drach J, Schuster J, Nowotny H, *et al.* Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer research* 1995;55(17):3854-9.
22. Konigsberg R, Ackermann J, Kaufmann H, *et al.* Deletions of chromosome 13q in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia* 2000;14(11):1975-9.
23. Avet-Loiseau H, Li JY, Morineau N, *et al.* Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Intergroupe Francophone du Myelome*. *Blood* 1999;94(8):2583-9.
24. Liu P, Leong T, Quam L, *et al.* Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Trial. *Blood* 1996;88(7):2699-706.
25. Bezieau S, Devilder MC, Avet-Loiseau H, *et al.* High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Human mutation* 2001;18(3):212-24.
26. Shou Y, Martelli ML, Gabrea A, *et al.* Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(1):228-33.
27. Avet-Loiseau H, Gerson F, Magrangeas F, Minvielle S, Harousseau JL, Bataille R. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood* 2001;98(10):3082-6.
28. Drach J, Ackermann J, Fritz E, *et al.* Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood* 1998;92(3):802-9.
29. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975;36(3):842-54.
30. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, *et al.* International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23(15):3412-20.
31. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, *et al.* A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *Intergroupe Francais du Myelome*. *The New England journal of medicine* 1996;335(2):91-7.
32. Barlogie B, Jagannath S, Desikan KR, *et al.* Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 1999;93(1):55-65.
33. Barlogie B, Shaughnessy J, Tricot G, *et al.* Treatment of multiple myeloma. *Blood* 2004;103(1):20-32.
34. Reece DE. Management of multiple myeloma: the changing landscape. *Blood reviews* 2007;21(6):301-14.

35. Alexanian R, Haut A, Khan AU, *et al.* Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *Jama* 1969;208(9):1680-5.
36. Alexanian R, Dimopoulos M. The treatment of multiple myeloma. *The New England journal of medicine* 1994;330(7):484-9.
37. Rajkumar SV. Treatment of multiple myeloma. *Nature reviews* 2011;8(8):479-91.
38. Osgood EE. The survival time of patients with plasmocytic myeloma. *Cancer chemotherapy reports* 1960;9:1-10.
39. Gregory WM, Richards MA, Malpas JS. Combination chemotherapy versus melphalan and prednisolone in the treatment of multiple myeloma: an overview of published trials. *J Clin Oncol* 1992;10(2):334-42.
40. Peest D, Deicher H, Fett W, *et al.* Pyridinium cross-links in multiple myeloma: correlation with clinical parameters and use for monitoring of intravenous clodronate therapy--a pilot study of the German Myeloma Treatment Group (GMTG). *Eur J Cancer* 1996;32A(12):2053-7.
41. Cavo M, Terragna C, Martinelli G, *et al.* Molecular monitoring of minimal residual disease in patients in long-term complete remission after allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Blood* 2000;96(1):355-7.
42. Lemoli RM, Martinelli G, Zamagni E, *et al.* Engraftment, clinical, and molecular follow-up of patients with multiple myeloma who were reinfused with highly purified CD34+ cells to support single or tandem high-dose chemotherapy. *Blood* 2000;95(7):2234-9.
43. Martinelli G, Terragna C, Zamagni E, *et al.* Molecular remission after allogeneic or autologous transplantation of hematopoietic stem cells for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2000;18(11):2273-81.
44. Giles FJ, Wickham NR, Rapoport BL, *et al.* Cyclophosphamide, etoposide, vincristine, adriamycin, and dexamethasone (CEVAD) regimen in refractory multiple myeloma: an International Oncology Study Group (IOSG) phase II protocol. *American journal of hematology* 2000;63(3):125-30.
45. Mineur P, Menard JF, Le Loet X, *et al.* VAD or VMBCP in multiple myeloma refractory to or relapsing after cyclophosphamide-prednisone therapy (protocol MY 85). *British journal of haematology* 1998;103(2):512-7.
46. Parameswaran R, Giles C, Boots M, *et al.* CCNU (lomustine), idarubicin and dexamethasone (CIDEX): an effective oral regimen for the treatment of refractory or relapsed myeloma. *British journal of haematology* 2000;109(3):571-5.
47. Zöllinger A, Stühmer T, Chatterjee M, *et al.* Combined functional and molecular analysis of tumor cell signaling defines 2 distinct myeloma subgroups: Akt-dependent and Akt-independent multiple myeloma. *Blood* 2008;112(8):3403-11.
48. Hsu J, Shi Y, Krajewski S, *et al.* The AKT kinase is activated in multiple myeloma tumor cells. *Blood* 2001;98(9):2853-5.
49. Steinbrunn T, Stühmer T, Gattenlöhner S, *et al.* Mutated RAS and constitutively activated Akt delineate distinct oncogenic pathways, which independently contribute to multiple myeloma cell survival. *Blood* 2011;117(6):1998-2004.
50. Chng WJ, Gonzalez-Paz N, Price-Troska T, *et al.* Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia* 2008;22(12):2280-4.
51. Neri A, Murphy JP, Cro L, *et al.* Ras oncogene mutation in multiple myeloma. *The Journal of experimental medicine* 1989;170(5):1715-25.
52. Corradini P, Ladetto M, Voena C, *et al.* Mutational activation of N- and K-ras oncogenes in plasma cell dyscrasias. *Blood* 1993;81(10):2708-13.

53. Bergsagel PL, Kuehl WM. Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma. *Immunological reviews* 2003;194:96-104.
54. Chatterjee M, Rancso C, Stühmer 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(7):3714-22.
55. Jones PG, VanBogelen RA, Neidhardt FC. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 1987;169(5):2092-5.
56. 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(4):290-8.
57. Wolffe AP. Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *Bioessays* 1994;16(4):245-51.
58. Kloks CP, Spronk CA, Lasonder E, *et al.* The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1. *Journal of molecular biology* 2002;316(2):317-26.
59. 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(19):7322-6.
60. 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(8):5856-60.
61. Jürchott 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(30):27988-96.
62. 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(2):499-507.
63. Stratford AL, Habibi G, Astanehe A, *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) is transcriptionally induced by the Y-box binding protein-1 (YB-1) and can be inhibited with Iressa in basal-like breast cancer, providing a potential target for therapy. *Breast Cancer Res* 2007;9(5):R61.
64. Blobel G. Protein tightly bound to globin mRNA. *Biochemical and biophysical research communications* 1972;47(1):88-95.
65. Evdokimova VM, Kovrigina EA, Nashchekin DV, Davydova EK, Hershey JW, Ovchinnikov LP. The major core protein of messenger ribonucleoprotein particles (p50) promotes initiation of protein biosynthesis in vitro. *The Journal of biological chemistry* 1998;273(6):3574-81.
66. Sommerville J. Activities of cold-shock domain proteins in translation control. *Bioessays* 1999;21(4):319-25.
67. 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(10):1873-8.
68. Toh S, Nakamura T, Ohga T, *et al.* Genomic organization of the human Y-box protein (YB-1) gene. *Gene* 1998;206(1):93-7.
69. Yokoyama H, Harigae H, Takahashi S, *et al.* Regulation of YB-1 gene expression by GATA transcription factors. *Biochemical and biophysical research communications* 2003;303(1):140-5.
70. Shiota M, Izumi H, Onitsuka T, *et al.* Twist promotes tumor cell growth through YB-1 expression. *Cancer research* 2008;68(1):98-105.

71. Uramoto H, Izumi H, Ise T, *et al.* p73 Interacts with c-Myc to regulate Y-box-binding protein-1 expression. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(35):31694-702.
72. Fukuda T, Ashizuka M, Nakamura T, *et al.* Characterization of the 5'-untranslated region of YB-1 mRNA and autoregulation of translation by YB-1 protein. *Nucleic acids research* 2004;32(2):611-22.
73. Skabkina OV, Skabkin MA, Popova NV, Lyabin DN, Penalva LO, Ovchinnikov LP. Poly(A)-binding protein positively affects YB-1 mRNA translation through specific interaction with YB-1 mRNA. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(20):18191-8.
74. Skabkina OV, Lyabin DN, Skabkin MA, Ovchinnikov LP. YB-1 autoregulates translation of its own mRNA at or prior to the step of 40S ribosomal subunit joining. *Molecular and cellular biology* 2005;25(8):3317-23.
75. Kuwano M, Oda Y, Izumi H, *et al.* The role of nuclear Y-box binding protein 1 as a global marker in drug resistance. *Molecular cancer therapeutics* 2004;3(11):1485-92.
76. Ruzanov PV, Evdokimova VM, Korneeva NL, Hershey JW, Ovchinnikov LP. Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments. *Journal of cell science* 1999;112 (Pt 20):3487-96.
77. Bergmann S, Royer-Pokora B, Fietze E, *et al.* YB-1 provokes breast cancer through the induction of chromosomal instability that emerges from mitotic failure and centrosome amplification. *Cancer research* 2005;65(10):4078-87.
78. Horwitz EM, Maloney KA, Ley TJ. A human protein containing a "cold shock" domain binds specifically to H-DNA upstream from the human gamma-globin genes. *The Journal of biological chemistry* 1994;269(19):14130-9.
79. Tafuri SR, Wolffe AP. DNA binding, multimerization, and transcription stimulation by the *Xenopus* Y box proteins in vitro. *The New biologist* 1992;4(4):349-59.
80. Tafuri SR, Wolffe AP. Selective recruitment of masked maternal mRNA from messenger ribonucleoprotein particles containing FRGY2 (mRNP4). *The Journal of biological chemistry* 1993;268(32):24255-61.
81. Bouvet P, Matsumoto K, Wolffe AP. Sequence-specific RNA recognition by the *Xenopus* Y-box proteins. An essential role for the cold shock domain. *The Journal of biological chemistry* 1995;270(47):28297-303.
82. Ladomery M, Sommerville J. Binding of Y-box proteins to RNA: involvement of different protein domains. *Nucleic acids research* 1994;22(25):5582-9.
83. Manival X, Ghisolfi-Nieto L, Joseph G, Bouvet P, Erard M. RNA-binding strategies common to cold-shock domain- and RNA recognition motif-containing proteins. *Nucleic acids research* 2001;29(11):2223-33.
84. Landsman D. RNP-1, an RNA-binding motif is conserved in the DNA-binding cold shock domain. *Nucleic acids research* 1992;20(11):2861-4.
85. Sutherland BW, Kucab J, Wu J, *et al.* Akt phosphorylates the Y-box binding protein 1 at Ser102 located in the cold shock domain and affects the anchorage-independent growth of breast cancer cells. *Oncogene* 2005;24(26):4281-92.
86. Evdokimova V, Ruzanov P, Anglesio MS, *et al.* Akt-mediated YB-1 phosphorylation activates translation of silent mRNA species. *Molecular and cellular biology* 2006;26(1):277-92.
87. Basaki Y, Hosoi F, Oda Y, *et al.* Akt-dependent nuclear localization of Y-box-binding protein 1 in acquisition of malignant characteristics by human ovarian cancer cells. *Oncogene* 2007;26(19):2736-46.
88. Stratford AL, Fry CJ, Desilets C, *et al.* Y-box binding protein-1 serine 102 is a downstream target of p90 ribosomal S6 kinase in basal-like breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2008;10(6):R99.

89. Davies AH, Barrett I, Pambid MR, *et al.* YB-1 evokes susceptibility to cancer through cytokinesis failure, mitotic dysfunction and HER2 amplification. *Oncogene* 2011;30(34):3649-60.
90. Matsumoto K, Meric F, Wolffe AP. Translational repression dependent on the interaction of the *Xenopus* Y-box protein FRGY2 with mRNA. Role of the cold shock domain, tail domain, and selective RNA sequence recognition. *The Journal of biological chemistry* 1996;271(37):22706-12.
91. Murray MT, Schiller DL, Franke WW. Sequence analysis of cytoplasmic mRNA-binding proteins of *Xenopus* oocytes identifies a family of RNA-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89(1):11-5.
92. Bader AG, Vogt PK. Inhibition of protein synthesis by Y box-binding protein 1 blocks oncogenic cell transformation. *Molecular and cellular biology* 2005;25(6):2095-106.
93. Evdokimova VM, Wei CL, Sitikov AS, *et al.* The major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family. *The Journal of biological chemistry* 1995;270(7):3186-92.
94. Koike K, Uchiumi T, Ohga T, *et al.* Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS letters* 1997;417(3):390-4.
95. Sorokin AV, Selyutina AA, Skabkin MA, *et al.* Proteasome-mediated cleavage of the Y-box-binding protein 1 is linked to DNA-damage stress response. *The EMBO journal* 2005;24(20):3602-12.
96. Das S, Chattopadhyay R, Bhakat KK, *et al.* Stimulation of NEIL2-mediated oxidized base excision repair via YB-1 interaction during oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 2007;282(39):28474-84.
97. Stein U, Jürchott 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(30):28562-9.
98. Higashi K, Inagaki Y, Suzuki N, *et al.* Y-box-binding protein YB-1 mediates transcriptional repression of human alpha 2(I) collagen gene expression by interferon-gamma. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(7):5156-62.
99. Ladomery M, Sommerville J. A role for Y-box proteins in cell proliferation. *Bioessays* 1995;17(1):9-11.
100. Swamynathan SK, Nambiar A, Guntaka RV. Role of single-stranded DNA regions and Y-box proteins in transcriptional regulation of viral and cellular genes. *Faseb J* 1998;12(7):515-22.
101. Okamoto T, Izumi H, Imamura T, *et al.* Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene* 2000;19(54):6194-202.
102. Mertens PR, Steinmann K, Alfonso-Jaume MA, En-Nia A, Sun Y, Lovett DH. Combinatorial interactions of p53, activating protein-2, and YB-1 with a single enhancer element regulate gelatinase A expression in neoplastic cells. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(28):24875-82.
103. Diamond P, Shannon MF, Vadas MA, Coles LS. Cold shock domain factors activate the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter in stimulated Jurkat T cells. *The Journal of biological chemistry* 2001;276(11):7943-51.
104. Ohga T, Koike K, Ono M, *et al.* Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light. *Cancer research* 1996;56(18):4224-8.

105. Ohga T, Uchiumi T, Makino Y, *et al.* Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. *The Journal of biological chemistry* 1998;273(11):5997-6000.
106. Sengupta S, Mantha AK, Mitra S, Bhakat KK. Human AP endonuclease (APE1/Ref-1) and its acetylation regulate YB-1-p300 recruitment and RNA polymerase II loading in the drug-induced activation of multidrug resistance gene MDR1. *Oncogene* 2011;30(4):482-93.
107. En-Nia A, Yilmaz E, Klinge U, Lovett DH, Stefanidis I, Mertens PR. Transcription factor YB-1 mediates DNA polymerase alpha gene expression. *The Journal of biological chemistry* 2005;280(9):7702-11.
108. 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(37):35516-23.
109. Shiota M, Yokomizo A, Itsumi M, *et al.* Twist1 and Y-box-binding protein-1 promote malignant potential in bladder cancer cells. *BJU international* 2011;108(2 Pt 2):E142-9.
110. Hasegawa SL, Doetsch PW, Hamilton KK, *et al.* DNA binding properties of YB-1 and dbpA: binding to double-stranded, single-stranded, and abasic site containing DNAs. *Nucleic acids research* 1991;19(18):4915-20.
111. Zasedateleva OA, Krylov AS, Prokopenko DV, *et al.* Specificity of mammalian Y-box binding protein p50 in interaction with ss and ds DNA analyzed with generic oligonucleotide microchip. *Journal of molecular biology* 2002;324(1):73-87.
112. de Souza-Pinto NC, Mason PA, Hashiguchi K, *et al.* Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria. *DNA repair* 2009;8(6):704-19.
113. Torigoe T, Izumi H, Ishiguchi H, *et al.* Cisplatin resistance and transcription factors. *Current medicinal chemistry* 2005;5(1):15-27.
114. Ise T, Nagatani G, Imamura T, *et al.* Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer research* 1999;59(2):342-6.
115. Gu C, Oyama T, Osaki T, Kohno K, Yasumoto K. Expression of Y box-binding protein-1 correlates with DNA topoisomerase IIalpha and proliferating cell nuclear antigen expression in lung cancer. *Anticancer research* 2001;21(4A):2357-62.
116. Kelm RJ, Jr., Elder PK, Getz MJ. The single-stranded DNA-binding proteins, Puralpha, Purbeta, and MSY1 specifically interact with an exon 3-derived mouse vascular smooth muscle alpha-actin messenger RNA sequence. *The Journal of biological chemistry* 1999;274(53):38268-75.
117. MacDonald GH, Itoh-Lindstrom Y, Ting JP. The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter. *The Journal of biological chemistry* 1995;270(8):3527-33.
118. Ting JP, Painter A, Zeleznik-Le NJ, *et al.* YB-1 DNA-binding protein represses interferon gamma activation of class II major histocompatibility complex genes. *The Journal of experimental medicine* 1994;179(5):1605-11.
119. Lloberas J, Maki RA, Celada A. Repression of major histocompatibility complex I-A beta gene expression by dbpA and dbpB (mYB-1) proteins. *Molecular and cellular biology* 1995;15(9):5092-9.
120. Mertens PR, Harendza S, Pollock AS, Lovett DH. Glomerular mesangial cell-specific transactivation of matrix metalloproteinase 2 transcription is mediated by YB-1. *The Journal of biological chemistry* 1997;272(36):22905-12.

121. Bargou RC, Jürchott 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(4):447-50.
122. Li WW, Hsiung Y, Wong V, *et al.* Suppression of grp78 core promoter element-mediated stress induction by the dbpA and dbpB (YB-1) cold shock domain proteins. *Molecular and cellular biology* 1997;17(1):61-8.
123. Coles LS, Diamond P, Lambrusco L, *et al.* A novel mechanism of repression of the vascular endothelial growth factor promoter, by single strand DNA binding cold shock domain (Y-box) proteins in normoxic fibroblasts. *Nucleic acids research* 2002;30(22):4845-54.
124. Coles LS, Lambrusco L, Burrows J, *et al.* Phosphorylation of cold shock domain/Y-box proteins by ERK2 and GSK3beta and repression of the human VEGF promoter. *FEBS letters* 2005;579(24):5372-8.
125. Minich WB, Maidebura IP, Ovchinnikov LP. Purification and characterization of the major 50-kDa repressor protein from cytoplasmic mRNP of rabbit reticulocytes. *European journal of biochemistry / FEBS* 1993;212(3):633-8.
126. Skabkin MA, Kiselyova OI, Chernov KG, *et al.* Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1. *Nucleic acids research* 2004;32(18):5621-35.
127. Jain SK, Pluskal MG, Sarkar S. Thermal chromatography of eukaryotic messenger ribonucleoprotein particles on oligo (dT)-cellulose. Evidence for common mRNA-associated proteins in various cell types. *FEBS letters* 1979;97(1):84-90.
128. 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(19):5491-502.
129. Weidensdorfer D, Stohr N, Baude A, *et al.* Control of c-myc mRNA stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs. *RNA (New York, NY)* 2009;15(1):104-15.
130. Evdokimova VM, Ovchinnikov LP. Translational regulation by Y-box transcription factor: involvement of the major mRNA-associated protein, p50. *The international journal of biochemistry & cell biology* 1999;31(1):139-49.
131. Minich WB, Ovchinnikov LP. Role of cytoplasmic mRNP proteins in translation. *Biochimie* 1992;74(5):477-83.
132. Ray D, Kazan H, Chan ET, *et al.* Rapid and systematic analysis of the RNA recognition specificities of RNA-binding proteins. *Nature biotechnology* 2009;27(7):667-70.
133. Jenkins RH, Bennagi R, Martin J, Phillips AO, Redman JE, Fraser DJ. A conserved stem loop motif in the 5'untranslated region regulates transforming growth factor-beta(1) translation. *PloS one* 2010;5(8):e12283.
134. Evdokimova V, Tognon C, Ng T, *et al.* Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer cell* 2009;15(5):402-15.
135. Coles LS, Bartley MA, Bert A, *et al.* A multi-protein complex containing cold shock domain (Y-box) and polypyrimidine tract binding proteins forms on the vascular endothelial growth factor mRNA. Potential role in mRNA stabilization. *European journal of biochemistry / FEBS* 2004;271(3):648-60.
136. Skabkin MA, Evdokimova V, Thomas AA, Ovchinnikov LP. The major messenger ribonucleoprotein particle protein p50 (YB-1) promotes nucleic acid strand annealing. *The Journal of biological chemistry* 2001;276(48):44841-7.
137. Minich WB, Volyanik EV, Korneyeva NL, Berezin YV, Ovchinnikov LP. Cytoplasmic mRNP proteins affect mRNA translation. *Molecular biology reports* 1990;14(2-3):65-7.
138. Pisarev AV, Skabkin MA, Thomas AA, Merrick WC, Ovchinnikov LP, Shatsky IN. Positive and negative effects of the major mammalian messenger ribonucleoprotein p50 on binding of

- 40 S ribosomal subunits to the initiation codon of beta-globin mRNA. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(18):15445-51.
139. Svitkin YV, Ovchinnikov LP, Dreyfuss G, Sonenberg N. General RNA binding proteins render translation cap dependent. *The EMBO journal* 1996;15(24):7147-55.
140. Matsumoto K, Tanaka KJ, Tsujimoto M. An acidic protein, YBAP1, mediates the release of YB-1 from mRNA and relieves the translational repression activity of YB-1. *Molecular and cellular biology* 2005;25(5):1779-92.
141. Lorsch JR. RNA chaperones exist and DEAD box proteins get a life. *Cell* 2002;109(7):797-800.
142. Jackson RJ, Hunt SL, Gibbs CL, Kaminski A. Internal initiation of translation of picornavirus RNAs. *Molecular biology reports* 1994;19(3):147-59.
143. Spriggs KA, Stoneley M, Bushell M, Willis AE. Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 2008;100(1):27-38.
144. 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(1):40-9.
145. 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(19):2884-91.
146. Mani SA, Guo W, Liao MJ, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133(4):704-15.
147. Mounneimne G, Brugge JS. YB-1 translational control of epithelial-mesenchyme transition. *Cancer cell* 2009;15(5):357-9.
148. Nekrasov MP, Ivshina MP, Chernov KG, *et al.* The mRNA-binding protein YB-1 (p50) prevents association of the eukaryotic initiation factor eIF4G with mRNA and inhibits protein synthesis at the initiation stage. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(16):13936-43.
149. Davydova EK, Evdokimova VM, Ovchinnikov LP, Hershey JW. Overexpression in COS cells of p50, the major core protein associated with mRNA, results in translation inhibition. *Nucleic acids research* 1997;25(14):2911-6.
150. Bader AG, Felts KA, Jiang N, Chang HW, Vogt PK. Y box-binding protein 1 induces resistance to oncogenic transformation by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100(21):12384-9.
151. 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(4):797-803.
152. Tafuri SR, Wolffe AP. Xenopus Y-box transcription factors: molecular cloning, functional analysis and developmental regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;87(22):9028-32.
153. Shibao K, Takano H, Nakayama Y, *et al.* Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas. *International journal of cancer* 1999;83(6):732-7.
154. Grant CE, Deeley RG. Cloning and characterization of chicken YB-1: regulation of expression in the liver. *Molecular and cellular biology* 1993;13(7):4186-96.
155. Ito K, Tsutsumi K, Kuzumaki T, Gomez PF, Otsu K, Ishikawa K. A novel growth-inducible gene that encodes a protein with a conserved cold-shock domain. *Nucleic acids research* 1994;22(11):2036-41.

156. Lu ZH, Books JT, Ley TJ. Cold shock domain family members YB-1 and MSY4 share essential functions during murine embryogenesis. *Molecular and cellular biology* 2006;26(22):8410-7.
157. 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(11):4625-37.
158. Bhullar J, Sollars VE. YBX1 expression and function in early hematopoiesis and leukemic cells. *Immunogenetics* 2011;63(6):337-50.
159. Lovett DH, Cheng S, Cape L, Pollock AS, Mertens PR. YB-1 alters MT1-MMP trafficking and stimulates MCF-7 breast tumor invasion and metastasis. *Biochemical and biophysical research communications* 2010;398(3):482-8.
160. Xu W, Zhou L, Qin R, Tang H, Shen H. Nuclear expression of YB-1 in diffuse large B-cell lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome. *European journal of haematology* 2009;83(4):313-9.
161. Fujii T, Yokoyama G, Takahashi H, *et al.* Preclinical studies of molecular-targeting diagnostic and therapeutic strategies against breast cancer. *Breast cancer (Tokyo, Japan)* 2008;15(1):73-8.
162. 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* 2002;97(3):278-82.
163. Schittek 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* 2007;120(10):2110-8.
164. Wu Y, Yamada S, Izumi H, *et al.* Strong YB-1 expression is associated with liver metastasis progression and predicts shorter disease-free survival in advanced gastric cancer. *Journal of surgical oncology* 2012;105(7):724-30.
165. Gens GP, Moiseeva NI, Stromskaia TP, Rybalkina E, Vaiman AV, Stavrovskaja AA. [Determination of the amount of YB-1 gene mRNA in the breast tumor tissues to predict the course of disease]. *Klinicheskaja laboratornaia diagnostika* 2010(2):29-32.
166. Oda Y, Sakamoto A, Shinohara N, *et al.* Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 1998;4(9):2273-7.
167. Gimenez-Bonafe P, Fedoruk MN, Whitmore TG, *et al.* YB-1 is upregulated during prostate cancer tumor progression and increases P-glycoprotein activity. *The Prostate* 2004;59(3):337-49.
168. Huang X, Ushijima K, Komai K, *et al.* Co-expression of Y box-binding protein-1 and P-glycoprotein as a prognostic marker for survival in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 2004;93(2):287-91.
169. 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. *Clin Cancer Res* 2001;7(10):3151-5.
170. Kashihara M, Azuma K, Kawahara A, *et al.* Nuclear Y-box binding protein-1, a predictive marker of prognosis, is correlated with expression of HER2/ErbB2 and HER3/ErbB3 in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2009;4(9):1066-74.
171. Rubinstein DB, Stortchevoi A, Boosalis M, Ashfaq R, Guillaume T. Overexpression of DNA-binding protein B gene product in breast cancer as detected by in vitro-generated combinatorial human immunoglobulin libraries. *Cancer research* 2002;62(17):4985-91.
172. Wu J, Lee C, Yokom D, *et al.* Disruption of the Y-box binding protein-1 results in suppression of the epidermal growth factor receptor and HER-2. *Cancer research* 2006;66(9):4872-9.

173. Yasen M, Kajino K, Kano S, *et al.* The up-regulation of Y-box binding proteins (DNA binding protein A and Y-box binding protein-1) as prognostic markers of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(20):7354-61.
174. Gessner C, Woischwill C, Schumacher A, *et al.* Nuclear YB-1 expression as a negative prognostic marker in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* 2004;23(1):14-9.
175. Sinnberg T, Sauer B, Holm P, *et al.* MAPK and PI3K/AKT mediated YB-1 activation promotes melanoma cell proliferation which is counteracted by an autoregulatory loop. *Experimental dermatology* 2012;21(4):265-70.
176. Lipson KE, Chen ST, Koniecki J, Ku DH, Baserga R. S-phase-specific regulation by deletion mutants of the human thymidine kinase promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989;86(18):6848-52.
177. Gai XX, Lipson KE, Prystowsky MB. Unusual DNA binding characteristics of an in vitro translation product of the CCAAT binding protein mYB-1. *Nucleic acids research* 1992;20(3):601-6.
178. Travali S, Ku DH, Rizzo MG, Ottavio L, Baserga R, Calabretta B. Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen. *The Journal of biological chemistry* 1989;264(13):7466-72.
179. Yoshimatsu T, Uramoto H, Oyama T, *et al.* Y-box-binding protein-1 expression is not correlated with p53 expression but with proliferating cell nuclear antigen expression in non-small cell lung cancer. *Anticancer research* 2005;25(5):3437-43.
180. Pearson BE, Nasheuer HP, Wang TS. Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. *Molecular and cellular biology* 1991;11(4):2081-95.
181. Jürchott 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(12):e1001231.
182. 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(52):40440-9.
183. Cheng S, Alfonso-Jaume MA, Mertens PR, Lovett DH. Tumour metastasis suppressor, nm23-beta, inhibits gelatinase A transcription by interference with transactivator Y-box protein-1 (YB-1). *The Biochemical journal* 2002;366(Pt 3):807-16.
184. Astanehe A, Finkbeiner MR, Hojabrpour P, *et al.* The transcriptional induction of PIK3CA in tumor cells is dependent on the oncoprotein Y-box binding protein-1. *Oncogene* 2009;28(25):2406-18.
185. Gao Y, Fotovati A, Lee C, *et al.* Inhibition of Y-box binding protein-1 slows the growth of glioblastoma multiforme and sensitizes to temozolomide independent O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *Molecular cancer therapeutics* 2009;8(12):3276-84.
186. Akiyama K, Ohga N, Hida Y, *et al.* Tumor endothelial cells acquire drug resistance by MDR1 up-regulation via VEGF signaling in tumor microenvironment. *The American journal of pathology* 2012;180(3):1283-93.
187. Kaszubiak A, Kupstat A, Muller U, Hausmann R, Holm PS, Lage H. Regulation of MDR1 gene expression in multidrug-resistant cancer cells is independent from YB-1. *Biochemical and biophysical research communications* 2007;357(1):295-301.
188. Scotto KW. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* 2003;22(47):7496-511.
189. Hu Z, Jin S, Scotto KW. Transcriptional activation of the MDR1 gene by UV irradiation. Role of NF-Y and Sp1. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(4):2979-85.

190. Kohno K, Sato S, Takano H, Matsuo K, Kuwano M. The direct activation of human multidrug resistance gene (MDR1) by anticancer agents. *Biochemical and biophysical research communications* 1989;165(3):1415-21.
191. Asakuno K, Kohno K, Uchiumi T, *et al.* Involvement of a DNA binding protein, MDR-NF1/YB-1, in human MDR1 gene expression by actinomycin D. *Biochemical and biophysical research communications* 1994;199(3):1428-35.
192. Kohno K, Sato S, Uchiumi T, *et al.* Activation of the human multidrug resistance-1 (mdr1) gene promoter in response to inhibitors of DNA topoisomerases. *International journal of oncology* 1992;1(1):73-7.
193. Uchiumi T, Kohno K, Tanimura H, *et al.* Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation. *Cell Growth Differ* 1993;4(3):147-57.
194. Yahata H, Kobayashi H, Kamura T, *et al.* Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2002;128(11):621-6.
195. 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. *Clin Cancer Res* 2005;11(24 Pt 1):8837-44.
196. Jernberg-Wiklund H, Nilsson K. *Multiple Myeloma Cell Lines. Human Cell Culturesa Vol III* 2000;Kluwer Academic Publishers:81-155.
197. Murphy DJ, Junttila MR, Pouyet L, *et al.* Distinct thresholds govern Myc's biological output in vivo. *Cancer cell* 2008;14(6):447-57.
198. Wang H, Mannava S, Grachtchouk V, *et al.* c-Myc depletion inhibits proliferation of human tumor cells at various stages of the cell cycle. *Oncogene* 2008;27(13):1905-15.
199. Peritz T, Zeng F, Kannanayakal TJ, *et al.* Immunoprecipitation of mRNA-protein complexes. *Nature protocols* 2006;1(2):577-80.
200. Tenenbaum SA, Carson CC, Lager PJ, Keene JD. Identifying mRNA subsets in messenger ribonucleoprotein complexes by using cDNA arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(26):14085-90.
201. Finkbeiner MR, Astanehe A, To K, *et al.* Profiling YB-1 target genes uncovers a new mechanism for MET receptor regulation in normal and malignant human mammary cells. *Oncogene* 2009;28(11):1421-31.
202. Dong J, Akcakanat A, Stivers DN, Zhang J, Kim D, Meric-Bernstam F. RNA-binding specificity of Y-box protein 1. *RNA biology* 2009;6(1):59-64.
203. Tanaka T, Ohashi S, Funakoshi T, Kobayashi S. YB-1 binds to GluR2 mRNA and CaM1 mRNA in the brain and regulates their translational levels in an activity-dependent manner. *Cellular and molecular neurobiology* 2010;30(7):1089-100.
204. Gachet Y, Tournier S, Lee M, Lazaris-Karatzas A, Poulton T, Bommer UA. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *Journal of cell science* 1999;112 (Pt 8):1257-71.
205. Chan TH, Chen L, Guan XY. Role of translationally controlled tumor protein in cancer progression. *Biochemistry research international* 2012;2012:369384.
206. Chitpatima ST, Makrides S, Bandyopadhyay R, Brawerman G. Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic acids research* 1988;16(5):2350.
207. Bommer UA, Borovjagin AV, Greagg MA, *et al.* The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. *RNA (New York, NY)* 2002;8(4):478-96.

208. Chung S, Kim M, Choi W, Chung J, Lee K. Expression of translationally controlled tumor protein mRNA in human colon cancer. *Cancer letters* 2000;156(2):185-90.
209. Arcuri F, Papa S, Carducci A, *et al.* Translationally controlled tumor protein (TCTP) in the human prostate and prostate cancer cells: expression, distribution, and calcium binding activity. *The Prostate* 2004;60(2):130-40.
210. Chan TH, Chen L, Liu M, *et al.* Translationally controlled tumor protein induces mitotic defects and chromosome missegregation in hepatocellular carcinoma development. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2012;55(2):491-505.
211. Tuynnder M, Susini L, Prieur S, *et al.* Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(23):14976-81.
212. Zhang D, Li F, Weidner D, Mnjoyan ZH, Fujise K. Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and Fortilin. The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(40):37430-8.
213. Yang Y, Yang F, Xiong Z, *et al.* An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity. *Oncogene* 2005;24(30):4778-88.
214. Lin CJ, Malina A, Pelletier J. c-Myc and eIF4F constitute a feedforward loop that regulates cell growth: implications for anticancer therapy. *Cancer research* 2009;69(19):7491-4.
215. Jopling CL, Willis AE. N-myc translation is initiated via an internal ribosome entry segment that displays enhanced activity in neuronal cells. *Oncogene* 2001;20(21):2664-70.
216. Prendergast GC. Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* 1999;18(19):2967-87.
217. Kuehl WM, Brents LA, Chesi M, Huppi K, Bergsagel PL. Dysregulation of c-myc in multiple myeloma. *Current topics in microbiology and immunology* 1997;224:277-82.
218. Selvanayagam P, Blick M, Narni F, *et al.* Alteration and abnormal expression of the c-myc oncogene in human multiple myeloma. *Blood* 1988;71(1):30-5.
219. Sawyer JR, Lukacs JL, Thomas EL, *et al.* Multicolour spectral karyotyping identifies new translocations and a recurring pathway for chromosome loss in multiple myeloma. *British journal of haematology* 2001;112(1):167-74.
220. Brown RD, Pope B, Luo XF, Gibson J, Joshua D. The oncoprotein phenotype of plasma cells from patients with multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma* 1994;16(1-2):147-56.
221. Jernberg-Wiklund H, Pettersson M, Larsson LG, Anton R, Nilsson K. Expression of myc-family genes in established human multiple myeloma cell lines: L-myc but not c-myc gene expression in the U-266 myeloma cell line. *International journal of cancer* 1992;51(1):116-23.
222. Stoneley M, Subkhankulova T, Le Quesne JP, *et al.* Analysis of the c-myc IRES; a potential role for cell-type specific trans-acting factors and the nuclear compartment. *Nucleic acids research* 2000;28(3):687-94.
223. 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(51):32061-6.
224. Stoneley M, Paulin FE, Le Quesne JP, Chappell SA, Willis AE. C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene* 1998;16(3):423-8.
225. Chappell SA, LeQuesne JP, Paulin FE, *et al.* A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: a novel mechanism of oncogene de-regulation. *Oncogene* 2000;19(38):4437-40.
226. Paulin FE, West MJ, Sullivan NF, Whitney RL, Lyne L, Willis AE. Aberrant translational control of the c-myc gene in multiple myeloma. *Oncogene* 1996;13(3):505-13.

227. Wu J, Stratford AL, Astanehe A, Dunn SE. YB-1 is a transcription/translation factor that orchestrates the oncogenome by hardwiring signal transduction to gene expression. *Translational Oncogenomics* 2007;2:49-65.
228. Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, *et al.* Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 2002;99(5):1745-57.
229. Fan J, Zeller K, Chen YC, *et al.* Time-dependent c-Myc transactomes mapped by Array-based nuclear run-on reveal transcriptional modules in human B cells. *PloS one* 2010;5(3):e9691.
230. Indra AK, Warot X, Brocard J, *et al.* Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic acids research* 1999;27(22):4324-7.
231. Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic acids research* 2005;33(Web Server issue):W741-8.
232. Duncan DT, Prodduturi N, Zhang B. WebGestalt2: an updated and expanded version of the Web-based Gene Set Analysis Toolkit. *BMC Bioinformatics* 2010;11(Suppl 4):P10.
233. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, *et al.* PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature genetics* 2003;34(3):267-73.
234. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102(43):15545-50.
235. Matsumoto S, Uchiumi T, Tanamachi H, *et al.* Ribonucleoprotein Y-box-binding protein-1 regulates mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) protein expression after serum stimulation through binding to OXPHOS mRNA. *The Biochemical journal* 2012;443(2):573-84.
236. Mokrejs M, Masek T, Vopalensky V, Hlubucek P, Delbos P, Pospisek M. IRESite--a tool for the examination of viral and cellular internal ribosome entry sites. *Nucleic acids research* 2009;38(Database issue):D131-6.
237. Stoneley M, Willis AE. Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 2004;23(18):3200-7.
238. Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* 2012;485(7396):109-13.
239. Imataka H, Olsen HS, Sonenberg N. A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G. *The EMBO journal* 1997;16(4):817-25.
240. Chen KY, Chang ZF, Pang JH, He GS, Liu AY. Polyamine metabolism and cell-cycle-dependent gene expression in IMR-90 human diploid fibroblasts during senescence in culture. *Experimental gerontology* 1989;24(5-6):523-37.
241. Iadevaia V, Caldarola S, Tino E, Amaldi F, Loreni F. All translation elongation factors and the e, f, and h subunits of translation initiation factor 3 are encoded by 5'-terminal oligopyrimidine (TOP) mRNAs. *RNA (New York, NY)* 2008;14(9):1730-6.
242. Meyuhas O. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *European journal of biochemistry / FEBS* 2000;267(21):6321-30.
243. Sonenberg N. mRNA translation: influence of the 5' and 3' untranslated regions. *Current opinion in genetics & development* 1994;4(2):310-5.
244. Hsieh AC, Liu Y, Edlind MP, *et al.* The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature* 2012;485(7396):55-61.

245. Coleman AE, Kovalchuk AL, Janz S, Palini A, Ried T. Jumping translocation breakpoint regions lead to amplification of rearranged Myc. *Blood* 1999;93(12):4442-4.
246. Kovalchuk AL, Kim JS, Park SS, *et al.* IL-6 transgenic mouse model for extrasosseous plasmacytoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(3):1509-14.
247. Pandolfi PP. Aberrant mRNA translation in cancer pathogenesis: an old concept revisited comes finally of age. *Oncogene* 2004;23(18):3134-7.
248. Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ. Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10(4):254-66.
249. Johnson LF, Levis R, Abelson HT, Green H, Penman S. Changes in RNA in relation to growth of the fibroblast. IV. Alterations in the production and processing of mRNA and rRNA in resting and growing cells. *The Journal of cell biology* 1976;71(3):933-8.
250. Zetterberg A, Larsson O, Wiman KG. What is the restriction point? *Current opinion in cell biology* 1995;7(6):835-42.
251. Paulin FE, Chappell SA, Willis AE. A single nucleotide change in the c-myc internal ribosome entry segment leads to enhanced binding of a group of protein factors. *Nucleic acids research* 1998;26(13):3097-103.
252. Chng WJ, Huang GF, Chung TH, *et al.* Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia* 2011;25(6):1026-35.
253. Skopelitou A, Hadjiyannakis M, Tsenga A, *et al.* Expression of C-myc p62 oncoprotein in multiple myeloma: an immunohistochemical study of 180 cases. *Anticancer research* 1993;13(4):1091-5.
254. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, *et al.* BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 2011;146(6):904-17.
255. Kolluri R, Kinniburgh AJ. Full length cDNA sequence encoding a nuclease-sensitive element DNA binding protein. *Nucleic acids research* 1991;19(17):4771.
256. Kolluri R, Torrey TA, Kinniburgh AJ. A CT promoter element binding protein: definition of a double-strand and a novel single-strand DNA binding motif. *Nucleic acids research* 1992;20(1):111-6.
257. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual review of biochemistry* 1999;68:913-63.
258. Yu YN, Yip GW, Tan PH, *et al.* Y-box binding protein 1 is up-regulated in proliferative breast cancer and its inhibition deregulates the cell cycle. *International journal of oncology* 2010;37(2):483-92.
259. Schuhmacher M, Staeger MS, Pajic A, *et al.* Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr Biol* 1999;9(21):1255-8.
260. Pajic A, Spitkovsky D, Christoph B, *et al.* Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *International journal of cancer* 2000;87(6):787-93.
261. Blackwell TK, Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN, Weintraub H. Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science (New York, NY)* 1990;250(4984):1149-51.
262. Halazonetis TD, Kandil AN. Determination of the c-MYC DNA-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991;88(14):6162-6.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Methode	<i>Avidin-Biotin-Complex-Methode</i>
AP2	<i>Activating protein 2</i>
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Aqua dest.</i>	bidestilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CD138	Syndecan-1
cDNA	<i>copy-DNA</i>
CRS	<i>Cytoplasmic retention signal</i>
CSD	<i>Cold shock domain</i> ; Kälteschockdomäne
CT	Computertomographie
CTD	C-terminale Domäne
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylen-Glykol-Tetraacetat
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor der Translation
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
<i>et al.</i>	und andere
F	Farad (nach M. Faraday)
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FGFR3	<i>Fibroblast growth factor receptor 3</i>
g	Gramm
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
h	<i>hour</i> ; Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDCT	Hochdosis-Chemotherapie

HIF1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1 α</i>
HMZL	Humane Myelomzelllinien
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IgH	Immunglobulin Schwereketten
IgL	Immunglobulin Leichtketten
IgM	Immunglobulin
IL-6	Interleukin-6
IMWG	<i>International myeloma working group</i>
IP	Immunpräzipitation
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
ISS	<i>International staging system</i>
ITAF	IRES- <i>trans</i> -aktivierender Faktor
KCl	Kaliumchlorid
KMSZ	Knochenmarkstromazellen
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LNGFR	<i>Low-affinity nerve growth factor receptor</i>
M	Mol
m	milli
MAPK	MAP-Kinase
max.	maximal
MDR1	<i>Multiple drug resistance 1</i>
MEFs	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGUS	Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MM	Multiple Myelom
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
mRNP	<i>messenger ribonucleoprotein</i>
MRP-1	<i>Multi-drug resistance-related protein-1</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MT-MMP	<i>Membrane type 1 matrix metalloproteinase</i>
MYC	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NLS	<i>Nuclear localisation signal</i>
NP-40	Nonidet-P40
NTR	Nicht-translatierte Region

p	piko
PABP	<i>Poly(A)-binding protein</i> ; Poly(A)-bindendes Protein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	potentia Hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PIP	Phosphoinositid Phosphat
PTB-1	Polypyrimidintrakt-bindendes Protein-1
RAS	Homolog des <i>rat sarcoma virus</i> -Onkogens
RBP	RNA-Bindungsprotein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCTP	Translational kontrolliertes Tumorprotein
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TGS	Tris-Glycin-SDS
TOP	<i>5'-terminal oligopyrimidine</i>
Tris	a,a,a,-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
Tween-20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitan-monolaurat
U	<i>unit</i> ; Einheit
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
YB-1	Y-Box-bindendes Protein 1
μ	mikro
°C	Grad Celcius
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen

Anhang

A1: Tabelle der YB-1 gebundenen mRNAs für AMO-1, MM.1S, MOPC und PZT mit einem Vermerk zu bekannten 5'NTR-Elementen (IRES, TOP).

IRES	TOP	Gen	Beschreibung
		ACTB	Actin, beta
		ACTG1	actin, gamma, cytoplasmic 1 (Actg1), mRNA.
		ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate (Aldoa), transcript variant 3, mRNA.
		ANAPC5	anaphase-promoting complex subunit 5 (Anapc5), transcript variant 2, mRNA.
		ARF1	ADP-ribosylation factor 1 (Arf1), transcript variant 1, mRNA.
		ARPC1B	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B (Arpc1b), mRNA.
		ARPC2	actin related protein 2/3 complex, subunit 2 (Arpc2), mRNA.
		ATP6V0C	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit C
		B2M	beta-2 microglobulin (B2m), mRNA.
		CCDC72	coiled-coil domain containing 72 (Ccdc72), mRNA.
		CDK2AP1	CDK2 (cyclin-dependent kinase 2)-associated protein 1 (Cdk2ap1), mRNA.
		CFL1	cofilin 1, non-muscle (Cfl1), mRNA.
		CHCHD2	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2 (Chchd2), mRNA.
		CKS1B	CDC28 protein kinase 1b
		CLPTM1L	CLPTM1-like (Clptm1l), mRNA.
		COX6A1	cytochrome c oxidase, subunit VI a, polypeptide 1 (Cox6a1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
		COX6B1	Cytochrome c oxidase, subunit VIb polypeptide 1
		COX8A	cytochrome c oxidase, subunit VIIIa (Cox8a), mRNA.
		CSDA	cold shock domain protein A (Cdda), transcript variant 2, mRNA.
		CYCS	cytochrome c, somatic (Cyccs), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
		CYFIP2	cytoplasmic FMR1 interacting protein 2 (Cyfip2), mRNA.
		DYNLL1	Dynein light chain LC8-type 1
	X	EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (Eef1a1), mRNA.
		EEF1B2	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2 (Eef1b2), mRNA.
	X	EEF1G	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma (Eef1g), mRNA.
	X	EEF2	eukaryotic translation elongation factor 2 (Eef2), mRNA.
		EIF1	eukaryotic translation initiation factor 1 (Eif1), mRNA.
	X	EIF3E	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit E (Eif3e), mRNA.
	X	EIF3H	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit H (Eif3h), mRNA.
		EIF3I	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit I (Eif3i), mRNA.
		EIF3L	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit L (Eif3l), mRNA.
X		EIF4G2	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 2 (Eif4g2), transcript variant 2, mRNA.
		FAM96A	family with sequence similarity 96, member A (Fam96a), mRNA.
	X	FAU	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived) (Fau), transcript variant 3, mRNA.
		FTH1	ferritin heavy chain 1 (Fth1), mRNA.
		GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
		GDI2	Guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor 2
		GNAS	GNAS (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating) complex locus (Gnas), transcript variant 5, mRNA.
	X	GNB2L1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2 like 1 (Gnb2l1), mRNA.
		GNG5	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 5 (Gng5),

IRES	TOP	Gen	Beschreibung
			mRNA.
		GSTP1	glutathione S-transferase, pi 1 (Gstp1), mRNA.
		H2AFZ	H2A histone family, member Z (H2afz), mRNA.
		H3F3A	H3 histone, family 3A (H3f3a), mRNA.
		HAX1	HCLS1 associated X-1
		HDGF	hepatoma-derived growth factor (Hdgf), mRNA.
		HSPA8	Heat shock protein 8
		LAPTM5	lysosomal-associated protein transmembrane 5 (Laptm5), mRNA.
		LDHA	lactate dehydrogenase A (Ldha), transcript variant 1, mRNA.
		MAT2A	methionine adenosyltransferase II, alpha (Mat2a), mRNA.
		MATR3	matrin 3 (Matr3), mRNA.
		MDH2	Malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)
		MFF	mitochondrial fission factor (Mff), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
		MIF	macrophage migration inhibitory factor (Mif), mRNA.
		MORF4L2	mortality factor 4 like 2 (Morf4l2), transcript variant 6, mRNA.
X		MYC	myelocytomatosis oncogene (Myc), transcript variant 2, mRNA.
		NACA	nascent polypeptide-associated complex alpha polypeptide (Naca), transcript variant 2, mRNA.
		NDUFA12	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 12
		NDUFB11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 11 (Ndufb11), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
		NDUFV2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2
		NHP2L1	NHP2 non-histone chromosome protein 2-like 1 (S. cerevisiae) (Nhp2l1), mRNA.
		NME2	non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in (Nme2), transcript variant 1, mRNA.
		NOP10	NOP10 ribonucleoprotein homolog (yeast) (Nop10), mRNA.
		NPC2	Niemann Pick type C2 (Npc2), mRNA.
	X	NPM1	nucleophosmin 1 (Npm1), mRNA.
		NTAN1	N-terminal Asn amidase (Ntan1), mRNA.
		NUTF2	nuclear transport factor 2 (Nutf2), mRNA.
		OAZ1	ornithine decarboxylase antizyme 1 (Oaz1), mRNA.
X		ODC1	ornithine decarboxylase, structural 1 (Odc1), mRNA.
	X	PABPC1	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1 (Pabpc1), mRNA.
		PAICS	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoribosylaminoimidazole, succinocarboxamide synthetase (Paics), mRNA.
		PCBP1	poly(rC) binding protein 1 (Pcbp1), mRNA.
		PCBP2	poly(rC) binding protein 2 (Pcbp2), transcript variant 4, mRNA.
		PHB2	prohibitin 2 (Phb2), mRNA.
		PLP2	proteolipid protein 2 (Plp2), mRNA.
		POLR2J	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J (Polr2j), mRNA.
		PPIA	peptidylprolyl isomerase A (Ppia), mRNA.
		PPP1CC	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform (Ppp1cc), mRNA.
		PTMA	prothymosin alpha (Ptma), mRNA.
		RAN	RAN, member RAS oncogene family (Ran), mRNA.
		RPL10	ribosomal protein 10 (Rpl10), mRNA.
	X	RPL10A	ribosomal protein L10A (Rpl10a), mRNA.
		RPL11	ribosomal protein L11 (Rpl11), mRNA.
	X	RPL12	Ribosomal protein L12
		RPL13	ribosomal protein L13 (Rpl13), mRNA.
	X	RPL13A	ribosomal protein L13A (Rpl13a), mRNA.

IRES	TOP	Gen	Beschreibung
	X	RPL14	ribosomal protein L14 (Rpl14), mRNA.
		RPL15	ribosomal protein L15 (Rpl15), mRNA.
		RPL17	ribosomal protein L17 (Rpl17), mRNA.
	X	RPL18	ribosomal protein L18 (Rpl18), mRNA.
	X	RPL18A	ribosomal protein L18A (Rpl18a), mRNA.
	X	RPL19	ribosomal protein L19 (Rpl19), transcript variant 2, mRNA.
	X	RPL21	ribosomal protein L21 (Rpl21), mRNA.
	X	RPL22	Ribosomal protein L22
	X	RPL23	ribosomal protein L23 (Rpl23), mRNA.
	X	RPL23A	Ribosomal protein L23a
	X	RPL24	ribosomal protein L24 (Rpl24), mRNA.
		RPL27	ribosomal protein L27 (Rpl27), mRNA.
		RPL27A	ribosomal protein L27A (Rpl27a), mRNA.
		RPL28	ribosomal protein L28 (Rpl28), mRNA.
		RPL29	ribosomal protein L29 (Rpl29), mRNA.
		RPL3	ribosomal protein L3 (Rpl3), mRNA.
	X	RPL30	ribosomal protein L30 (Rpl30), transcript variant 2, mRNA.
		RPL31	Ribosomal protein L31
	X	RPL32	ribosomal protein L32 (Rpl32), mRNA.
	X	RPL34	Ribosomal protein L34
	X	RPL35	ribosomal protein L35 (Rpl35), mRNA.
		RPL35A	ribosomal protein L35A (Rpl35a), transcript variant 3, mRNA.
		RPL36	ribosomal protein L36 (Rpl36), mRNA.
	X	RPL36A	Ribosomal protein L36A
	X	RPL37	ribosomal protein L37 (Rpl37), mRNA.
	X	RPL37A	Ribosomal protein L37a
	X	RPL38	ribosomal protein L38 (Rpl38), transcript variant 3, mRNA.
	X	RPL39	ribosomal protein L39 (Rpl39), mRNA.
	X	RPL4	ribosomal protein L4 (Rpl4), mRNA.
	X	RPL41	ribosomal protein L41 (Rpl41), mRNA.
	X	RPL5	ribosomal protein L5 (Rpl5), mRNA.
	X	RPL6	ribosomal protein L6 (Rpl6), mRNA.
	X	RPL7	ribosomal protein L7 (Rpl7), mRNA.
	X	RPL7A	ribosomal protein L7A (Rpl7a), mRNA.
	X	RPL8	ribosomal protein L8 (Rpl8), mRNA.
	X	RPL9	Ribosomal protein L9
	X	RPLP0	ribosomal protein, large, P0 (Rplp0), mRNA.
	X	RPLP1	ribosomal protein, large, P1 (Rplp1), mRNA.
	X	RPLP2	ribosomal protein, large P2 (Rplp2), mRNA.
	X	RPS10	ribosomal protein S10 (Rps10), mRNA.
	X	RPS11	ribosomal protein S11 (Rps11), mRNA.
		RPS12	Ribosomal protein S12
		RPS13	Ribosomal protein S13
	X	RPS14	Ribosomal protein S14
	X	RPS15	ribosomal protein S15 (Rps15), mRNA.
	X	RPS15A	ribosomal protein S15A (Rps15a), mRNA.
	X	RPS16	Ribosomal protein S16
		RPS17	ribosomal protein S17 (Rps17), mRNA.
		RPS18	ribosomal protein S18 (Rps18), mRNA.
	X	RPS19	ribosomal protein S19 (Rps19), mRNA.
		RPS2	Ribosomal protein S2
	X	RPS20	Ribosomal protein S20

IRES	TOP	Gen	Beschreibung
	X	RPS21	ribosomal protein S21 (Rps21), mRNA.
	X	RPS24	ribosomal protein S24 (Rps24), transcript variant 1, mRNA.
	X	RPS25	ribosomal protein S25 (Rps25), mRNA.
	X	RPS26	ribosomal protein S26 (Rps26), mRNA.
		RPS27	Ribosomal protein S27
	X	RPS27A	ribosomal protein S27A (Rps27a), transcript variant 1, mRNA.
		RPS28	ribosomal protein S28 (Rps28), mRNA.
	X	RPS3	ribosomal protein S3 (Rps3), mRNA.
	X	RPS3A	ribosomal protein S3A (Rps3a), mRNA.
	X	RPS4X	ribosomal protein S4, X-linked (Rps4x), mRNA.
	X	RPS5	ribosomal protein S5 (Rps5), mRNA.
		RPS6	Ribosomal protein S6
		RPS7	Ribosomal protein S7
		RPS8	ribosomal protein S8 (Rps8), mRNA.
	X	RPS9	ribosomal protein S9 (Rps9), mRNA.
		RPSA	ribosomal protein SA (Rpsa), mRNA.
		SERP1	stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (Serp1), mRNA.
		SLC25A39	solute carrier family 25, member 39 (Slc25a39), mRNA.
		SLC25A5	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member 5
		SNRPD2	small nuclear ribonucleoprotein D2 (Snrpd2), mRNA.
		SUMO2	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2 (yeast) (Sumo2), mRNA.
		TAF9	TAF9 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor (Taf9), transcript variant 2, mRNA.
		TAGLN2	transgelin 2
		TMED2	transmembrane emp24 domain trafficking protein 2 (Tmed2), mRNA.
		TMEM147	transmembrane protein 147 (Tmem147), mRNA.
		TOMM6	Translocase of outer mitochondrial membrane 6 homolog (yeast)
		TPI1	Triosephosphate isomerase 1
	X	TPT1	tumor protein, translationally-controlled 1 (Tpt1), mRNA.
		TUBA1B	tubulin, alpha 1B (Tuba1b), mRNA.
		UBB	Ubiquitin B
		UBC	ubiquitin C (Ubc), mRNA.
		UBE2C	ubiquitin-conjugating enzyme E2C (Ube2c), mRNA.
		UBE2D3	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast) (Ube2d3), mRNA.
		UBE2I	ubiquitin-conjugating enzyme E2I (Ube2i), transcript variant 2, mRNA.
		UBE2L3	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3 (Ube2l3), mRNA.
		UBE2S	ubiquitin-conjugating enzyme E2S (Ube2s), mRNA.
		UBE2V1	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 (Ube2v1), mRNA.
X		YBX1	Y box protein 1
		YWHAQ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide (Ywhaq), mRNA.

A2: Pathologische Bewertung der immunhistochemischen Analyse intramedullärer MM-Fälle.

Fall-Nr.	% pos. Zellen MYC	Färbe- intensität	% pos. Zellen YB-1	Färbe- intensität	% pos. Zellen TCTP	Färbe- intensität
1	90	2-3	50	2	1	1
2	80	2-3	100	3	90	3
3	60	2	90	2-3	90	2
4	20	2	95	3	90	2
5	5	2-3	80	2-3	30-40	2
6	20	2-3	70	2	100	3
7	10	1-3	90	3	60	2-3
8	60	2-3	50	1-3	90	3
9	80	3	50	3	50-60	2-3
10	20	1-2	5	1	10	1
11	10	1	40	3	40	2
12	50	2	5	1	5	1
13	5	2	95	3	80	2-3
14	5	1-3	90	3	80	2
15	15	2	70	3	60	2
16	20	2	50	3	60	3
17	30	1-2	100	3	60	2-3
18	40	2	100	3	50	1
19	10	2-3	100	3	90	3
20	10	1-2	100	3	60-70	2

A3: Ergebnisse der WebGestalt-Annotationen Gene Ontology (GO)-Analyse.

Biologischer Prozess	# Gene
Biogenese der kleinen ribosomalen Untereinheit	10
Biosynthetischer Prozess	111
Genexpression	106
Makromolekularer biosynthetischer Prozess	102
Proteinmetabolischer Prozess	99
Translation	85
Translationale Elongation	78
Zellulärer biosynthetischer Prozess	111
Zellulärer makromolekularer biosynthetischer Prozess	102
Zellulärer proteinmetabolischer Prozess	99

Molekulare Funktion	# Gene
mRNA-Bindung	8
Nukleinsäurebindung	82
Proteinbindung	120
RNA-Bindung	61
rRNA-Bindung	11
Struktureller Bestandteil des Ribosomens	72
Strukturmolekül-Aktivität	78
Translationselongationfaktor-Aktivität	4
Translationsfaktor-Aktivität, Nukleinsäurebindung	10
Translationsinitiationsfaktor-Aktivität	6

Zellulärer Bestandteil	# Gene
Große ribosomale Untereinheit	35
Makromolekularer Komplex	117
Ribonukleoprotein-Komplex	88
Ribosomale Untereinheit	65
Ribosomen	77
Zytosol	99
Zytosolische große ribosomale Untereinheit	32
Zytosolische kleine ribosomale Untereinheit	30
Zytosolischer Bestandteil	62
Zytosolisches Ribosomen	63

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Veröffentlichungen und Vorträge

Kathryn S. Bommert*, Madlen Effenberger*, Ellen Leich, Maritta Küspert, Daniel Murphy, Christian Langer, Roland Moll, Sigfried Janz, Anja Mottok, Susann Weißbach, Andreas Rosenwald, Ralf Bargou und Kurt Bommert

The feed-forward loop between YB-1 and MYC is essential for multiple myeloma cell survival. Leukemia (2012), 1–10. (Accession Number 22772059)

* gleichberechtigte Erstautorenschaft

Madlen Effenberger, Valentin Bruttel, Ralf Bargou, Kurt Bommert

The relevance of phosphorylated YB-1 in Multiple Myeloma.

Jahrestagung der American Society of Hematology (2008), *Vortrag*

Madlen Effenberger, Ellen Leich, Ralf Bargou, Kurt Bommert

Functional analysis of cytoplasmic YB-1 in Multiple Myeloma: Translational control of anti-apoptotic proteins.

21. Treffen der European Association for Cancer Research (2010), *Posterpräsentation*

Madlen Effenberger, Ellen Leich, Andreas Rosenwald, Ralf Bargou, Kurt Bommert

Functional analysis of cytoplasmic YB-1 in Multiple Myeloma: Translational control of anti-apoptotic proteins.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (2010), *Posterpräsentation*

Danksagung

Viele Personen haben mich auf dem Weg bis zur Fertigstellung der Dissertation begleitet und mich hierbei direkt oder indirekt unterstützt.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Kurt Bommert und dem Leiter der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ralf Bargou, für die Überlassung des Promotionsthemas, die Betreuung der Arbeit und die wertvollen Hinweise, die sehr zur Vertiefung des Themas beigetragen haben.

Meiner Kollegin Dr. Kathryn Bommert sowie den guten Seelen im Labor Nina Königl und Jessica Kruk möchte ich für die kollegiale Arbeitsatmosphäre, die Motivierungsarbeit nach Misserfolgen, ihre Freundschaft und die fortwährende Unterstützung im Laboralltag danken.

Mein Dank gilt ebenso der restlichen Arbeitsgruppe und meinen Kooperationspartnern, ohne die das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Namentlich möchte ich hier insbesondere Dr. Ellen Leich erwähnen, die mich in die „Welt“ der Microarrays eingeführt hat und mit mir zusammen viele Stunden für die Auswertung und Interpretation der Daten investierte. Auch für deine mentale Unterstützung bin ich dir sehr dankbar. Ich danke außerdem Maritta Küspert für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Großeltern gilt die Dankbarkeit, die keiner weiteren Worte bedarf.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Funktionelle Charakterisierung von YB-1 im Zytoplasma des Multiplen Myeloms“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Ort, Datum

Unterschrift