
Pharmakologische und genetische Inaktivierung
des Kälteschockproteins YB-1
in der akuten myeloischen Leukämie

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

Von: cand. med. Maximilian Hartmann

Geboren am 07.01.1996 in Lichtenfels

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. Florian H. Heidel

Klinik und Poliklinik für Innere Medizin C, Hämatologie und Onkologie –
Transplantationszentrum, Palliativmedizin
Universitätsmedizin Greifswald

2. Herr Prof. Dr. Peter R. Mertens

Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten, Diabetologie und Endokrinologie
Universitätsklinikum Magdeburg

3. Herr Prof. Dr. Frank-D. Böhmer

Institut für molekulare Zellbiologie, Zentrum für molekulare Biomedizin (CMB)
Universitätsklinikum Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 18.11.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	5
2	Zusammenfassung	7
3	Einleitung	8
3.1	Regulation der Hämatopoese und Entstehung hämatopoetischer Neoplasien.....	8
3.1.1	Die Hämatopoese und ihre Regulation.....	8
3.1.2	Die Leukämogenese	10
3.2	Die akute myeloische Leukämie.....	11
3.3	Die Familie der Kälteschockproteine	13
3.4	Das Kälteschockprotein YB-1	13
3.4.1	Strukturelle Merkmale von YB-1	14
3.4.2	Regulation der Expression von YB-1.....	14
3.4.3	Biologische Funktionen und onkogenes Potential von YB-1	15
3.4.4	Phytopharmaka zur Beeinflussung von YB-1 via RSK	17
4	Fragestellung und Ziele der Arbeit	19
5	Material und Methoden	20
5.1	Material.....	20
5.1.1	Zelllinien	20
5.1.2	Inhibitoren	20
5.1.3	Antikörper	21
5.1.4	Chemikalien und Lösungen.....	22
5.1.5	Geräte	24
5.1.6	Sonstiges verwendetes Material	24
5.1.7	Software	25
5.1.8	Lösungen und Puffer	26
5.2	Methoden	29
5.2.1	Zellkultur	29

5.2.2	Biochemie und Durchflusszytometrie	31
5.2.3	Statistische Analysen.....	38
6	Ergebnisse	39
6.1	Genexpression von YB-1 in akuter myeloischer Leukämie	39
6.2	Charakterisierung von YB-1 als essenzielles Protein in humanen AML-Zellen.....	40
6.3	Evaluation der Flavonoide Fisetin und Luteolin in AML-Zellen.....	44
6.4	Vergleich von genetischer und pharmakologischer Inhibition von YB-1	49
7	Diskussion	53
7.1	YB-1 als essenzielles Protein in der akuten myeloischen Leukämie	53
7.2	Fisetin und Luteolin hemmen Proliferation und induzieren Apoptose in einigen AML-Zelllinien.....	55
7.3	Mögliches Modell zur Regulation von YB-1 und die Wirkungsweise von Fisetin und Luteolin.....	59
7.4	<i>In vivo</i> Experimente und Ausblick	60
8	Schlussfolgerung	62
9	Literaturverzeichnis	63
10	Anhang	78
10.1	Abbildungsverzeichnis	78
10.2	Tabellenverzeichnis	80
10.3	Lebenslauf	81
10.4	Ehrenwörtliche Erklärung.....	83
10.5	Danksagung	84

1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AML	Akute myeloische Leukämie
CARHSP1	„calcium-regulated heat-stable protein 1“
CDK	„cyclin-dependent kinase“ (Cyklin-abhängige Kinase)
CDKi	„cycline-dependent kinase inhibitor“
CK	„complex caryotype“ (Komplexer Karyotyp)
CML	Chronische myeloische Leukämie
CRS	„cytoplasmic retention side“
CSD	„cold-shock domain“
CSDA / E	„cold-shock domain protein A / E“
CSP	„cold shock protein“ (Kälteschockprotein)
CTD	C-terminale Domäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„desoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
ECL	„enhanced chemoluminescence“ - Substrat für Western Blot
ERK1/2	„extracellular signal-regulated kinases 1/2“
FACS	„fluorescence activated cell sorting“ (Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung)
FBS	„fetal bovine serum“ (Fetales Kälberserum)
FBX33	F-Box Protein 33
FLT-3	„fms-like tyrosine kinase 3“
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	„granulocyte macrophage colony-stimulating factor“
HRP	„horseradish peroxidase“ (Meerrettichperoxidase)
HSC	„hematopoietic stem cell“ (hämatopoetische Stammzellen)
HSPC	„hematopoietic stem- and progenitor cells“ (hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen)
JAK	Janus Kinase
KD	„knockdown“
KO	„knockout“
LIN28A/B	„abnormal cell lineage protein 28 A/B“
LSC	„leukemic stem cell“ (Leukämie-Stammzelle)

LT-LSC	„long-term leukemic stem cells“ (lang-lebende leukämische Stammzelle)
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“ (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
MDR	„multi drug resistance“
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEK	MAPK/ERK Kinase
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
MRD	„minimal residual disease“ (Minimale Resterkrankung)
mRNA	„messenger RNA“
mRNP	„messenger Ribonukleoprotein“
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NLS	„nuclear location signal“ (Nukleäres Lokalisationssignal)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PMN	„polymorphonuclear leucozytes“
Raf	„rapidly accelerated fibrosarcoma“
Ras	„rat sarcoma“
RISC	„RNA-induced silencing complex“
RNA	„ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)
RSK	p90-ribosomale S6-Kinase
SDS	„sodium dodecyl sulfate“ (Natriumdodecylsulfat)
shRNA	„small hairpin RNA“
siRNA	„small interfering RNA“
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SRC	„self-renewal capacity“ (Selbsterneuerungskapazität)
STAT	„signal transducer and activator of transcription“
ST-LSC	„short-term leukemic stem cell“ (kurz-lebende leukämische Stammzelle)
TBST	„Tris-buffered saline with Tween20“
VEGF	„vascular endothelial growth factor“
YB-1 / 2 / 3	„Y-box-binding Protein 1 / 2 / 3“

2 Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne hämatologische Erkrankung, ausgelöst durch spezifische genetische Alterationen. Auf zellulärer Ebene kommt es zu einer gesteigerten Zellteilungsrate (Proliferation), verminderter Induktion von programmiertem Zelltod (Apoptose) und einer Blockade der hämatopoetischen Differenzierung von Stamm- und Progenitorzellen (HSPC). Diese pathologischen Veränderungen im blutbildenden System führen in den malignen Zellen zu genetischem und metabolischem Stress. Die Fähigkeit von Leukämie-Zellen mit diesen Stress-Faktoren umzugehen, um die unkontrollierte Proliferation aufrechtzuerhalten, ist entscheidend für die Progression der Erkrankung.

YB-1, ein Mitglied der evolutionär hochkonservierten Familie der Kälteschockproteine mit zentralen Funktionen in der Embryonalentwicklung, ist an der Stressadaptation in inflammatorischen und neoplastischen Systemen beteiligt. Es agiert sowohl nukleär als Transkriptionsfaktor als auch zytosolisch durch die Modifikation des mRNA-Metabolismus und der Translation. Eine erhöhte Expression von YB-1 ist mit einer erhöhten Aggressivität und schlechterer Prognose von Tumor-Erkrankungen assoziiert.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Funktion von YB-1 in der akuten myeloischen Leukämie. Unter Verwendung einer spezifischen genetischen Inaktivierung mittels RNA-Interferenz konnte YB-1 als essenzielles Protein in der AML etabliert werden. Darüber hinaus wurde die Effektivität und Spezifität zweier Pharmaka untersucht, die als potenzielle Inhibitoren von YB-1 beschrieben sind.

Das Kälteschockprotein YB-1 wies in allen genotypischen Subtypen der akuten myeloischen Leukämie eine erhöhte Gen-Expression im Vergleich zu normalen hämatopoetischen Zellen auf. Eine gezielte Reduktion des YB-1 Protein-Levels mittels „small hairpin RNA“ (shRNA)-vermitteltem „knockdown“ (KD) führte zu einer drastischen Reduktion der Proliferation in einer Mehrheit der untersuchten AML-Zelllinien. Darüber hinaus wurde in einigen dieser Modell-Systeme Zelltod induziert. Zur Validierung potenzieller Inhibitoren von YB-1 wurden die beiden Phytopharmaka Luteolin und Fisetin verwendet, welche die Phosphorylierung von YB-1 am Serin 102 hemmen sollen. Die beiden Substanzen zeigten jedoch lediglich in drei von zehn Zelllinien einen proliferationshemmenden Effekt, der in keinem klaren Zusammenhang mit dem Sensitivitäts-Profil nach genetischer Inaktivierung stand.

In der Zusammenschau der Daten dieser Arbeit wird geschlussfolgert, dass YB-1 – ähnlich wie in diversen soliden Tumor-Erkrankungen – ein attraktives Ziel-Molekül in humanen Zell-Modellen der AML ist. Aktuell verfügbare indirekte Inhibitoren von YB-1 zeigen jedoch eine unbefriedigende Spezifität und Wirksamkeit.

3 Einleitung

3.1 Regulation der Hämatopoese und Entstehung hämatopoetischer Neoplasien

Die Hämatopoese, von griechisch „haimatos“ – Blut, „poiesis“ – Herstellung, dient der Bildung der zellulären Bestandteile des Blutes. Ausgehend von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) reifen pro Tag mehr als 100 Milliarden Zellen in der Erythropoese, Myelopoese und Thrombozytopoese (Zibert und Schmidt 2016). Der Anteil der HSCs an den gesamten mononukleären Zellen des Knochenmarks beträgt 0,01 - 0,2 % (Riether et al. 2014). Daher ist eine streng kontrollierte Balance zwischen Differenzierung und Selbsterneuerung („self-renewal“) der HSCs essentiell, um die zelluläre Homöostase im Blut aufrechtzuerhalten (Qiu et al. 2014).

3.1.1 Die Hämatopoese und ihre Regulation

An der Regulation der Aktivität von HSCs sind eine Vielzahl von zell-extrinsischen Faktoren, wie Zytokine und Wachstumsfaktoren, beteiligt. Aktuelle Studien postulieren eine spezifische Stammzellnische im komplexen multizellulären System des Knochenmarkes. Dort interagieren Knochenstroma- und Immunzellen mit HSCs und Vorläuferzellen (Pinho und Frenette 2019, Boulais und Frenette 2015, Lee et al. 2019). Darüber hinaus sind zell-intrinsische Faktoren wie Signalkaskaden, Transkriptionsfaktoren sowie epigenetische und metabolische Vorgänge an der Modulation der Hämatopoese beteiligt (Attar und Scadden 2004). Die Signal-Netzwerke von intrinsischen und extrinsischen Faktoren sind stark miteinander assoziiert und können daher funktionell nicht getrennt betrachtet werden. Die meisten Signalmoleküle binden an einen Rezeptor auf der Zellmembran und aktivieren über diesen zelluläre Signalkaskaden (Abbildung 1). Eine wichtige Rolle in der myeloischen Differenzierung sowie dem Zellüberleben kommt dem JAK-STAT-Signaltransduktionsweg zu. Nach Aktivierung der Janus-Kinasen (JAK) durch Bindung eines Liganden an Zytokin- oder Wachstumsfaktor-Rezeptoren kommt es zur JAK-abhängigen Phosphorylierung von STATs („signal transducer and activator of transcription“). Dadurch dimerisieren die STAT-Monomere und es findet eine Translokation in den Nukleus zur Aktivierung der Transkription relevanter Ziel-Gene statt (Dorritie et al. 2013, Perner et al. 2019). Weiterhin kommt es vermittelt durch Zytokine und Wachstumsfaktoren zur Aktivierung des Ras / Raf / MEK / ERK-Signalwegs. Das durch eine GTP-Bindung aktivierte Ras bindet an Raf, welches wiederum durch Phosphorylierung MEK aktiviert. Dieses bindet und aktiviert damit ERK1/2 („extracellular signal-regulated kinases 1/2“) , was dimerisiert, in

den Nukleus transloziert und dort die Gen-Expression wichtiger Mediatoren von Zellteilung und Apoptose reguliert (Chan et al. 2013). Durch Mutationen in Genen, die für Proteine dieser Signalwege kodieren, kann die Signal-Homöostase der Zelle gestört werden und die Entstehung von Neoplasien durch unkontrollierte Proliferation und verminderte Apoptoserate gefördert werden. Mögliche Mutationen, die eine konstitutive Aktivierung dieser Signalwege bedingen, sind in Abbildung 1 ebenfalls dargestellt. *FLT-3*, *BRAF*, *RAF1*, *MYC* und *TEL / JAK* gelten als bekannte Onkogene in der akuten myeloischen Leukämie und aktivieren den ERK1/2 bzw. JAK-STAT Signalweg. BCR-ABL als ursächliches Fusionsprotein in einer chronisch myeloischen Leukämie (CML) aktiviert beide Signalkaskaden (Schäfer 2016, Steelman et al. 2008, Roberts et al. 2012, Vainchenker und Constantinescu 2013).

Zusammen ermöglichen diese Prozesse optimale Bedingungen zum Wachstum der Zellen unter physiologischen Umständen, speziell ermöglichen sie eine Adaptation der Hämatopoese bei Infektionen oder Blutungen. Im Gegensatz zu Progenitorzellen, die eine hohe Proliferationsrate aufweisen, befinden sich HSC in einer Ruhephase, der sogenannten „Quiescence“ (Laurenti et al.

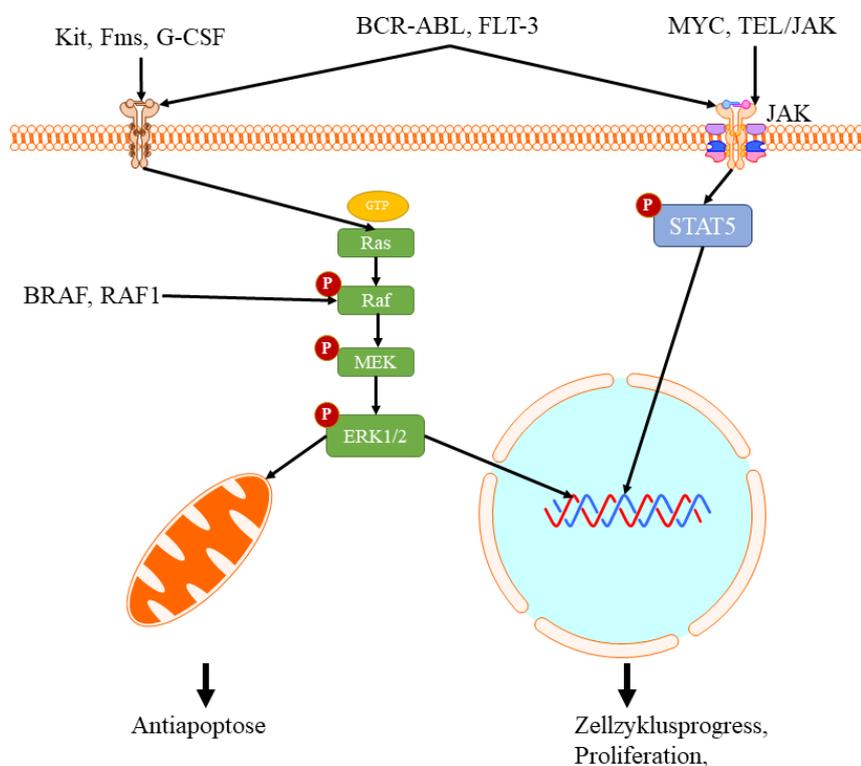


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Ras / Raf / MEK / ERK- und JAK / STAT-Signalweges und deren onkogene Aktivierung

2015), in der sie den normalen Zellzyklus verlassen und in der G₀-Phase des Zellzyklus arretieren. Durch die Vermeidung von stetiger Zellteilung ist das Risiko somatischer Mutationen reduziert und somit die genetische Integrität der Stammzellen geschützt (Lajtha 1963, Pietras et al. 2011). Bei einem erhöhten Bedarf von differenzierte Zellen, wie beispielsweise Erythrozyten bei einer relevanten Blutung, verlassen die HSCs jenen Ruhezustand, proliferieren und differenzieren zu neuen Vorläuferzellen (Trumpp et al. 2010, Bradford et al. 1997, Uchida et al. 2003, Wilson et al. 2008). Zur Aufrechterhaltung einer suffizienten Hämatopoese befinden sich Differenzierung und Selbsterneuerung in einem streng

kontrollierten Gleichgewicht (Riether et al. 2014). Ein Versagen jener Kontrolle kann folglich zur Entstehung neoplastischer Erkrankungen führen (Renneville et al. 2008).

3.1.2 Die Leukämogenese

Während des Alterns akkumulieren somatische Mutationen in HSCs, die zur Entstehung verschiedener nebeneinander existierender Stammzell-Klone führen. Im Rahmen dieser klonalen Hämatopoese kommt es im Laufe der Zeit zur Expansion von Klonen mit einem kompetitiven Vorteil gegenüber normalen Zellen. Auf Grundlage dieser Veränderungen entwickeln sich präleukämische Erkrankungen wie das myelodysplastische Syndrom (MDS) oder myeloproliferative Neoplasien (MPN) (Perner et al. 2019). Präleukämische Stamm- und Progenitorzellen (HSPC) gelten durch hochpotente Onkogene wie *NPM1*, *MLL*-Fusionsgene, *FLT3-ITD* oder *Ras*-Mutationen als Basis der malignen Transformation. Aus den HSPC werden durch diese sog. „driver“-Mutationen leukämische Stammzellen (LSC) und es entwickelt sich eine akute Leukämie (Abelson et al. 2018, Krivtsov et al. 2006). Vergleicht man LSC mit HSC erkennt man Unterschiede insbesondere hinsichtlich externer Regulationsmechanismen: LSCs gewinnen durch genetische Veränderungen Resistenzmechanismen und können dadurch u. a. apoptoseinduzierenden sowie proliferationshemmenden Kaskaden entkommen (Zhang et al. 2019, Li et al. 2016). Sie weisen jedoch auch Gemeinsamkeiten auf: immunophänotypisch sind sie $CD34^+CD38^-$, beide sind in der Lage zur Selbsterneuerung und zur Kontrolle des Stammzellpools und sie sind „quiescent“ (Pollyea et al. 2014). Dies ist entscheidend für die Therapie von Leukämien. Weil die meisten Chemotherapeutika insbesondere hoch teilungsaktive Zellen angreifen, überleben „quiescente“ LSCs vielfach die zytostatische Therapie und sind damit ursächlich für ein Rezidiv und die schlechte Prognose der akuten Leukämie (Holyoake und Vetrie 2017, Shlush et al. 2017). Aufgrund dessen sind Behandlungsstrategien notwendig, die unabhängig von der Zellteilungsrate zu einer Eradikation der malignen Zellen führen bzw. im Anschluss an eine Chemotherapie die Reexpansion der verbliebenen LSCs verhindern. Hierbei sind zielgerichtete Therapien, die evolutionär konservierte Stress-Mediatoren, epigenetische Regulatoren oder metabolische Schlüsselproteine adressieren, von besonderem Interesse.

3.2 Die akute myeloische Leukämie

Etymologisch bedeutet Leukämie „weißes Blut“, was sich historisch auf die verbreiterte weiße Leukozytenfraktion im zentrifugierten Blut bezieht. Durch die unkontrollierte Proliferation hämatopoetischer Progenitorzellen kommt es zur Expansion von malignen myeloischen oder lymphatischen Zellen. In Folge dessen wird die normale Hämatopoese durch die Akkumulation dieser unreifen Zellen verdrängt, sodass es zur Ausbildung von Zytopenien der drei Zellreihen kommt (Schulz 2016, Röllig et al. 2018).

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne klonale Neoplasie hämatopoetischer Zellen der Myelopoese, die durch eine Differenzierungsblockade von Vorläuferzellen, Ausschwemmung unreifer Zellen (Blasten) ins Blut sowie deren Infiltration extramedullärer Organe wie Lunge, Leber, Milz und Lymphknoten charakterisiert ist (Barabé et al. 2007, Döhner et al. 2015). Die Prävalenz der AML liegt in der BRD bei 3,7 Erkrankungen / 100.000 Einwohner, wobei diese mit zunehmendem Alter überproportional ansteigt, bei >70-jährigen Patienten / -innen >100 Fälle / 100.000 Einwohner (Röllig et al. 2018). Neben der typischen B-Symptomatik (Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß) treten die Symptome einer Panzytopenie auf: Müdigkeit und Blässe durch eine Anämie, die mit einer Neutropenie assoziierte Infektanfälligkeit sowie eine erhöhte Blutungsneigung bei einer Thrombozytopenie (Röllig et al. 2018, Schulz 2016). Die Diagnose wird durch eine Knochenmarkszytologie und / oder -histologie gesichert, in der mehr als 20 % Blasten befundet werden können (Döhner et al. 2017).

Pathophysiologisch entwickelt sich eine akute Leukämie durch die Anhäufung genomischer Mutationen (Renneville et al. 2008). Eine ältere Theorie beschreibt ein 2-Stufen-Modell. Nach diesem gibt es zwei Klassen von Mutationen: Klasse-I beschreibt Mutationen, die durch die Aktivierung von Kinasen und Onkogenen bzw. Inaktivierung mancher Tumorsuppressorgene zur Dysregulation der Proliferation und Apoptose führen. Dazu gehören z. B. *FLT3-ITD*-, *N-Ras*-, *c-Kit*-Mutation oder das *BCR-ABL*-Fusionsgen. Daneben führen Klasse-II-Mutationen wie *MLL1*- und *RUNX1*-Fusionsgene oder *NPM1*-Mutationen zur Steigerung der „self-renewal-capacity“ und Blockierung der Differenzierung. Beide Mutationsklassen zusammen bzw. alleinige Klasse-II-Mutationen führen zur Entwicklung einer akuten Leukämie, wohingegen das ausschließliche Vorliegen einer Klasse-I-Mutation lediglich einen myeloproliferativen Phänotyp bedingt (Kitamura et al. 2016, Gilliland und Griffin 2002, Carubaccia et al. 2009). Dieses Modell wurde in den letzten Jahren um Kategorien ergänzt: so gibt es auch Mutationen mit Auswirkungen auf die Epigenetik, Splicing, Signaltransduktion und Adhäsionsmoleküle,

wobei einzelne Mutationen nicht mehr streng einer Klasse zugeordnet werden können (Rocquain et al. 2010, Thiede 2012). Die Konsequenzen hinsichtlich der biologischen Aktivität sind neben der Induktion der Proliferation, der Hemmung der Apoptose und der Blockierung der Differenzierung auch die Anpassung der Zelle an mögliche Stressoren (Kitamura et al. 2014, Illmer et al. 2004, van der Kolk et al. 2002).

Man unterscheidet zwei Hauptgruppen: die AML mit normalem Karyotyp (48 %) mit lediglich molekulargenetischen Veränderungen und die AML mit chromosomalen Aberrationen (52 %) (Yin et al. 2010, Arber et al. 2016). Durch die genaue Analyse der genetischen Veränderungen lassen sich neue zielgerichtete therapeutische Optionen, sog. „targeted therapies“, entwickeln. Einige dieser Therapeutika, z. B. Midostaurin bei AML mit *FLT3-ITD*, sind inzwischen in Deutschland zugelassen (Montalban-Bravo und Garcia-Manero 2014). Anhand der chromosomalen Anomalien lassen sich aber auch prognostische Gruppen mit Hilfe der ELN-Klassifikation einteilen (Papaemmanuil et al. 2016).

Im Allgemeinen wird die AML mittels intensiver Chemotherapie behandelt (Induktionstherapie). Insgesamt wird hier bei 60-80 % der Patienten eine komplette Remission, die durch einen Blastenanteil in Blut und Knochenmark <5 % gekennzeichnet ist, erreicht. Um das Ansprechen zu konsolidieren, wird eine anschließende Fortführung der Chemotherapie (Konsolidierungs-Chemotherapie) und / oder eine Konsolidierung mittels allogener Stammzelltransplantation (als Immuntherapie) eingesetzt. Zur Induktionstherapie nutzt man Cytarabin und ein Anthrazyklin (Daunorubicin, Idarubicin, Mitoxantron) (Buchner et al. 2003). Die anschließende Konsolidierungstherapie und Erhaltungstherapie richtet sich nach dem genetischen Risiko der Erkrankung (Döhner et al. 2015). Eine Heilung der Erkrankung ist jedoch nur in 30-40 % der Fälle möglich (Röllig et al. 2011, Krug et al. 2016). Die Therapie ist mit Komplikationen wie Thrombozytopenie, Neutropenie, kardialer Pumpschwäche und Niereninsuffizienz assoziiert und kann dementsprechend letal verlaufen (Atallah et al. 2007, Kahl et al. 2016). Ursächlich für ein Rezidiv sind persistierende LSCs, die im Zuge der Chemotherapie nicht eliminiert wurden (Heidel et al. 2015, Shlush et al. 2017). Die Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD, „minimal residual disease“), den Anteil an leukämischen Zellen nach stattgefundener Behandlung, erlaubt die Einschätzung einer Remission bzw. eines drohenden Rezidivs (Döhner et al. 2017, Ivey et al. 2016). Zu einem Rezidiv kommt es insbesondere bei Hochrisikopatienten mit komplexen genetischen Aberrationen, hohem Alter oder schlechtem Ansprechen auf die Induktionstherapie (Döhner et al. 2017). Daher ist die Entwicklung gezielter Therapien Gegenstand aktueller Forschung, die sich auf die Identifikation spezifischer Proteine oder Signaltransduktionswege fokussiert.

3.3 Die Familie der Kälteschockproteine

Kälteschockproteine („cold shock proteins“, CSP) stellen eine evolutionär hochkonservierte Proteinfamilie mit 8 Mitgliedern (YB-1, YB-2, YB-3, CARHSP1, CSDE1, CSDC2, LIN28A, LIN28B) dar (Keto-Timonen et al. 2016). Initial wurden sie in Bakterien als Reaktion auf Temperaturabfall zur Stabilisierung von RNA beschrieben (Jones und Inouye 1994, Jones et al. 1987). Mittels ihrer Kälteschockdomäne („cold-shock domain“; CSD) sind sie in der Lage RNA und DNA zu binden. Deshalb sind sie auch an der Regulation der Transkription, dem Splicing, der Translation und damit der Expression von diversen Proteinen beteiligt, die zur Stressadaptation beitragen, indem sie beispielsweise mRNA stabilisieren, zelluläre Prozesse reprogrammieren oder Signalkaskaden beeinflussen. Veränderungen der Expression von humanen CSPs sind assoziiert mit Erkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematoses (SLE), Nephropathien, neurodegenerativen Erkrankungen und Neoplasien (Lindquist und Mertens 2018).

Die Y-box bindenden Proteine, deren Gene auf Chromosom 1p34.2, 17p13.1 bzw. 12p13.1 liegen, sind für humane Stressantworten essenziell (Lyabin et al. 2014). Während YB-1 und YB-3 in allen menschlichen Zellen vorkommen, reguliert YB-2 die mRNA-Stabilität lediglich in Keimzellen. YB-3 beteiligt sich an der Steuerung von Wachstumsfaktoren während der embryonalen Entwicklung, wohingegen YB-1 an Mechanismen des Zellüberlebens und der Zellteilung beteiligt ist (Suresh et al. 2018). Generell muss jedoch gesagt werden, dass die exakte Funktion der Kälteschockproteine im menschlichen Organismus bisher nur lückenhaft verstanden ist.

3.4 Das Kälteschockprotein YB-1

YB-1 liegt in der Zelle meist paranukleär vor und dient als Interaktionspartner zur Adaptation der Zelle an Stressoren. Es ist ein 324 Aminosäure langes und ca. 35,9 kDa schweres Protein. Es interagiert mit DNA und stabilisiert außerdem freie mRNA, steuert Polysomen-Formation und kann sezerniert werden. Dadurch ist es an vielen Prozessen wie der DNA-Replikation, DNA-Reparation, Transkription, mRNA-Packing, Splicing und der Regulation der mRNA-Stabilisierung und Translation beteiligt (Lasham et al. 2013). Im Zuge dessen beeinflusst YB-1 die Zellproliferation, Differenzierung, Stressantwort sowie die maligne Transformation. Außerdem ist es in der Lage, mit anderen Proteinen oder sich selbst zu interagieren (Eliseeva et al. 2011).

3.4.1 Strukturelle Merkmale von YB-1

YB-1 besteht aus drei verschiedenen Protein-Domänen, wobei die „cold-shock domain“ (CSD) evolutionär konserviert ist, während die C- und N-terminale Domäne variabel ist (Abbildung 2).

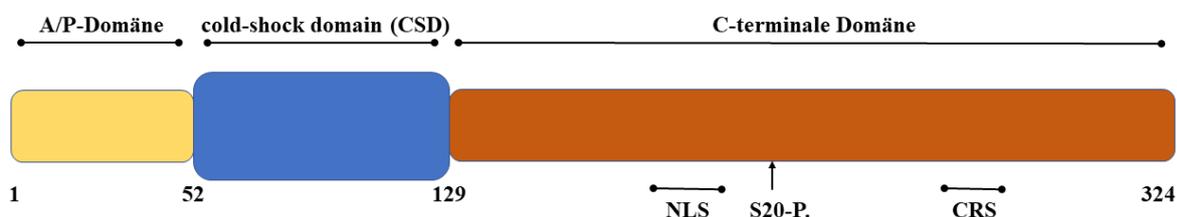


Abbildung 2: Struktur des „Y-box binding Protein 1“ (YB-1) modifiziert nach Lyabin et al. 2014

Am N-terminalen Ende befindet sich die Alanin-Prolin-reiche- (A/P-) Domäne (AS 1 – 51), die an der Interaktion von YB-1 mit Regulationsproteinen des Zellzyklus wie Cyclin D1 oder p53 beteiligt ist (Lyabin et al. 2014). Dem schließt sich die durch RPN-1- und RPN-2-Sequenz mit RNA oder DNA interagierende CSD (AS 52 – 128) an (Kloks et al. 2002). Die am C-terminalen Ende gelegene „long-c-terminal-domain“ (CTD, 129 - 324) dient der Bildung von Homomultimeren oder Komplexen mit anderen Proteinen, die zusammen ein Gewicht von bis zu 800-1000 kDa aufweisen (Eliseeva et al. 2011). Gemeinsam mit der A/P-Domäne stabilisiert sie die RNA- und DNA-Bindung durch die CSD, außerdem kann die CTD selbst mit RNA-Strängen interagieren. Darüber hinaus liegen in diesem Abschnitt die Position der „nuclear location signal“ (NLS), die „cytoplasmic retention side“ (CRS) sowie eine Schnittstelle für das 20S-Proteasom. Normalerweise überwiegt die Aktivierung der CRS und sorgt damit für die zytoplasmatische perinukleäre Lokalisation von YB-1 (Eliseeva et al. 2011). Wird YB-1 phosphoryliert, ändert sich die Konformation und damit überwiegt der Einfluss des NLS, wodurch es zur Translokation in den Nukleus kommt. Eine verkürzte Form des YB-1, durch das 20S-Proteasom prozessiert, verliert die CRS. Dies bedingt durch die NLS eine dauerhafte nukleäre Lokalisation von YB-1 (Prabhu et al. 2015, Eliseeva et al. 2011).

3.4.2 Regulation der Expression von YB-1

Die Regulation der Expression von YB-1 ist nicht vollständig geklärt. Gewisse Triggerfaktoren wie GATA- und TWIST-Transkriptionsfaktoren, Xenobiotika und Proliferationsstimuli fördern die Transkription (Norozi et al. 2016, Yokoyama et al. 2003, Shiota et al. 2008). DNA-Schäden führen zur Prozessierung von YB-1 durch 20S-Proteasomen und damit zur

Translokation in den Nukleus (Eliseeva et al. 2011). Zellphysiologische Vorgänge einer kontrollierten Apoptose und reduzierter Proliferation bzw. Zellzyklusarrest hingegen fördern die proteolytische Spaltung von YB-1 durch 26S-Proteasomen nach Ubiquitylierung durch die E3-Ligasen FBX33 oder RBBP6 (Lutz et al. 2006, Chibi et al. 2008). Die Sekretion von YB-1 ist abhängig von der Acetylierung an Lys301 oder Lys304 (Eliseeva et al. 2011).

Da YB-1 sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus vielfältig wirkt, sind mehrere Regulationsmechanismen der Translokation bekannt. Wie bereits beschrieben liegt YB-1 durch seine CRS primär paranukleär vor, nach Prozessierung durch das 20S-Proteasom - beispielsweise bei DNA-Schaden - gelangt es durch die NLS in den Zellkern (Lyabin et al. 2014). Aber auch nach der Interaktion mit anderen Proteinen wie p53 oder nach Modifikation durch Kinasen wie AKT oder RSK im Zuge einer Zytokin- bzw. Wachstumshormonreaktion transloziert YB-1 in den Nukleus (Gieseler-Halbach et al. 2016, Maier et al. 2019, Prabhu et al. 2015, Tiwari et al. 2018).

Relativ gut verstanden ist die Phosphorylierung an Serin 102 innerhalb der CSD (Abbildung 3). Diese Phosphorylierung erfolgt primär abhängig vom PI3K / AKT und dem MAPK / ERK-Signalwegen als Konsequenz externer Stimuli (Maier et al. 2019). Die dadurch ausgelöste Phosphorylierung von YB-1 an S102 via der p90-ribosomalen S6-Kinase (RSK) bedingt die Translokation des CSP in den Nukleus, wo es mutmaßlich die Transkription und Genexpression beeinflusst (Wilson et al. 2008).

3.4.3 Biologische Funktionen und onkogenes Potential von YB-1

Das CSP YB-1 ist an der Modifikation zellphysiologischer Vorgänge beteiligt. Während eine erhöhte Expression von YB-1 mit einer gesteigerten Proliferation assoziiert ist, sind niedrige YB-1-Level in Zellen mit geringer Teilungsaktivität nachweisbar. Dies ist auf die Wechselwirkung von YB-1 mit Signalwegen zurückzuführen, die u. a. die Transkription von *p16* bzw. *p21* inhibieren (Kotake et al. 2013, Basaki et al. 2010). Diese Tumorsuppressor-Gene sind an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Am Übergang von der G₁- in die Synthese-(S)-Phase existiert ein Kontrollpunkt („Checkpoint“) im Zellzyklus, an dem defekte Zellen an der weiteren Zellteilung gehindert werden. Durch die Inhibition von „cyclin-dependent kinases“ (CDK) / Cyclin-Komplexen durch p16 und p21 arretieren diese Zellen vor dem G₁-Kontrollpunkt des Zellzyklus und reduzieren damit die Teilungsaktivität (Basaki et al. 2010, Terzi et al. 2016). Ein weiterer Prozess, an dem YB-1 mitwirkt, ist die Apoptose. Insbesondere ist YB-1 an der Regulation der Expression des Tumorsuppressorgens *TP53* sowie dessen Produkt p53 und an der Beeinflussung der Transkription proapoptotischer Zielgene des p53 wie

APAF1, *NOXA* und *BAX* beteiligt (Eliseeva et al. 2011). Der Transkriptionsfaktor p53 wird physiologischerweise am Ende der G₂-Phase bei DNA-Schäden im Verlauf des ATM-Signalweges aktiviert. Als Wächter des Genoms liegt p53 normalerweise gebunden an MDM2 vor. Nach dessen Phosphorylierung dissoziiert p53, arretiert den Zellzyklus durch Aktivierung von CDK-Inhibitoren wie p21 und rekrutiert proapoptische Proteine der Bcl-2-Familie wie Puma oder Noxa (Aubrey et al. 2017). Durch eine YB-1-vermittelte verminderte Expression von p53 werden die proapoptischen Vorgänge reduziert sowie die Transkription von p21 gehemmt (Eliseeva et al. 2011). Agierend als Stressprotein wirkt YB-1 sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch. Im Zellkern kann YB-1 beispielsweise nach der Behandlung mit Xenobiotika oder bei DNA-Schäden durch UV-Strahlung die Transkription von Genen modulieren, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind. So sind embryonale Zellen einer heterozygoten *YB-1*^{-/+} Maus anfälliger für die DNA-schädigenden Substanzen Cisplatin und Mitomycin-C (Tiwari et al. 2018). Außerdem beeinflusst YB-1 Gene zum Schutz der Zelle vor Stressoren wie Pharmaka u. a. durch Interaktion mit „*multi drug resistance*“ (*MDR*)-Gene zur Exprimierung von MDR1-Kanälen, die jene aus den Zellen wieder ausschleusen können (Eliseeva et al. 2011, Li et al. 2018). Zytoplasmatisch stabilisiert YB-1 onkogene mRNAs, wenn die Translation durch Hypoxie reduziert ist (Goodarzi et al. 2015). Darüber hinaus ist es an der Modifikation translationaler Prozesse beteiligt (El-Naggar et al. 2015). Exkretorisch kann YB-1 als Wachstumsfaktor wirken und ist dabei mit mesangioproliferativen Erkrankungen assoziiert (Eliseeva et al. 2011).

Viele der oben genannten Funktionen legen ein mögliches onkogenes Potential von YB-1 nahe, was bereits in verschiedenen soliden Tumoren suggeriert wird. Darüber hinaus wird diskutiert, ob die Expression von YB-1 als diagnostischer Marker zur Einschätzung der Aggressivität und möglicher Resistenzen dienen kann (Kosnopfel et al. 2014). Außerdem sollen hohe YB-1-Level durch eine fehlerhafte Aktin- bzw. Zentromerfunktion, eine fehlerhafte Mitose und die damit einhergehenden chromosomalen Anomalien zur malignen Transformation beitragen (Davies et al. 2011). In manchen soliden Tumoren wird eine Mitwirkung von YB-1 an der Neovaskularisierung und Metastasierung aufgezeigt. So ist eine erhöhte Expression dieses Proteins mit einer schlechten Prognose in Brust-, Ovarial-, Prostata-, Lungen-, Lebertumoren, dem Multiplen Myelom und B-Zell Lymphomen assoziiert (Kariminia et al. 2017, Shiraiwa et al. 2016, El-Naggar et al. 2015, Khan et al. 2014, Yassen et al. 2005, Bergmann et al. 2005, Shibahara et al. 2001, Gimenez-Bonafe et al. 2004).

3.4.4 Phytopharmaka zur Beeinflussung von YB-1 via RSK

Zwei beschriebene Wirkstoffe zur Inhibition der Phosphorylierung und Translokation von YB-1 sind die Flavonoide Fisetin und Luteolin. Beides sind Pflanzenfarbstoffe mit einem antiproliferativen und proapoptotischen Effekt, der bereits in einigen soliden Tumoren wie Brust- und Prostatakrebs nachgewiesen wurde (Haddad et al. 2006, Reipas et al. 2013). Während Luteolin die RSK hemmt, interagiert Fisetin vermutlich mit dem CSP selbst. Beide Phytopharmaka verhindern dadurch die Phosphorylierung an Serin 102 und damit die Translokation von YB-1 in den Nukleus (Abbildung 3) (Sun et al.

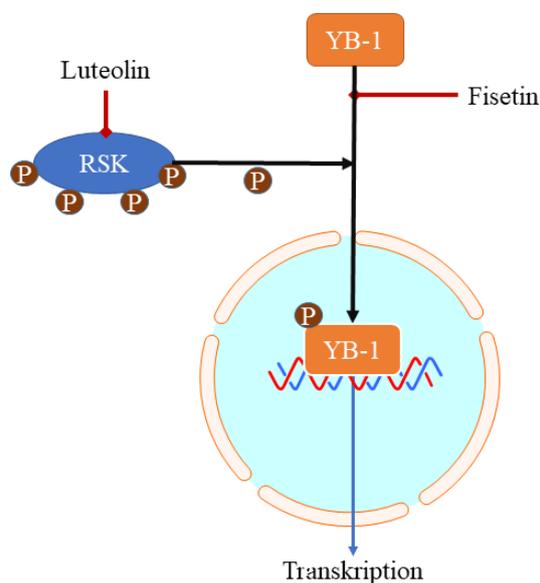


Abbildung 3: Mediation der Translokation von YB-1 in den Nukleus durch die RSK

2018, Reipas et al. 2013). Die Behandlung verschiedener Krebs-Zelllinien mit diesen Wirkstoffen führt in einigen Systemen zur Aktivierung von Apoptose-Kaskaden, Zellzyklusarrest und antiproliferativen Effekten. Darüber hinaus werden Migration und damit Metastasierung inhibiert sowie der Angiogenese entgegenwirkende Effekte beschrieben (Youns und Abdel Halim Hegazy 2017). All diese Prozesse sind essenziell in soliden Tumoren und bedingen die klinische Progression.

Die p90-ribosomale S6-Kinase ist eine Serin- / Threonin-Kinase mit den vier verschiedenen Isoformen RSK1-4. Sie wurde zuerst als Enzym beschrieben, was die S6-Untereinheit des 40S-Ribosoms in *Xenopus laevis* Eiern phosphoryliert (Erikson und Maller 1985). Sie wird als „down-stream“-Effektor des ERK-Signalweges aktiviert und ist an der Regulation des Zellzyklus, der Proliferation und der Apoptose beteiligt (Anjum und Blenis 2008). Eine Überexpression der RSK ist mit verschiedenen Neoplasien assoziiert (Roberts und Der 2007). Zielproteine, die durch die RSK stimuliert werden, sind z. B. CREB1 und NF- κ B, welche als Transkriptionsfaktoren das Zellüberleben fördern (Bonni et al. 1999, Anjum und Blenis 2008). Darüber hinaus hat die RSK einen fördernden Einfluss auf Initiationsfaktoren der Translation wie eIF-4b. Hemmend wirkt sie auf Transkriptionsfaktoren wie p53 (Cho et al. 2005) und die Apoptose-Mediatoren Caspase 8 und BAD (Peng et al. 2011, Anjum und Blenis 2008). Im

Prostatakrebs-Modell konnte mittels eines siRNA-vermittelten „knockdown“ (KD) der RSK die Proliferation von Krebszellen gehemmt werden (Clark et al. 2005). Laut aktuellem Forschungsstand phosphoryliert die RSK YB-1 an Serin 102 und bedingt damit die nukleäre Translokation des Kälteschockproteins, wo es als Transkriptionsfaktor wirkt und damit Adaptationsprozesse von Zellen steuern kann. Somit ist die therapeutische Inhibition der RSK eine indirekte Möglichkeit die biologische Aktivität von YB-1 zumindest partiell zu inhibieren.

4 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Die enorme klonale Komplexität der AML mit daraus resultierenden primären und sekundären Resistenzen gegen die Inhibition diverser zellulärer Signalwege erschweren die zielgerichtete Therapie dieser Leukämieform (Ciurea et al. 2018, Watanabe-Smith et al. 2017). Wie bereits beschrieben, kann das CSP YB-1 onkogene Prozesse unterstützen. In dieser Arbeit soll die Relevanz von YB-1 in AML-Zellen überprüft sowie der Nutzen als potenzielle Zielstruktur einer „targeted therapy“ validiert werden.

Ziel 1: Analyse der Gen-Expression von YB-1 in verschiedenen Sub-Typen der AML im Vergleich zu normalen hämatopoetischen Zellen.

Mittels eines öffentlich verfügbaren Gen-Expressions-Datensatzes wurde die Expression von *YB-1* in verschiedenen AML-Subtypen untersucht und anschließend wurden diese mit gesunden Zellen gegenübergestellt.

Ziel 2: Funktionelle Charakterisierung von YB-1 als Zielstruktur in der AML.

Unter Nutzung der Methode der RNA-Interferenz wurde *YB-1* in diversen AML-Zelllinien mit verschiedenen genetischen Hintergründen inaktiviert. Funktionell untersuchte man diese Zellen im Hinblick auf ihre Zellteilungs- und Apoptoserate im Vergleich zu Kontroll-Zellen mit normalem YB-1-Level.

Ziel 3: Validierung von pharmakologischen Inhibitoren der YB-1 Phosphorylierung in der AML.

Unter Nutzung der Phytopharmaka Fisetin und Luteolin, deren hemmender Effekt auf die S102-Phosphorylierung von YB-1 in der Literatur beschrieben ist, wurde deren Einfluss auf Proliferation und Apoptose von Leukämie-Zellen sowie die Auswirkungen auf die zelluläre Signaltransduktion untersucht. Um die Spezifität dieser Pharmaka einzuschätzen, wurden die Ergebnisse unter Verwendung dieser beiden Pharmaka miteinander sowie mit den Daten der genetischen Inaktivierung verglichen.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Zelllinien

Tabelle 1: Liste der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Mutationsstatus (exemplarisch)	Herkunft
MOLM-13 (human, AML-Zelllinie)	FLT3-ITD, MLL-AF9	DSMZ, Braunschweig
THP-1 (human, AML-Zelllinie)	MLL-AF9	DSMZ, Braunschweig
MONO-MAC-6 (human, AML-Zelllinie)	MLL-AF9, FLT3-V592A	DSMZ, Braunschweig
OCI-AML3 (human, AML-Zelllinie)	NPM1	DSMZ, Braunschweig
HL60 (human, AML-Zelllinie)	c-MYC	DSMZ, Braunschweig
MV4;11 (human, AML-Zelllinie)	FLT3-ITD, MLL-AF4	DSMZ, Braunschweig
K562 (human, CML-Zelllinie)	BCR-ABL	DSMZ, Braunschweig
U-937 (human, histiozytisches Lymphom)	MLL-AF5	DSMZ, Braunschweig
NOMO-1 (human, AML-Zelllinie)	MLL-AF9	DSMZ, Braunschweig

5.1.2 Inhibitoren

Tabelle 2: Liste der verwendeten pharmakologischen Inhibitoren

Pharmakon	Firma
Fisetin	Abcam
Luteolin	Abcam

5.1.3 Antikörper

Tabelle 3: Liste der verwendeten primären und sekundären Antikörper

Antikörper	Lösungsmittel	Verdünnung	Sek. Antikörper	Firma
Sekundärer Antikörper Maus	5 % TM	1:2000		Santa Cruz Biotechnology
Sekundärer Antikörper Kaninchen	5 % TM	1:2000		Cell Signaling Technology
p-S102-YB-1	5 % BSA	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling Technology 2900
YB-1	5 % BSA	1:2000	Kaninchen	Abcam 76149
p-STAT5	5 % TM	1:1000	Maus	Temecula California
STAT5	5 % TM	1: 100	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology 1081
p-p44 / 42 MAPK = p-ERK1/2	5 % BSA	1:1000	Maus	Cell Signaling Technology 9106
p44 / 42 MAPK = ERK1/2	5 % BSA	1:1000	Kaninchen	Cell Signaling Technology 9102
GAPDH	5 % TM	1:5000	Maus	Median Life Science H86504M
p53	5 % BSA	1:2000	Maus	Cell Signaling Technology
p21	5 % BSA	1:1000	Maus	Cell Signaling Technology
p16	5 % BSA	1:500	Kaninchen	Cell Signaling Technology

5.1.4 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 4: Liste der verwendeten Substanzen

Substanz	Firma
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
AnnexinV (APC)	Biolegend
AnnexinV-binding-Puffer	Biolegend
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Asparagin	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Complete (Protease Inhibitor Cocktail)	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
DPBS (Gibco)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
FBS (Kälberserum)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
HRP Substrat Luminol Reagent	Immobilon Western
HRP Substrat Peroxide Solution	Immobilon Western
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid (Gimenez-Bonafe et al.)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nichtsessenzielle AS, 10-fach konzentriert	Life Technologies, Carlsbad, USA
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Carlsbad, USA
Phosphatase-Inhibitor	Life Technologies, Carlsbad, USA
Plasmocin™	Life Technologies, Carlsbad, USA
Puromycin	Life Technologies, Carlsbad, USA
Rinder-Serum-Albumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI Medium (Gibco)	Life Technologies, Carlsbad, USA
SYTOX® blue	Life Technologies, Carlsbad, USA
SYTOX® orange	Life Technologies, Carlsbad, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trockenmilchpulver	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Trypanblau	Life Technologies, Carlsbad, USA
Tween 20	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Urea	Carl Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Life Technologies, Carlsbad, USA

5.1.5 Geräte

Tabelle 5: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Firma
Durchflusszytometer FACS Canto II TM	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, United States
Chemilumineszenz-Detektor G:BOX Chemi XX6	Syngene, Frederick, USA
CO ₂ -Inkubator Galaxy 170S	New Brunswick, Midland, Kanada
BIO-RAD Mini-Protean® Blotting System	BIO-RAD Laboratories, Berkeley, USA
Heizblock	PeqLab, Erlangen
Mikroliter Pipetten diverser Volumina	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop „Primo Vert“	Carl Zeiss, Jena
Mikrozentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	neoLab, Heidelberg
Schüttelgerät	CAT, Ballrechten-Dottingen
Zellkulturbank	VWR, Radnor, USA
Zentrifuge Fresco17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

5.1.6 Sonstiges verwendetes Material

Tabelle 6: Liste verwendeter Gefäße und sonstiger Materialien

Material / Gefäß	Firma
Eppendorfgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
BRAND plates 96 Well	Corning, Corning, USA
CELLSTAR® Cell Culture 24 Well Plates	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
CELLSTAR® Serologische Pipetten 10 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

CELLSTAR® Serologische Pipetten 25 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
CELLSTAR® Serologische Pipetten 5 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
CellTiter96® AQueous One Solution Proliferation Assay (MTS)	Promega, Fitchberg, USA
Cryovial® Cryotubes	Simport, Quebec, Canada
Eppendorfgefäß 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
epT.I.P.S. Standard Pipettenspitzen 0,5 µl - 20 µl, 20 µl - 200 µl, 200 µl – 1 ml	Eppendorf, Hamburg
FACS Röhrchen 4 ml	Becton Dickson (BD), Franklin Lakes, USA
Falcon-Gefäß (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Whatman® gel blotting paper	Sigma Aldrich

5.1.7 Software

Tabelle 7: Liste der verwendeten Software

Software	Anwendung	Firma
FACS DIVA Software	Mess-Management am FACS-Canto	BD
FlowJo-Software	Analyse und Auswertung von FACS-Daten	Tree star
Syngene-Software	Aufnahme der Western Blot Untersuchung	Syngene
GraphPad Prism 5	Statistische und graphische Auswertung der Daten	GraphPad Inc.
ImageJ	Densitometrische Analyse	NIH
Microsoft Word 2016	Verfassung der Dissertation	Microsoft Office
Microsoft Excel 2016	Datensammlung	Microsoft Office

5.1.8 Lösungen und Puffer

Additiva

1x PBS	100 ml
1x PBS mit β -Mercaptoethanol (175 μ l / 500 ml PBS)	100 ml
Hepespuffer, 1 M, pH 7,2 steril	100 ml
Natriumpyruvat, 100 mM	100 ml
L-Glutamin, 200 mM	100 ml
Nichtessenzielle AS, 10-fach konzentriert	60 ml
Asparagin (10 mg / ml)	20 ml

Lösung nach Herstellen steril filtrieren.

10 x Western Blot Puffer

Tris	60,5 g
Glycin	288 g
SDS	20 g
H ₂ O	Auf 2000 ml

Lysepuffer

Hepespuffer, 1M, pH 7,4 steril	50 mM
Glycerol	10 %
NaCl	150 mM
TritonX100	1 %
MgCl ₂	1,5 mM
EGTA	5 mM
H ₂ O	Auf 1000 ml

10 x TBST Puffer

NaCl	150 mM
Tris	50 mM
Tween 20	5 ml
H ₂ O	Auf 500 ml

Laufpuffer

10 x Western Blot Puffer	100 ml
H ₂ O	900 ml

Transferpuffer

10 x Western Blot Puffer	100 ml
H ₂ O	700 ml
Ethanol 96 %	200 ml

Strippingpuffer

62,5 mM Tris, pH 6,8 (HCl)	62,5 ml
2 % SDS	20 g
H ₂ O	Auf 1000 ml

4 x SDS -Ladepuffer

Tris, pH 6,8	6,25 ml
Glycerol	25 ml
10 % SDS	2 g

β -Mercaptoethanol	10 ml
Bromphenol Blau	1 Spatelspitze
H ₂ O	8,75 ml (auf 50 ml)

2 x SDS -Ladepuffer

Tris, pH 6,8	6,25 ml
Urea	24,024 g
2 % SDS	2 g
H ₂ O	Auf 100 ml

Trenngelpuffer

Tris Base 1,5 M	36,34 g in 200 ml H ₂ O, pH 8,8
-----------------	--

Sammelgelpuffer

Tris Base 1,0 M	24,23 g in 200 ml H ₂ O, pH 6,8
-----------------	--

5.2 Methoden

5.2.1 Zellkultur

5.2.1.1 Kulturbedingungen für Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten AML- und Suspensions-Zelllinien wurden bei 37 °C in einer 5 %igen CO₂ Atmosphäre kultiviert. Das verwendete RPMI-Medium beinhaltete 10 % FBS (Kälberserum), 29 ml Additiva sowie eine Mycoplasmen Prophylaxe (Plasmocin) mit einer Endkonzentration von 2 µg / ml. Das Kulturmedium wurde angesetzt und bis zu 3 Wochen bei 4 °C gelagert. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage nach DMSZ-Empfehlungen passagiert, um die Suspension von toten Zellen und Zelldebridement zu reinigen. Hierfür wurden die Zellen in ein Falcon überführt und sechs Minuten bei 800 U / min zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und anschließend in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Je nach Zelllinie wurden die Zellen in einer bestimmten Dichte in Medium überführt. Hierfür wurden die Zellen im Hämatozytometer gezählt. OCI-AML3-Zellen in einer Dichte von 1,5 – 2 Millionen in 20 ml Medium, NOMO-1 1 Millionen in 2 ml Medium in einer 6-Well-Platte, bei MOLM-13-, THP-1-, MV4;11-, U937-, K562-, HL60- sowie MONO-MAC-6-Zellen wurden 1 – 1,5 Millionen Zellen in 20 ml Medium überführt.

5.2.1.2 Kryokonservierung

Die Methode der Kryokonservierung wurde zur dauerhaften Lagerung der Suspensionszelllinien genutzt. Hierfür wurden nach Zentrifugation der Zellen bei 800 U / min und Entfernung des Überstandes 5 – 10 Millionen Zellen in 800 µl Kulturmedium suspendiert. Folgend wurden diese in spezielle Kryo-Röhrchen überführt und nach der Zugabe von 100 µl FBS sowie 100 µl DMSO in einen Nalgene® Cell Freezing Container bei -80 °C für 24 Stunden gelagert. Dieser Container beinhaltet Isopropanol, welches zu einem kontinuierlichen Abkühlen der Zellen um 1 °C / min führt. Dies ist essenziell für die Lebensfähigkeit der Zellen nach erneutem Auftauen. Die Kryo-Röhrchen wurden anschließend bei -169 °C in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum erneuten Kultivieren der Zelllinien wurden die Kryo-Röhrchen in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und in Kulturmedium gewaschen, um das cytotoxische DMSO zu verdünnen. Der Überstand wurde nach Zentrifugation entfernt und die Zellzahl bestimmt. Je nach Zelldichte wurden die Zellen in 2 ml, 10 ml oder 20 ml Medium überführt und kultiviert.

5.2.1.3 Infektion von Zellen mit lentiviralen Partikeln zum *YB-1* „knockdown“

Zur stabilen Transduktion der Ziel-Zellen wurde die „short hairpin RNA“ (shRNA) Technologie (nach Abbildung 4) verwendet. Diese Methode ist bereits in mehreren Projekten etabliert worden und wurde analog dazu bereits in publizierten Studien durchgeführt (Ebert et al. 2016, Perner et al. 2015). Konkret nutzt man bei dieser Methode die „small interfering RNA“ (siRNA)-vermittelte Gen-Inaktivierung, das sogenannte „gene silencing“. Die Vorteile dieser Methode im Vergleich zur einfachen Transfektion mittels siRNA liegen in der stabilen Integration der shRNA und dadurch prolongierter Expression im Zellkulturexperiment. Weiterhin weisen Lentiviren als Vektoren eine relativ geringe Toxizität in der Zielzelle auf, wodurch man das Ausmaß methodisch bedingter Apoptose reduziert (Lambeth und Smith 2013).

Zuerst wurden 3 Millionen Zellen abgezählt und in 300 µl RPMI suspendiert. Davon wurden jeweils 100 µl in 800 µl Virus-Partikel-haltigem Überstand resuspendiert. Letztere wurden von anderen wissenschaftlichen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe hergestellt und zur Verfügung gestellt. Diese lentiviralen Partikel waren entweder gegen *YB-1* (shRNA-YB-1-1 und -2) gerichtet oder entsprachen einer nicht funktionellen Kontrolle (shRNA-scr „scrambled“).

Die Virus-Zell-Suspension wurde in eine 24-Well-Platte überführt und in einer auf 33°C vorgewärmten Zentrifuge für 90 Minuten bei 2000 U / min zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Suspensionen vorsichtig resuspendiert, um an der Wand adhärierende Zellen zu lösen, und bei 37°C inkubiert. Nach acht Stunden erfolgte die zweite Infektion. Nach der Zugabe von 500 µl Virus-Partikel wurde die Suspension wieder bei 33 °C und 2000 U / min zentrifugiert, danach resuspendiert und im Inkubator platziert.

Das Virusmedium enthält Lentiviren, die als Vektor für die shRNA dienen und sie in die Zelle einschleusen. Die shRNA besitzt eine Haarnadelstruktur, welche ähnlich wie bei der siRNA von der RNA-Maschinerie der Zelle wahrgenommen wird. Die shRNA wird mittels Exportin 5-Ran-GTP gekoppeltem Cotransport aus dem Nukleus exportiert. Anschließend wird die shRNA durch das RNase-III-Enzym Dicer in siRNA prozessiert, dabei werden am 3' Überhang zwei bis drei Nukleotide mit 5'-Phosphat und 3'-Hydroxyl Termini gespalten. Im nächsten Schritt bindet die siRNA an den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) und bindet in diesem den homologen mRNA-Abschnitt. Anschließend wird die mRNA degradiert und kann nicht mehr translatiert werden. Das Ziel-Protein wird somit geringer exprimiert (Lambeth und Smith 2013, Moore et al. 2010).

Spätestens 24 Stunden nach der ersten Infektion wurde das Virusmedium entfernt und die Zellen wurden zwei Mal durch Zentrifugation (5 min, 1400 U / min) mit anschließendem Resuspendieren in RPMI gewaschen. Danach wurden die Zellen 24 Stunden kultiviert und hierauf mittels Puromycin (1 µg / ml) selektiert. Während erfolgreich transduzierte Zellen durch eine Puromycin-Resistenz einen Überlebensvorteil aufwiesen, gingen nicht transduzierte Zellen durch den ausgesetzten Stress zu Grunde, wodurch die nicht-transduzierten Zellen in den Reinigungsprozessen entfernt wurden. Die Zellsuspension wurde in den ersten 3 Tagen nach Puromycin-Zugabe täglich gereinigt.

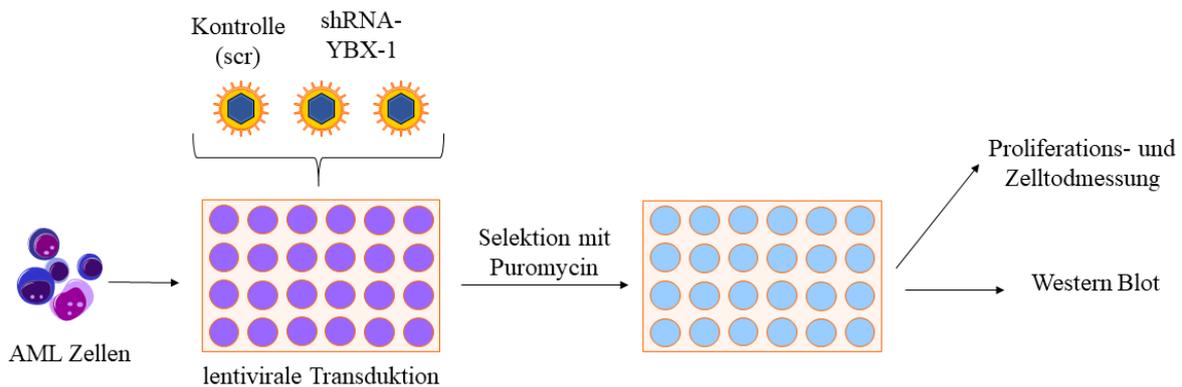


Abbildung 4: Transduktion von AML-Zellen zum „knockdown“ von YB-1.

Am dritten Tag nach der Selektion wurde ein Teil der Zellen in gleicher Zellzahl in 24-Well-Platten ausgesät, um Zellproliferation mittels Zellzählung im Hämatozytometer und Zelltod durch „Sytox blue“-Färbung im Durchflusszytometer für vier aufeinander folgende Tage zu bestimmen. Abschließend wurde am fünften Tag nach der Infektion die Suffizienz des „knockdowns“ (KD) im Western Blot nachgewiesen.

5.2.2 Biochemie und Durchflusszytometrie

5.2.2.1 Allgemeines zur Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch „fluorescence activated cell sorting“ (FACS), dient der Erfassung bestimmter Charakteristika einer Zellpopulation wie Größe, Granularität oder auch Markierung durch einen Fluoreszenzfarbstoff. Durch einen Mikrokanal einer hoch präzisen Küvette fließen die Zellen einzeln an einer Spannungs- bzw. Lichtquelle vorbei und werden bestrahlt. Hierbei emittieren sie je nach ihren Eigenschaften oder ihrer Fluoreszenz-Färbung ein bestimmtes Streulicht als Signal, welches detektiert und analysiert wird.

5.2.2.2 Apoptosemessung mittels AnnexinV-Sytox-Färbung

Zur Quantifizierung apoptotischer Zellen wurde die AnnexinV-Sytox-Färbung genutzt. Während der APC-konjugierte Fluoreszenzfarbstoff AnnexinV an Phosphatidylserin bindet, ein Signalmolekül an der Außenmembran früh-apoptotischer Zellen, interkaliert „Sytox blue“ bzw. „orange“ nur mit der DNA toter Zellen. Diese weisen eine beeinträchtigte Plasmamembran auf und sind dadurch permeabel für den Farbstoff. Dadurch lassen sich früh-apoptotische von toten Zellen unterscheiden.

Für die Experimente in dieser Arbeit wurden 5×10^4 – 1×10^5 Zellen der AML-Zelllinien zuerst mit drei relevanten Konzentrationen (1 μM , 5 μM und 10 μM) von Luteolin bzw. Fisetin und einer DMSO-Kontrolle für 48 Stunden in einer 24-Well-Platte behandelt. Anschließend wurden die Zellen aus der Platte in FACS-Röhrchen überführt und für fünf Minuten bei 1200 U / min zentrifugiert. Nachdem man den Überstand abgesaugt hat, wurde der Zellüberstand in 100 μl AnnexinV-binding-Puffer resuspendiert und 1,7 μl AnnexinV-APC zugegeben, vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Der spezielle calciumhaltige Puffer ist essenziell für die Bindung von AnnexinV an Phosphatidylserin. Danach wurden 200 μl AnnexinV-binding-Puffer hinzugegeben und die Proben zum Messgerät transportiert. Dort wurden direkt vor der Messung 1 μl „Sytox blue“ bzw. „Sytox orange“ hinzugeben. Alle AnnexinV-positiven Zellen wurden als apoptotische gewertet.

Mit der FlowJo-Software wurden die am FACS-Gerät aufgenommen Messungen ausgewertet (Abbildung 5). Zur Ermittlung des Anteils apoptotischer Zellen addierte man die beiden rechten Quadranten, „Annexin+ / Sytox+“ bzw. „- / Sytox-“ Zellen.

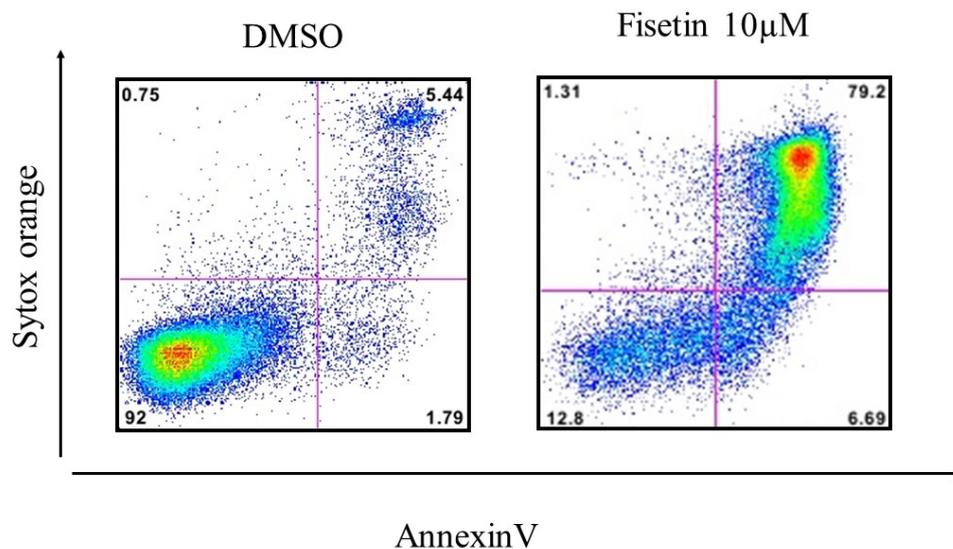


Abbildung 5: „Gating“-Strategie bei AnnexinV-Sytox-Färbung zur Apoptosemessung in MOLM-13-Zellen.

Dargestellt sind FACS-Daten der für 48h behandelten MOLM-13-Zellen während der Auswertung in ImageJ. Für die Messung der Apoptoserate wurde die AnnexinV-„Sytox orange“-Färbung nach Fisetin Behandlung im PE-Kanal bzw. „Sytox blue“ bei Luteolin im „Pacific blue“ Kanal (nicht dargestellt) genutzt. AnnexinV wird im APC-Kanal gemessen.

Bei der Messung der reinen Zelltod-Rate - ohne distinkte Differenzierung apoptotischer Zellen - wurden die Zellen direkt in den FACS-Röhrchen mit PBS / FBS resuspendiert und zum Analysegerät transportiert. Dort wurde vor der Messung 1 µl „Sytox blue“ hinzugegeben. Die Sytox-positiven Zellen wurden als tot gezählt. Anschließend wurden die am Analysegerät aufgenommenen Daten mit Hilfe der FlowJo-Software ausgewertet. Wie in Abbildung 6 dargestellt, wurden hier zuerst die lebenden Zellen, also „Sytox blue“-negative Zellen, von den übrigen Zellen abgegrenzt.

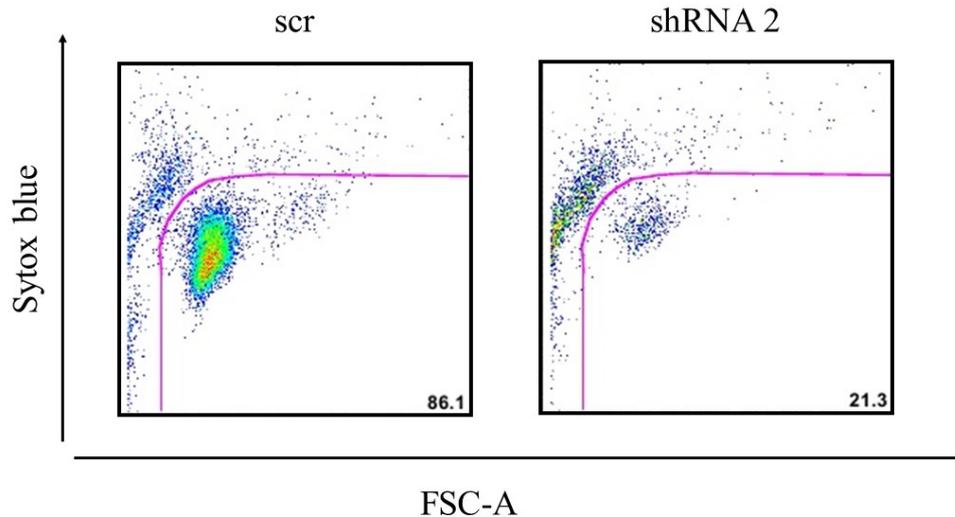


Abbildung 6: „Gating“ bei „Sytox blue“-Färbung zur Ermittlung des Anteils lebender Zellen in MOLM-13-Zellen.

Dargestellt sind die FACS Daten in ImageJ nach Messung der „Sytox blue“-positiven Zellen an Tag 4 nach *YB-1*-KD in MOLM-13-Zellen. Der Farbstoff wird im „Pacific blue“-Kanal gemessen.

5.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung und Hämatocytozometer

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde eine 0,0025 mm² Neubauer Zählkammer genutzt. Dafür wurden nach Zentrifugation der Zellen, Absaugen des Überstandes und Resuspension in frischem Medium 10 µl dieser Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau verdünnt. Hiervon wurden 10 µl entnommen und auf die Zählkammer pipettiert, sodass die lebenden Zellen in den vier großen Quadranten ausgezählt werden konnten. Trypanblau färbt tote Zellen durch ihre erhöhte Zellmembranpermeabilität blau an, wohingegen lebende Zellen frei von diesem Farbstoff bleiben und damit hell-leuchtend erscheinen. Dadurch können diese unter dem Mikroskop voneinander unterschieden werden. Nach dem Zählen kann die ermittelte Anzahl über folgende Formel in die Zahl lebender Zellen / ml umgerechnet werden: lebende Zellen / ml = Anzahl gezählter Zellen / Anzahl gezählter Quadranten x Verdünnungsfaktor (10) x Kammerfaktor (10.000).

Um Rückschlüsse auf die Proliferation der Zellen zu ziehen, wurden unterschiedlich behandelte AML-Zelllinien über vier Tage nach diesem Verfahren im Triplikat gezählt und anschließend ausgewertet.

5.2.2.4 MTS-Proliferations-Assay

Das MTS-Assay stellt eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen dar. Der enthaltene gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid wird durch mitochondriale Oxydoreduktasen in das violette, hydrophobe Formazan reduziert. Die Aktivität der Mitochondrien dient als Marker für die Vitalitäts- und Proliferationseigenschaften. Für diese Experimente wurden je 5.000 Zellen verschiedener AML-Zelllinien in 100 µl Medium auf einer 96-Well-Platte im Triplikate ausplattiert. Diese wurden mit drei relevanten Konzentrationen (1 µM, 5 µM und 10 µM) der Phytopharmaka Fisetin und Luteolin sowie DMSO zur Kontrolle für 72 Stunden behandelt. Danach wurden 20 µl der zuvor aufgetauten MTS-Lösung pro Well aufgetragen und für 150 min inkubiert. Hierauf erfolgte die Messung der Absorption im Tecan® Plattenphotometer bei 490 nm Wellenlänge (OD 490). Im Anschluss wurden die Daten in Microsoft Excel ausgewertet. Dabei wurde zuerst ein Leerwert abgezogen sowie die Absorptionsänderung der behandelten Triplikate mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Der daraus abgeleitete Quotient entspricht der relativen Proliferationsänderung nach Behandlung.

Nachdem im MTS-Assay durch Absorptionseigenschaften bei einer Wellenlänge von 490 nm auf der Grundlage von Stoffwechselfvorgängen indirekt auf eine mögliche Proliferation geschlossen wird, korreliert man diese Methode mit der Zellzählung, bei der anhand der Zellzahl direkt die Proliferation dargestellt wird. Beide Methoden wurden in sechs verschiedenen Zelllinien durchgeführt (Abbildung 7). Der Korrelationskoeffizient r (siehe 5.2.3 Statistische Analysen) nimmt in allen Zelllinien Werte $>0,99$ an, d. h. man kann davon ausgehen, dass sowohl die Zellzählung als auch das MTS-Assay die Proliferationseigenschaften von Zellpopulationen signifikant darstellen.

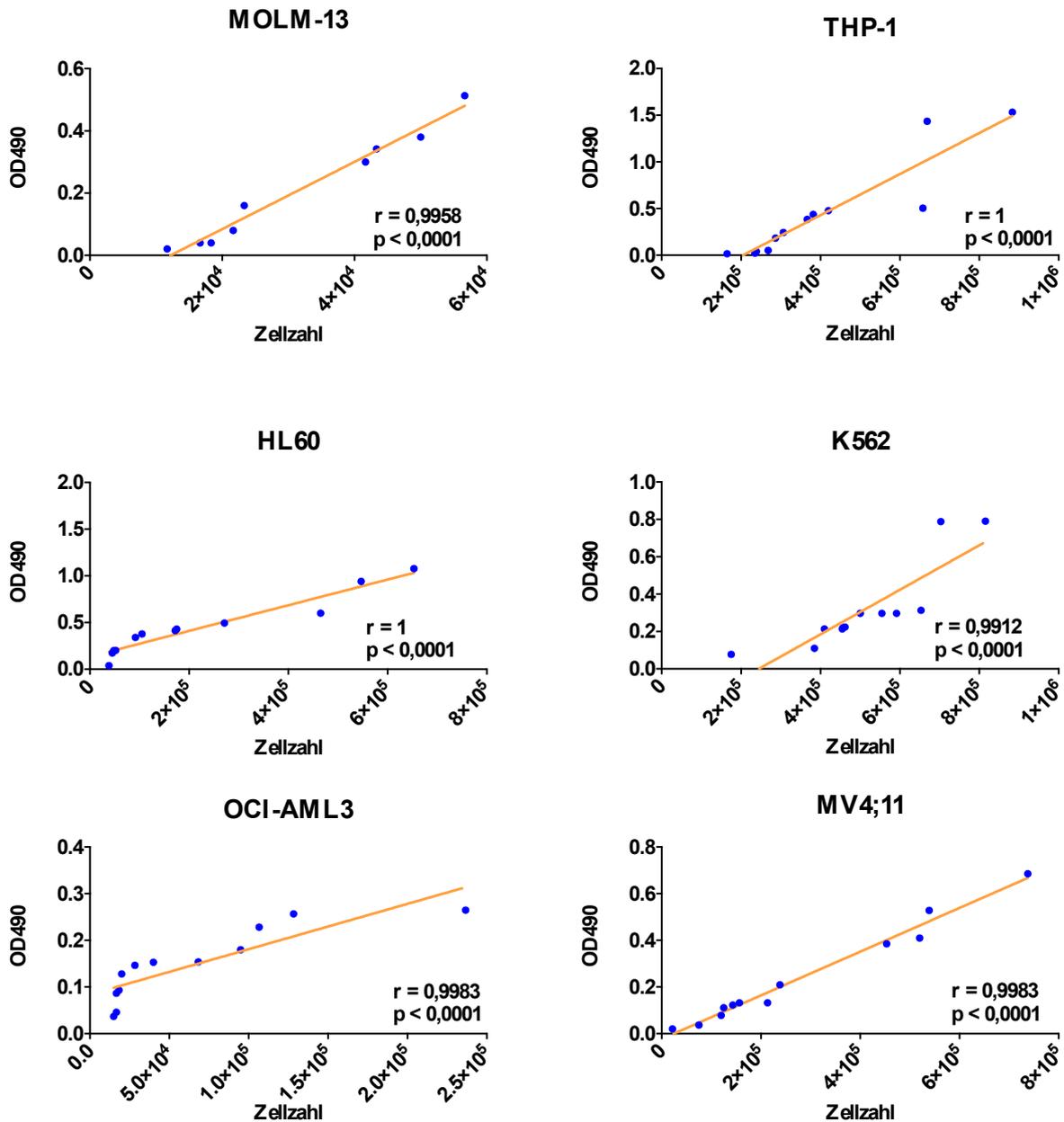


Abbildung 7: Spearman-Korrelation zwischen MTS-Assay (OD 490) und Zellzählung.

Zur Analyse wurden die OD 490 nach MTS-Assay 72 h nach sowie die Zellzählung am dritten Tag nach YB-1-KD miteinander in Relation gesetzt und der Spearman Korrelationskoeffizient r bestimmt, p-Wert <0,0001.

5.2.2.5 Western Blot

Zur Evaluierung der Proteinexpression und Phosphorylierung wurde die Methode des Western Blots genutzt. In einem ersten Schritt wurden aus kultivierten Zellen Lysate hergestellt. Zuerst wurden die gezählten Zellen (ca. 5×10^6) in ein Eppendorfgefäß überführt und drei Mal mit 1 ml 4 °C kaltem PBS gewaschen, nachdem sie jeweils für fünf Minuten bei 1200 U / min

zentrifugiert wurden. Darauf wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden mit 100 - 150 µl Lyse-Puffer mit Protease-Inhibitoren (Complete, NaF) und Phosphatase-Inhibitor (Phospho-Stop) resuspendiert. Die Zell-Puffer-Suspension wurde daraufhin 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 13.000 U / min. Der Überstand wurde dann in ein anderes Eppendorfgefäß überführt und der zelluläre Rückstand konnte verworfen werden. Zur Bestimmung der gesamten Protein-Konzentration im Lysat wurde die Bradford-Lösung genutzt. Der dort enthaltene Tryphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G250 ändert sein Absorptionsspektrum sobald er mit Proteinen einen Komplex bildet. Es wurden 200 µl der Bradford-Lösung mit 1 µl Zell-Lysat oder 2 µl einer BSA-Protein-Standard-Reihe vermischt und anschließend photometrisch bei 595 nm Wellenlänge gemessen und ausgewertet.

Als nächstes wurden mittels Gel-Elektrophorese Proteine aus den Lysaten in einem Acrylamid-Gel nach Größe aufgetrennt. Die negativ geladene Trägermatrix SDS-Page zerstört die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine. Außerdem interagiert SDS-Page mit den Proteinen, wodurch eine gleichmäßige negative Ladung entsprechend der Größe entsteht. Danach wurde die Laufkammer demontiert, das Gel kurz in Transferpuffer gelegt und dann zusammen mit der Nitrocellulosemembran in Western Blot Papier in eine Halterung für das Blot-Sandwich gespannt und in Transfer-Puffer gestellt. An dieses wurde dann für 90 min ein zum Gel senkrecht verlaufendes elektrisches Feld (100 V) angelegt. Die durch SDS negativ geladenen Proteine wanderten in Richtung Kathode auf die Nitrozellulose-Membran (Elektrotransfer) und wurden dort gebunden. Im Anschluss daran wurde das Blot-Sandwich demontiert und die Membran für zehn Minuten in 1 x TBST gewaschen und danach 60 min in 5 % TBST-Milchpulver (TM) geschüttelt. Dann wurden die Membranen erneut drei Mal in 1 x TBST jeweils zehn Minuten gewaschen. Hierauf schnitt man diese anhand des Markers („PAGE-Ruler“) für die jeweiligen Proteine, um einzelne Abschnitte in den jeweiligen Antikörpern zu inkubieren (ca. 12-18 Stunden).

Darauffolgend wurden die Membran-Abschnitte nach dreimaligem Waschen mit 1 x TBST 60 min in sekundärem Antikörper inkubiert. Dieser ist mit einer „horseradish peroxidase“ (HRP) gekoppelt und ermöglicht dadurch die enzymatische Umwandlung des im ECL enthaltenen Luminols in dessen oxidierte Form, dessen Lumineszenz nachweisbar ist. Nach der einstündigen Inkubation wurden die Abschnitte dreimal gewaschen und konnten dann durch die Zugabe von Chemolumineszenz-Lösung im Detektor aufgenommen und dokumentiert werden (Deschênes-Simard et al. 2014). Um die Membran-Abschnitte für weitere Untersuchungen zu nutzen, musste man diese vorher von gebundenen Antikörpern „stripfen“.

Dafür schüttelte man die Membran in 100 ml Stripping-Puffer mit 70 μ l β -Mercaptoethanol bei 50 °C für 20 min. Anschließend wurden die Membranen drei Mal je 15 min in 1 x TBST gewaschen, eine Stunde in 5 % TM geblockt, um dann schließlich für neue Antikörper genutzt zu werden.

Die densitometrische Analyse erfolgte in ImageJ und die Zusammenstellung der Ergebnisse in Microsoft Power Point.

5.2.3 Statistische Analysen

Zur statistischen Auswertung wurde die „GraphPad Prism“-Software verwendet. Abhängig von den vorliegenden Daten wurde der ungepaarte t-Test, eine Varianzanalyse (two way ANOVA) oder die lineare Regression mit Spearman-Korrelation genutzt. Der genau verwendete Test ist in den Legenden der jeweiligen Abbildung vermerkt.

Zum Vergleich zweier Messungen wurde die Pearson- (Benesty et al. 2009) bzw. Spearman-Korrelation durchgeführt (Spearman 2010, Spearman 1904). Deren Korrelationskoeffizient r kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Der negativste Wert -1 bedeutet, dass ein indirekter Zusammenhang zwischen Methode A und B besteht, wohingegen positive Werte auf einen direkten Zusammenhang hinweisen. Werte um Null deuten auf keinen Zusammenhang hin.

Die Signifikanz ist anhand eines p-Wertes bzw. im Graphen als Linie mit Stern markiert. Ein Stern beschreibt einen p-Wert $< 0,1$, zwei Sterne $p < 0,01$, drei Sterne $p < 0,001$ und vier Sterne $p < 0,0001$.

6 Ergebnisse

6.1 Genexpression von YB-1 in akuter myeloischer Leukämie

Zur Detektion einer möglichen differenziellen mRNA-Expression von Kälteschockproteinen (CSPs) in der AML wurde ein öffentlich verfügbarer Datensatz aus der „Bloodspot“-Datenbank genutzt (Bagger et al. 2018). Hierbei wurde die mRNA-Expression der CSPs in verschiedenen, häufigen genetischen Subtypen der akuten myeloischen Leukämie betrachtet. Außerdem wurden die Daten aus der AML mit zytogenetischen Veränderungen im Vergleich zu HSC sowie differenzierten Zellen (PMN, „polymorphonuclear leukocytes“) analysiert (Abbildung 8). Die horizontale Linie spiegelt die mRNA-Expression in den HSCs wider und dient damit als Vergleichspunkt. YB-1 zeigte in allen untersuchten karyotypischen Subtypen der AML eine signifikant erhöhte mRNA-Expression im Vergleich zu normalen HSC. Am höchsten exprimiert war das CSP in der AML mit komplexem Karyotyp (CK), welche mit der schlechtesten Prognose assoziiert ist. Mit zunehmender Differenzierung, wie in PMN, zeigt sich die YB-1 mRNA-Expression weiter reduziert (Abbildung 8 A), was eine geringere Bedeutung in differenzierten Zellen nahelegt. Unter den anderen Mitgliedern der CSPs zeigte YB-2 ein sehr ähnliches Expressionsmuster mit signifikant erhöhter mRNA-Expression in AML im Vergleich zu HSC und weiterer Reduktion der Expression in differenzierten Zellen (Abbildung 8 B), jedoch insgesamt eine geringere Expression als YB-1. Weiterhin war die Expression von CARSH1 in AMLs signifikant erhöht, ein klarer Zusammenhang zum Differenzierungsstatus der Zellen ergab sich jedoch nicht (Abbildung 8 C). Die weiteren Mitglieder der Protein-Familie CDCS2, CSDE1, LIN28B und LIN28A zeigten keine veränderte mRNA-Abundanz in den untersuchten Subtypen der AML im Vergleich zu normalen Zellen (Abbildung 8 D-G). Aufgrund der Tatsache, dass YB-1 in der Literatur am deutlichsten mit onkogener Aktivität in Verbindung steht, konzentrieren sich die weiteren Untersuchungen auf dieses CSP.

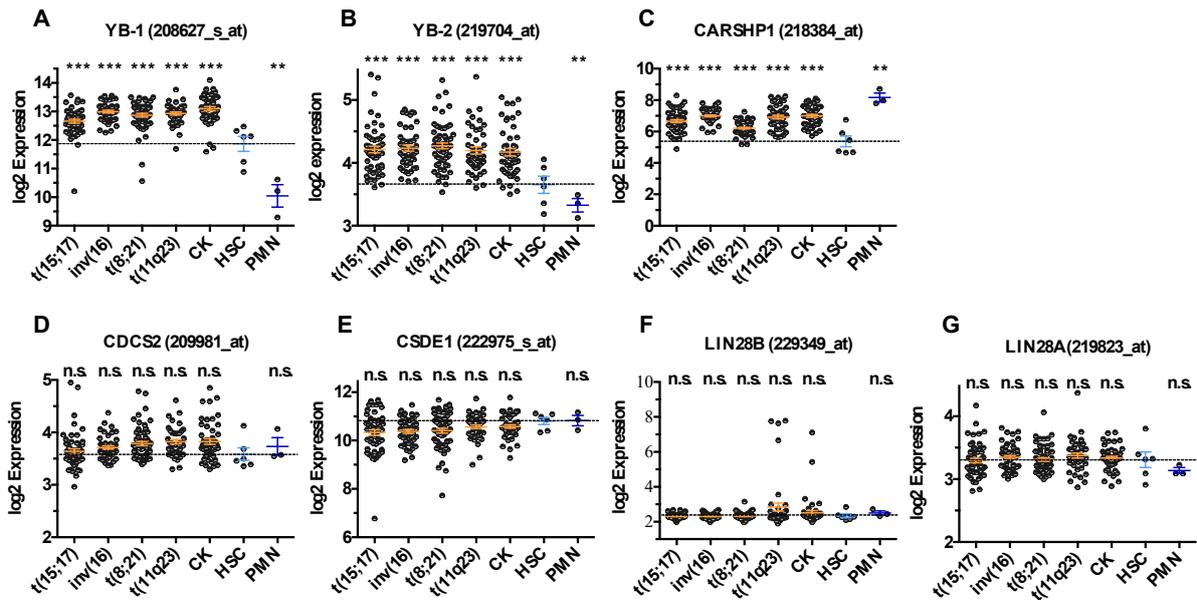


Abbildung 8: Transkriptionelle Expression der Kälteschockproteine in humaner AML, hämatopoetischen Stammzellen und differenzierten Zellen.

Die mRNA-Expression der Mitglieder der Kälteschockprotein Familie YB-1 (A), YB-2 (B), CARSHIP1 (C), CDCS2 (D), CSDE1 (E), LIN28B (F) und LIN28A (G) in verschiedenen Subtypen der AML, detektiert mittels Gen-Expressions-Array (log₂-Expressions-Werte). Expressionen in der akuten myeloischen Leukämie mit t(15;17), inv(16), t(8;21), t(11q23), komplexer Karyotyp (CK) sowie hämatopoetische Stammzellen (HSC) und differenzierte Zellen (PMN) wurden untersucht. Die horizontale Linie verläuft auf Höhe der Expression in HSC. Die Daten stammen aus der Datenbank „Bloodspot“ (Bagger et al. 2018) (ungepaarter t-Test).

6.2 Charakterisierung von YB-1 als essenzielles Protein in humanen AML-Zellen

Zur Ermittlung der Abhängigkeit humaner AML-Zellen von YB-1 wurde eine genetische Inaktivierung dieses Kälteschockproteins mittels RNA-Interferenz durchgeführt. Insgesamt wurden acht AML-Zelllinien unterschiedlicher genetischer Subtypen (Tabelle 8) lentiviral mit je zwei shRNAs gegen *YB-1* bzw. einer nicht funktionellen Kontrolle („scrambled“ (scr)-shRNA) transduziert (Abbildung 4). Die Proliferation der Zellen wurde an vier aufeinander folgenden Tagen mittels Zellzählung im Triplikat untersucht. Ebenso wurde der Anteil toter Zellen durchflusszytometrisch mittels „Sytox blue“-Färbung täglich dargestellt (Abbildung 9).

Tabelle 8: Übersicht über zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen in den verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Zytogenetische Alteration (Auswahl)	Molekulargenetik
MV4;11	t(4;11)	FLT3-ITD, MLL-AF4
HL60	der(1)	c-MYC amplifiziert
MOLM-13	t(9;11)	FLT3-ITD, MLL-AF9
OCI-AML3	keine Aberration	NPM1c
NOMO-1	t(9;11)	MLL-AF9
U937	t(1;5), t(2;5), t(10;11)	CALM / AF10
THP-1	t(9;11)	MLL-AF9
K562	t(9;22)	BCR-ABL
MONO-MAC-6	t(9;11)	MLL-AF9, FLT3-V592A

Das zelluläre Protein-Level von YB-1 konnte in den AML-Zellen durch den shRNA-vermittelten „knockdown“ (KD) deutlich reduziert werden, wie in den dargestellten repräsentativen Western Blots ersichtlich (Abbildung 9). Die beiden shRNAs wiesen keine relevanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Effektivität auf. Funktionell zeigten alle untersuchten Zelllinien eine Reduktion der Proliferationsrate nach genetischer Inaktivierung von *YB-1*, während sich die Kontrollgruppe exponentiell teilte. Dieser Effekt war in MV4;11-, MOLM-13-, OCI-AML3-, HL60- und NOMO-1-Zellen am stärksten ausgeprägt (Abbildung 9 A-E). Bereits am zweiten und dritten Tag entwickelten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich des Proliferationsverhaltens nach *YB-1*-KD im Vergleich zur Kontrollgruppe. Insgesamt wiesen diese Zellen keinerlei relevante Expansion nach *YB-1*-KD auf. U937- und THP-1-Zellen zeigten eine intermediäre Hemmung der Proliferationsrate nach *YB-1*-Inaktivierung mit verminderter Expansion der Zellen nach Transduktion mit den *YB-1* shRNAs (Abbildung 9 F, G). Lediglich die Zelllinie K562 (sekundäre AML / CML in Blastenkrise) besaß eine geringe Abhängigkeit von YB-1 (Abbildung 9 H). Einen Anstieg der Anzahl an toten Zellen war nur in zwei der untersuchten Zelllinien sichtbar, MOLM-13 und OCI-AML3 (Abbildung 9 C-D). Dieser Anstieg der Zelltodrate war lediglich in den OCI-AML3-Zellen so prominent ausgeprägt, dass die beobachtete Reduktion der Zellzahl dadurch suffizient erklärbar war (Abbildung 9 D). Die Induktion von Zelltod in diesen zwei Zelllinien lässt sich am ehesten durch ein funktionelles p53 begründen (Weisberg et al. 2015, Kojima et al. 2005). Alle anderen Zelllinien haben ent-

weder inaktivierende Mutationen in *TP53* oder Deletionen am entsprechenden Locus, wodurch eine Reduzierung der Apoptoseinduktion vermutet werden kann (Lyu et al. 2017). Darüber hinaus war die Ausprägung der beobachteten Effekte hinsichtlich Proliferation und Apoptose weder durch eine unterschiedliche „knockdown“-Effizienz (Abbildung 9 A-H, Western Blots) noch durch unterschiedliche AML-Subtypen zu belegen (Tabelle 8). Der hemmende Effekt der *YB-1*-Inaktivierung scheint somit nicht Genotyp-selektiv zu sein.

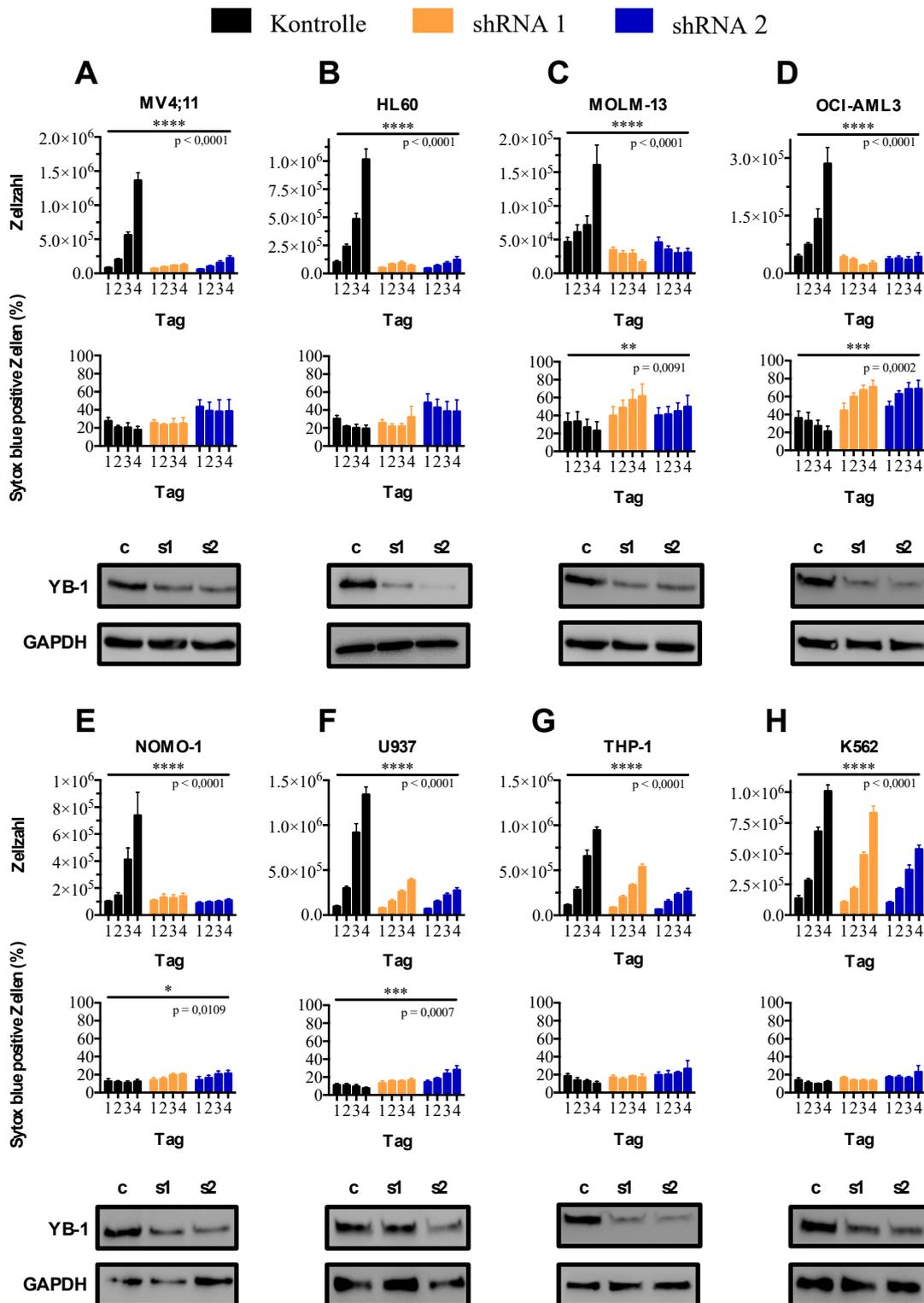


Abbildung 9: Funktionelle Auswirkung einer verminderten YB-1-Expression

Auswirkungen auf Proliferation und Zelltod nach Expressionsminderung von YB-1 durch shRNA-vermitteltem KD in den AML-Zellen MV4;11 (A), HL60 (B), MOLM-13 (C), OCI-AML3 (D), NOMO-1 (E), U937 (F), THP-1 (G) und der CML-Zelllinie K562 (H). Zellen wurden an vier aufeinanderfolgenden Tagen in der Neubauer Zählkammer zur Ermittlung der Proliferation gezählt sowie mittels „Sytox blue“-Färbung im FACS hinsichtlich der Zelltote analysiert. Der Nachweis der KD-Effizienz erfolgte im Western Blot am zweiten Tag. (Varianzanalyse two-way ANOVA der Werte an Tag 4; n = 4).

Zur Bestätigung der Vermutung hinsichtlich der Induktion des Zelltodes in MOLM-13- und OCI-AML3-Zellen (Abbildung 9 C und D) auf der Grundlage eines Wildtyp *TP53*, wurden Western Blot Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wurden nach Transduktion der Zellen mit einer Kontroll-shRNA (c) oder einer shRNA gegen *YB-1* (s1 oder s2) zum einen YB-1 sowie der Regulator des Zellzyklus p53 untersucht (Abbildung 10). Die Lyse der Zellen für die Western Blot Untersuchung erfolgte am fünften Tag nach der Infektion. Mittels densitometrischer Analyse wurde die Protein-Expression von YB-1 und p53 berechnet.

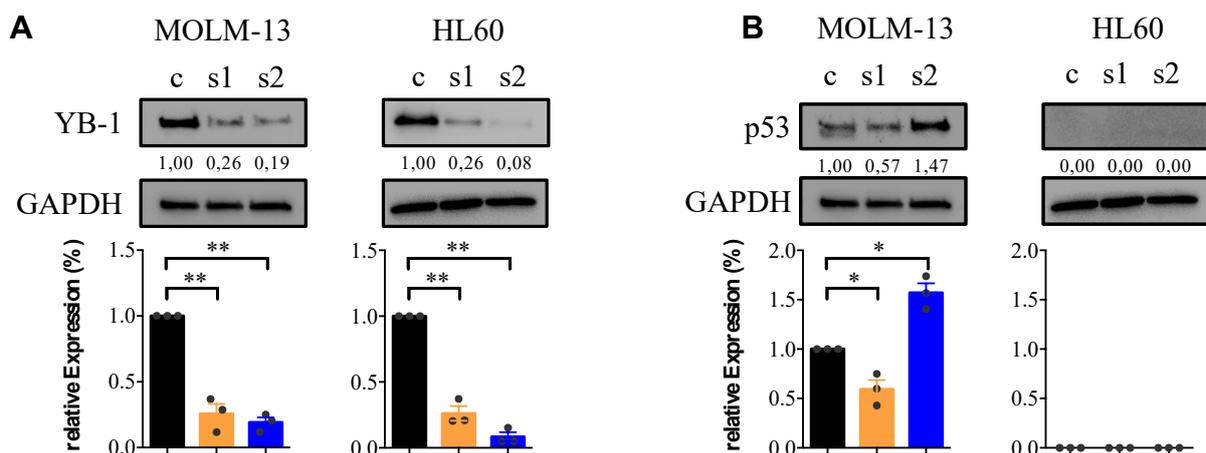


Abbildung 10: Expressionsanalyse von p53 nach KD von YB-1

Western Blot Untersuchung in MOLM-13- und HL60-Zellen zur Quantifizierung der Expression von YB-1 (A) und p53 (B) nach einem shRNA-vermitteltem KD von *YB-1*. Transduziert wurden die Zellen mit einer Kontroll-shRNA scr (c) und zwei verschiedenen shRNAs gegen *YB-1* (s1 bzw. s2). (ungepaarter t-Test, n=3).

Sowohl in MOLM-13- als auch HL60-Zellen konnte eine signifikante Expressionsminderung für YB-1 nachgewiesen werden (Abbildung 10A). Die beiden shRNAs gegen *YB-1* unterschieden sich nur marginal hinsichtlich ihrer KD-Effizienz. Lediglich in den MOLM-13-Zellen konnte in den funktionellen Untersuchungen eine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden (Abbildung 9 C), was sich möglicherweise mit der Induktion des Transkriptionsfaktors p53 begründen lässt (Abbildung 10 B). Dieser Effekt war jedoch nur nach der Transduktion mit der shRNA 2 deutlich ersichtlich. In den p53-deletierten HL60-Zellen (Jiang et al. 2019, Lyu et al. 2017, Wolf und Rotter 1985) konnte dieses Protein im Western Blot wie erwartet nicht

nachgewiesen werden. Eine Apoptoseinduktion war in Einklang damit nicht zu verzeichnen (Abbildung 9 B).

6.3 Evaluation der Flavonoide Fisetin und Luteolin in AML-Zellen

Um YB-1 als therapeutische Zielstruktur in der AML nutzbar zu machen, ist es zunächst notwendig, Substanzen mit potenzieller Wirksamkeit gegen YB-1 im Zellmodell funktionell und biochemisch zu testen. Die Flavonoide Luteolin und Fisetin (Abbildung 11 A, B) sind Phytopharmaka mit bekannter Aktivität gegen YB-1 (Khan et al. 2014, Lin et al. 2018, Reipas et al. 2013). Ein Vorteil dieser Substanzen ist ihre Verfügbarkeit. Sie werden aktuell als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt und können im Handel regulär bezogen werden. Entsprechend der Berichte aus der Literatur beruht die Funktion beider Moleküle unter anderem auf einer Hemmung der Phosphorylierung und Aktivierung von YB-1 (Reipas et al. 2013, Sechi et al. 2018).

Um zunächst zu prüfen inwieweit diese Substanzen eine biologische Aktivität in AML-Zellen aufweisen, wurden die gleichen Zelllinien, die in Abbildung 9 dargestellt sind, mit je drei verschiedenen therapeutisch relevanten Konzentrationen der Inhibitoren (1 μM , 5 μM und 10 μM) behandelt (Dong et al. 2017). Gemessen wurde der Zellmetabolismus mittels MTS-Assay nach drei Tagen Inkubation als Indikator für die Zahl vitaler Zellen (Abbildung 7). Die Apoptoseinduktion wurde mittels AnnexinV-, „Sytox orange“-Färbung für Fisetin bzw. AnnexinV-, „Sytox blue“-Assay für Luteolin am Durchflusszytometer dargestellt. Das „Gating“ erfolgte gegen AnnexinV-positive-Zellen, wodurch apoptotische Zellen detektiert werden konnten. Nach Behandlung mit Fisetin wiesen lediglich MOLM-13-, MONO-MAC-6- und MV4;11-Zellen eine verringerte Zellzahl sowie eine Induktion von Apoptose auf (Abbildung 11 C und D). MV4;11-Zellen zeigten bereits bei 1 μM eine Reduktion der Proliferation auf ca. 75 % des Kontrollwertes. Bei 5 μM -Konzentration wiesen alle drei Zelllinien ein Viertel der ursprünglichen Proliferationsrate auf. Am stärksten zeigte sich die Apoptoseinduktion in MOLM-13-Zellen, welche bereits bei 1 μM Behandlung ca. 20 % und bei 5 μM annähernd 90 % apoptotische Zellen aufwiesen. Die Effekte waren in MV4;11- und MONO-MAC-6-Zellen geringer ausgeprägt. Im Gegensatz dazu zeigten alle anderen AML-Zelllinien keinerlei Inhibition nach Behandlung mit bis zu 10 μM Fisetin (Abbildung 11 C und D). Unter Behandlung mit Luteolin waren MOLM-13-, MONO-MAC-6- und MV4;11-Zellen ebenfalls am sensibelsten und reagierten mit der Induktion von Apoptose. In diesen Zellen nahm die metabolische Aktivität im MTS-Assay ähnlich wie bei Fisetin ab. Die Luteolin Behandlung

fürte darüber hinaus zu einer diskreten Hemmung der Proliferation von OCI-AML3-Zellen auf ca. 50 % sowie von NOMO-1-, HL60- und K562-Zellen auf ca. 70 % bei Behandlung mit 10 µM der Substanz (Abbildung 11 E und F). Dieser Effekt korrelierte jedoch nicht mit einer Induktion von Apoptose.

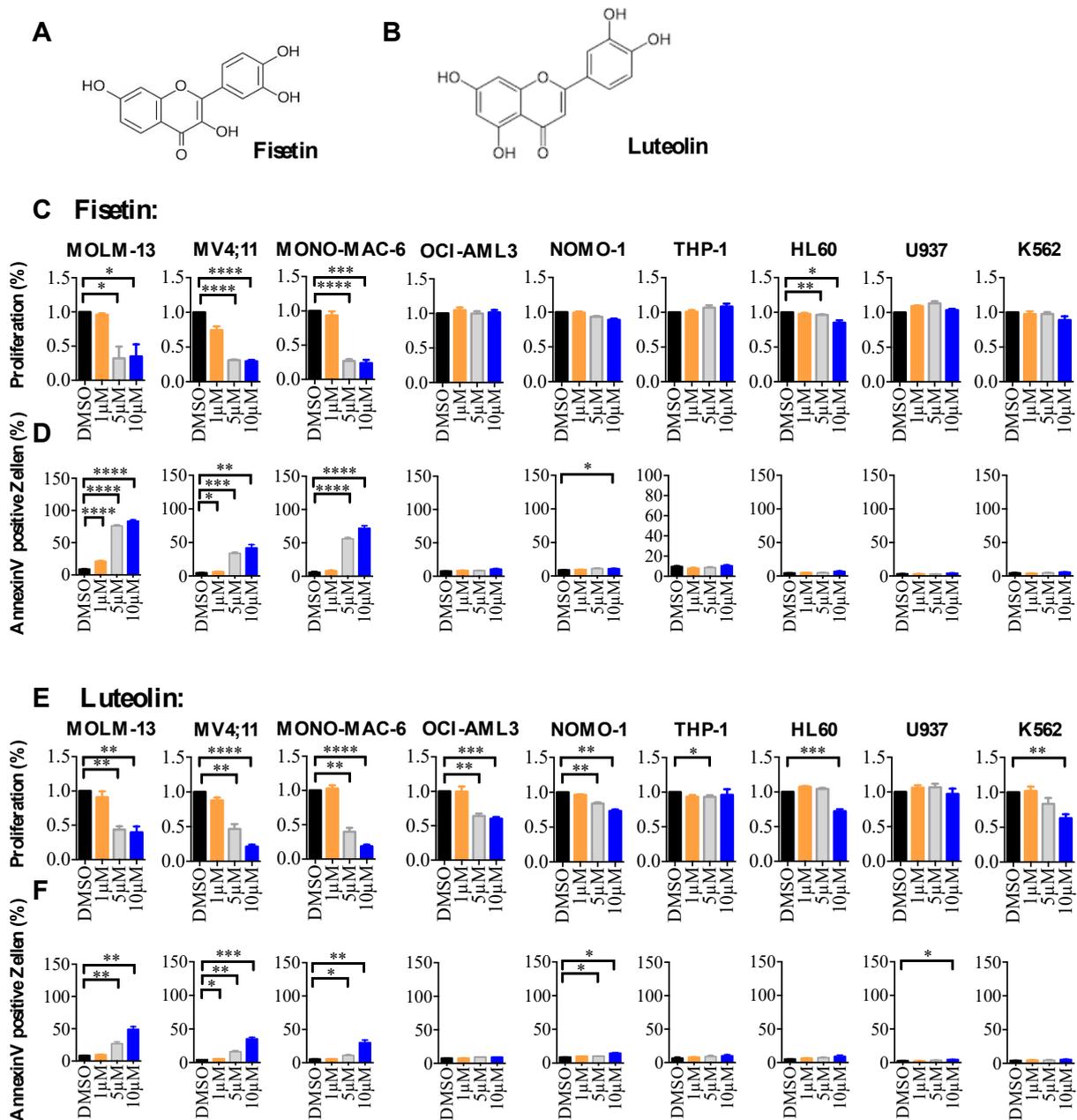


Abbildung 11: Funktionelle Auswirkungen der pharmakologischen Behandlung von AML-Zellen mit Fisetin und Luteolin hinsichtlich Apoptose und Proliferation.

- (A) und (B): Strukturformel der beiden Flavonoide Fisetin (A) bzw. Luteolin (B). (Abbildung höflich zur Verfügung gestellt von Abcam. Abbildung A copyright © 2012 Abcam, Abbildung B copyright © 2013 Abcam)
- (C) und (E): MTS-Assay zur Ermittlung der Hemmung der Proliferation nach 72 h Behandlung mittels drei verschiedener Konzentrationen (1 µM, 5 µM und 10 µM) von Fisetin (C) und Luteolin (E) in AML- Zelllinien. Von der ermittelten OD 490 wurde erst ein Leerwert

abgezogen und anschließend die Werte mit der DMSO-Kontrolle verglichen. Dargestellt ist die Änderung in Bezug zur Kontrolle. (ungepaarter t-Test, n = 4)

(D) und (F): AnnexinV-Sytox-Messung Fisetin (D) bzw. Luteolin (F) behandelter Leukämiezellen. Die Zellen wurden 48 h inkubiert und anschließend im FACS nach Färbung gemessen. Dargestellt sind die AnnexinV-positiven Zellen. (ungepaarter t-Test, n = 4)

Fisetin und Luteolin wurden als Inhibitoren der YB-1-Phosphorylierung an Serin 102 durch die RSK beschrieben, was mutmaßlich die Translokation des CSP in Nukleus verhindert und damit die Wirkungsweise als Transkriptionsfaktor. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Western Blot Experimente zur Detektion der YB-1-Phosphorylierung durchgeführt. Darüber hinaus wurden exemplarisch die Signaltransduktion des JAK / STAT- und ERK / MAPK-Signalweges nach einer Behandlung mit den Phytopharmaka untersucht.

Zur Validierung der zielgerichteten Wirkung der Pflanzenstoffe wurde zunächst die Phosphorylierung von YB-1 untersucht (Abbildung 12). Hier konnten die Zelllinien anhand der Effizienz der Reduktion der Phosphorylierung um mehr bzw. weniger als 50 % oder eine fehlende Hemmung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. In MOLM-13- und MONO-MAC-6-Zellen (Abbildung 12 A) wurde sowohl durch Fisetin als auch Luteolin die YB-1-Phosphorylierung an Serin 102 effizient gehemmt. So ließ sich in den behandelten Lysaten kaum phosphoryliertes YB-1 nachweisen. Dahingegen konnte in K562- und THP-1-Zellen (Abbildung 12 B) nur in Fisetin behandelten Lysaten eine effiziente Reduktion festgestellt werden, die in den Luteolin behandelten Zellen deutlich schwächer ausfiel. In der letzten Gruppe MV4;11-, OCI-AML3- und HL60-Zellen war lediglich bei den mit Fisetin behandelten Zellen eine erniedrigte Phosphorylierung nachweisbar, die jedoch im Vergleich mit den anderen beiden Gruppen weniger effektiv war. Nach Luteolin Behandlung war die Phosphorylierung von YB-1 in dieser Gruppe sogar leicht gesteigert (Abbildung 12 C). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse eine hohe Heterogenität im Reaktionsverhalten der einzelnen Zelllinien und einen unklaren Zusammenhang zwischen YB-1-Phosphorylierung und Proliferationshemmung bzw. Apoptoseinduktion.

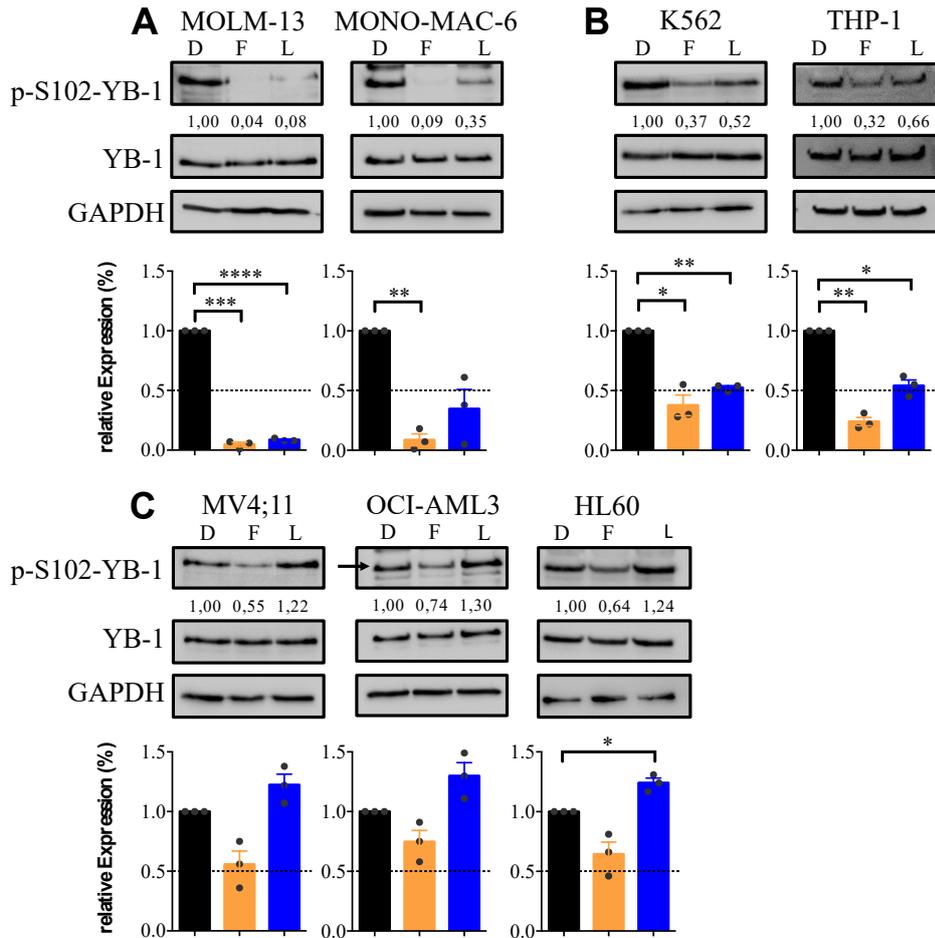


Abbildung 12: Effizienz von Fisetin und Luteolin hinsichtlich der Inhibition der YB-1-Phosphorylierung.

Western Blot Analyse der Expression von an Serin 102 phosphoryliertem YB-1 und „total YB-1“ nach der Behandlung mit 10 μ M Konzentration von Fisetin (F), Luteolin (L) sowie einer DMSO-Kontrolle (D) in AML-Zelllinien (A-C). Es ist die relative Expressionsänderung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle dargestellt. Effektive Änderung der Phosphorylierung ab einer Differenz von 0,5, angedeutet mit Hilfe der horizontalen Linien. (ungepaarter t-Test, n = 3).

Weiterhin wurde eine Analyse der ERK-Phosphorylierung durchgeführt (Abbildung 13). Hier zeigten sich ebenfalls heterogene Ergebnisse, die aber weitestgehend mit den Ergebnissen des YB-1-Phosphorylierungsstatus korrelierten. In MOLM-13- sowie in MONO-MAC-6-Zellen wurde die Phosphorylierung von ERK durch beide Flavonoide reduziert (Abbildung 13 A), wobei sich Fisetin effektiver als Luteolin darstellte. In K562 stieg unter der Behandlung mit Fisetin die ERK-Phosphorylierung um mehr als das Doppelte an, während diese unter Luteolin annähernd konstant blieb. In THP-1-Zellen verhielt sich der Phosphorylierungsstatus bei beiden Inhibitoren annähernd stabil (Abbildung 13 B). Bei der OCI-AML3-, MV4;11- und HL60-Zelllinie wurde sowohl unter Fisetin- als auch Luteolin-Behandlung ERK stärker phosphoryliert (Abbildung 13 C). Am eindrücklichsten war dieser Effekt bei den HL60-Zellen und MV4;11-Zellen, bei den sich die Werte mindestens verdoppelten.

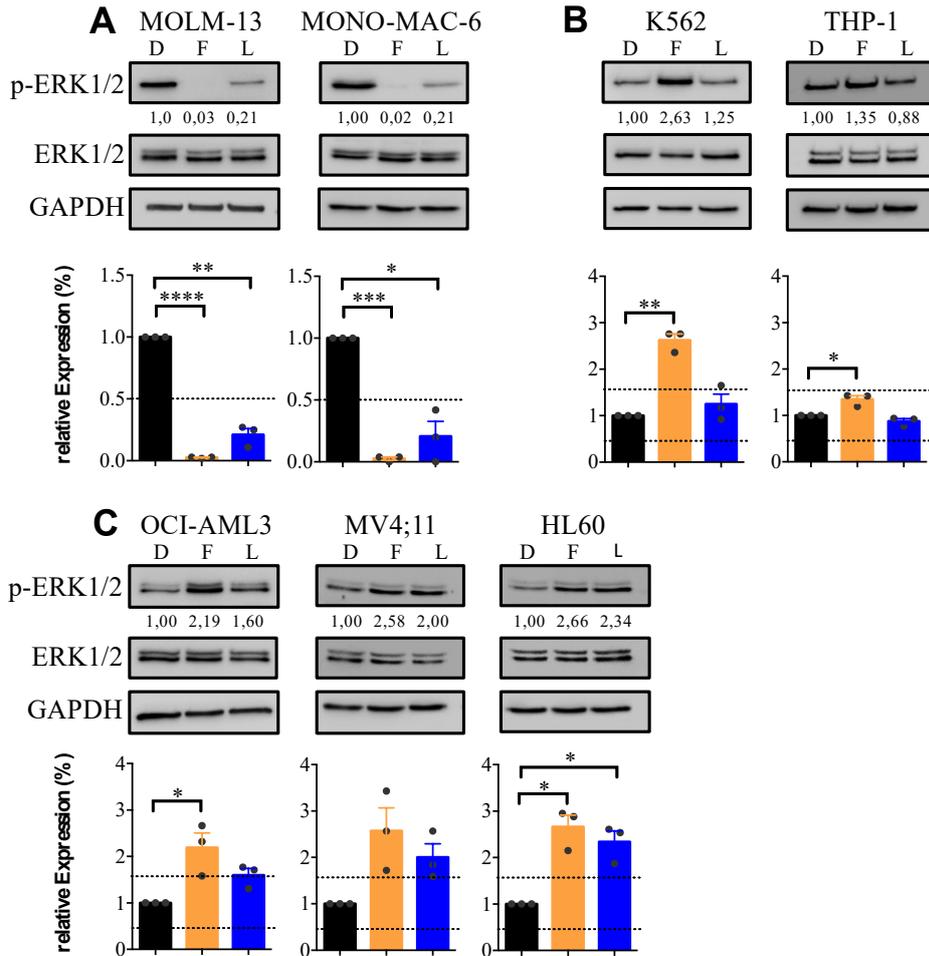


Abbildung 13: Auswirkungen von Fisetin und Luteolin auf den ERK / MAPK-Signalweg.

Analyse der relativen Expressionsänderung von p-ERK1/2 mittels Western Blot. Behandlung und Herstellung der Lysate sowie densitometrische Auswertung erfolgte wie in Abbildung 12. (ungepaarter t-Test, n = 3).

Neben dem Ras / Raf / MEK / ERK-Signalweg gilt auch der JAK / STAT-Signalweg als Interaktionspartner von YB-1 (Herzog et al. 2014). Daher wurde dessen Aktivierung anhand der Phosphorylierung des STAT5 untersucht (Abbildung 14). In MOLM-13-, MONO-MAC-6- und MV4;11-Zellen wurde die Phosphorylierung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach der Behandlung reduziert (Abbildung 14 A). In MOLM-13- und MV4;11-Zellen konnte man nahezu keine Phosphorylierung mehr feststellen. Dem gegenüber zeigten K562- und THP-1-Zellen eine ineffizientere Reduktion (Abbildung 14 C). In THP-1-Zellen blieben die Phosphorylierung bei beiden Inhibitoren näherungsweise konstant, in K562-Zellen ergab sich unter Fisetin Inkubation eine effiziente Reduktion der STAT5-Phosphorylierung. In OCI-AML3- und HL60-Zellen konnte weder in der Kontrolle noch in behandelten Zellen phosphoryliertes STAT5 nachgewiesen werden (Abbildung 14 B).

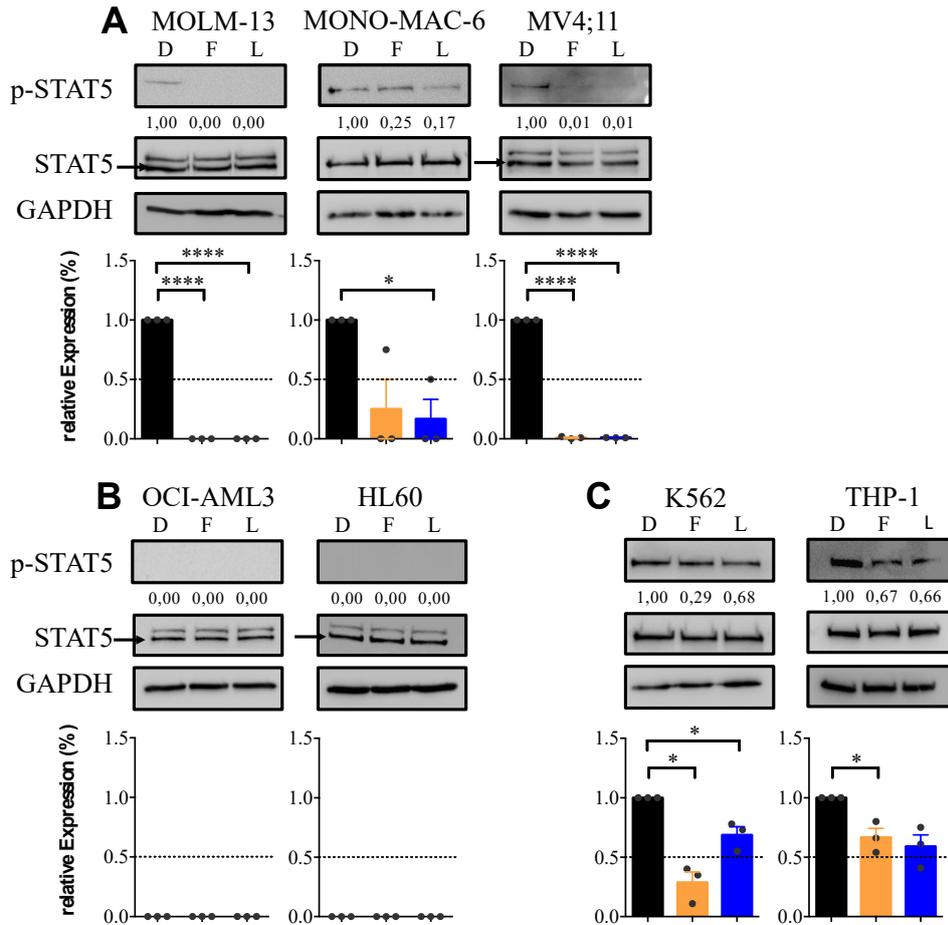


Abbildung 14: Beeinflussung des STAT-Signalweges durch Fisetin und Luteolin

Untersuchung der relativen Expressionsänderung der Phosphorylierung von STAT5 mittels Western Blot in AML-Zelllinien (A-C). Herstellung und Behandlung der Lysate sowie densitometrische Auswertung erfolgte wie in Abbildung 12. (ungepaarter t-Test, n = 3).

Zusammenfassend zeigte sich eine Wirksamkeit der beiden Substanzen in bestimmten AML-Zelllinien. Die Ergebnisse waren jedoch nicht vollständig konsistent. Es zeigten sich Unterschiede sowohl zwischen den beiden Inhibitoren und auch im Vergleich der phyto-pharmakologischen Behandlung mit dem Effekt nach der genetischen Inaktivierung von *YB-1*.

6.4 Vergleich von genetischer und pharmakologischer Inhibition von YB-1

Zur Gegenüberstellung der Ergebnisse aus der genetischen und der pharmakologischen Inhibition von YB-1 wurden korrelative Untersuchungen genutzt. Zunächst wurden die Auswirkungen hinsichtlich Proliferationshemmung im Vergleich von pharmakologischer Inhibition (Fisetin / Luteolin via MTS Assay) mit der genetischen Inaktivierung von *YB-1* (mittels Zellzahl) jeweils an Tag 3 evaluiert (Abbildung 15 A). Die Werte beider Methoden wurden zuvor mit der Kontrollgruppe in Relation gesetzt. Der Pearson Koeffizient r ist sowohl

nach der Behandlung mit Luteolin als auch mit Fisetin in Bezug zu der genetischen Intervention annähernd gleich Null. Die dargestellte Regressionslinie (linearen Regression) verdeutlicht dies visuell. Das bedeutet, dass es keinen statistischen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen beider Methoden gibt. Lediglich in K562-Zellen waren beide Methoden ähnlich insuffizient und in MOLM-13 bzw. MV4;11 ähnlich proliferationshemmend. In den übrigen Zelllinien zeigten sich mit den beiden Methoden grundlegend unterschiedliche Ergebnisse. Zur Validierung der Konsistenz der beobachteten Effekte zwischen den beiden shRNAs wurde die Effektstärke in Bezug auf die Zellzahl-Reduktion nach *YB-1*-KD mit den beiden shRNAs in Bezug zueinander gesetzt (Abbildung 15 B). Hier beträgt der Korrelationskoeffizient annähernd 0,9, was für einen klaren direkten Zusammenhang und damit konsistente Effekte der beiden shRNAs spricht. Analog wurden die beiden Phytopharmaka gegenübergestellt (Abbildung 15 C), die ebenfalls eine starke Korrelation ihres Wirkungsprofils in AML-Zellen aufwiesen.

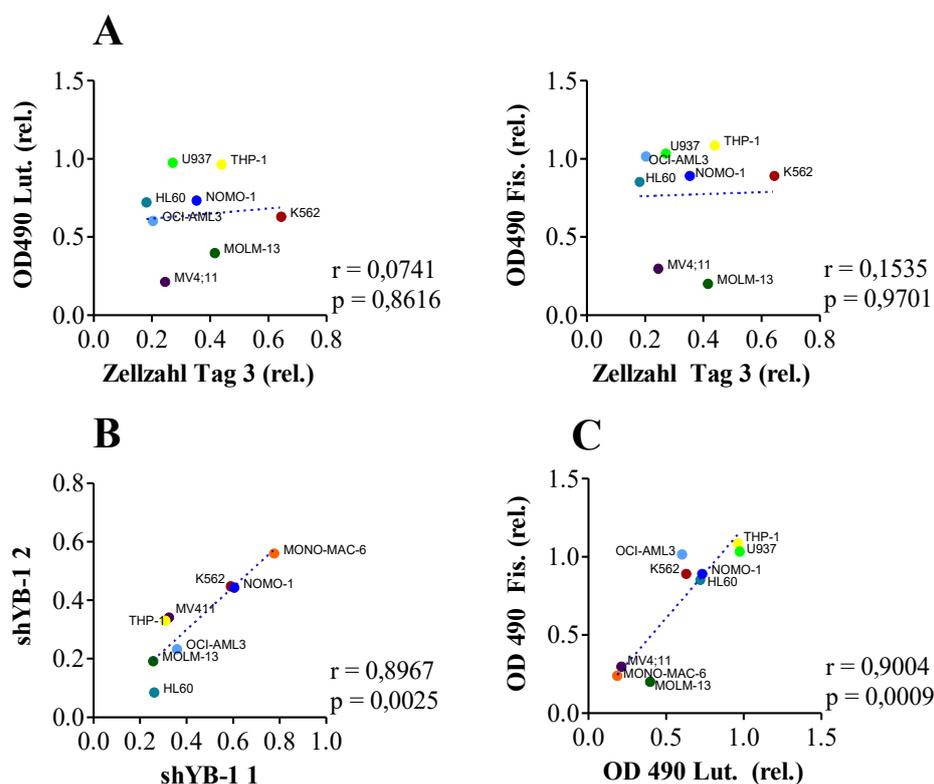


Abbildung 15: Vergleich proliferationshemmender Eigenschaften nach pharmakologischer und genetischer Intervention

Mittels Pearson-Korrelation werden folgende Daten gegenübergestellt:

- (A) Relative OD 490 nach Luteolin bzw. Fisetin Behandlung mit der relativen Zellzahl an Tag 3. Es wurde der Mittelwert der beiden shRNAs gebildet.
- (B) Relative Zellzahl an Tag 3 nach KD durch shRNA-*YB-1* 1 bzw. 2. Es wurde der Mittelwert aus den jeweiligen Triplikaten herangezogen.
- (C) Relative OD 490 nach Luteolin bzw. Fisetin Behandlung.

Der Pearson Koeffizient r und der p -Wert sind bei den jeweiligen Graphen angegeben.

Analog wurden Änderungen der Phosphorylierung von YB-1 und Auswirkungen auf die Proliferation als Resultat einer Behandlung mit Fisetin (Abbildung 16 A, D und G) und Luteolin (Abbildung 16 B, E und H) evaluiert, gemessen an der relativen OD 490 im MTS-Assay. Dabei ergab sich kein signifikanter Zusammenhang, jedoch ein leichter Trend. Vergleicht man allerdings die Hemmung der S102-Phosphorylierung durch Fisetin mit der von Luteolin zeigte sich wiederum eine starke und signifikante Korrelation (Abbildung 16C). Die Ergebnisse weisen auf eine ähnliche Wirkungsweise beider Substanzen in Bezug auf YB-1 hin.

In identischer Weise wurden die Änderungen der YB-1-Phosphorylierung mit der ERK1/2-Phosphorylierung gegenübergestellt. Hier zeigten sich sowohl unter Behandlung mit Fisetin als auch mit Luteolin eine signifikante Korrelation (Abbildung 16 D und E). Wie durch die publizierte Literatur suggeriert, steht die S102-Phosphorylierung von YB-1 also im komplexen Zusammenhang mit dem ERK-Signalweg. Das Muster, mit dem Fisetin und Luteolin ERK inhibieren, war ebenfalls konsistent (Abbildung 16 F)

In der Korrelation der S102-Phosphorylierung mit der STAT5-Phosphorylierung zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang (Abbildung 16 G - I).

Zusammenfassend war die genetische Inaktivierung von *YB-1* in Hinblick auf eine Proliferationshemmung effektiver als die Behandlung mit den Flavonoiden. Die beiden shRNAs bzw. Inhibitoren unterschieden sich allerdings jeweils nur minimal in ihrem Wirkungsprofil.

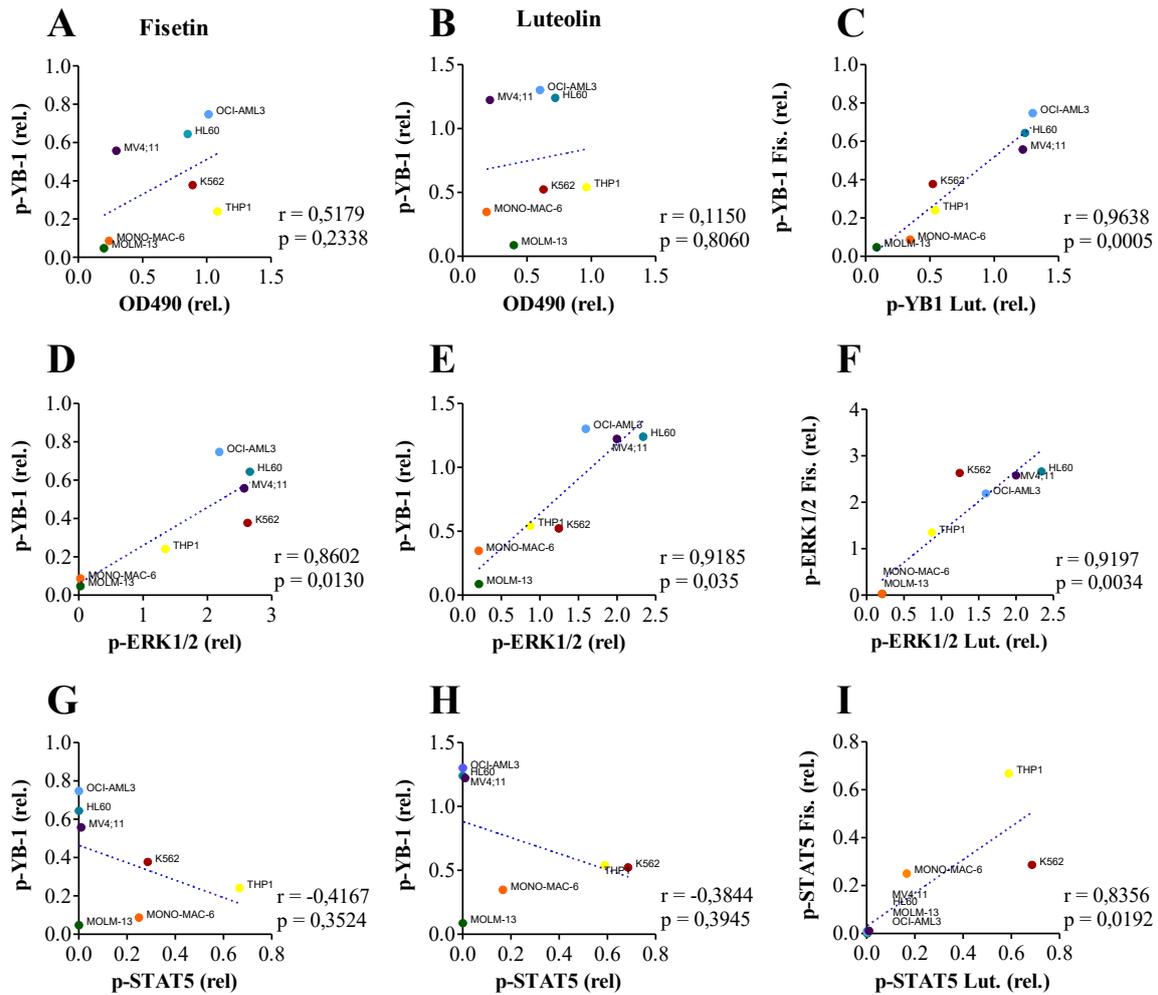


Abbildung 16: Gegenüberstellung des YB-1-Phosphorylierungsstatus mit Auswirkungen hinsichtlich Proliferation und Signaltransduktion

Pearson-Korrelation zum Vergleich von den Auswirkungen von Fisetin und Luteolin auf die Phosphorylierung von YB-1 und (A) der Proliferationsänderung gemessen mit der relativen OD 490 im MTS Assay, (B) der Aktivierung der ERK1/2-Signalweges bzw. (C) der STAT5-Signalkaskade. Der Pearson Koeffizient r und der p -Wert sind bei den jeweiligen Graphen angegeben.

7 Diskussion

7.1 YB-1 als essenzielles Protein in der akuten myeloischen Leukämie

Anhand der Auswertung der transkriptionellen Expression der verschiedenen Kälteschockproteine wurde YB-1 charakterisiert: es war höher exprimiert in maligne transformierte Zellen der AML im Vergleich zu hämatopoetischen Stammzellen und deutlich weniger exprimiert in differenzierten Zellen (Abbildung 8). YB-1 erfüllt essenzielle Funktionen in der embryonalen Entwicklung und in neoplastischen Systemen wie der AML, beispielsweise bei der Reaktion auf Stressoren, Regulierung der Proliferation, Apoptose und Differenzierung. Dahingegen scheint die Funktion in homöostatischen, adulten Geweben obsolet zu sein (Lindquist und Mertens 2018). YB-1 besitzt wichtige Funktionen im mRNA-Metabolismus, insbesondere in der Stabilisierung der mRNA, beim „Splicen“ und bei der Initiation der Translation (Deschênes-Simard et al. 2014, Goodarzi et al. 2015, El-Naggar et al. 2015). Daher sind insbesondere Zellen mit einer gesteigerten Proteinbiosynthese, wie sie Tumorzellen darstellen, von einem dynamischen RNA-Metabolismus abhängig. Dadurch schützt YB-1 maligne transformierte Zellen vor Stress. YB-1 wird in der Literatur zudem als Inhibitor und Modulator von *TP53* und auch von dessen Produkt p53 beschrieben (Deschênes-Simard et al. 2014, Lyabin et al. 2014), d. h. wenn die YB-1 Expression vermindert ist, sollte die von p53 erhöht sein. In dem shRNA-vermitteltem KD konnte man diesen Zusammenhang nur in einer von zwei shRNAs bestätigen (siehe Abbildung 10 B). Ebenso wird ein hemmender Effekt auf Regulationsproteine der Seneszenz wie p16 und p21 beschrieben (Kotake et al. 2013, Basaki et al. 2010). In Zellen des Multiplen Myeloms zeigte sich nach einer Expressionsminderung des CSP zum einen eine Induktion der Apoptose und zum anderen eine p21-abhängige Hemmung der Proliferation (Chatterjee et al. 2008). In Osteosarkom-Zellen wird der Zellzyklusarrest nach *YB-1*-KD mit einer Akkumulation am G₁-S-Phasen-Übergang begründet (Fujiwara-Okada et al. 2013), der u. a. auch durch p16, p21 und p53 vermittelt wird (Wang et al. 2002, Hartwell und Kastan 1994). Insgesamt konnte man den in der Literatur beschriebenen Effekt von YB-1 auf p16, p21 und p53 nicht konsistent bestätigen. Hier zeigten sich die Limitation des shRNA-vermittelten KD von Proteinen auf. Durch die hergestellte shRNA ließ sich die Expression von YB-1 stabil supprimieren, was anhand der durchgeführten Western Blots deutlich gezeigt werden konnte. Dies geschieht über die Prozessierung zu einer siRNA, welche die mRNA von *YB-1* im RISC blockiert und dadurch die Translation hemmt. Die Kapazität der RISC ist nicht genauer beschrieben. So können freie siRNA-mRNA-Komplexe zu möglichen „off-target-effects“ führen, wenn eine zu hohe shRNA-Konzentration vorliegt (Scherer und Rossi 2003).

Außerdem können andere Transkripte ähnlich komplementäre Zielregionen wie die mRNA von *YB-1* aufweisen, mit der die siRNA interagiert. Durch diese ungewollten „silence“-Effekte würden auch andere Proteine in ihrer Translation gehemmt werden (Tilesi et al. 2009). Die beiden verwendeten shRNAs gegen *YB-1* waren sich hinsichtlich ihrer Effektivität im *YB-1*-KD sehr ähnlich, unterschieden sich jedoch deutlich z. B. hinsichtlich ihrer Potenz, p53 zu induzieren (Abbildung 10 B und Abbildung 16 B). Oben genannte, mögliche „off-target“-Mechanismen können die unterschiedlichen Effekte der beiden shRNAs auch in Hinblick auf p16, p21 und p-ERK1/2 (Abbildung 17) erklären. Dies ist der Grund dafür, dass im Rahmen guter wissenschaftlicher Praxis auch für relativ spezifische Methoden wie der RNA-Interferenz mindestens zwei verschiedene shRNAs bzw. siRNAs für diese Art von Experimenten verwendet werden müssen. Außerdem sollte die Tatsache nicht vernachlässigt werden, dass es sich bei der viralen Transduktion und dem shRNA-vermittelten KD um einen enormen Stress für die Zelle handelt, der sich in einer Aktivierung von Stress-Signalwegen äußern kann. Eine Möglichkeit, spezifischere Aussagen über die funktionellen Zusammenhänge treffen zu können, ist die zusätzliche Verwendung des CRISPR-Cas9-Systems zur Induktion von spezifischen Gen-„knockouts“ (KO). Während des Erstellungsprozesses dieser Arbeit wurde diese Methode weiterführend genutzt, um die Erkenntnisse dieser Arbeit zu validieren und zu erweitern. Aufgrund der deutlich verbesserten Spezifität und einem geringeren Maß an Methoden-induziertem Stress für die Zelle wird das CRISPR-Cas9-System in den nächsten Jahren die RNA-Interferenz in den meisten Bereichen der biomedizinischen Forschung möglicherweise sogar ablösen.

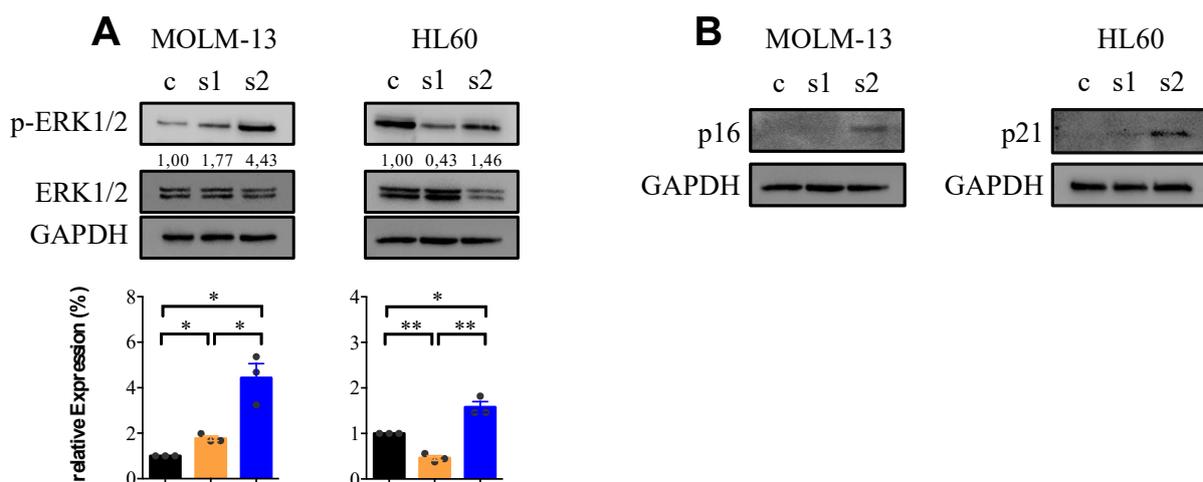


Abbildung 17: Auswirkungen eines *YB-1*-KD auf *ERK1/2* und Seneszenzmarker

shRNA-vermittelter KD von *YB-1* in MOLM-13- und HL60-Zellen. Ermittlung der Expression von p-ERK1/2 (A), p16 bzw. p21 (B) mittels Western Blot. Herstellung und Behandlung der Lysate sowie densitometrische Auswertung erfolgte wie in Abbildung 12. (ungepaarter t-Test, n = 3).

Funktionell konnte mithilfe des shRNA-vermittelten KD gezeigt werden, dass YB-1 essenziell für die Proliferation der meisten verwendeten Leukämie-Zellen ist. (Abbildung 9). Die Induktion von Apoptose spielte jedoch eine untergeordnete Rolle. In nur zwei Zelllinien, MOLM-13 und OCI-AML3, war die Apoptoseinduktion relevant. Gleichzeitig handelt es sich bei MOLM-13 und OCI-AML3 um die einzigen beiden Zellreihen, die über ein nicht mutiertes *TP53* verfügen (Weisberg et al. 2015). In MOLM-13-Zellen konnten eine Expressionssteigerung von p53 zumindest in einer shRNA gegen *YB-1* gezeigt werden (Abbildung 10 B). Insgesamt ließ sich eine deutliche Abhängigkeit der AML-Zellen gegenüber YB-1 in den meisten untersuchten Zelllinien nachweisen.

Zusammenfassend konnte bestätigt werden, dass YB-1 bei AML-Zellen eine zentrale Funktion in der Regulation der Proliferation einnimmt und dadurch essenziell für Krebszellen der akuten myeloischen Leukämie *in vitro* ist. Ein genauer molekularbiologischer Mechanismus konnte in dieser Arbeit jedoch nicht adressiert werden. Die Identifikation dieses Mechanismus ist aktuell Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten.

7.2 Fisetin und Luteolin hemmen Proliferation und induzieren Apoptose in einigen AML-Zelllinien

Die beiden Phytopharmaka Fisetin und Luteolin gelten in der Literatur als Inhibitoren der Phosphorylierung von YB-1, haben aber auch Einfluss auf viele andere Signalwege, wodurch eine endgültige Klärung ihrer Wirkungsweise schwierig ist (Imran et al. 2019, Youns und Abdel Halim Hegazy 2017, Sak et al. 2016). Die Inhibition des CSP könnte eine mögliche Erklärung für die beschriebenen hemmenden Effekte auf das Tumorwachstum in verschiedenen Zell- und Tier-Modellen sein (Sechi et al. 2018, Khan et al. 2014, Deng et al. 2017, Reipas et al. 2013), was in Experimenten mit AML-Zelllinien überprüft wurde. Hierfür wurden therapeutisch relevante Konzentrationen der beiden Flavonoide genutzt, basierend auf *in vivo* Studien (Davies et al. 2015, Reipas et al. 2013). Insgesamt zeigten jedoch sowohl Luteolin als auch Fisetin keinen Einfluss in AML-Zellen, der konsistent mit den Erkenntnissen der genetischen Inaktivierung war (siehe Abbildung 15 A). Von den zehn untersuchten Zelllinien sprachen nur MOLM-13, MV4;11 und MONO-MAC-6 hinsichtlich einer Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion auf die Behandlung mit Fisetin an. Nach Luteolin Behandlung reduzierte sich die Proliferation in MOLM-13-, MV4;11-, MONO-MAC-6- und in geringem Maße in OCI-AML3-, NOMO-1-, K562- und HL60-Zellen, jedoch wurde die Apoptose nur in den ersten drei beschriebenen Zelllinien induziert. Es ließ sich kein klarer Zusammenhang mit den

genetischen Charakteristika der verwendeten Zelllinien feststellen (Tabelle 1). Fisetin und Luteolin unterschieden sich hinsichtlich ihrer Effizienz: Fisetin war in drei Zelllinien effektiver als Luteolin, indem Fisetin sowohl stärker Apoptose induzierend als auch Proliferation hemmend war. Allerdings zeigte Luteolin insgesamt in mehr Zelllinien einen hemmenden Effekt (Abbildung 15 C). Beide Inhibitoren haben ein ähnliches Verhalten im Hinblick auf die Inhibition der YB-1-Phosphorylierung, unterscheiden sich jedoch vermutlich hinsichtlich ihrer Wirkungsweise (Abbildung 16 C). Während angenommen wird, dass Fisetin YB-1 direkt bindet, hemmt Luteolin primär die p90-ribosomale S6-Kinase und damit indirekt die Phosphorylierung von YB-1 (Abbildung 3). Konsistent mit diesen postulierten Wirkungsmechanismen zeigte sich in allen mit Fisetin behandelten Zelllinien eine Reduktion der Phosphorylierung von YB-1. In den mit Luteolin behandelten Proben konnte in allen Zelllinien bis auf MV4;11, OCI-AML3 und HL60 die YB-1-Phosphorylierung reduziert werden (Abbildung 12). Auf diesen Erkenntnissen basiert die Schlussfolgerung, dass die Hemmung der untersuchten S102-Phosphorylierung von YB-1 - entgegen suggestiver Behauptungen in der Literatur - nicht prädiktiv für die zelluläre Wirksamkeit von Luteolin und Fisetin ist. Eine mögliche Erklärung dafür ist die komplexe Regulation von YB-1 durch multiple Phosphorylierung, welche mittels quantitativen Phosphoproteom-Analysen im Kontext myeloproliferativer Neoplasien in einem anderen Projekt beschrieben wurde (Daten ersichtlich in Proteom eXchange: PXD006921; Paper aktuell noch nicht veröffentlicht). Trotz entsprechender Hypothesen in der Literatur wird die funktionelle Aktivierung von YB-1 entsprechend nicht suffizient durch Darstellung der S102-Phosphorylierung repräsentiert.

Darüber hinaus ist bekannt, dass sowohl Luteolin als auch Fisetin YB-1-unabhängig Einfluss auf die zelluläre Signaltransduktion nehmen. Die durchgeführten exemplarischen Western Blot Untersuchungen für die Aktivierung des ERK- sowie des JAK-STAT5-Signalweges zeigten inkonsistente Ergebnisse zwischen den Zelllinien. Es bestand jedoch eine klare Korrelation zwischen der Inhibition von ERK und / oder STAT5 und der Sensitivität der untersuchten Zelllinien auf Fisetin und Luteolin. Die drei Zelllinien, die am deutlichsten durch die Inhibitoren affektiert wurden (MOLM-13, MV4,11 und MONO-MAC-6), zeigten konsistent eine Reduktion der ERK- und / oder STAT5-Phosphorylierung. In Zelllinien, die sich funktionell nicht-responsiv verhielten, wurden die genannten Signalwege durch Fisetin oder Luteolin-Behandlung nicht beeinflusst. Die drei responsiven Zelllinien haben gemein, dass sie aktivierende Mutationen der FLT-3-Kinase tragen (Milella et al. 2001, Morgan et al. 2001). Sowohl der ERK- als auch der STAT5-Signalweg werden durch diese Mutanten von FLT-3 konstitutiv aktiviert. Fisetin und Luteolin scheinen diese Aktivierung zu hemmen.

Leukämiezellen können im Zuge von Adaptationsvorgängen u. a. ABC-Transporter exprimieren, die Chemotherapeutika beispielsweise direkt wieder aus den Zellen ausschleusen (Ross 2000, Konopleva et al. 2002) und damit deren Wirkung verhindern (Bonhoure et al. 2006). Insbesondere in Stresssituationen werden über das MDR-Gen Ca^{2+} -Kotransporter exprimiert, die exogene Stoffe aus der Zelle ausschleusen (Karp 2001). Als ein „up-stream“ Effektor des MDR-Gens gilt u. a. der ERK- und JAK / STAT-Signalweg (Shen et al. 2011, Jagadeeshan et al. 2017). Diese Signalwege sind in den sensitiven MOLM-13- und MONO-MAC-6-Zellen nicht mehr aktiviert, während in den scheinbar resistenten HL60- und THP-1-Zellen eine erhöhte Phosphorylierung und gleichzeitig ein schlechteres Ansprechen auf eine Fisetin- oder Luteolinbehandlung vorliegt. Die Expression von diesen ABC-Transportern ist auch *in vivo* mit einem schlechten Ansprechen des Tumors auf Chemotherapeutika und damit einer schlechten Prognose assoziiert (Damiani et al. 2007)

Interessanterweise zeigte sich die ERK-Phosphorylierung bei der konstitutiv aktiven BCR-ABL-Kinase in K562-Zellen unbeeinflusst von Fisetin oder Luteolin. Diese Beobachtung suggeriert, dass die verwendeten Phytopharmaka möglicherweise die Signaltransduktion unterhalb von FLT-3 und anderen strukturverwandten Tyrosinkinase-Rezeptoren hemmen. Dadurch ließe sich das beobachtete Profil der zellulären Sensitivität der verwendeten Zelllinien erklären. Entsprechend ist zu vermuten, dass YB-1 und insbesondere die S102-Phosphorylierung von YB-1 in diesen Systemen keine funktionell relevante Zielstruktur von Fisetin und Luteolin ist. Das genaue Profil der molekularen Wirksamkeit der beiden Phytopharmaka kann im Rahmen dieser Arbeit nicht definiert werden. Anhand der Daten der Experimente kann man vermuten, dass multiple Strukturen in der Zelle affektiert sind. Zusammenfassend kann man aus den dargelegten Gründen nicht davon ausgehen, dass Fisetin und Luteolin attraktive pharmakologische Werkzeuge für das Adressieren molekularer Fragestellungen sind.

Diese Erkenntnisse sind in der Hinsicht wichtig und relevant, als dass in der Literatur vielfach die Behauptung aufgestellt wird, dass die S102-Phosphorylierung der essenzielle „Schalter“ für die YB-1-Aktivierung und dessen relevante Funktion im Nukleus sei (Gieseler-Halbach et al. 2016, Lindquist und Mertens 2018). Die Daten aus dieser Arbeit sowie Ergebnisse weiterer Studien zur Rolle von YB-1 in JAK2-mutierten Zellen zeigen in diesem Zelltyp keine JAK-abhängige Modifikation dieser Phosphorylierungsstelle (Herzog et al. 2014). In Einklang mit den in der Literatur publizierten Daten steht der inhibitorische Effekt auf die YB-1-Phosphorylierung an Serin 102 indirekt in einem Zusammenhang mit der Aktivierung des ERK1/2-Signalweges (Abbildung 16 D, E und F).

Eine mögliche Erklärung für die diskreten Unterschiede zwischen den beiden Phytopharmaka stellen die Zielstrukturen dar. Fisetin gilt als direkter Hemmer von YB-1, der die Phosphorylierung an S102 und dadurch die Translokation in den Nukleus verhindert (Khan et al. 2014). Die Phosphorylierung von YB-1 an dieser „phospho-site“ stellt nur eine von vielen möglichen Aktivierungen des CSP dar. So wurden in einem Phosphoproteom-Screening von YB-1 mehrere JAK2-V617F-mediierte Sequenzen gefunden, die relevant für die Aktivierung von YB-1 sind. Zu diesen gehörte S102 allerdings nicht (Herzog et al. 2014). Insgesamt scheinen die nukleären Funktionen von YB-1 für das Überleben und die Kompetitivität der AML-Zellen denen im Zytosol, insbesondere dem mRNA-Metabolismus, nachzustehen, was im nächsten Punkt genauer diskutiert wird. Luteolin als Inhibitor der RSK greift auch in den Signalweg „up-stream“ von YB-1 ein. Durch die Hemmung der Kinase wird die Phosphorylierung von YB-1 an S102 indirekt inhibiert, allerdings auch viele andere Funktionen, mit denen die RSK assoziiert ist. Die aktivierte Form der RSK transloziert in den Nucleus und nimmt dort Einfluss auf zellzykluskontrollierende Transkriptionsfaktoren wie CREB1 und NF- κ B und proapoptotische Proteine wie BAD (Anjum und Blenis 2008).

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass die Phosphorylierung an S102 und damit die Aktivierung von YB-1 in der AML nur eine geringe Relevanz im Hinblick auf das Zellüberleben hat. Mögliche „off-target“ Effekte der Phytopharmaka können die Apoptose-induktion und Proliferationshemmung unabhängig von deren Wirkung auf YB-1 erklären. In dieser Arbeit wurde zuerst die Relevanz von YB-1 mittels RNA-Interferenz und im Anschluss die Wirkung der mutmaßlichen YB-1-Inhibitoren Fisetin und Luteolin in AML-Zellen untersucht. Nach genetischer Inaktivierung wurde eine Abnahme der Proliferation in sieben von acht Zelllinien festgestellt, während die beiden Flavonoide in lediglich drei Zelllinien einen ähnlichen Effekt aufwiesen und die Proliferation um mehr als 50 % reduzierten. Insgesamt lässt sich also keine überzeugende Korrelation zwischen genetischer und pharmakologischer Beeinflussung zeigen (Abbildung 15 A). Diese Unterschiede hinsichtlich der Effektivität der beiden Ansätze auf die Proliferationshemmung sind jedoch keine Folge der unterschiedlichen Methoden, die zur Proliferationsmessung verwendet wurden, wie mittels korrelativem Vergleich gezeigt werden konnte (Abbildung 7).

7.3 Mögliches Modell zur Regulation von YB-1 und die Wirkungsweise von Fisetin und Luteolin

Zusammenfassend lässt sich auf Grundlage der Untersuchungen in dieser Arbeit und der aktuellen Literatur folgendes Modell zur Wirkungsweise und Regulation von YB-1 sowie der Wirkungsweise der beiden Flavonoide Fisetin und Luteolin aufstellen (Abbildung 18).

Aufgrund seiner CRS ist YB-1 vorrangig paranukleär im Zytosol lokalisiert. Dort wirkt es an der Stabilisierung von mRNA, ist an dessen Prozessierung und der Modifikation der Translation beteiligt. Externe Stimuli wie Wachstumshormone oder Zytokine sorgen über eine Phosphorylierung von YB-1 an Serin 102 für die Translokation in den Nukleus. Dort ist YB-1 mutmaßlich als Transkriptions- und vor allem als Splicing-Faktor an der Expression von Genen beteiligt. Externe Signale nehmen über Signalkaskaden Einfluss auf diesen Prozess. Zum einen wird der Ras / Raf / MEK / ERK-Signalweg aktiviert, der über die RSK eine YB-1-Phosphorylierung und -Aktivierung

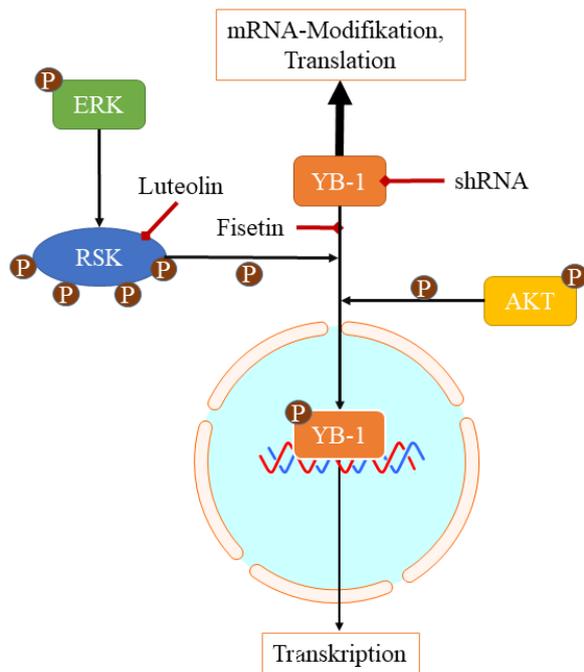


Abbildung 18: Darstellung möglicher Translokationsmechanismen von YB-1 sowie der angenommenen Wirkungsweise von Fisetin und Luteolin.

vermittelt. Daneben kann auch AKT YB-1 phosphorylieren oder nach DNA-Schaden das S20-Proteasom aktivieren, welches nach proteolytischer Prozessierung von YB-1 einen nukleären Transport über die NLS bedingt. Die S102-Phosphorylierung von YB-1 scheint in den untersuchten Systemen jedoch von untergeordneter Relevanz zu sein, wodurch die Inhibition dieser Phosphorylierungsstelle die Funktion des Kälteschockproteins nicht suffizient inhibiert. Im Gegensatz dazu scheinen die zytosolischen Funktionen von YB-1 ausschlaggebend für dessen Relevanz in Zellpopulationen der AML zu sein.

7.4 *In vivo* Experimente und Ausblick

Im Zuge dieses Projektes hat man neben der phytopharmakologischen und genetischen Beeinflussung von YB-1 auch sowohl Experimente *in vivo* als auch mit primären Patientenproben durchgeführt (Perner et al. 2017). In primären Patientenproben konnte gezeigt werden, dass mit einer Zunahme der Malignität der Erkrankung auch die Expression von YB-1 zunimmt. So zeigt sich auf Proteinebene mehr YB-1 in Proben von Patienten mit AML verglichen mit MDS-Patientenproben. Außerdem bestätigte sich der Effekt nach KD von *YB-1* in AML-Zelllinien auch in den Patientenproben, wo primäre Blasten nach einer Transduktion der shRNA und einer Supprimierung des CSP ihre Teilungsfähigkeit verloren. In einem *in vivo* Ansatz wurden die Auswirkungen eines *YB-1*-„knockout“ (KO) im Mausmodell überprüft. Murine Modelle der AML verloren durch *YB-1*-KO ihre „self-renewal capacity“ im Methylzellulose-basierten Kolonie-Assay. *In vivo* zeigte sich ein verlängertes Überleben und eine reduzierte Penetranz in den *YB-1*-defizienten Leukämien.

Aktuell wird an der detaillierten Charakterisierung der Wirkungsweise von YB-1 in der AML geforscht. Hierbei konnte mittels ChIP-sequencing / RNA-sequencing die untergeordnete Rolle der DNA-Bindung von YB-1 bestätigt werden. Dies rückt die zytosolischen Funktionen von YB-1 näher in den Fokus weiterer Untersuchungen. Offensichtlich ist die Regulation der Translation von YB-1 ein essenzieller Faktor in der Stressadaptation und damit in der Aufrechterhaltung einer AML. Um dies näher zu evaluieren, werden in einer RNA-Sequenzierung von ribosomal gebundenen Transkripten die Wechselwirkungen zwischen YB-1 und Translations-, Elongations- und Initiationsfaktoren näher charakterisiert. Außerdem soll ein RNA-Interaktionsprofil erstellt werden.

Im Hinblick auf die Wirkung von Fisetin und Luteolin als suffiziente Inhibitoren von YB-1 konnten in den Experimenten im Rahmen dieses Projektes die Ergebnisse aus anderen Versuchen nicht bestätigt werden. Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass diese beiden Phytopharmaka keine aussichtsreichen Substanzen zur Beeinflussung der YB-1-Biologie in der AML sind. Ursächlich hierfür kann man zum einen das heterogene Ansprechen der Phytopharmaka in den verwendeten Zelllinien sehen, was eine allgemeine Wirksamkeit in der Therapie der AML infrage stellt. Zum anderen ist in der Literatur beschrieben, dass neben einer Induktion der Apoptose und Proliferationshemmung auch die Metastasierung und Induktion von Angiogenese durch Fisetin und Luteolin in soliden Tumoren gehemmt wird (Imran et al. 2019, Kashyap et al. 2018). Letztere spielen in der Leukämogenese eine untergeordnete Rolle. Die orale Bioverfügbarkeit von Luteolin und Fisetin ist gering, konnte aber durch chemische

Modifikation im Tierexperiment gesteigert werden (Miguel 2009, Kashyap et al. 2018). Die Daten hinsichtlich der Verwendung am Menschen sind unpräzise und wenig aussagekräftig. Insgesamt stellen die unterschiedlichen Aufgaben dieses CSP und die verschiedenen funktionellen Proteindomänen die stärkste Limitation in der Anwendung der Phytopharmaka in der AML dar. Die singuläre Inhibition einer bestimmten Phosphorylierungsstelle scheint die Funktion dieses komplexen Proteins nicht suffizient zu hemmen. Ein neueres Verfahren, die sogenannte „targeted degradation“, könnte hierbei von Nutzen sein. Dabei handelt es sich um eine Methode, die zielgerichtet zu einer proteasomalen Degradation eines Proteins durch Ubiquitinierung führt (Nabet et al. 2018, Winter et al. 2017).

8 Schlussfolgerung

Das Kälteschockprotein YB-1 ist ein multifunktionales Molekül. In den durchgeführten Experimenten konnte die Relevanz von YB-1 in der AML durch die genetische Inaktivierung bewiesen werden. In dieser Arbeit lag der Fokus außerdem auf potenzielle nukleäre Funktionen des CSP als Transkriptionsfaktor und Genregulator. Diese werden in der Literatur als „downstream“ Effekte verschiedener Kinasen beschrieben, wie u. a. RSK und ERK. Der in vielen soliden Tumoren suggerierten proliferationshemmenden Effekt der Inhibition der S102-vermittelten nukleären Translokation konnte in den Experimenten nur partiell bestätigt werden. Daher wurde der nukleären Akkumulation von YB-1 durch den Vergleich der genetischen und pharmakologischen Beeinflussung ein geringer Stellenwert in der AML zugeordnet. Aktuelle Untersuchungen deuten darauf hin, dass diese Signaltransduktions-abhängigen Funktionen von YB-1 in der AML eine untergeordnete Rolle spielen. Stattdessen scheint dessen Funktion als Mediator von mRNA-Prozessierung und Translation im Zytosol, sowie die Transkriptionsfaktor-Aktivität eine kritische Rolle in malignen transformierten Systemen zu spielen. Diese basalen zellulären Funktionen von YB-1 sind scheinbar nicht abhängig von dessen Serin 102-Phosphorylierung. In einer aktuellen Kooperation finden Untersuchungen statt, um den detaillierten Mechanismus der Funktion von YB-1 in der AML aufzuklären und neue Substanzen zu identifizieren, mit denen sich die Aktivität von YB-1 profunder inhibieren lässt. Hier spielen RNA-Interaktionen eine große Rolle, um die Wechselwirkungen von YB-1 mit zellulären Strukturen und damit dessen Wirkungsweise näher zu charakterisieren. Natürlich sollen weitere Moleküle identifiziert oder generiert werden, um YB-1 als mögliche Zielstruktur der Therapie der AML zu etablieren. Hierfür gilt die bereits erwähnte „targeted degradation“ als vielversprechender Ansatz. In dieser Methode wird mittels einer Substanz die Expression von YB-1 wie im shRNA-vermittelten KD supprimiert und dadurch alle Funktionen von YB-1 inhibiert.

9 Literaturverzeichnis

- Abelson S, Collord G, Ng SWK, Weissbrod O, Mendelson Cohen N, Niemeyer E, Barda N, Zuzarte PC, Heisler L, Sundaravadanam Y, Luben R, Hayat S, Wang TT, Zhao Z, Cirlan I, Pugh TJ, Soave D, Ng K, Latimer C, Hardy C, Raine K, Jones D, Hoult D, Britten A, McPherson JD, Johansson M, Mbabaali F, Eagles J, Miller JK, Pasternack D, Timms L, Krzyzanowski P, Awadalla P, Costa R, Segal E, Bratman SV, Beer P, Behjati S, Martincorena I, Wang JCY, Bowles KM, Quirós JR, Karakatsani A, La Vecchia C, Trichopoulou A, Salamanca-Fernández E, Huerta JM, Barricarte A, Travis RC, Tumino R, Masala G, Boeing H, Panico S, Kaaks R, Krämer A, Sieri S, Riboli E, Vineis P, Foll M, McKay J, Polidoro S, Sala N, Khaw K-T, Vermeulen R, Campbell PJ, Papaemmanuil E, Minden MD, Tanay A, Balicer RD, Wareham NJ, Gerstung M, Dick JE, Brennan P, Vassiliou GS, Shlush LI. 2018. Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature*, 559 (7714):400-404.
- Anjum R, Blenis J. 2008. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9:747.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127 (20):2391-2405.
- Atallah E, Cortes J, O'Brien S, Pierce S, Rios MB, Estey E, Markman M, Keating M, Freireich EJ, Kantarjian H. 2007. Establishment of baseline toxicity expectations with standard frontline chemotherapy in acute myelogenous leukemia. *Blood*, 110 (10):3547-3551.
- Attar EC, Scadden DT. 2004. Regulation of hematopoietic stem cell growth. *Leukemia*, 18 (11):1760-1768.
- Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. 2017. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death And Differentiation*, 25:104.
- Bagger FO, Kinalis S, Rapin N. 2018. BloodSpot: a database of healthy and malignant haematopoiesis updated with purified and single cell mRNA sequencing profiles. *Nucleic Acids Research*, 47 (D1):D881-D885.
- Barabé F, Kennedy JA, Hope KJ, Dick JE. 2007. Modeling the Initiation and Progression of Human Acute Leukemia in Mice. *Science*, 316 (5824):600-604.
- Basaki Y, Taguchi K, Izumi H, Murakami Y, Kubo T, Hosoi F, Watari K, Nakano K, Kawaguchi H, Ohno S, Kohno K, Ono M, Kuwano M. 2010. Y-box binding protein-1

- (YB-1) promotes cell cycle progression through CDC6-dependent pathway in human cancer cells. *Eur J Cancer*, 46 (5):954-965.
- Benesty J, Chen J, Huang Y, Cohen I. 2009. Pearson Correlation Coefficient. *Noise Reduction in Speech Processing*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1-4.
- Bergmann S, Royer-Pokora B, Fietze E, Jürchott K, Hildebrandt B, Trost D, Leenders F, Claude J-C, Theuring F, Bargou R, Dietel M, Royer H-D. 2005. YB-1 Provokes Breast Cancer through the Induction of Chromosomal Instability That Emerges from Mitotic Failure and Centrosome Amplification. *Cancer Research*, 65 (10):4078-4087.
- Bonhoure E, Pchejetski D, Aouali N, Morjani H, Levade T, Kohama T, Cuvillier O. 2006. Overcoming MDR-associated chemoresistance in HL-60 acute myeloid leukemia cells by targeting shingosine kinase-1. *Leukemia*, 20 (1):95-102.
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. 1999. Cell Survival Promoted by the Ras-MAPK Signaling Pathway by Transcription-Dependent and -Independent Mechanisms. *Science*, 286 (5443):1358.
- Boulais PE, Frenette PS. 2015. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*, 125 (17):2621-2629.
- Bradford GB, Williams B, Rossi R, Bertoncetto I. 1997. Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp Hematol*, 25 (5):445-453.
- Buchner T, Hiddemann W, Berdel WE, Wormann B, Schoch C, Fonatsch C, Löffler H, Haferlach T, Ludwig WD, Maschmeyer G, Staib P, Aul C, Gruneisen A, Lengfelder E, Frickhofen N, Kern W, Serve HL, Mesters RM, Sauerland MC, Heinecke A. 2003. 6-Thioguanine, cytarabine, and daunorubicin (TAD) and high-dose cytarabine and mitoxantrone (HAM) for induction, TAD for consolidation, and either prolonged maintenance by reduced monthly TAD or TAD-HAM-TAD and one course of intensive consolidation by sequential HAM in adult patients at all ages with de novo acute myeloid leukemia (AML): a randomized trial of the German AML Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 21 (24):4496-4504.
- Carbuccia N, Trouplin V, Gelsi-Boyer V, Murati A, Rocquain J, Adélaïde J, Olschwang S, Xerri L, Vey N, Chaffanet M, Birnbaum D, Mozziconacci MJ. 2009. Mutual exclusion of ASXL1 and NPM1 mutations in a series of acute myeloid leukemias. *Leukemia*, 24:469.
- Chan G, Gu S, Neel BG. 2013. Erk1 and Erk2 are required for maintenance of hematopoietic stem cells and adult hematopoiesis. *Blood*, 121 (18):3594-3598.

- Chatterjee M, Rancso C, Stühmer T, Eckstein N, Andrulis M, Gerecke C, Lorentz H, Royer H-D, Bargou RC. 2008. The Y-box binding protein YB-1 is associated with progressive disease and mediates survival and drug resistance in multiple myeloma. *Blood*, 111 (7):3714-3722.
- Chibi M, Meyer M, Skepu A, DJ GR, Moolman-Smook JC, Pugh DJ. 2008. RBBP6 interacts with multifunctional protein YB-1 through its RING finger domain, leading to ubiquitination and proteosomal degradation of YB-1. *J Mol Biol*, 384 (4):908-916.
- Cho Y-Y, He Z, Zhang Y, Choi HS, Zhu F, Choi BY, Kang BS, Ma W-Y, Bode AM, Dong Z. 2005. The p53 Protein Is a Novel Substrate of Ribosomal S6 Kinase 2 and a Critical Intermediary for Ribosomal S6 Kinase 2 and Histone H3 Interaction. *Cancer Research*, 65 (9):3596-3603.
- Ciurea SO, Chilkulwar A, Saliba RM, Chen J, Rondon G, Patel KP, Khogeer H, Shah AR, Randolph BV, Perez JMR, Popat U, Hosing CM, Bashir Q, Mehta R, Al-Atrash G, Im J, Khouri IF, Kebriaei P, Champlin RE. 2018. Prognostic factors influencing survival after allogeneic transplantation for AML/MDS patients with *TP53* mutations. *Blood*, 131 (26):2989-2992.
- Clark DE, Errington TM, Smith JA, Frierson HF, Weber MJ, Lannigan DA. 2005. The Serine/Threonine Protein Kinase, p90 Ribosomal S6 Kinase, Is an Important Regulator of Prostate Cancer Cell Proliferation. *Cancer Research*, 65 (8):3108-3116.
- Damiani D, Tiribelli M, Raspadori D, Michelutti A, Gozzetti A, Calistri E, Candoni A, Chiarvesio A, Lenoci M, Russo D, Fanin R. 2007. The role of MDR-related proteins in the prognosis of adult acute myeloid leukaemia (AML) with normal karyotype. *Hematological Oncology*, 25 (1):38-43.
- Davies AH, Reipas K, Hu K, Berns R, Firmino N, Stratford AL, Dunn SE. 2015. Inhibition of RSK with the novel small-molecule inhibitor LJI308 overcomes chemoresistance by eliminating cancer stem cells. *Oncotarget*, 6 (24):20570-20577.
- Davies AH, Barrett I, Pambid MR, Hu K, Stratford AL, Freeman S, Berquin IM, Pelech S, Hieter P, Maxwell C, Dunn SE. 2011. YB-1 evokes susceptibility to cancer through cytokinesis failure, mitotic dysfunction and HER2 amplification. *Oncogene*, 30:3649.
- Deng L, Jiang L, Lin X, Tseng KF, Lu Z, Wang X. 2017. Luteolin, a novel p90 ribosomal S6 kinase inhibitor, suppresses proliferation and migration in leukemia cells. *Oncol Lett*, 13 (3):1370-1378.
- Deschênes-Simard X, Lessard F, Gaumont-Leclerc M-F, Bardeesy N, Ferbeyre G. 2014. Cellular senescence and protein degradation. *Cell Cycle*, 13 (12):1840-1858.

- Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. 2015. Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 373 (12):1136-1152.
- Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenau P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien H-F, Wei AH, Löwenberg B, Bloomfield CD. 2017. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 129 (4):424-447.
- Dong X, Lan W, Yin X, Yang C, Wang W, Ni J. 2017. Simultaneous Determination and Pharmacokinetic Study of Quercetin, Luteolin, and Apigenin in Rat Plasma after Oral Administration of *Matricaria chamomilla* L. Extract by HPLC-UV. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017.
- Dorritie KA, McCubrey JA, Johnson DE. 2013. STAT transcription factors in hematopoiesis and leukemogenesis: opportunities for therapeutic intervention. *Leukemia*, 28:248.
- Ebert C, Perner F, Wolleschak D, Schnöder TM, Fischer T, Heidel FH. 2016. Expression and function of ABC-transporter protein ABCB1 correlates with inhibitory capacity of Ruxolitinib *in vitro* and *in vivo*. *Haematologica*, 101 (3):e81-e85.
- El-Naggar Amal M, Veinotte Chansey J, Cheng H, Grunewald Thomas GP, Negri Gian L, Somasekharan Syam P, Corkery Dale P, Tirode F, Mathers J, Khan D, Kyle Alastair H, Baker Jennifer H, LePard Nancy E, McKinney S, Hajee S, Bosiljic M, Leprivier G, Tognon Cristina E, Minchinton Andrew I, Bennewith Kevin L, Delattre O, Wang Y, Dellaire G, Berman Jason N, Sorensen Poul H. 2015. Translational Activation of HIF1 α by YB-1 Promotes Sarcoma Metastasis. *Cancer Cell*, 27 (5):682-697.
- Eliseeva IA, Kim ER, Guryanov SG, Ovchinnikov LP, Lyabin DN. 2011. Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Biochemistry (Moscow)*, 76 (13):1402-1433.
- Erikson E, Maller JL. 1985. A protein kinase from *Xenopus* eggs specific for ribosomal protein S6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82 (3):742-746.
- Fujiwara-Okada Y, Matsumoto Y, Fukushi J, Setsu N, Matsuura S, Kamura S, Fujiwara T, Iida K, Hatano M, Nabeshima A, Yamada H, Ono M, Oda Y, Iwamoto Y. 2013. Y-box binding protein-1 regulates cell proliferation and is associated with clinical outcomes of osteosarcoma. *British Journal Of Cancer*, 108:836.
- Gieseler-Halbach S, Meltendorf S, Pierau M, Weinert S, Heidel FH, Fischer T, Handschuh J, Braun-Dullaes RC, Schrappe M, Lindquist JA, Mertens PR, Thomas U, Brunner-

- Weinzierl MC. 2016. RSK-mediated nuclear accumulation of the cold-shock Y-box protein-1 controls proliferation of T cells and T-ALL blasts. *Cell Death And Differentiation*, 24:371.
- Gilliland DG, Griffin JD. 2002. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*, 100 (5):1532-1542.
- Gimenez-Bonafe P, Fedoruk MN, Whitmore TG, Akbari M, Ralph JL, Ettinger S, Gleave ME, Nelson CC. 2004. YB-1 is upregulated during prostate cancer tumor progression and increases P-glycoprotein activity. *Prostate*, 59 (3):337-349.
- Goodarzi H, Liu X, Nguyen HCB, Zhang S, Fish L, Tavazoie SF. 2015. Endogenous tRNA-derived fragments suppress breast cancer progression via YBX1 displacement. *Cell*, 161 (4):790-802.
- Haddad AQ, Venkateswaran V, Viswanathan L, Teahan SJ, Fleshner NE, Klotz LH. 2006. Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 9 (1):68-76.
- Hartwell L, Kastan M. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science*, 266 (5192):1821-1828.
- Heidel FH, Arriba-Tutusaus P, Armstrong SA, Fischer T. 2015. Evolutionarily conserved signaling pathways: acting in the shadows of acute myelogenous leukemia's genetic diversity. *Clin Cancer Res*, 21 (2):240-248.
- Herzog C, Polanetzki A, Frey S, Schnoeder TM, Wolleschak D, Mashamba N, Thangapandi VR, Jentsch-Ullrich K, Kahl C, Schroeder N, Mertens PR, Fischer T, Heidel FH. 2014. Inflammation Induced Expression of Ybx1 Mediates Resistance to JAK-Kinase Inhibitor Therapy in Myeloproliferative Neoplasia. *Blood*, 124 (21):161-161.
- Holyoake TL, Vetrie D. 2017. The chronic myeloid leukemia stem cell: stemming the tide of persistence. *Blood*, 129 (12):1595-1606.
- Illmer T, Schaich M, Platzbecker U, Freiberg-Richter J, Oelschlägel U, von Bonin M, Pursche S, Bergemann T, Ehniger G, Schleyer E. 2004. P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. *Leukemia*, 18 (3):401-408.
- Imran M, Rauf A, Abu-Izneid T, Nadeem M, Shariati MA, Khan IA, Imran A, Orhan IE, Rizwan M, Atif M, Gondal TA, Mubarak MS. 2019. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 112:108612.
- Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, Patel Y, Bhudia N, Farah H, Mason J, Wall K, Akiki S, Griffiths M, Solomon E, McCaughan F, Linch DC, Gale

- RE, Vyas P, Freeman SD, Russell N, Burnett AK, Grimwade D. 2016. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N Engl J Med*, 374 (5):422-433.
- Jagadeeshan S, David D, Jisha S, Manjula S, Asha Nair S. 2017. Solanum nigrum Unripe fruit fraction attenuates Adriamycin resistance by down-regulating multi-drug resistance protein (Mdr)-1 through Jak-STAT pathway. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17 (1):370.
- Jiang L, Malik N, Acedo P, Zawacka-Pankau J. 2019. Protoporphyrin IX is a dual inhibitor of p53/MDM2 and p53/MDM4 interactions and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Cell Death Discovery*, 5 (1):77.
- Jones PG, Inouye M. 1994. The cold-shock response — a hot topic. *Molecular Microbiology*, 11 (5):811-818.
- Jones PG, VanBogelen RA, Neidhardt FC. 1987. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 169 (5):2092-2095.
- Kahl C, Krahl R, Becker C, Al-Ali HK, Sayer HG, Schulze A, Herold M, Hanel M, Scholl S, Hochhaus A, Uharek L, Maschmeyer G, Haehling D, Junghanss C, Peter N, Kampfe D, Kettner E, Heinicke T, Fischer T, Kreibich U, Wolf HH, Niederwieser D. 2016. Long-term follow-up of the AML97 study for patients aged 60 years and above with acute myeloid leukaemia: a study of the East German Haematology and Oncology Study Group (OSHO). *J Cancer Res Clin Oncol*, 142 (1):305-315.
- Kariminia A, Ivison SM, Leung VM, Sung S, Couto N, Rozmus J, Rolf N, Narendran A, Dunn SE, Reid GSD, Schultz KR. 2017. Y-box-binding protein 1 contributes to IL-7-mediated survival signaling in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Lett*, 13 (1):497-505.
- Karp JE. 2001. MDR modulation in acute myelogenous leukemia: is it dead? *Leukemia*, 15 (4):666-667.
- Kashyap D, Sharma A, Sak K, Tuli HS, Buttar HS, Bishayee A. 2018. Fisetin: A bioactive phytochemical with potential for cancer prevention and pharmacotherapy. *Life Sciences*, 194:75-87.
- Keto-Timonen R, Hietala N, Palonen E, Hakakorpi A, Lindström M, Korkeala H. 2016. Cold Shock Proteins: A Minireview with Special Emphasis on Csp-family of Enteropathogenic *Yersinia*. *Frontiers in Microbiology*, 7 (1151).
- Khan MI, Adhami VM, Lall RK, Sechi M, Joshi DC, Haidar OM, Syed DN, Siddiqui IA, Chiu SY, Mukhtar H. 2014. YB-1 expression promotes epithelial-to-mesenchymal transition

- in prostate cancer that is inhibited by a small molecule fisetin. *Oncotarget*, 5 (9):2462-2474.
- Kitamura T, Inoue D, Okochi-Watanabe N, Kato N, Komeno Y, Lu Y, Enomoto Y, Doki N, Uchida T, Kagiya Y, Togami K, Kawabata KC, Nagase R, Horikawa S, Hayashi Y, Saika M, Fukuyama T, Izawa K, Oki T, Nakahara F, Kitaura J. 2014. The molecular basis of myeloid malignancies. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences*, 90 (10):389-404.
- Kitamura T, Watanabe-Okochi N, Enomoto Y, Nakahara F, Oki T, Komeno Y, Kato N, Doki N, Uchida T, Kagiya Y, Togami K, Kawabata KC, Nishimura K, Hayashi Y, Nagase R, Saika M, Fukushima T, Asada S, Fujino T, Izawa Y, Horikawa S, Fukuyama T, Tanaka Y, Ono R, Goyama S, Nosaka T, Kitaura J, Inoue D. 2016. Novel working hypothesis for pathogenesis of hematological malignancies: combination of mutations-induced cellular phenotypes determines the disease (cMIP-DD). *J Biochem*, 159 (1):17-25.
- Kloks CP, Spronk CA, Lasonder E, Hoffmann A, Vuister GW, Grzesiek S, Hilbers CW. 2002. The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1. *J Mol Biol*, 316 (2):317-326.
- Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, Shikami M, Cabreira-Hansen M, McQueen T, Ruvolo V, Tsao T, Zeng Z, Vassilev LT, Andreeff M. 2005. MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy. *Blood*, 106 (9):3150-3159.
- Konopleva M, Konoplev S, Hu W, Zaritsky AY, Afanasiev BV, Andreeff M. 2002. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia*, 16 (9):1713-1724.
- Kosnopfel C, Sinnberg T, Schitteck B. 2014. Y-box binding protein 1 – A prognostic marker and target in tumour therapy. *European Journal of Cell Biology*, 93 (1):61-70.
- Kotake Y, Ozawa Y, Harada M, Kitagawa K, Niida H, Morita Y, Tanaka K, Suda T, Kitagawa M. 2013. YB1 binds to and represses the p16 tumor suppressor gene. *Genes to Cells*, 18 (11):999-1006.
- Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, Levine JE, Wang J, Hahn WC, Gilliland DG, Golub TR, Armstrong SA. 2006. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL–AF9. *Nature*, 442 (7104):818-822.
- Krug U, Berdel WE, Gale RP, Haferlach C, Schnittger S, Müller-Tidow C, Braess J, Spiekermann K, Staib P, Beelen D, Serve H, Schliemann C, Stelljes M, Balleisen L,

- Maschmeyer G, Grüneisen A, Eimermacher H, Giagounidis A, Rasche H, Hehlmann R, Lengfelder E, Thiel E, Reichle A, Aul C, Ludwig WD, Kern W, Haferlach T, Köpcke W, Görlich D, Sauerland MC, Heinecke A, Wörmann BJ, Hiddemann W, Büchner T. 2016. Increasing intensity of therapies assigned at diagnosis does not improve survival of adults with acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 30:1230.
- Lajtha LG. 1963. ON THE CONCEPT OF THE CELL CYCLE. *J Cell Comp Physiol*, 62:Suppl1:143-145.
- Lambeth LS, Smith CA. 2013. Short Hairpin RNA-Mediated Gene Silencing. In: Taxman DJ, Hrsg. *siRNA Design: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 205-232.
- Lasham A, Print CG, Woolley AG, Dunn SE, Braithwaite AW. 2013. YB-1: oncoprotein, prognostic marker and therapeutic target? *Biochem J*, 449 (1):11-23.
- Laurenti E, Frelin C, Xie S, Ferrari R, Dunant CF, Zandi S, Neumann A, Plumb I, Doulatov S, Chen J, April C, Fan JB, Iscove N, Dick JE. 2015. CDK6 levels regulate quiescence exit in human hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 16 (3):302-313.
- Lee G-Y, Jeong S-Y, Lee H-R, Oh I-H. 2019. Age-related differences in the bone marrow stem cell niche generate specialized microenvironments for the distinct regulation of normal hematopoietic and leukemia stem cells. *Scientific Reports*, 9 (1):1007.
- Li S, Zhao Q, Wang B, Yuan S, Wang X, Li K. 2018. Quercetin reversed MDR in breast cancer cells through down-regulating P-gp expression and eliminating cancer stem cells mediated by YB-1 nuclear translocation. *Phytotherapy Research*, 32 (8):1530-1536.
- Li X, Chen F, Zhu Q, Ding B, Zhong Q, Huang K, Jiang X, Wang Z, Yin C, Zhu Y, Li Z, Meng F. 2016. Gli-1/PI3K/AKT/NF- κ B pathway mediates resistance to radiation and is a target for reversion of responses in refractory acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*, 7 (22):33004-33015.
- Lin Y-C, Liu L-C, Ho C-T, Hung C-M, Way T-D. 2018. Luteolin inhibits ER- α expression through ILK inhibition is regulated by a pathway involving Twist and YB-1. *Journal of Functional Foods*, 42:75-84.
- Lindquist JA, Mertens PR. 2018. Cold shock proteins: from cellular mechanisms to pathophysiology and disease. *Cell Communication and Signaling*, 16 (1):63.
- Lutz M, Wempe F, Bahr I, Zopf D, von Melchner H. 2006. Proteasomal degradation of the multifunctional regulator YB-1 is mediated by an F-Box protein induced during programmed cell death. *FEBS Letters*, 580 (16):3921-3930.
- Lyabin DN, Eliseeva IA, Ovchinnikov LP. 2014. YB-1 protein: functions and regulation. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 5 (1):95-110.

- Lyu Y, Lou J, Yang Y, Feng J, Hao Y, Huang S, Yin L, Xu J, Huang D, Ma B, Zou D, Wang Y, Zhang Y, Zhang B, Chen P, Yu K, Lam EWF, Wang X, Liu Q, Yan J, Jin B. 2017. Dysfunction of the WT1-MEG3 signaling promotes AML leukemogenesis via p53-dependent and -independent pathways. *Leukemia*, 31:2543.
- Maier E, Attenberger F, Tiwari A, Lettau K, Rebholz S, Fehrenbacher B, Schaller M, Gani C, Toulany M. 2019. Dual Targeting of Y-Box Binding Protein-1 and Akt Inhibits Proliferation and Enhances the Chemosensitivity of Colorectal Cancer Cells. *Cancers*, 11 (4):562.
- Miguel L-L. 2009. Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 9 (1):31-59.
- Milella M, Kornblau SM, Estrov Z, Carter BZ, Lapillonne H, Harris D, Konopleva M, Zhao S, Estey E, Andreeff M. 2001. Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 108 (6):851-859.
- Montalban-Bravo G, Garcia-Manero G. 2014. Novel drugs for older patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 29:760.
- Moore CB, Guthrie EH, Huang MT, Taxman DJ. 2010. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol*, 629:141-158.
- Morgan MA, Dolp O, Reuter CWM. 2001. Cell-cycle-dependent activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK-1/2) in myeloid leukemia cell lines and induction of growth inhibition and apoptosis by inhibitors of RAS signaling. *Blood*, 97 (6):1823-1834.
- Nabet B, Roberts JM, Buckley DL, Paulk J, Dastjerdi S, Yang A, Leggett AL, Erb MA, Lawlor MA, Souza A, Scott TG, Vittori S, Perry JA, Qi J, Winter GE, Wong K-K, Gray NS, Bradner JE. 2018. The dTAG system for immediate and target-specific protein degradation. *Nature chemical biology*, 14 (5):431-441.
- Norozi F, Ahmadzadeh A, Shahjahani M, Shahrabi S, Saki N. 2016. Twist as a new prognostic marker in hematological malignancies. *Clinical and Translational Oncology*, 18 (2):113-124.
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, Potter NE, Heuser M, Thol F, Bolli N, Gundem G, Van Loo P, Martincorena I, Ganly P, Mudie L, McLaren S, O'Meara S, Raine K, Jones DR, Teague JW, Butler AP, Greaves MF, Ganser A, Döhner K, Schlenk RF, Döhner H, Campbell PJ. 2016. Genomic

- Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 374 (23):2209-2221.
- Peng C, Cho Y-Y, Zhu F, Zhang J, Wen W, Xu Y, Yao K, Ma W-Y, Bode AM, Dong Z. 2011. Phosphorylation of Caspase-8 (Thr-263) by Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2) Mediates Caspase-8 Ubiquitination and Stability. *Journal of Biological Chemistry*, 286 (9):6946-6954.
- Perner F, Perner C, Ernst T, Heidel HF. 2019. Roles of JAK2 in Aging, Inflammation, Hematopoiesis and Malignant Transformation. *Cells*, 8 (8).
- Perner F, Jayavelu AK, Schnoeder TM, Mashamba N, Mohr J, Hartmann M, Odenwald K, Schroeder N, Brandt S, Mertens P, Bullinger L, Heidel FH. 2017. The Cold-Shock Protein Ybx1 Is Required for Development and Maintenance of Acute Myeloid Leukemia (AML) in Vitro and In Vivo. *Blood*, 130 (Suppl 1):792-792.
- Perner F, Schnöder TM, Ranjan S, Wolleschak D, Ebert C, Pils MC, Frey S, Polanetzki A, Fahldieck C, Schönborn U, Schraven B, Isermann B, Fischer T, Heidel FH. 2015. Specificity of JAK-kinase inhibition determines impact on human and murine T-cell function. *Leukemia*, 30:991.
- Pietras EM, Warr MR, Passegué E. 2011. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *The Journal of Cell Biology*, 195 (5):709-720.
- Pinho S, Frenette PS. 2019. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20 (5):303-320.
- Pollyea DA, Gutman JA, Gore L, Smith CA, Jordan CT. 2014. Targeting acute myeloid leukemia stem cells: a review and principles for the development of clinical trials. *Haematologica*, 99 (8):1277-1284.
- Prabhu L, Hartley A-V, Martin M, Warsame F, Sun E, Lu T. 2015. Role of post-translational modification of the Y box binding protein 1 in human cancers. *Genes & diseases*, 2 (3):240-246.
- Qiu J, Papatsenko D, Niu X, Schaniel C, Moore K. 2014. Divisional history and hematopoietic stem cell function during homeostasis. *Stem Cell Reports*, 2 (4):473-490.
- Reipas KM, Law JH, Couto N, Islam S, Li Y, Li H, Cherkasov A, Jung K, Cheema AS, Jones SJ, Hassell JA, Dunn SE. 2013. Luteolin is a novel p90 ribosomal S6 kinase (RSK) inhibitor that suppresses Notch4 signaling by blocking the activation of Y-box binding protein-1 (YB-1). *Oncotarget*, 4 (2):329-345.

- Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, Preudhomme C. 2008. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*, 22:915.
- Riether C, Schürch CM, Ochsenbein AF. 2014. Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. *Cell Death And Differentiation*, 22:187.
- Roberts Kathryn G, Morin Ryan D, Zhang J, Hirst M, Zhao Y, Su X, Chen S-C, Payne-Turner D, Churchman ML, Harvey Richard C, Chen X, Kasap C, Yan C, Becksfort J, Finney Richard P, Teachey David T, Maude Shannon L, Tse K, Moore R, Jones S, Mungall K, Birol I, Edmonson Michael N, Hu Y, Buetow Kenneth E, Chen IM, Carroll William L, Wei L, Ma J, Kleppe M, Levine Ross L, Garcia-Manero G, Larsen E, Shah Neil P, Devidas M, Reaman G, Smith M, Paugh Steven W, Evans William E, Grupp Stephan A, Jeha S, Pui C-H, Gerhard Daniela S, Downing James R, Willman Cheryl L, Loh M, Hunger Stephen P, Marra Marco A, Mullighan Charles G. 2012. Genetic Alterations Activating Kinase and Cytokine Receptor Signaling in High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*, 22 (2):153-166.
- Roberts PJ, Der CJ. 2007. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26:3291.
- Rocquain J, Carbuccia N, Trouplin V, Raynaud S, Murati A, Nezri M, Tadriz Z, Olschwang S, Vey N, Birnbaum D, Gelsi-Boyer V, Mozziconacci M-J. 2010. Combined mutations of ASXL1, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2 and WT1 genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *BMC Cancer*, 10 (1):401.
- Röllig C, Beelen DW, Braess J, Greil R, Niederwieser D, Passweg J, Reinhardt D, Schlenk RF Akute myeloische Leukämie (AML)
- Röllig C, Bornhäuser M, Thiede C, Taube F, Kramer M, Mohr B, Aulitzky W, Bodenstein H, Tischler H-J, Stuhlmann R, Schuler U, Stölzel F, von Bonin M, Wandt H, Schäfer-Eckart K, Schaich M, Ehninger G. 2011. Long-Term Prognosis of Acute Myeloid Leukemia According to the New Genetic Risk Classification of the European LeukemiaNet Recommendations: Evaluation of the Proposed Reporting System. *Journal of Clinical Oncology*, 29 (20):2758-2765.
- Ross DD. 2000. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia*, 14 (3):467-473.
- Sak K, Kasemaa K, Everaus H. 2016. Potentiation of luteolin cytotoxicity by flavonols fisetin and quercetin in human chronic lymphocytic leukemia cell lines. *Food Funct*, 7 (9):3815-3824.

- Schäfer R. 2016. 101e Tumorgenetik. In: Suttorp N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M, Hrsg. *Harrisons Innere Medizin*. 19. Auflage Aufl: ABW Verlag.
- Scherer LJ, Rossi JJ. 2003. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nature Biotechnology*, 21 (12):1457-1465.
- Schulz C-O. 2016. Akute myeloische Leukämie. *Harrison Innere Medizin*. 19. Auflage Aufl: ABW Verlag, 828 - 837.
- Sechi M, Lall RK, Afolabi SO, Singh A, Joshi DC, Chiu S-Y, Mukhtar H, Syed DN. 2018. Fisetin targets YB-1/RSK axis independent of its effect on ERK signaling: insights from in vitro and in vivo melanoma models. *Scientific reports*, 8 (1):15726-15726.
- Shen H, Xu W, Luo W, Zhou L, Yong W, Chen F, Wu C, Chen Q, Han X. 2011. Upregulation of *mdr1* gene is related to activation of the MAPK/ERK signal transduction pathway and YB-1 nuclear translocation in B-cell lymphoma. *Exp Hematol*, 39 (5):558-569.
- Shibahara K, Sugio K, Osaki T, Uchiumi T, Maehara Y, Kohno K, Yasumoto K, Sugimachi K, Kuwano M. 2001. Nuclear Expression of the Y-Box Binding Protein, YB-1, as a Novel Marker of Disease Progression in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 7 (10):3151-3155.
- Shiota M, Izumi H, Onitsuka T, Miyamoto N, Kashiwagi E, Kidani A, Yokomizo A, Naito S, Kohno K. 2008. Twist promotes tumor cell growth through YB-1 expression. *Cancer Res*, 68 (1):98-105.
- Shiraiwa S, Kinugasa T, Kawahara A, Mizobe T, Ohchi T, Yuge K, Fujino S, Katagiri M, Shimomura S, Tajiri K, Sudo T, Kage M, Kuwano M, Akagi Y. 2016. Nuclear Y-Box-binding Protein-1 Expression Predicts Poor Clinical Outcome in Stage III Colorectal Cancer. *Anticancer Res*, 36 (7):3781-3788.
- Shlush LI, Mitchell A, Heisler L, Abelson S, Ng SWK, Trotman-Grant A, Medeiros JF, Rao-Bhatia A, Jaciw-Zurakowsky I, Marke R, McLeod JL, Doedens M, Bader G, Voisin V, Xu C, McPherson JD, Hudson TJ, Wang JCY, Minden MD, Dick JE. 2017. Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature*, 547:104.
- Spearman C. 1904. The Proof and Measurement of Association between Two Things. *The American Journal of Psychology*, 15 (1):72-101.
- Spearman C. 2010. The proof and measurement of association between two things. *International Journal of Epidemiology*, 39 (5):1137-1150.
- Steelman LS, Abrams SL, Whelan J, Bertrand FE, Ludwig DE, Bäsecke J, Libra M, Stivala F, Milella M, Tafuri A, Lunghi P, Bonati A, Martelli AM, McCubrey JA. 2008.

- Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia*, 22:686.
- Sun X, Ma X, Li Q, Yang Y, Xu X, Sun J, Yu M, Cao K, Yang L, Yang G, Zhang G, Wang X. 2018. Anti-cancer effects of fisetin on mammary carcinoma cells via regulation of the PI3K/Akt/mTOR pathway: In vitro and in vivo studies. *International journal of molecular medicine*, 42 (2):811-820.
- Suresh PS, Tsutsumi R, Venkatesh T. 2018. YBX1 at the crossroads of non-coding transcriptome, exosomal, and cytoplasmic granular signaling. *European Journal of Cell Biology*, 97 (3):163-167.
- Terzi MY, Izmirli M, Gogebakan B. 2016. The cell fate: senescence or quiescence. *Molecular Biology Reports*, 43 (11):1213-1220.
- Thiede C. 2012. Mutant *DNMT3A*: teaming up to transform. *Blood*, 119 (24):5615-5617.
- Tilesi F, Fradiani P, Socci V, Willems D, Ascenzioni F. 2009. Design and validation of siRNAs and shRNAs. *Curr Opin Mol Ther*, 11 (2):156-164.
- Tiwari A, Rebholz S, Maier E, Dehghan Harati M, Zips D, Sers C, Rodemann HP, Toulany M. 2018. Stress-Induced Phosphorylation of Nuclear YB-1 Depends on Nuclear Trafficking of p90 Ribosomal S6 Kinase. *International journal of molecular sciences*, 19 (8):2441.
- Trumpp A, Essers M, Wilson A. 2010. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nature Reviews Immunology*, 10:201.
- Uchida N, Dykstra B, Lyons KJ, Leung FY, Eaves CJ. 2003. Different in vivo repopulating activities of purified hematopoietic stem cells before and after being stimulated to divide in vitro with the same kinetics. *Exp Hematol*, 31 (12):1338-1347.
- Vainchenker W, Constantinescu SN. 2013. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene*, 32 (21):2601-2613.
- van der Kolk DM, de Vries EGE, Müller M, Vellenga E. 2002. The Role of Drug Efflux Pumps in Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 43 (4):685-701.
- Wang CJ, Hsieh YJ, Chu CY, Lin YL, Tseng TH. 2002. Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculetin. *Cancer Lett*, 183 (2):163-168.
- Watanabe-Smith K, Rosenberg M, Bucy T, Tyner JW, Borate U. 2017. Factors Predicting Response and Resistance to Midostaurin in FLT3 Positive and FLT3 Negative AML in 483 Primary AML Patient Samples. *Blood*, 130 (Suppl 1):296-296.

- Weisberg E, Halilovic E, Cooke VG, Nonami A, Ren T, Sanda T, Simkin I, Yuan J, Antonakos B, Barys L, Ito M, Stone R, Galinsky I, Cowens K, Nelson E, Sattler M, Jeay S, Wuerthner JU, McDonough SM, Wiesmann M, Griffin JD. 2015. Inhibition of Wild-Type p53-Expressing AML by the Novel Small Molecule HDM2 Inhibitor CGM097. *Mol Cancer Ther*, 14 (10):2249-2259.
- Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lio P, Macdonald HR, Trumpp A. 2008. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*, 135 (6):1118-1129.
- Winter GE, Mayer A, Buckley DL, Erb MA, Roderick JE, Vittori S, Reyes JM, di Iulio J, Souza A, Ott CJ, Roberts JM, Zeid R, Scott TG, Paulk J, Lachance K, Olson CM, Dastjerdi S, Bauer S, Lin CY, Gray NS, Kelliher MA, Churchman LS, Bradner JE. 2017. BET Bromodomain Proteins Function as Master Transcription Elongation Factors Independent of CDK9 Recruitment. *Molecular Cell*, 67 (1):5-18.e19.
- Wolf D, Rotter V. 1985. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82 (3):790-794.
- Yasen M, Kajino K, Kano S, Tobita H, Yamamoto J, Uchiumi T, Kon S, Maeda M, Obulhasim G, Arii S, Hino O. 2005. The Up-Regulation of Y-Box Binding Proteins (DNA Binding Protein A and Y-Box Binding Protein-1) as Prognostic Markers of Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 11 (20):7354-7361.
- Yin CC, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE. 2010. Recent advances in the diagnosis and classification of myeloid neoplasms--comments on the 2008 WHO classification. *International journal of laboratory hematology*, 32 (5):461-476.
- Yokoyama H, Harigae H, Takahashi S, Kameoka J, Miyamura K, Ishizawa K, Kaku M, Sasaki T. 2003. High Expression of YB-1 Gene in Erythroid Cells in Patients with Refractory Anemia. *International Journal of Hematology*, 78 (3):213-218.
- Youns M, Abdel Halim Hegazy W. 2017. The Natural Flavonoid Fisetin Inhibits Cellular Proliferation of Hepatic, Colorectal, and Pancreatic Cancer Cells through Modulation of Multiple Signaling Pathways. *PloS one*, 12 (1):e0169335-e0169335.
- Zhang H, Savage S, Schultz AR, Bottomly D, White L, Segerdell E, Wilmot B, McWeeney SK, Eide CA, Nechiporuk T, Carlos A, Henson R, Lin C, Searles R, Ho H, Lam YL, Sweat R, Follit C, Jain V, Lind E, Borthakur G, Garcia-Manero G, Ravandi F, Kantarjian HM, Cortes J, Collins R, Buelow DR, Baker SD, Druker BJ, Tyner JW. 2019. Clinical

resistance to crenolanib in acute myeloid leukemia due to diverse molecular mechanisms. *Nature Communications*, 10 (1):244.

Zibert A, Schmidt HHJ. 2016. 89e Hämatopoetische Stammzellen. In: Suttorp N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M, Hrsg. *Harrisons Innere Medizin*. 19. Auflage Aufl: ABW Verlag.

10 Anhang

10.1 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Ras / Raf / MEK / ERK- und JAK / STAT-Signalweges und deren onkogene Aktivierung	9
Abbildung 2: Struktur des „Y-box binding Protein 1“ (YB-1) modifiziert nach Lyabin et al. 2014	14
Abbildung 3: Mediation der Translokation von YB-1 in den Nukleus durch die RSK.....	17
Abbildung 4: Transduktion von AML-Zellen zum „knockdown“ von YB-1.....	31
Abbildung 5: „Gating“-Strategie bei AnnexinV-Sytox-Färbung zur Apoptosemessung in MOLM-13-Zellen.....	33
Abbildung 6: „Gating“ bei „Sytox blue“-Färbung zur Ermittlung des Anteils lebender Zellen in MOLM-13-Zellen.	34
Abbildung 7: Spearman-Korrelation zwischen MTS-Assay (OD 490) und Zellzählung.....	36
Abbildung 8: Transkriptionelle Expression der Kälteschockproteine in humaner AML, hämatopoetischen Stammzellen und differenzierten Zellen.	40
Abbildung 9: Funktionelle Auswirkung einer verminderten YB-1-Expression	43
Abbildung 10: Expressionsanalyse von p53 nach KD von YB-1	43
Abbildung 11: Funktionelle Auswirkungen der pharmakologischen Behandlung von AML-Zellen mit Fisetin und Luteolin hinsichtlich Apoptose und Proliferation.....	45
Abbildung 12: Effizienz von Fisetin und Luteolin hinsichtlich der Inhibition der YB-1-Phosphorylierung.	47
Abbildung 13: Auswirkungen von Fisetin und Luteolin auf den ERK / MAPK-Signalweg..	48
Abbildung 14: Beeinflussung des STAT-Signalweges durch Fisetin und Luteolin.....	49
Abbildung 15: Vergleich proliferationshemmender Eigenschaften nach pharmakologischer und genetischer Intervention	50

Abbildung 16: Gegenüberstellung des YB-1-Phosphorylierungsstatus mit Auswirkungen hinsichtlich Proliferation und Signaltransduktion.....	52
Abbildung 17: Auswirkungen eines YB-1-KD auf ERK1/2 und Seneszenzmarker	54
Abbildung 18: Darstellung möglicher Translokationsmechanismen von YB-1 sowie der angenommenen Wirkungsweise von Fisetin und Luteolin.	59

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Zelllinien	20
Tabelle 2: Liste der verwendeten pharmakologischen Inhibitoren	20
Tabelle 3: Liste der verwendeten primären und sekundären Antikörper	21
Tabelle 4: Liste der verwendeten Substanzen	22
Tabelle 5: Liste der verwendeten Geräte	24
Tabelle 6: Liste verwendeter Gefäße und sonstiger Materialien	24
Tabelle 7: Liste der verwendeten Software	25
Tabelle 8: Übersicht über zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen in den verwendeten Zelllinien	41

10.3 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurde der Lebenslauf entfernt.

10.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. med. Florian Perner und Prof. Dr. med. Florian Heidel,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

10.5 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Florian Heidel für das zur Untersuchung bereitgestellte, interessante Thema meiner Dissertation bedanken. Dabei gilt der professionellen und intensiven Betreuung sowie der wissenschaftlichen Koordination besonderer Dank. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit der Durchführung einer experimentellen Promotionsarbeit bedanken.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Dr. med. Florian Perner, der mich während meiner Promotionsarbeit betreute. Unter seiner Anleitung wurde ich mit den experimentellen Methoden und der Auswertung der Daten vertraut gemacht. Außerdem hat er meine Arbeit stets durch konstruktive Ideen für die Durchführung der Experimente und Erstellung des Manuskriptes verbessert.

Selbstverständlich bedanke ich mich bei allen Kollegen, mit denen ich in den Forschungslaboratorien zusammenarbeiten durfte, insbesondere Dr. rer. nat. Tina Schnöder, die bei Fragen und Anliegen immer zur Verfügung stand und mich bei meiner Arbeit mit unterstützte. Insgesamt förderte das produktive und freundliche Klima innerhalb der Arbeitsgruppe das strukturierte und motivierte Vorankommen meiner Arbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich beim interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung (IZKF) sowie dem Graduiertenkolleg „Experimental Medicine“ für die finanzielle Förderung und wissenschaftliche Weiterbildung während der experimentellen Phase meiner Arbeit.

Außerdem gilt mein Dank der Hanns-Seidel-Stiftung für die finanzielle und ideelle Förderung während meines Studiums und der Erstellung des Manuskriptes.

Besonders möchte ich meinen Eltern, Großeltern und ganz besonders meinen Freunden danken, die mich in der Zeit meines Studiums und während meiner Arbeit an meiner Promotion unterstützt haben.