

Frauenklinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. M. B. Kiechle)

**Quantifizierung des Y-Box bindenden Proteins YB-1, ein neuer Marker für  
Chemotherapieresistenz beim Mamma- und  
Ovarialkarzinom**

Julia Goedel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Schmitt
2. Univ.-Prof. Dr. B. Schmalfeldt

Die Dissertation wurde am 25.02.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 24.06.2009 angenommen.

Meinem Großvater

---

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
2.1 Mamma- und Ovarialkarzinom .....	9
2.2 Das Y-box bindende Protein YB-1 .....	9
2.2.1 Struktur und Funktion von YB-1 .....	9
2.2.2 Die Rolle von YB-1 bei Transkription und Translation.....	11
2.2.3 Bedeutung von YB-1 bei Medikamentenresistenz und Prognose von Tumorerkrankungen .....	12
<b>3. Zielsetzung</b> .....	<b>16</b>
<b>4. Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
4.1 Material .....	17
4.1.1 Reagenzien .....	17
4.1.2 Puffer und Lösungen .....	18
4.1.3 Geräte .....	19
4.1.4 Antikörper .....	19
4.1.5 Zelllinien .....	20
4.1.6 Gewebeproben.....	21
4.1.7 Patientenkollektiv .....	21
4.1.7.1 Mammakarzinompatientinnen.....	21
4.1.7.2 Ovarialkarzinompatientinnen .....	22
4.2 Methoden.....	22
4.2.1 Zellkultur .....	22
4.2.2 Herstellung von Zelllinienlysaten .....	23
4.2.3 Herstellung von Gewebelysaten.....	23
4.2.4 Herstellung von Plasma- und Serumproben sowie Leukozytenlysaten .....	24
4.2.5 Protokoll YB-1 ELISA und Anfertigung der HeLa-Lysat Standardkurve.....	24
4.2.6 Proteinbestimmung.....	26
4.2.7 Immunhistochemie .....	27

---

4.2.7.1	Herstellung von Paraffinblöcken.....	27
4.2.7.2	Protokoll Mammakarzinom.....	27
4.2.7.3	Protokoll Ovarialkarzinom.....	28
4.2.8	Statistische Methoden .....	29
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
5.1	YB-1 Gehalt in Zelllinienlysaten und Kulturmediumüberständen bestimmt mittels ELISA.....	30
5.1.1	YB-1 Gehalt in Zelllinienlysaten bestimmt mittels ELISA .....	30
5.1.2	YB-1 Gehalt in Kulturmediumüberständen bestimmt mittels ELISA .....	31
5.2	YB-1 Gehalt in Mammakarzinomgewebelysaten und benignen Mammagewebelysaten bestimmt mittels ELISA .....	32
5.2.1	YB-1 Gehalt in Mammakarzinomgewebelysaten bestimmt mittels ELISA .....	32
5.2.2	YB-1 Gehalt in benignen Mammagewebelysaten bestimmt mittels ELISA.....	34
5.3	YB-1 Gehalt in Ovarialkarzinomgewebelysaten und benignen Ovarialgewebelysaten bestimmt mittels ELISA .....	36
5.3.1	YB-1 Gehalt in Ovarialkarzinomgewebelysaten bestimmt mittels ELISA.....	36
5.3.2	YB-1 Gehalt in benignen Ovarialgewebelysaten bestimmt mittels ELISA.....	38
5.4	YB-1 Gehalt in malignem Aszites bestimmt mittels ELISA .....	39
5.5	YB-1 Gehalt im Serum und Plasma gesunder Probanden bestimmt mittels ELISA.....	40
5.6	YB-1 Gehalt in Leukozytenlysaten gesunder Probanden bestimmt mittels ELISA.....	42
5.7	Qualitätsüberprüfungen des ELISAs.....	43
5.7.1	Kontrolle auf Matrixeffekte der Gewebelysate im ELISA .....	43
5.7.1.1	Mammakarzinomgewebelysat und HeLa-Lysat.....	44
5.7.1.2	Benignes Mammagewebelysat und HeLa-Lysat.....	45
5.7.1.3	Ovarialkarzinomgewebelysat und HeLa Lysat .....	46
5.7.1.4	Mammakarzinomgewebelysat und SKBR3-Lysat sowie OVMZ6-Lysat .....	47
5.7.1.5	Serielle Verdünnungen von Mammakarzinomgewebelysaten mit und ohne HeLa-Lysat.....	49
5.7.1.6	Sequentielle Verdünnung von Mammakarzinomgewebelysat und HeLa-Lysat.....	50
5.7.2	Kompetition des YB-1 durch Vorinkubation mit N-terminalem Peptid .....	51

---

5.8	YB-1 Gehalt im Mamma- und Ovarialkarzinomgewebe bestimmt mittels Immunhistochemie .....	53
5.8.1	YB-1 Gehalt im Mammakarzinomgewebe bestimmt mittels Immunhistochemie .....	53
5.8.2	YB-1 Gehalt im Ovarialkarzinomgewebe bestimmt mittels Immunhistochemie .....	55
5.9	Statistische Auswertung der Daten.....	57
5.9.1	Statistische Auswertung der Daten beim Mammakarzinom .....	57
5.9.1.1	Korrelation des YB-1 Gehalts bestimmt durch ELISA und Immunhistochemie beim Mammakarzinom.....	57
5.9.1.2	YB-1 Gehalt bestimmt durch ELISA und rezidivfreies Überleben beim Mammakarzinom .....	58
5.9.1.3	YB-1 Gehalt bestimmt durch ELISA und Gesamtüberleben beim Mammakarzinom .....	59
5.9.1.4	YB-1 Gehalt bestimmt durch Immunhistochemie und rezidivfreies Überleben beim Mammakarzinom.....	60
5.9.1.5	YB-1 Gehalt bestimmt durch Immunhistochemie und Gesamtüberleben beim Mammakarzinom .....	61
5.9.1.6	YB-1 Gehalt und Grading beim Mammakarzinom.....	62
5.9.1.7	YB-1 Gehalt und Lymphknotenstatus beim Mammakarzinom .....	63
5.9.2	Statistische Auswertung der Daten beim Ovarialkarzinom. ....	63
5.9.2.1	Korrelation des YB-1 Gehalts bestimmt durch ELISA und Immunhistochemie beim Ovarialkarzinom.....	63
5.9.2.2	YB-1 Gehalt bestimmt durch ELISA und rezidivfreies Überleben beim Ovarialkarzinom.....	63
5.9.2.3	YB-1 Gehalt bestimmt durch ELISA und Gesamtüberleben beim Ovarialkarzinom.....	64
5.9.2.4	YB-1 Gehalt bestimmt durch Immunhistochemie und rezidivfreies Überleben beim Ovarialkarzinom .....	65
5.9.2.5	YB-1 Gehalt bestimmt durch Immunhistochemie und Gesamtüberleben beim Ovarialkarzinom.....	66
5.9.2.6	YB-1 Gehalt und Grading beim Ovarialkarzinom .....	67
5.9.2.7	YB-1 Gehalt und FIGO-Stadium beim Ovarialkarzinom .....	68

---

<b>6.</b>	<b>Diskussion</b> .....	69
6.1	YB-1 Gehalt in Zelllinien.....	69
6.2	YB-1 Gehalt im Mammakarzinom.....	72
6.3	YB-1 Gehalt im Ovarialkarzinom .....	77
6.4	YB-1 Gehalt im malignem Aszites .....	81
6.5	YB-1 Gehalt im Blut .....	82
6.6	YB-1 und Matrixeffekte .....	83
6.7	Ausblick .....	90
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	92

## 1. Zusammenfassung

Das zur Familie der „cold shock domain“ (CSD) Proteine gehörende Y-box-bindende Protein YB-1 übt zahlreiche zelluläre Funktionen aus, wie die Regulation der Transkription, die Regulation der Translation, die DNA-Reparatur und die Entwicklung einer Medikamentenresistenz, und ist eng mit der Zellproliferation assoziiert. Bei zahlreichen Malignomen, und hier insbesondere beim Mammakarzinom, finden sich erhöhte YB-1 Werte. Hohe YB-1 Werte sind mit einer schlechteren Prognose sowie einer erhöhten Chemotherapieresistenz assoziiert. Auch beim Ovarialkarzinom spielt eine erhöhte Protein-Expression von YB-1 hinsichtlich des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Überlebens eine entscheidende Rolle.

Bisher stehen zur Bestimmung des YB-1 Gehalts nur semiquantitative immunhistochemische Methoden zur Verfügung. Ziel der vorliegenden Arbeit war es einen neu entwickelten ELISA auf seine Anwendung in verschiedenen Gewebelysaten, Plasma, Serum und malignen Aszites zu testen und den per ELISA gemessenen YB-1 Gehalt mit dem per Immunhistochemie bestimmten Gehalt an YB-1 zu vergleichen. Außerdem sollte untersucht werden, inwieweit der YB-1 Gehalt als Risikofaktor für das Gesamtüberleben bzw. das rezidivfreie Überleben von Patientinnen mit Mammakarzinomen bzw. Ovarialkarzinomen dienen kann.

Im Einzelnen wurden anhand des ELISA-Tests Tumorzelllinienlysate und deren Kulturmediumüberstände, Mammakarzinomgewebelysate und benigne Mammagewebelysate sowie Ovarialkarzinomgewebelysate und benigne Ovarialgewebelysate auf ihren Gehalt an YB-1 untersucht. Auch in Aszitesproben von Ovarialkarzinompatientinnen und Blutproben (Plasma und Serum) von gesunden Probanden erfolgte eine YB-1 Bestimmung. Es fanden sich hohe YB-1 Werte in Tumorzelllinienlysaten, wohingegen YB-1 in Kulturmediumüberständen der Tumorzelllinien kaum nachweisbar war. Die Mammakarzinomgewebelysate enthielten mehr YB-1 als die benignen Mammagewebelysate und auch der YB-1 Gehalt der Ovarialkarzinomgewebelysate lag über dem der benignen Ovarialgewebelysate. Der YB-1 Gehalt der Ovarialkarzinomgewebelysate lag über dem der Mammakarzinomgewebelysate. Maligner Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen enthielt nur einen geringen Gehalt an YB-1. Blutproben gesunder Probanden ergaben einen sehr unterschiedlichen Gehalt an YB-1. Allerdings ließ sich der YB-1 Gehalt im Blut, im Gegensatz zu anderen Proben, nicht durch eine Vorinkubation des, gegen das N-terminale Epitop des YB-1 gerichteten, Antikörpers mit dem N-terminalen Peptid von YB-1 reduzieren.

Bei dem Vergleich des mittels ELISA bestimmten YB-1 Gehalts mit den Messwerten der Immunhistochemie für YB-1 ergab sich für das Mammakarzinom eine statistisch signifikante Korrelation. Beim Ovarialkarzinom zeigte sich hingegen kein statistisch signifikanter Zusammenhang der Werte aus beiden Verfahren

Beim Follow-up der Mamma- und Ovarialkarzinompatientinnen wurde überprüft, ob ein hoher YB-1 Gehalt mit einer Verschlechterung des Gesamtüberlebens bzw. des rezidivfreien Überlebens assoziiert ist. Es konnte jedoch in beiden Patientengruppen, wohl aufgrund der geringen Fallzahl, weder für das Gesamtüberleben noch für das rezidivfreie Überleben eine Korrelation mit dem YB-1 Gehalt nachgewiesen werden. Bei Patientinnen mit Mammakarzinomen stand die Höhe des YB-1 Gehalts sowohl im ELISA als auch in der Immunhistochemie in keinem Zusammenhang mit dem Grading des Tumors oder dem Lymphknotenstatus der Patientinnen. Dagegen fand sich bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem immunhistochemisch bestimmten YB-1 Gehalt und dem Grading des Tumors. Bei dem per ELISA bestimmten YB-1 Gehalt wurde die statistische Signifikanz dieses Zusammenhangs gerade verfehlt. Zwischen dem FIGO Stadium der Patientinnen mit Ovarialkarzinomen und dem immunhistochemischen bzw. dem im ELISA bestimmten YB-1 Gehalt fand sich auch kein signifikanter Zusammenhang.

Bei der Überprüfung auf Matrixeffekte im ELISA ergaben sich Hinweise, dass in verschiedenen Gewebelysaten ein Faktor enthalten sein könnte, der an YB-1 bindet und es somit für den Zugang durch die Antikörper im ELISA maskiert. Da YB-1 ein sehr bindungsfreudiges Protein ist, das in verschiedenste Prozesse wie zum Beispiel Transkription, Translation und RNA Stabilisierung involviert ist, findet sich eine hohe Zahl an möglichen Reaktionspartnern, die als Störfaktoren im ELISA fungieren könnten.

Diese „Störfaktoren“ zu isolieren wird somit Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. Des Weiteren bedürfen die initialen Ergebnisse dieser Arbeit der Verifizierung an größeren Patientenkollektiven.



## 2. Einleitung

### 2.1 Mamma- und Ovarialkarzinom

Das Mammakarzinom ist, neben dem Lungen- und Kolonkarzinom, die häufigste maligne Erkrankung der Frau in den westlichen Industrieländern, mit einer geschätzten Zahl von 1 Million Neuerkrankungen pro Jahr weltweit (Bergmann et al, 2005). Allerdings hat sich die Früherkennung und Prognose des Mammakarzinoms in den letzten Jahren deutlich verbessert. Verglichen mit Frauen bei denen die Diagnosestellung zwischen 1976 und 1990 lag, wurde bei Frauen in den Jahren 1991-2000 ein Rückgang der Mortalität um 28 % in den ersten 5 Jahren nach Diagnosestellung festgestellt (Berube et al, 2007). Trotzdem ist die Mortalität bei Patientinnen mit Mammakarzinom noch sehr hoch. So beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 75 %, aber nach 10 Jahren leben nur noch 60 % aller Patientinnen mit Mammakarzinomen (Weyerstahl et al, 2005). Die Mortalitäts- und Rezidiv-Rate ist jedoch nicht für alle Patientinnen gleich hoch, sondern hängt von verschiedenen Parametern wie Alter, Nodalstatus, Tumorgröße, histologisches Grading, Steroidhormonrezeptorstatus, Her2/neu-Status und anderen tumorbiologischen Faktoren ab.

In Abhängigkeit von diesen Faktoren wird durch den behandelnden Arzt entschieden, ob sich die Patientinnen einer adjuvanten Therapie wie Chemotherapie, Hormontherapie oder Antikörpertherapie unterziehen sollten. Da diese Therapien mit potentiellen Nebenwirkungen behaftet sind, ist es wichtig, eine sorgfältige Nutzen-Risiko-Abwägung durchzuführen, um sicher zu gehen, dass die Patientinnen von der vorgeschlagenen Therapie auch profitieren werden. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist die Einführung der endokrinen Therapie in die Brustkrebsbehandlung. So werden nur die Patientinnen, deren Karzinome Steroidhormonrezeptoren produzieren, einer endokrinen Therapie unterzogen. Etwa 50-60 % der Tumoren von prämenopausalen und etwa 70-80 % der Tumoren von postmenopausalen Patientinnen zeigen eine Expression von Östrogen- oder Progesteronrezeptoren (Weyerstahl et al, 2005). Von diesen Tumoren weiß man daher schon vor Therapiebeginn, dass sie einer Therapie mit Tamoxifen, einem selektiven Östrogenrezeptormodulator zugänglich sind.

Auch die Therapie mit dem humanisierten Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) wird nur bei Patientinnen angewandt, die Her2/neu überexprimieren und von denen man somit ein Ansprechen auf die Therapie erwartet. Her2/neu gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Etwa 25-30 % aller Mammakarzinome zeigen eine

Überexpression von Her2/neu, die mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Slamon et al, 2001). Ein solcher validierter Marker zur Vorhersage des Ansprechens eines bestimmten Tumors auf die Chemotherapie existiert beim Vorliegen eines Mammkarzinoms bisher nicht. So muss sich die Patientin erst einigen Zyklen Chemotherapie unterziehen, bevor man durch ein erneutes Staging deren Wirksamkeit feststellen kann. Da die Chemotherapie jedoch die Therapie mit den schwerwiegendsten Nebenwirkungen ist, potentiell sogar mit letalem Ausgang, scheint es gerade hier besonders wichtig, schon vor Therapiebeginn das Ansprechen auf bestimmte Therapeutika einzuschätzen. Es könnte dann möglich sein, unnötige Therapien zu vermeiden bzw. schon frühzeitig alternative Chemotherapieschemata heranzuziehen. Die moderne Brustkrebstherapie sollte somit aus einem maßgeschneiderten individuell angepassten Therapiekonzept bestehen, das keine unnötigen, nebenwirkungsreichen Übertherapien, aber auch keine lebensverkürzenden Untertherapien zulässt.

Während das Mammkarzinom eine häufige maligne Erkrankung der Frau darstellt, ist das Ovarialkarzinom in den westlichen Industrieländern die führende Todesursache bei Patientinnen mit gynäkologischen Malignomen. Die Prognose des Ovarialkarzinoms ist sehr schlecht, denn 75 % aller Tumorerkrankungen werden erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt, bei einer 5 Jahres-Gesamtüberlebensrate von 5-25 %. Der Verlauf und die Mortalität der Ovarialkarzinomerkrankung haben sich in den letzten Jahren nur gering verbessert.

Die Therapieoptionen des Ovarialkarzinoms sind begrenzt. So besteht die Therapie zunächst aus einer radikalen Operation. Bei Patientinnen mit einem FIGO Stadium IC, II oder darüber hinaus ist auch nach einer radikalen Operation davon auszugehen, dass noch proliferationsfähige Tumorzellen verblieben sind. Diese Patientinnen müssen sich daher nach erfolgter Operation einer postoperativen Chemotherapie unterziehen, die Wirksamkeit dieser Chemotherapie ist jedoch beim Ovarialkarzinom häufig begrenzt.

So wird als einer der Gründe für die hohe Mortalität des Ovarialkarzinoms eine primäre Resistenz der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika angenommen. Bei etwa 20 % aller Ovarialkarzinompatientinnen sind die Tumoren primär resistent gegenüber „first-line“ Chemotherapeutika (Markman und Bookman, 2000) wie organische Platinanaloga und Taxane, weitaus häufiger handelt es sich jedoch um eine erworbene Resistenz gegenüber Chemotherapeutika.

Es wurden bereits viele Mechanismen diskutiert, die zur Entstehung einer Resistenz gegenüber Platinanaloga beitragen könnten wie zum Beispiel erhöhte zelluläre Entgiftung von Medikamenten (Godwin et al, 1992), verstärkte DNA Reparatur-Mechanismen (Eastman und Schulte 1988; Masuda et al 1988), reduzierte Akkumulation von Medikamenten (Andrews et al, 1988; Nakagawa et al, 1993) und viele andere. Diese Chemotherapieresistenz zu überwinden, stellt somit eine Schlüsselrolle in der Therapie des Ovarialkarzinoms dar.

Ein Faktor, der sowohl beim Mammakarzinom als auch beim Ovarialkarzinom zur Vorhersage der Chemotherapieresistenz und zur Vorhersage des Verlaufs der Krankheit eine entscheidende Rolle spielt, ist, wie im folgenden Abschnitt dargelegt, das Y-box bindende Protein YB-1.

## **2.2 Das Y-box bindende Protein YB-1**

### **2.2.1 Struktur und Funktion von YB-1**

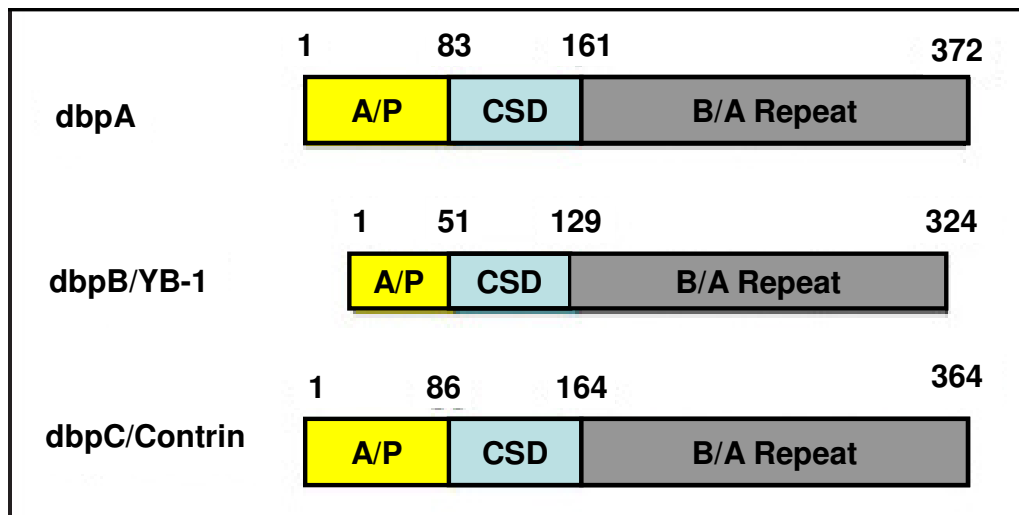
Das zur Familie der „cold shock domain“ (CSD) Proteine gehörende Y-box bindende Protein YB-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der an die sogenannte Y-box, eine invertierte CCAAT-Box innerhalb der Promoterregion von vielen eukaryontischen Genen, bindet. YB-1 wurde 1988 zum ersten Mal von Didier et al als ein Transkriptionsfaktor beschrieben, der an die Promoterregion des „major histocompatibility complex“ (MHC) Klasse II bindet (Didier et al, 1988). Das 324 Aminosäuren lange und 43 kDa große YB-1 Protein ist das evolutionär am höchsten konservierte nukleinsäurenbindende Protein, das zurzeit bekannt ist (Wolffe et al, 1992). Somit findet sich im Vergleich der Aminosäuresequenzen der YB-1 Moleküle des Menschen und der Maus eine > 98%ige Übereinstimmung (Lu et al, 2005). Allerdings sind die CSD-Proteine der Eukaryonten nur zu 43 % mit dem „cold shock protein“ CSPA aus *E. coli* identisch (Wistow, 1990).

Wild-Typ cold-shock-Proteine werden nur in Bakterien gefunden und wirken als RNA-Chaperone (Jiang et al, 1997; Matsumoto und Wolffe, 1998). Bakterien schützen sich durch erhöhte Expression von cold-shock-Proteinen, die durch einen raschen Temperaturabfall induziert werden, vor Stress durch niedrige Temperaturen (Jones und Inoye 1994; Thieringer et al, 1998; Jürchott et al, 2003; Horn et al, 2007). In Eukaryonten finden sich den cold shock Proteinen homologe Regionen im nukleinsäurebindenden Bereich der CSD-Protein Familie

(Lee et al, 1994; Kloks et al, 2002; Kloks et al, 2004). Allerdings verfügen diese eukaryonten CSD-Proteine über keine cold shock Funktionen (Kohno et al, 2003).

Y-box bindende Proteine enthalten neben der CSD eine variable N-terminale Domäne sowie eine C-terminale Domäne. Diese wurden wahrscheinlich während der Evolution vom unizellulären zum multizellulären Organismus hinzugefügt (Kohno et al, 2003). Die N-terminale Domäne ist reich an den Aminosäuren Alanin und Prolin. Ihr wurde bisher jedoch keine spezifische Funktion zugeschrieben. Die C-terminale Domäne besteht aus alternierenden Regionen von überwiegend basischen und sauren Aminosäuren (Schindelin et al, 1993; Schröder et al, 1994). Jede dieser Regionen ist ca. 30 Aminosäuren lang. Ein solcher Abschnitt wird als „B/A repeat“ bezeichnet. Der „B/A repeat“ wurde in Y-box bindenden Proteinen des Huhns und *Xenopus* gefunden (Lindquist, 1986). In Pflanzen und intervertebralen Spezies hingegen dominieren Zinkfinger Motive. Das heißt, der „B/A repeat“ könnte einzigartig für vertebrale Organismen sein (Kohno et al, 2003). Die C-terminale Domäne funktioniert wahrscheinlich als „charged zipper“ und ist für die Formation von Homodimeren entscheidend. Sie zeigt eine sehr hohe Affinität für einzelsträngige DNA und RNA *in vitro* (Izumi et al, 2001) und ist somit wahrscheinlich auch für die Bindung von YB-1 an Nukleinsäuren von Bedeutung.

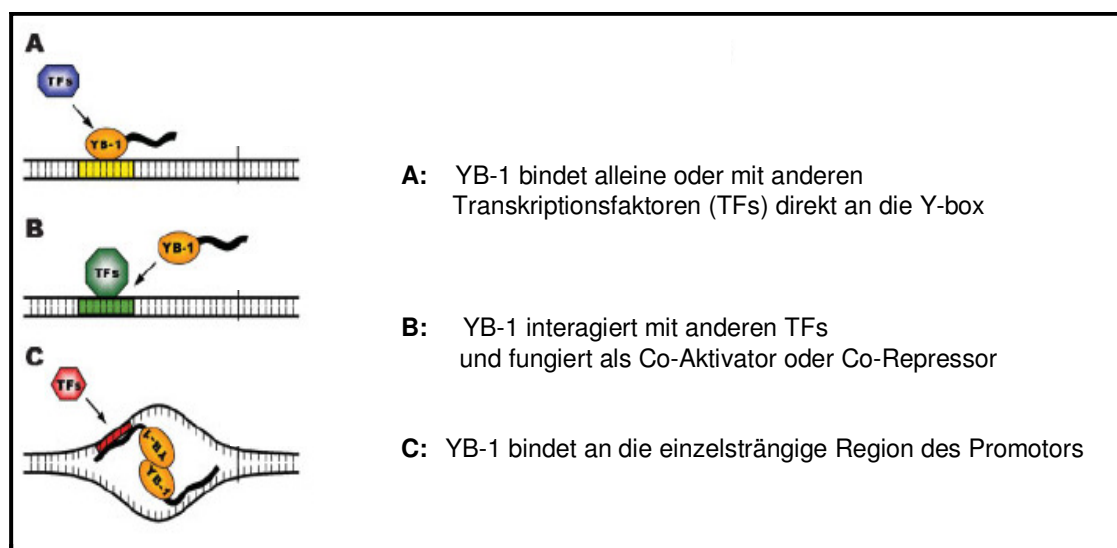
Zur Familie der Y-box bindenden Proteine gehören neben YB-1, das identisch mit dbpB ist, auch noch die Proteine dbpA und dbpC. DbpA wurde 1995 kloniert (Kudo et al, 1995) und als ein Protein beschrieben, das an den „epidermal growth factor receptor enhancer“ bindet (Sakura et al, 1998). Es wurde auch berichtet, dass dbpA eine Rolle in der Karzinogenese des hepatozellulären Karzinoms zu spielen scheint (Hayashi et al, 2002; Arakawa et al, 2004) und seine nukleäre Lokalisation bei dieser Erkrankung eine schlechte Prognose bedeuten könnte (Yasen et al, 2005). DbpC wird auch als Contrin bezeichnet. Es ist ein keimzellspezifisches Y-box bindendes Protein, das im Hoden exprimiert wird und 1999 kloniert wurde (Tekur et al, 1999). Kohno et al zeigten 2006, dass dbpC in testikulären Seminomen und Dysgerminomen des Ovars hoch exprimiert wird und somit ein neues Krebsantigen darstellen könnte (Kohno et al, 2006).



**Abb. 1** Struktur Y-box bindender Proteine (A/P = Alanin/Prolin)(nach Kohno et al, 2003)

### 2.2.2 Die Rolle von YB-1 bei Transkription und Translation

YB-1 kontrolliert die Transkription verschiedener Gene auf drei unterschiedlichen Wegen(s. Abb. 2). Einerseits interagiert YB-1 direkt mit der Y-box, um Zielgene zu regulieren, wie zum Beispiel bei der Regulation der MDR1 Expression oder auch bei der Regulation verschiedener wachstumsassoziierter Gene. Andererseits reguliert YB-1 die Genexpression auch auf eine Y-box-unabhängige Art, indem es mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert. Als dritten Mechanismus zeigt YB-1 eine hohe Affinität zu einzelsträngiger DNA, die vor allem in Regionen transkriptionsaktiver Promotoren vorkommt (Wilusz et al, 2001; Kohno et al, 2003).



**Abb. 2** Mechanismen der DNA-Bindung von YB-1 (nach Kohno et al, 2003)

YB-1 spielt aber nicht nur bei der Transkription von Genen eine wichtige Rolle sondern interagiert auch mit RNA und ist damit ein wichtiger Faktor der Translation (Ladomery und Sommerville, 1994; Evdokimova et al, 1998; Sommerville, 1999; Ashizuka et al, 2002; Fukuda et al, 2004). So hat YB-1 eine essentielle Funktion im „packaging“ der mRNA in „messenger ribonucleoprotein particle“ (mRNP) im Zytoplasma (Evdokimova et al, 1995). Außerdem ist YB-1 ein bedeutender Faktor, der zur Stabilisierung der mRNA beiträgt, wofür vor allem die CSD entscheidend zu sein scheint (Evdokimova et al, 2001). Des Weiteren kann YB-1 die Translation dosisabhängig beeinflussen. Ein niedriger Gehalt an YB-1 aktiviert die Translation, während sie ein hoher Gehalt inhibiert (Minnich und Ovchinnikov, 1992; Skobkin et al, 2001).

CSD-Proteine wechseln, abhängig von verschiedenen Faktoren, zwischen Zytoplasma und Nukleus und können somit Transkription und Translation in den beiden Kompartimenten kontrollieren (Wilkinson und Shyu, 2001; Faustino und Cooper, 2003; Raffetseder et al, 2003). YB-1 ist jedoch hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert und wird u.a. in den Zellkern transportiert wenn die Zellen mit ultravioletter Strahlung oder Zytostatika behandelt werden (Koike et al, 1997; Saji et al, 2003). Im Zytoplasma scheint YB-1 an Ankerproteine gebunden zu sein. Die Bindungsstelle hierfür wurde der C-terminalen Domäne zugesprochen (Koike et al, 1997). Diese enthält ein zytoplasmatisches Retentionssignal.

### **2.2.3 Bedeutung von YB-1 bei Medikamentenresistenz und Prognose von Tumorerkrankungen**

Wie bereits weiter oben erwähnt, bindet YB-1 an die sogenannte Y-box, die sich in der Promoterregion verschiedener eukaryontischer Gene befindet. So findet man zum Beispiel eine Y-box in der Promotorregion von wachstumsassoziierten Genen aber auch in der Promoterregion des „multidrug resistance 1“ (MDR1) Gens (Labielle et al, 2002). Die cDNA für den MDR1-Y-box bindenden nukleären Faktor wurde 1998 kloniert. Es stellte sich heraus, dass die Sequenz dieser DNA mit der des YB-1 identisch war (Swamyathan et al, 1998).

Das MDR1 Gen spielt eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung einer Chemotherapieresistenz (Fojo et al, 1987; Friche et al, 1989; Marei et al, 1991; Pauly et al, 1992). MDR1 ist ein SOS-Gen. Die MDR1-Promoter-Aktivität in den Zellen nimmt zu, wenn diese durch äußere Faktoren unter Stress gesetzt werden. Man findet eine Zunahme der

Aktivität unter der Behandlung mit Zytostatika (Chaudhary und Roninson, 1993; Asakuno et al, 1994), unter ultravioletter Strahlung (Uchiumi et al, 1993) sowie unter Hitzeschock (Chin et al, 1990; Miyazaki et al, 1992).

Die Zunahme der MDR1-Promoter-Aktivität scheint durch YB-1 über Bindung an die Y-box in der Promoterregion vermittelt zu werden (Kohno et al, 1992; Uchiumi et al, 1993; Asakano et al, 1994). So zeigte sich eine erhöhte Aktivität von YB-1 in nukleären Extrakten von Krebszellen, die zuvor mit ultravioletter Strahlung oder Zytostatika behandelt wurden (Kohno et al, 1992; Uchiumi et al, 1993). Bargou et al zeigten 1997, dass in multiresistenten MCF-7 Mammakarzinomzellen die nukleäre Lokalisation von YB-1 mit einer MDR-1-Gen-Überexpression verbunden ist (Bargou et al, 1997). YB-1 scheint somit als positiver Transkriptionsfaktor für die Hochregulation des MDR1-Gens zu fungieren und daher eine wichtige Rolle im Signaltransduktionsweg bei Umweltstress und Medikamentenresistenz zu spielen.

Das MDR-1 Gen kodiert das P-Glykoprotein (PGP). Das PGP ist ein 170 kDa großes transmembranes Protein, das zur Familie der ATP bindenden Transporter gehört (Kuwano et al, 2004). PGP Expression ist verantwortlich für Resistenzen gegenüber einer großen Bandbreite an Chemotherapeutika, die unterschiedlich in ihrer Struktur und Wirkungsweise sind und führt somit zur Entwicklung eines multiresistenten Phänotyps (Gottesman und Pastan, 1993/ Perez et al, 1993/ Alvarez et al, 1995/ Scherf et al, 2000/ Gottesman et al, 2002). Des Weiteren scheint PGP auch eine Rolle in der Tumoraggressivität zu spielen (Pinedo und Giaccone, 1995).

Die Relevanz der PGP Expression für klinische Medikamentenresistenz wird jedoch kontrovers diskutiert, da eine Assoziation zwischen PGP Expression und Überleben nicht in allen Untersuchungen erhoben werden konnte (Kaye, 1997). Es ist außerdem immer noch unklar, ob die Resistenzentwicklung eine direkte Folge der PGP Expression ist oder ob die PGP Expression nur einen Marker für andere genetische und biologische Veränderungen darstellt.

Darüber hinaus scheint YB-1 auch noch über andere Mechanismen Chemotherapieresistenz, vor allem gegen platinhaltige Zytostatika, zu vermitteln. So wurde gezeigt, dass YB-1 vornehmlich an Cisplatin modifizierte DNA bindet (Ise et al, 1999). Des Weiteren wurde

beschrieben, dass die YB-1 Konzentration in Cisplatin resistenten Zelllinien höher ist als in ihren medikamentensensiblen Elternzellen. Die zellulären YB-1 Level korrelierten hierbei direkt mit der Cisplatin Sensitivität (Ohga et al, 1996). Yahata et al berichteten ebenfalls über die Assoziation einer erhöhten YB-1 Expression im Nukleus mit einer erworbenen Cisplatin Resistenz in Ovarialkarzinomzellen (Yahata et al, 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Ovarialkarzinomzelllinien, die resistent gegenüber Cisplatin waren, eine Kreuzresistenz gegen eine Vielzahl anderer Chemotherapeutika zeigten und somit einen multiresistenten Phänotyp entwickelt hatten (Hamauchi et al, 1993).

Auch in malignen Melanomzellen führte eine Downregulation von YB-1 zu einer erniedrigten Resistenz gegenüber den Chemotherapeutika Cisplatin und Etoposid (Schitteck et al, 2007).

Der Zusammenhang zwischen YB-1 Expression und Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika wurde unterstützt von Shibahara et al, die zeigten, dass Stammzellen von Mäusen, die über ein ausgeschaltetes YB-1 Allel verfügten, eine erhöhte Sensitivität gegenüber den zytotoxischen Stoffen Cisplatin und Mitomycin C zeigten (Shibahara et al, 2004). Levenson et al zeigten ebenfalls dass Resistenzen gegenüber DNA-interagierenden Therapeutika mit einer erhöhten YB-1 Expression verbunden sind (Levenson et al, 2000).

Bemerkenswerterweise ist YB-1 nicht nur ein Schlüsselfaktor für die Chemotherapieresistenz und PGP Expression, sondern wirkt auch auf viele andere biologische Prozesse, die zu der Entwicklung eines malignen Phänotyps beitragen (Janz et al, 2002). So zeigten zum Beispiel Bergmann et al 2005 in einem transgenen Maus Modell, dass YB-1 Brustkrebs durch die Induktion von genetischer Instabilität, die durch mitotische Fehler und Zentrosomen Amplifikation entsteht, provoziert. In dieser Studie wurde YB-1 als Brustkrebsonkogen identifiziert, das eine 100%ige Penetranz zeigte. YB-1 unterschied sich von bereits etablierten Brustkrebsonkogenen dadurch, dass die entstandenen Tumoren multiple Phänotypen zeigten (Bergmann et al, 2005). Da Aneuploidie und eine zugrunde liegende genetische Instabilität in nahezu allen Tumoren zu finden sind (Lengauer et al, 1998), könnte YB-1 über diesen Mechanismus nicht nur zur Brustkrebsentstehung sondern auch zur Entwicklung anderer Malignome führen.

Wu et al zeigten 2006, dass eine Überexpression von YB-1 in Brustkrebszelllinien mit einer erhöhten Expression von Her2/neu und EGFR (epidermal growth factor receptor) verbunden ist. Her2/neu und EGFR wiederum verstärken das Wachstum aggressiver Brustkrebszellen.



Mutationen im YB-1 Gen verhinderten die Induktion dieser Rezeptoren und machten die Zellen weniger sensitiv gegenüber EGF (epidermal growth factor). Weiterhin wurde gezeigt, dass nach der Ausschaltung von YB-1 durch kurze interferierende RNA die Expression von Her2/neu und EGFR supprimiert werden konnte. Daraus resultierte eine Reduktion des Tumorwachstums (Wu et al, 2006)

Außerdem zeigten zahlreiche Studien einen Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben bzw. rezidivfreien Überleben der Patientinnen und dem YB-1 Level des Tumors. So wurde von Bargou et al schon 1997 berichtet, dass YB-1 in 75 % der Mammakarzinome überexprimiert ist (Bargou et al, 1997). Weiterführende Untersuchungen zeigten einen Zusammenhang zwischen YB-1 Expression und Gesamtüberleben bzw. Chemotherapieresistenz im Mammakarzinom wie zum Beispiel die 2002 erschienene Studie von Janz et al (Janz et al, 2002) oder die Daten aus der Untersuchung von Fujita et al, die 2005 erschienen sind (Fujita et al, 2005). Mehrere Studien berichteten auch über eine schlechtere Prognose für Patientinnen mit Ovarialkarzinomerkrankungen, deren Tumoren eine erhöhte Expression von YB-1 zeigten. So wiesen Kamura et al nach, dass eine erhöhte nukleäre YB-1 Konzentration im Ovarialkarzinom zu einem verkürzten rezidivfreien Überleben führte (Kamura et al, 1999). Insofern scheint YB-1 nicht nur eine wichtige Rolle in der Prognose des Mammakarzinoms sondern auch in der des Ovarialkarzinoms zu spielen.

Dementsprechend scheint YB-1 als ein wesentlicher tumorbiologischer Faktor in bestimmten Tumorerkrankungen, wie zum Beispiel beim Mamma- und Ovarialkarzinom, zur Vorhersage des Ansprechens eines Tumors auf die Chemotherapie sowie auch zur Vorhersage des Gesamtüberlebens bzw. des rezidivfreien Überlebens in Frage zu kommen.

### **3. Zielsetzung**

Zur Bestimmung des Gehaltes des Y-Box-bindenden Proteins YB-1 in Tumorgeweben stehen bisher nur immunhistochemische Methoden zur Verfügung. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einen in der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der Technischen Universität München entwickelten immunenzymometrischen Test (ELISA) auf seine Anwendung zur Bestimmung des YB-1 Gehalts in verschiedenen Gewebelysaten (Mamma- und Ovarialkarzinomgewebe sowie benignes Mamma- und Ovarialgewebe), in Zelllinienlysaten und deren Kulturmediumüberständen, in malignem Aszitis sowie in Plasma, Serum und Leukozytenlysaten gesunder Probanden zu überprüfen. Die an Gewebelysaten erhobenen Werte sollten mit der bewährten Methode der YB-1 Immunhistochemie verglichen werden. Zudem sollten die an den Geweben erhobenen Daten auch mit dem rezidivfreien bzw. dem Gesamtüberleben der Patientinnen in Beziehung gebracht werden und damit gezeigt werden, ob die Protein-Überexpression von YB-1 als Krebsbiomarker zur Beschreibung des Krankheitsverlaufes beim Mamma- bzw. Ovarialkarzinom klinisch verwertbar ist.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Reagenzien

APAAP Mouse Dako REAL Detection System	Dako, Hamburg
2-Amino-2-Methyl-1,3-Propanediol	Merck, Darmstadt
BCA-Protein-Assay	Pierce, Rockford, USA
BSA = bovines Serum Albumin, Reinheit 98%, Cohn Fraction V	ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
Citratpuffer	Sigma-Aldrich Chemie, München
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dulbecco`s modified Eagle`s Medium	Gibco, Karlsruhe
EDTA (Stammkonzentration 27mM)	Biochrom AG, Berlin
Ethanol, vergällt	Apotheke Klinikum rechts der Isar, München,
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Gentamycin (10mg/ml)	Gibco, Karlsruhe
Glyceringelatine (Kaisers)	Meck, Darmstadt
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Fluka Chemie, Neu-Ulm
KCl	Merck, Darmstadt
Levamisol	Sigma-Aldrich Chemie, München
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
Liquid DAB plus	Dako, Hamburg
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Naphthol-AS-Bi-Phosphat	Sigma-Aldrich Chemie, München
Natriumnitrit	Sigma-Aldrich Chemie, München
Neufuchsin Stammlösung	Sigma-Aldrich Chemie, München
NH <sub>4</sub> Cl	Merck, Darmstadt

Normales Humanserum	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
PBS = Phosphate-buffered saline	Gibco, Karlsruhe
Pertex	AssistentHistokit, Chemi-Teknik, Oslo, Norwegen
Precipath U	Roche, Mannheim
Salzsäure 2 N	Merck, Darmstadt
Saures Hämalan nach Meyer	Apotheke Klinikum rechts der Isar, München,
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	
Peroxidase Substrat (50-76-02)	KPL, Gaithersburg MD, USA
TMB Solution B (50-65-02)	KPL, Gaithersburg MD, USA
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, München
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, München
Xylol (Xylol Pharm. Helv. VI)	Hedinger, Stuttgart

#### 4.1.2 Puffer und Lösungen

Coatingpuffer	$\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 9,5
Entwicklungspuffer	8,7 g NaCl + 1,5 g Tris-HCl, + 4,9 g Tris auf 1 L aqua dest.
Erythrozytenlysepuffer	0,829 g $\text{NH}_4\text{Cl}$ + 0,1 g KCl
Lösung A aus APAAP Mouse Dako REAL Detection System	44 ml Entwicklungspuffer + 15,5 ml Propandiolpuffer mit Salzsäure 2 N auf pH 8,7 einstellen + 25 mg Levamisol
Lösung B aus APAAP Mouse Dako REAL Detection System	31 mg Naphthol-AS-Bi-Phosphat + 375 $\mu\text{l}$ Dimethylformamid
Lösung C aus APAAP Mouse Dako REAL Detection System	12,8 mg Natriumnitrit + 320 $\mu\text{l}$ aqua dest. + 125 $\mu\text{l}$ Neufuchsin Stammlösung. 1 min bei RT reagieren lassen
Propandiolpuffer	21 g 2-Amino-2-Methyl-1,3-Propandiol in 1 L aqua dest
TBS (Tris-buffered saline)	Tris plus NaCl, pH 8,5 für ELISA Tris plus NaCl, pH 7,6 für IHC

### 4.1.3 Geräte

BD Vacutainer Blutentnahme System	Preanalytical Solutions, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Zeiss, Göttingen Deutschland
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikrodismembrator S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Mikrotiterplattenlesegerät Spectra Reader (I239 001)	SLT Labinstruments, Grödig, Österreich
Mikrotom HM 335 E	Microm, Walldorf, Deutschland
Objekträger Super Frost plus	Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Polystyrolmikrotiterplatten 96-well, schwarz mit durchsichtigem Boden (14625-2385)	Nalge Nunc, Rochester, New York, USA
Polystyrolmikrotiterplatten, 96-well, transparent mit F-Boden (655001)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Polystyrol-Zellkulturflaschen	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

### 4.1.4 Antikörper

#### **Kaninchen-Antikörper gegen das N-terminale Ende von YB-1**

Polyklonaler IgG Antikörper aus dem Kaninchen, von BioGenes GmbH (Berlin) hergestellt im Auftrag von H.D. Royer (CAESAR, Bonn); Immunisierung mit dem N-terminalen Peptid von YB-1 mit der Sequenz Ac-MSSEAETQQPPAC-Amid; über YB-1-Peptid Affinitätschromatographie aufgereinigt; Stammkonzentration 0,5 mg/ml; aufbewahrt bei -20 °C gelöst in TBS

#### **Kaninchen-Antikörper gegen das C-terminale Ende von YB-1**

Polyklonaler IgG Antikörper aus dem Kaninchen, von BioGenes GmbH (Berlin) hergestellt im Auftrag von H.D. Royer (CAESAR, Bonn); Immunisierung mit C-terminalem Peptid von YB-1 mit der Sequenz CDGKETKAADPPAENS-Amid; über YB-1-Peptid Affinitätschromatographie aufgereinigt; Markierung des Antikörpers mit Fluoreszein (FITC) durch die Firma BioGenes GmbH (Berlin); anschließende Entfernung des nicht gebundenen FITC durch Dialyse gegen TBS; Stammkonzentration 1,3 mg/ml; aufbewahrt bei -20 °C gelöst in TBS

**Kaninchen-Antikörper gegen FITC**

Polyklonaler IgG Antikörper aus dem Kaninchen gegen FITC; konjugiert mit einer „horseradish peroxidase“ (anti-fluorescein/Oregon Green®); von Molecular Probes/Invitrogen (Eugene, USA); Stammkonzentration 0,5 mg/ml; aufbewahrt bei -20 °C gelöst in PBS

**Maus-Antikörper gegen Kaninchen-IgG**

Polyklonaler IgG Antikörper aus der Maus gegen Kaninchen IgG (Nr. 211-005-109); von Dianova (Hamburg); aufbewahrt bei 4 °C

**Kaninchen-Antikörper gegen Maus-IgG**

Polyklonaler IgG Antikörper aus dem Kaninchen gegen Maus IgG (Nr. Z0259); von Dako (Hamburg); aufbewahrt bei 4 °C

**4.1.5 Zelllinien**

CAL27	humanes Zungen-Plattenepithelkarzinom
FADU	humanes Nasopharyngeal-Plattenepithelkarzinom
HeLa	humanes Cervixkarzinom
HT1080	humanes Fibrosarkom
SKBR3	humanes Mamma-Adenokarzinom
OVMZ6	humanes Ovarialkarzinom
U937	humanes histiozytäres Lymphom
KMS11	humanes multiples Myelom
KMS12	humanes multiples Myelom
OPM2	humanes multiples Myelom
U266	humanes multiples Myelom

#### 4.1.6 Gewebeproben

Die getesteten Mammakarzinomgewebe und Ovarialkarzinomgewebe sowie die benignen Mamma- und Ovargewebe stammen alle aus der Tumorbank der Frauenklinik der TU München. Von allen Patientinnen lagen unterschriebene Einverständniserklärungen für die Aufbewahrung und Nutzung von Gewebeproben für Forschungszwecke vor.

#### 4.1.7 Patientenkollektiv

##### 4.1.7.1 Mammakarzinompatientinnen

Die 34 untersuchten Mammakarzinompatientinnen waren alle Patientinnen der Frauenklinik der TU München. Das mediane Alter des Kollektivs ist 56 Jahre (37-77 Jahre). 25 der Patientinnen erhielten eine adjuvante Chemotherapie (74 %). Die restlichen 9 Patientinnen erhielten keine Chemotherapie (26 %). 13 Patientinnen erhielten eine adjuvante Hormontherapie (38 %). Die restlichen 21 Patientinnen erhielten keine Hormontherapie (62 %). Klinische und histomorphologische Daten der Patientinnen sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

**Tab. 1** Klinische und histomorphologische Charakteristika der Mammakarzinompatientinnen <sup>1</sup>

	Anzahl	Prozent (%)
<b>Menopausenstatus</b>		
postmenopausal	22	69
prämenopausal	10	31
<b>Lymphknotenstatus</b>		
lymphknoten-positiv	14	73
lymphknoten-negativ	9	27
<b>Tumorgröße</b>		
≤ 2 cm	10	30
> 2 cm	23	70
<b>Tumorgrading</b>		
G 1/2	15	44
G 3/4	19	56

<sup>1</sup> bei einigen Patientinnen waren nicht alle Daten verfügbar

### 4.1.7.2 Ovarialkarzinompatientinnen

Alle 29 Ovarialkarzinompatientinnen waren ebenfalls Patientinnen der Frauenklinik der TU München. Das mediane Alter beträgt 56 Jahre (29-81 Jahre). 21 Patientinnen erhielten eine Chemotherapie (75 %), 7 erhielten keine Chemotherapie (25 %). Von einer Patientin waren diesbezüglich keine Daten erhältlich. Klinische und histomorphologische Daten der Patientinnen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tab. 2** Klinische und histomorphologische Charakteristika der Ovarialkarzinompatientinnen<sup>1</sup>

	Anzahl	Prozent (%)
<b>Resttumor nach Operation</b>		
nicht vorhanden	18	64
vorhanden	10	36
<b>Stadium</b>		
FIGO 1/2	14	50
FIGO 3/4	14	50
<b>Tumor Grading</b>		
G 1/2	13	48
G 3/4	14	52

<sup>1</sup> bei einigen Patientinnen waren nicht alle Daten verfügbar

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellkultur

Die Zelllinien wurden in Polystyrol Zellkulturflaschen in Dulbecco`s modified Eagle`s Medium versetzt mit 5 % fetalem Kälberserum, 1 % L-Glutamin sowie 0,2 % Gentamycin kultiviert. Die Inkubation erfolgte hierbei in befeuchteter 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre bei 37 °C.

Kurz vor der Konfluenz wurden die Zellen mit sterilem PBS gespült, mit EDTA gelöst (1:20 verdünnt in PBS), passagiert und rekultiviert. Zur Gewinnung der Zellysate und Kulturmediumüberstände wurden die Zellen gezählt und so ausgesät, dass sie in etwa 3 Tagen ohne Mediumwechsel einen Konfluenzgrad von 80 % erreichten.



### **4.2.2 Herstellung von Zellienlysaten**

Die verwendeten Zelllinien wurden bis zu einem Konfluenzgrad von 80-90 % ohne Mediumwechsel für mehrere Tage kultiviert. Nach leichtem Schütteln für kurze Zeit wurde das Medium abgenommen und für 10 Minuten bei 4 °C auf Höchstgeschwindigkeit in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80 °C eingefroren. Die Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen, mit EDTA gelöst (1:20 verdünnt in sterilem PBS), gesammelt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf Höchstgeschwindigkeit abzentrifugiert. Die Pellets wurden in PBS resuspendiert und anschließend gezählt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen mit einer entsprechenden Menge TBS + 0,5 % Triton X-100 lysiert, so dass eine Endkonzentration von  $15 \times 10^6$  Zellen pro ml erreicht wurde. Das Gemisch wurde für 2 Stunden bei 4 °C auf dem Drehrad gelassen. Anschließend wurde das Lysat bei 4 °C auf Höchstgeschwindigkeit in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf überführt und bei -80 °C eingefroren. Das Zelltrümmerpellet wurde ebenfalls eingefroren.

### **4.2.3 Herstellung von Gewebelysaten**

Das bei Operationen in der Frauenklinik der TU München gewonnene Gewebe wurde gekühlt als Schnellschnitt in das Institut für Pathologie gebracht. Von dort wurden wiederum ausgewählte Anteile der Gewebeproben gekühlt in das Forschungslabor der Frauenklinik transportiert, wo diese sofort in flüssigem Stickstoff zwischengelagert wurden. Jede Gewebeprobe wurde im Computer in einer Datenbank unter Eingabe der Patientendaten archiviert und bekam eine Nummer zugeteilt. Die Gewebeproben wurden gewogen und anschließend in einem Mikrodismembrator für 30s auf höchster Stufe pulverisiert. Nun wurden 2 ml (bzw. entsprechend weniger bei sehr geringem Feuchtgewicht) TBS + 1 % Triton hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad gelassen. Am nächsten Tag wurden die Proben für 45 min bei 4 °C auf Höchstgeschwindigkeit in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde abgenommen, portioniert und in flüssigem Stickstoff gelagert.

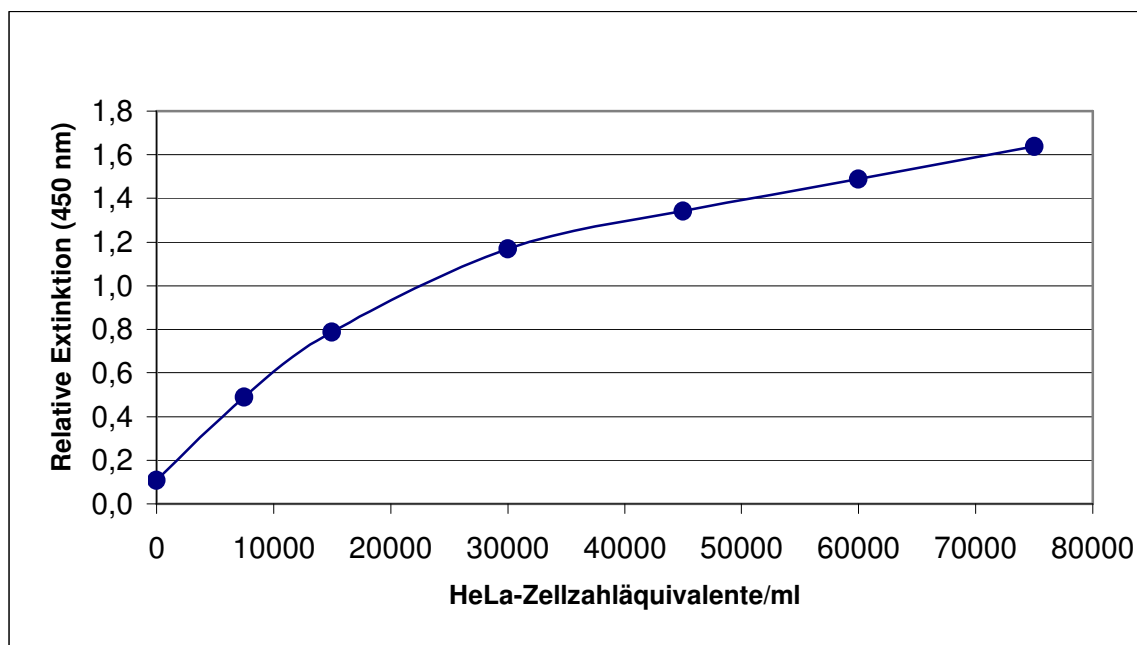
#### **4.2.4 Herstellung von Plasma- und Serumproben sowie Leukozytenlysaten**

Aus einer Armvene der Probanden wurde mittels Vacutainersystems Blut abgenommen. Hierbei wurden zwei Röhrchen eingesetzt, ein Serum-Röhrchen ohne Zusätze und ein Blutbild-Röhrchen, das EDTA als Zusatz enthielt, um das Blut vor dem Gerinnen zu bewahren. Das gewonnene Blut wurde sofort für 10 min bei 4 °C und 3000 rpm in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und in Eppendorfröhrchen aufgeteilt. Das so gewonnene Serum (Überstand aus dem Serum-Röhrchen) und Plasma (Überstand aus dem EDTA-Röhrchen) wurde bei -80 °C eingefroren. Der Bodensatz des Serumröhrchens wurde verworfen. Aus dem Bodensatz des EDTA-Röhrchens wurde ein Leukozytenlysate hergestellt. Hierzu wurde Erythrozytenlysepuffer auf den Bodensatz des Plasmaröhrchens in einem Verhältnis von 4 Teilen Lysepuffer zu 1 Teil Blut gegeben. Nach gründlichem Vermengen wurde das Gemisch für 5 min bei 4 °C stehen gelassen und anschließend für 5 min bei 4 °C und 1400 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das Zellpellet wurde mit 3 ml PBS gewaschen und für 5 min bei 4 °C und 1400 rpm erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde zweimal durchgeführt. Anschließend wurde erneut lysiert und der gesamte Arbeitsvorgang wiederholt. Die so gewonnenen Pellets wurden in 1 ml PBS resuspendiert und gezählt. Anschließend wurden zur Zellyse pro  $30 \times 10^6$  Zellen 2 ml TBS + 0,5 % Triton X-100 hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 2 h bei 4 °C auf einem Rad gedreht. Danach wurden die Proben für 30 min bei 4 °C auf Höchstgeschwindigkeit in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand, der das Leukozytenlysate enthielt, wurde portioniert und bei -80 °C eingefroren. Das Pellet wurde ebenfalls eingefroren.

#### **4.2.5 Protokoll YB-1 ELISA und Anfertigung der HeLa-Lysat Standardkurve**

Der in der vorliegenden Arbeit angewendete ELISA wurde in der klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der Technischen Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Schmitt unter Mitarbeit von Karin Mengele, Christel Schnelldorfer, Alexandra Sturmheit und Niels Ecksein entwickelt und in der vorliegenden Arbeit auf seine Anwendung in verschiedensten Proben getestet.

Als erster Schritt erfolgte das Coating einer schwarze Mikrotiterplatte mit durchsichtigem Boden (Nalge Nunc) mit dem N-terminalen Antikörper. Dieser wurde vorher in Coatingpuffer 1:500 auf eine Endkonzentration von 1 µg/ml verdünnt. Von dieser Lösung wurden in jedes Well 100 µl pipettiert. Die Platte wurde in eine feuchte Kammer gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte mit TBST (TBS + 0,05 % Tween 20) 3 x gewaschen. Anschließend wurde mit TBS + 2 % BSA geblockt, wovon in jedes Well 200 µl gegeben wurde. Die Inkubation erfolgte in der feuchten Kammer (2 h RT). Nach 3 x Waschen mit TBST wurden die Proben auf die Platte aufgetragen. Zunächst wurde als Referenzgröße eine Standardkurve aus HeLa-Lysat angefertigt. Dieses lag in einer Stamm-Konzentration von  $15 \times 10^6$  Zelläquivalenten/ml vor. Die nachfolgenden Verdünnungen wurden in TBS + 1 % BSA angefertigt. Zunächst wurde das Lysat 1:200 verdünnt, was einer Konzentration von 75000 Zelläquivalenten/ml entspricht. Diese Verdünnung wurde als 100 % definiert. Alle weiteren Verdünnungen berechneten sich entsprechend eines Zelläquivalents von 80 %, 60 %, 40 %, 20 % und 10 %. Von den Verdünnungen des HeLa-Lysats wurde in jedes Well 100 µl pipettiert, wobei jeweils eine Doppelbestimmung erfolgte. Der gemessene Wert entspricht dem Mittelwert aus beiden wells.



**Abb. 3** HeLa-Lysat Standardkurve

Die zu messenden Proben wurden in unterschiedlichen mit TBS + 1 % BSA angefertigten Verdünnungen hinzugegeben. In jedes Well wurde 100 µl der Probe pipettiert. Auch hier erfolgte eine Doppelbestimmung. Die Platte wurde über Nacht bei 4 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Am 3. Tag wurde die Platte zunächst erneut 3 x mit TBST gewaschen. Es erfolgte die Zugabe des 2. Antikörpers. Der C-terminale FITC markierte Antikörper wurde in TBS + 1 % BSA 1:650 auf eine Endkonzentration von 2 µg/ml verdünnt. Von dieser Lösung wurde in jedes Well 100 µl gegeben. Die Zugabe musste aufgrund der FITC Markierung im abgedunkelten Raum erfolgen. Anschließend wurde die Platte in der feuchten Kammer für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Nach 3 x Waschen mit TBST wurde der anti-FITC-POX-markierte Antikörper aufgetragen. Er wurde zur Reduzierung des Hintergrunds mit TBS + 0,5 M NaCl verdünnt (1:1000 auf 0,5 µg/ml), die Zugabe pro Well betrug 100 µl (Inkubation 1 h, RT, feuchte Kammer). Es erfolgte ein erneuter Waschschrift (3 x TBST) und anschließend die Zugabe des Substrats. Hierzu wurde TMB Peroxidase Substrat und Solution B 1:1 verdünnt und in jedes well 100 µl pipettiert. Die Platte wurde bei Raumtemperatur leicht geschaukelt und die Farbentwicklung (blau) beobachtet. Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Well gestoppt. Hierbei erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Platte wurde nun im Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Extinktion von 450 nm gemessen. Die erhaltene Einheit war Hela-Zelläquivalente/ml, da als Bezugsgröße die Standardkurve mit Hela-Lysat diente.

#### **4.2.6 Proteinbestimmung**

In den zu messenden Gewebe- bzw. Zelllinienlysaten wurde mittels des BCA Proteinbestimmungskits der Firma Pierce (Rockford, USA) der Proteingehalt in mg/ml bestimmt. Hierbei wurden die Proben in einer Verdünnung von 1:31 auf eine Polystyrol Mikrotiterplatte (Greiner) pipettiert, auf die zuvor das Proteinreagenz des Kits gegeben wurde. Als Standardkurve wurde im Kit enthaltenes bovines Serumalbumin in verschiedenen Verdünnungen verwendet. Eine Positivkontrolle mit bekanntem Proteingehalt wurde bei jeder Messung mitgeführt (Precipath U). Die Platte wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und am nächsten Tag im ELISA-Reader bei 550 nm gemessen. Der Gesamtproteingehalt der Gewebe- bzw. Zelllinienlysate wurde zur Standardisierung des YB-1 Gehalts derselben verwendet. Dies wurde erreicht, indem der Quotient aus YB1-Gehalt, gemessen in Hela-Zelläquivalenten/ml, und dem Gesamtproteingehalt der Probe, gemessen in

mg/ml, gebildet wurde. Die hieraus resultierende Einheit ist somit Hela-Zelläquivalente/mg Protein.

## **4.2.7 Immunhistochemie**

### **4.2.7.1 Herstellung von Paraffinblöcken**

Die Paraffinblöcke wurden aus dem Pathologischen Institut der TU München bezogen, in dem diese für die klinische Routine hergestellt werden.

### **4.2.7.2 Protokoll Mammakarzinom**

Die immunhistochemische Färbung der Paraffinblöcke wurde mittels dem gegen das N-terminale Ende von YB-1 gerichteten Antikörper durchgeführt. Alle Waschschritte erfolgten durch 5 min Waschen in TBS. Zuerst wurden die Paraffinblöcke in einer absteigenden Alkoholreihe deparaffinisiert. Hierzu wurden sie zunächst für 2 x 10 min in Xylol inkubiert. Danach erfolgte eine Rehydrierung durch Inkubation in Isopropanol für 2 x 5 min, anschließend für 5 min in 96 % Ethanol und zuletzt für 5 min in 70 % Ethanol. Nach Waschen mit TBS wurde der in TBS + 1 % BSA (Reinheit 98 %) auf 1:300 verdünnte primäre Antikörper auf die Schnitte aufgetragen (Inkubation 1 h, Raumtemperatur (RT)). Anschließend erfolgte, nach erneutem Waschen, die Auftragung des in TBS + 20 % Humanserum 1:200 verdünnten Zwischenantikörpers mouse-anti-rabbit IgG von Dianova (Hamburg, Deutschland) (30 min, RT). Nach Waschen mit TBS erfolgte die Inkubation mit dem in TBS + 20 % Humanserum 1:100 verdünnten Brückenantikörper rabbit-anti-mouse IgG von Dako (Hamburg, Deutschland) (30min, RT). Nun erfolgte, nach einem erneuten Waschschritt, die Auftragung des 1:80 in TBS verdünnten APAAP Komplexes (Dako, Hamburg, Deutschland) (30 min, RT). Als nächsten Schritt wurde, nach erneutem Waschen, das Entwicklungsreagenz aufgetragen. Das Entwicklungsreagenz wurde hergestellt, indem Lösung A und C vermischt wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe von Lösung B. Der pH wurde auf 8,7 eingestellt Nach Aufbringung des Entwicklungsreagenz auf die Schnitte wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein letzter Waschschritt und die Gegenfärbung der Nuklei durch saures Hämalaun für 10 s bei RT, das seine blaue Farbe durch

Spülung mit Leitungswasser über 5 min entwickelte. Anschließend wurden die Schnitte mit H<sub>2</sub>O dest. bedeckt und unter Zugabe von Glyceringelatine eingedeckelt. Als Negativkontrolle wurde dasselbe Protokoll ohne Zugabe des primären anti-YB-1 Antikörpers und unter Auftragung des Zwischenantikörpers in einer Verdünnung von 1:30 angewandt.

#### **4.2.7.3 Protokoll Ovarialkarzinom**

Die immunhistochemische Färbung der Paraffinblöcke wurde mittels dem gegen das C-terminale Ende von YB-1 gerichtetem FITC markierten Antikörper durchgeführt. Alle Waschschrte erfolgten durch zweimalige Inkubation mit TBS für jeweils 2,5min.

Als erstes wurden die Paraffin-Blöcke deparaffinisiert, indem sie zweimal für 10 min in Xylol inkubiert wurden. Danach wurden sie rehydriert, durch zweimalige Inkubation in Isopropanol für 5 min, anschließend für 5 min in 96 % Ethanol und anschließend für 5 min in 70 % Ethanol. Nach Waschen mit TBS wurden die Schnitte zur Hitze induziertem Epitop-Wiedergewinnung für 4min im Dampfkochtopf in 10 mmol/l Zitratpuffer, pH 6,0 behandelt.

Die Schnitte wurden nun für 5 min unter fließendem Leitungswasser abgespült und anschließend mit TBS gewaschen. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase Aktivität wurden sie für 20 min in 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in destilliertem Wasser (45 ml Aqua dest. + 5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %ig) inkubiert (RT). Nach kurzem Abspülen mit Leitungswasser und anschließendem Waschen mit TBS wurden die Schnitte mit 150 µl des FITC markierten YB-1 Antikörper 1:650 verdünnt in PBS + 1 % BSA inkubiert (60 min, RT). Anschließend wurde mit TBS gewaschen. Jetzt wurden die Schnitte mit 150µl anti-FITC-POX-markierten-Antikörper inkubiert (30 min, RT). Nach Waschen mit TBS wurde die Farbreaktion sichtbar gemacht durch Zugabe von liquid DAB plus (Dako, Hamburg Deutschland) (10 min, RT). Die Farbreaktion zeigte sich in einem braunen Reaktionsprodukt. Nach einem letzten Waschschrte mit TBS erfolgte die Gegenfärbung der Nuklei mit saurem Hämalaun, das seine blaue Farbe unter Spülung mit Leitungswasser entwickelte. Die Schnitte wurden anschließend mit H<sub>2</sub>O dest. bedeckt, und in einer aufsteigenden Alkoholreihe inkubiert (70 % Ethanol, 96 % Ethanol, Isopropanol, 2 x Xylol für je 5 min). Das Eindeckeln erfolgte durch Zugabe von Pertex. Als Negativkontrolle wurde dieselbe Prozedur parallel ohne Zugabe des primären anti-YB-1 Antikörpers durchgeführt.

#### **4.2.8 Statistische Methoden**

In der statistischen Auswertung wurde sowohl beim Mammakarzinom als auch beim Ovarialkarzinom der per ELISA bestimmte YB-1 Gehalt mit dem per Immunhistochemie bestimmten YB-1 Gehalt auf ihre Korrelation überprüft. Da die Werte des per ELISA bestimmten YB-1 Gehalts nicht normalverteilt sind, wurden die Werte auf eine Rangskala transformiert. Anschließend wurde der Rang der Werte in der Stichprobe durch die Anzahl der Patientinnen geteilt, was im Folgenden als relativer Rang bezeichnet wird. Da die per Immunhistochemie bestimmten Werte annähernd normalverteilt sind, wurde für diese kein relativer Rang berechnet. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten erfolgte sowohl nach Pearson als auch verteilungsunabhängig nach Spearman. Außerdem wurde die Regression berechnet. Die Berechnung des Gesamtüberlebens sowie des rezidivfreien Überlebens der Patientinnen mit Mammakarzinom und Ovarialkarzinom in Abhängigkeit des YB-1 Gehalts erfolgte nach Kaplan und Meier. Der YB-1 Gehalt wurde hierzu anhand des Median in einen hohen und einen niedrigen Bereich eingeteilt. Der Vergleich der Überlebenskurven erfolgte nach dem log rank Test. Die Berechnung der Abhängigkeit des YB-1 Gehalts von den verschiedenen klinischen Parametern erfolgte nach dem Mann-Whitney-U-Test. Für alle statistischen Test wurde ein Signifikanzlevel von  $\alpha=0,05$  angesetzt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 YB-1 Gehalt in Zelllinienlysaten und Kulturmedium- überständen bestimmt mittels ELISA

#### 5.1.1 YB-1 Gehalt in Zelllinienlysaten bestimmt mittels ELISA

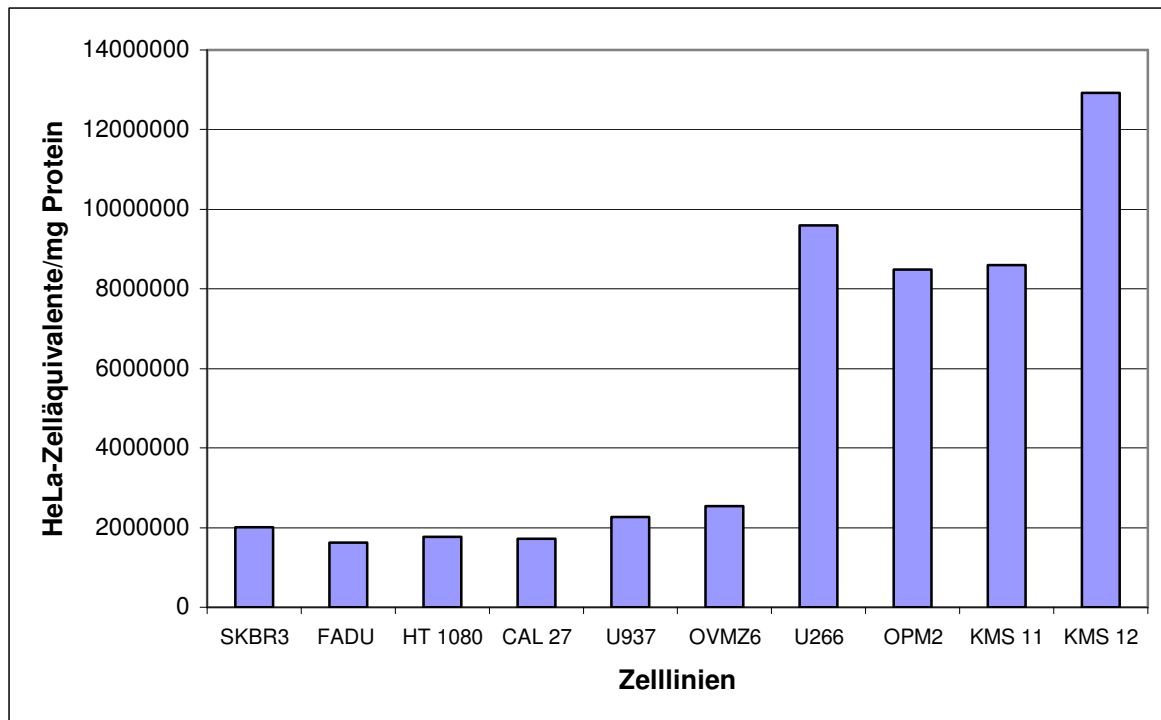
Die Lysate der verschiedenen Zelllinien wurden in den Verdünnungen 1:100, 1:500 sowie 1:1000 auf die ELISA Platte aufgetragen. Die ermittelten YB-1 Werte sind Mittelwerte aus diesen Verdünnungen. Die 10 gemessenen Zelllinienlysate zeigten einen YB-1 Gehalt, der einem Medianwert von  $2,4 \times 10^6$  ( $1,6 \times 10^6$ - $12,9 \times 10^6$ ) HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein entspricht. Der Mittelwert lag bei  $5,2 \times 10^6$  HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein (Standardabweichung  $\pm 4,3 \times 10^6$ ).

Die Zelllinien wurden nach den Entitäten solide und nicht-solide Tumoren aufgeteilt. Für die Zelllinien aus dem multiplen Myelom ergab sich ein medianer YB-1 Gehalt von  $9,1 \times 10^6$  ( $8,6 \times 10^6$ - $12,9 \times 10^6$ ) HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein. Der Mittelwert lag bei  $9,9 \times 10^6$  HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein (Standardabweichung  $\pm 2,1 \times 10^6$ ). Die anderen Zelllinienlysate zeigten einen medianen YB-1 Gehalt von  $1,9 \times 10^6$  ( $1,6 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^6$ ) HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein mit einem Mittelwert von  $2,0 \times 10^6$  HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein (Standardabweichung  $\pm 354030$ ).

**Tab. 3** YB-1 Gehalt in Zelllinienlysaten bestimmt mittels ELISA

Zelllinienlysate	Protein (mg/ml)	HeLa-Zelläquivalente/ml	HeLa-Zelläquivalente/mg Protein
SKBR3	4,00	8030000	2075000
FADU	3,59	5860000	1632312
HT 1080	4,82	8540000	1771784
CAL 27	3,89	6700000	1722365
U937	1,23	2790000	2268292
OVMZ6	2,77	7040000	2541516
U266	2,32	22260000	9594828
OPM2	4,00	33950000	8487500
KMS 11	4,80	41290000	8602083
KMS 12	4,44	57400000	12927927





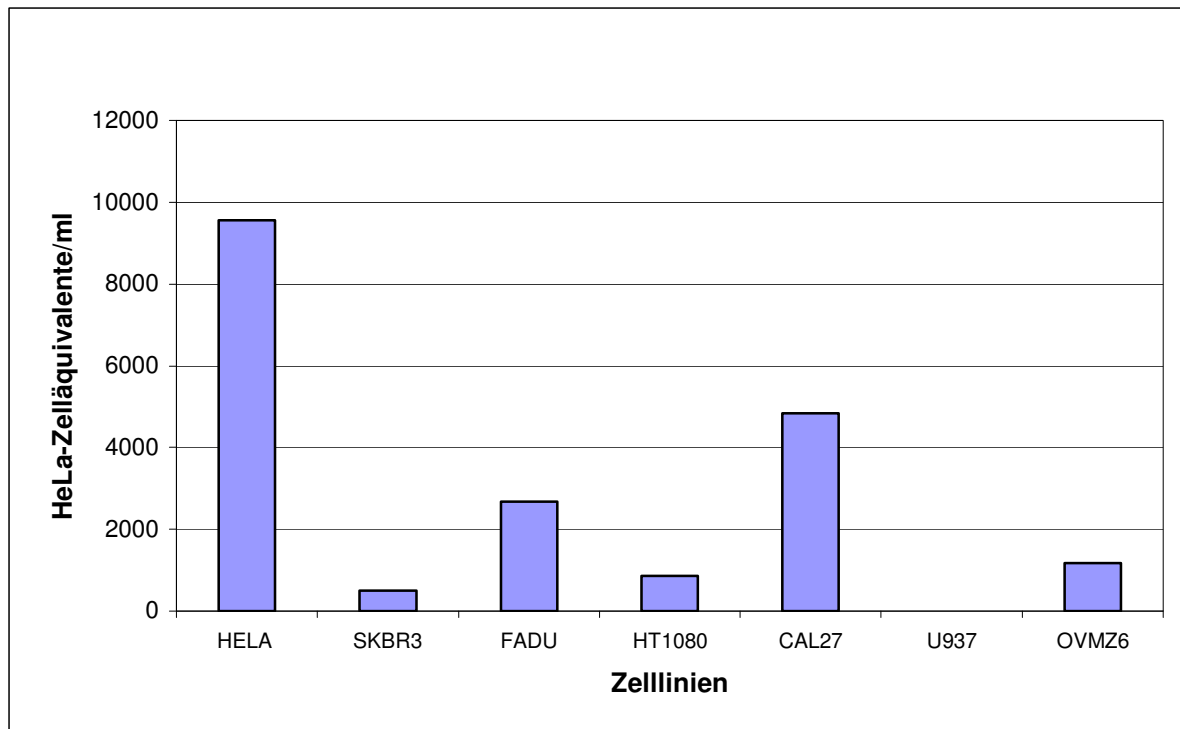
**Abb. 4** YB-1 Gehalt in Zelllinienlysaten bestimmt mittels ELISA

### 5.1.2 YB-1 Gehalt in Kulturmediumüberständen bestimmt mittels ELISA

Die Kulturmediumüberstände wurden in den Verdünnungen 1:2, 1:5 sowie 1:10 auf die Platte aufgetragen. Die ermittelten YB-1 Werte sind Mittelwerte aus diesen Verdünnungen. Eine Proteinbestimmung wurde nicht durchgeführt. Die Kulturmediumüberstände zeigten einen YB-1 Gehalt, der bei einem Medianwert von 1170 (0-9560) HeLa-Zelläquivalenten/ml lag. Der Mittelwert betrug 2800 HeLa-Zelläquivalente/ml (Standardabweichung  $\pm$  3400).

**Tab. 4** YB-1 Gehalt in Kulturmediumüberständen der Zelllinien bestimmt mittels ELISA

Kulturmediumüberstände	HeLa-Zelläquivalente/ml
HeLa	9560
SKBR3	500
FADU	2670
HT1080	860
CAL27	4840
U937	0
OVMZ6	1170



**Abb. 5** YB-1 Gehalt in Kulturmediumüberständen der Zelllinien bestimmt mittels ELISA

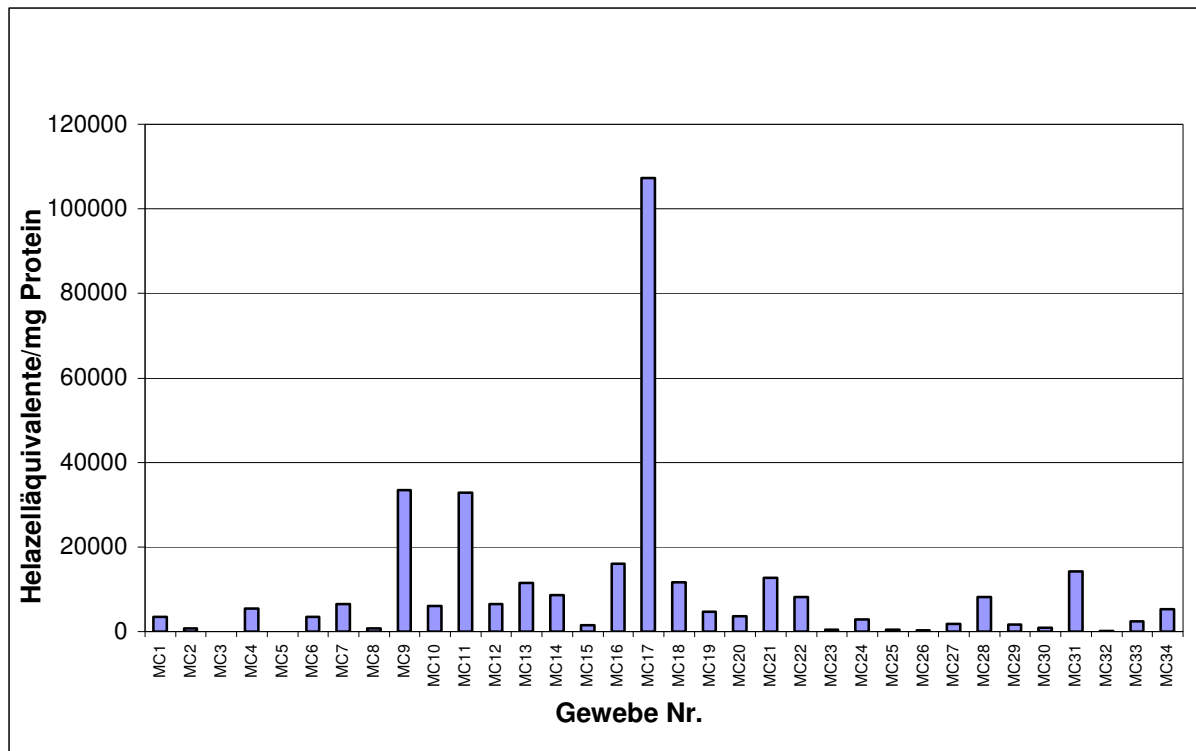
## **5.2 YB-1 Gehalt in Mammakarzinomgewebelysaten und benignen Mammagewebelysaten bestimmt mittels ELISA**

### **5.2.1 YB-1 Gehalt in Mammakarzinomgewebelysate bestimmt mittels ELISA**

Es wurden 34 Mammakarzinomgewebelysate in der Verdünnung 1:10 auf die Platte aufgetragen. Die untersuchten Mammakarzinomgewebelysate zeigten einen Medianwert von 4139 (0-107280) HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein. Der Mittelwert der Werte lag bei 9527 HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein (Standardabweichung  $\pm 19060$ ).

**Tab. 5** YB-1 Gehalt in Mammkarzinomgewebelysaten bestimmt mittels ELISA

Gewebe Nr.	Protein mg/ml	HeLa-Zelläquivalente/ml	HeLa Zelläquivalente/mg Protein
MC1	2,84	9670	3405
MC2	1,63	1130	693
MC3	4,91	0	0
MC4	2,08	11280	5423
MC5	4,04	0	0
MC6	3,40	11650	3427
MC7	6,07	39700	6540
MC8	4,81	3510	730
MC9	2,79	93390	33473
MC10	2,82	17260	6121
MC11	5,05	166140	32899
MC12	3,58	23300	6508
MC13	5,73	65640	11456
MC14	6,39	55500	8685
MC15	4,37	6940	1588
MC16	4,80	76960	16033
MC17	6,24	669430	107280
MC18	4,50	52210	11602
MC19	5,32	24610	4626
MC20	3,33	12160	3652
MC21	4,77	60810	12748
MC22	4,74	38990	8226
MC23	3,23	1290	399
MC24	4,96	14280	2879
MC25	4,49	2260	503
MC26	2,39	570	239
MC27	3,32	5910	1780
MC28	3,70	30370	8208
MC29	3,74	6450	1725
MC30	3,83	3400	888
MC31	1,26	17960	14254
MC32	4,00	810	203
MC33	4,30	10580	2460
MC34	3,48	18290	5256



**Abb. 6** YB-1 Gehalt in Mammakarzinomgewebelysaten bestimmt mittels ELISA

### 5.2.2 YB-1 Gehalt in benignen Mammagewebelysaten bestimmt mittels ELISA

Es wurden 21 benigne Mammagewebelysate in der Verdünnung 1:10 auf die Platte aufgetragen. Die benignen Mammagewebelysate unterteilten sich in 3 Gewebelysate aus gesundem Mammagewebe (Gewebe Nr. M1, M2, M3 aus Tab.6), 9 Gewebelysate aus Mastopathien (Gewebe Nr. M4-M12 aus Tab.6) sowie 9 Gewebelysate aus Fibroadenomen (Gewebe Nr. M13-M21 aus Tab.6). Die 21 benignen Mammagewebelysate zeigten einen medianen YB-1 Gehalt von 2792 (571-24095) HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein. Der Mittelwert lag bei 5200 HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein (Standardabweichung  $\pm$  6355).

Aufgeteilt in die einzelnen Untergruppen ergab sich in den 3 gesunden Mammagewebelysaten ein Medianwert von 1935 (835-4776) HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein, mit einem Mittelwert von 2515 HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein (Standardabweichung  $\pm$  2034). Für die 9 Lysate aus Mastopathien ergab sich ein Medianwert von 2702 (1314-16241) HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein sowie ein Mittelwert von 4574 HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein (Standardabweichung  $\pm$  4942). Die 9 Lysate aus Fibroadenomen zeigten einen

medianen YB-1 Gehalt von 3527 (571-24095) HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein, sowie einen mittleren YB-1 Gehalt von 6721 HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein (Standardabweichung  $\pm$  8352).

**Tab. 6** YB-1 Gehalt in benignen Mammagewebelysaten bestimmt mittels ELISA

Gewebe nr.	Protein mg/ml	HeLa-Zelläquivalente/ml	HeLa-Zelläquivalente/mg Protein
M1	4,41	21060	4776
M2	2,77	5360	1935
M3	4,36	3640	835
M4	2,5	6980	2792
M5	4,35	70650	16241
M6	0,65	1620	2492
M7	2,22	2990	1347
M8	2,05	5540	2702
M9	3,31	4350	1314
M10	1,36	3960	2911
M11	0,77	6930	9000
M12	4,42	10470	2369
M13	2,09	2740	1311
M14	4,84	86000	17769
M15	2,03	5740	2828
M16	3,71	2120	571
M17	3,13	75420	24095
M18	2,64	2770	1049
M19	2,51	9840	3920
M20	7,19	38980	5421
M21	3,76	13260	3527

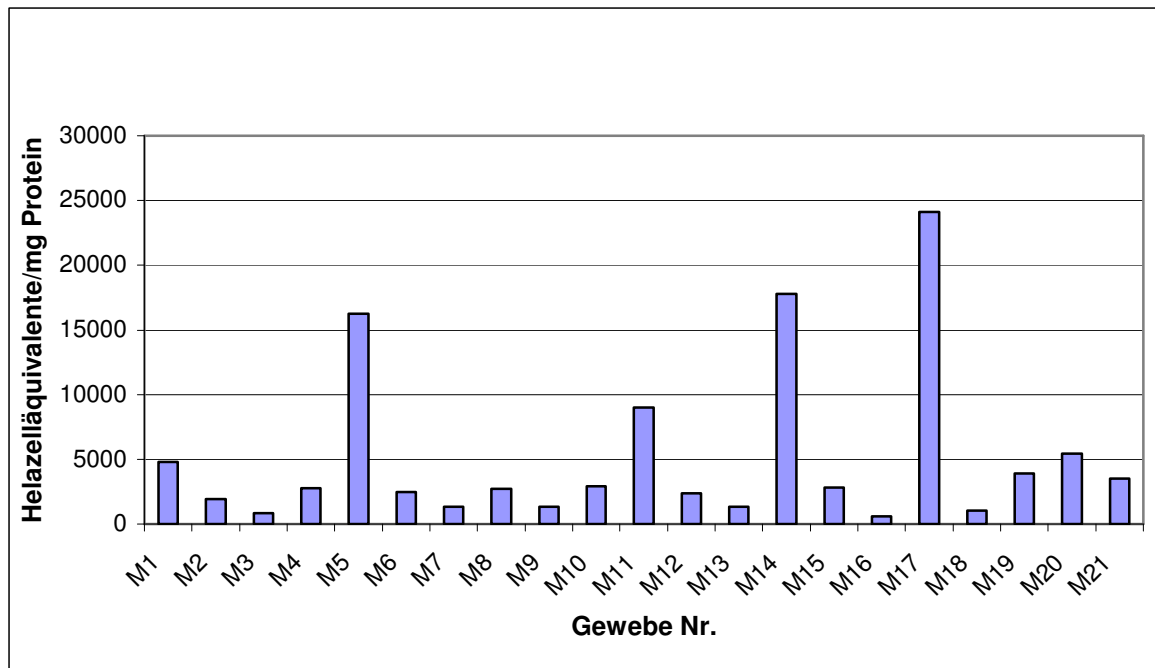


Abb. 7 YB-1 Gehalt in benignen Mammagewebelysaten bestimmt mittels ELISA

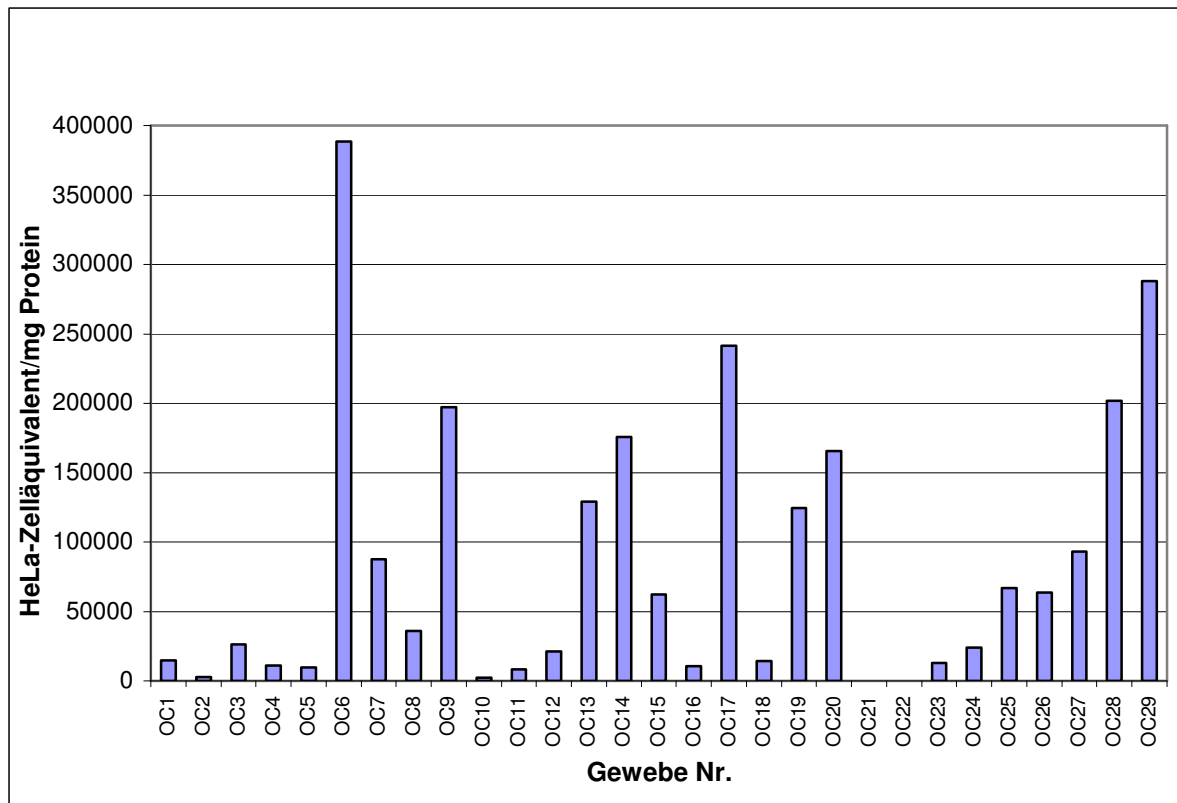
### 5.3 YB-1 Gehalt in Ovarialkarzinomgewebelysaten und benignen Ovarialgewebelysaten bestimmt mittels ELISA

#### 5.3.1 YB-1 Gehalt in Ovarialkarzinomgewebelysaten bestimmt mittels ELISA

Es wurden insgesamt 29 Ovarialkarzinomgewebelysate in der Verdünnung 1:50 auf die Platte aufgetragen. Die 29 getesteten Ovarialkarzinomgewebe zeigten in ihrem YB-1 Gehalt einen Medianwert von 36163 (0-388266) HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein. Der Mittelwert lag hierbei bei 85456 HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein (Standardabweichung  $\pm 100494$ ).

**Tab. 7** YB-1 Gehalt in Ovarialkarzinomgewebelysaten bestimmt mittels ELISA

<b>Gewebe Nr.</b>	<b>Protein mg/ml</b>	<b>HeLa-Zelläquivalente/ml</b>	<b>HeLa-Zelläquivalente/mg Protein</b>
OC1	6,8	101350	14904
OC2	4,26	12040	2826
OC3	7,32	192570	26307
OC4	5,1	55840	10949
OC5	5,39	51940	9636
OC6	5,46	2119930	388266
OC7	6,7	585200	87343
OC8	6,5	235060	36163
OC9	6,52	1286250	197278
OC10	5,72	14480	2532
OC11	6,44	53770	8349
OC12	4,21	88930	21124
OC13	7,17	923660	128823
OC14	7,43	1306150	175794
OC15	6,88	426900	62049
OC16	4,84	51940	10731
OC17	7,64	1843330	241274
OC18	3,56	50320	14135
OC19	5,05	628630	124481
OC20	4,56	754170	165388
OC21	5,36	0	0
OC22	6,4	0	0
OC23	6,46	82980	12845
OC24	6,62	159630	24113
OC25	5,34	355700	66611
OC26	4,8	305320	63608
OC27	5,09	472700	92868
OC28	7,41	1494270	201656
OC29	6,2	1786660	288171



**Abb. 8** YB-1 Gehalt in Ovarialkarzinomgewebelysaten bestimmt mittels ELISA

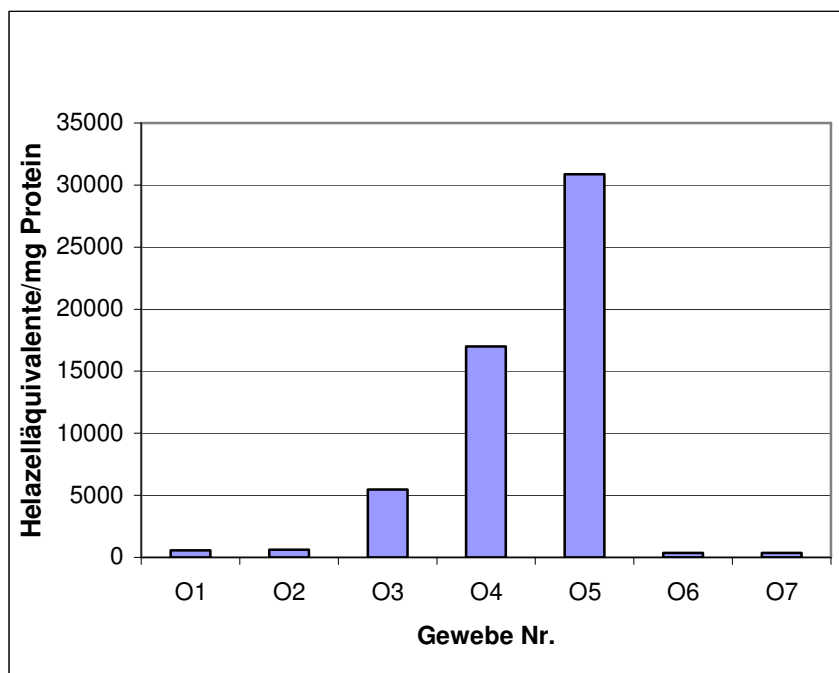
### 5.3.2 YB-1 Gehalt in benignen Ovarialgewebelysaten bestimmt mittels ELISA

Es wurden insgesamt 7 benigne Ovarialgewebelysate in der Verdünnung 1:50 auf die Platte aufgetragen. Die benignen Ovarialgewebelysate unterteilten sich in 3 Kystadenome (Gewebe Nr. O2, O4 und O6), 2 Zysten (Gewebe Nr. O3 und O7), 1 Kystadenofibrom (Gewebe Nr. O5) sowie eine Gewebeprobe aus dem den Tumor umgebenden gesunden Ovarialgewebe einer Patientin mit Ovarialkarzinom (Gewebe Nr. O1). Die 7 getesteten benignen Ovarialgewebe zeigten in ihrem YB-1 Gehalt einen Medianwert von 6106 (3550-309013) HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein. Der Mittelwert lag bei 79030 HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein (Standardabweichung  $\pm 118206$ ).



**Tab. 8** YB-1 Gehalt in benignen Ovarialgewebelysaten bestimmt mittels ELISA

Gewebe Nr.	Protein mg/ml	HeLa-Zelläquivalent/ml	HeLa-Zelläquivalent/mg Protein
O1	6,19	36540	5903
O2	5,07	278150	54862
O3	7,35	26490	3604
O4	5,13	18210	3550
O5	6,29	1070400	170175
O6	4,61	28150	6106
O7	4,66	1440000	309013

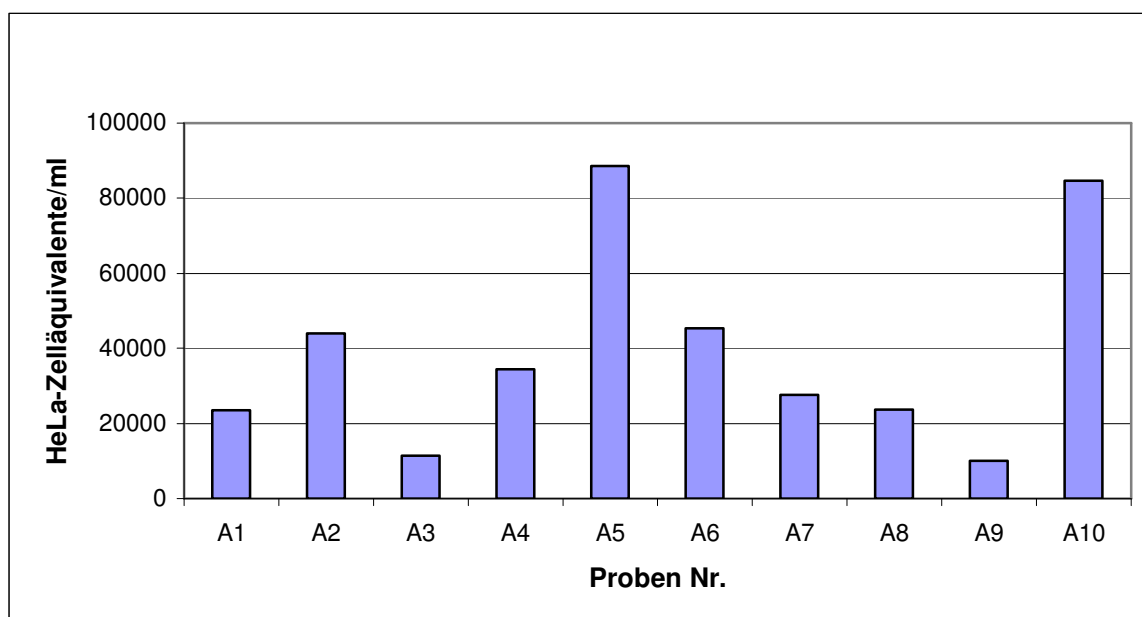
**Abb. 9** YB-1 Gehalt in benignen Ovarialgewebelysaten bestimmt mittels ELISA

## 5.4 YB-1 Gehalt in malignem Aszites bestimmt mittels ELISA

Alle Aszites-Proben stammen aus der Tumorbank der Frauenklinik der TU München. Die Proben wurden von an Ovarialkarzinom erkrankten Frauen gewonnen. Die Proben wurden 1:10 verdünnt. Eine Proteinbestimmung wurde nicht durchgeführt. Die ermittelten Werte haben somit die Einheit HeLa-Zelläquivalente/ml. Die gemessenen Aszitesproben zeigten in ihrem YB-1 Gehalt einen Medianwert von 30945 (9970-88550) HeLa-Zelläquivalenten/ml. Der Mittelwert der YB-1 Werte lag bei 39295 HeLa-Zelläquivalenten/ml (Standardabweichung  $\pm 27541$ ).

**Tab. 9** YB-1 Gehalt in malignem Aszites bestimmt mittels ELISA

Proben Nr.	HeLa-Zelläquivalente/ml
A1	23580
A2	43990
A3	11390
A4	34360
A5	88550
A6	45250
A7	27530
A8	23730
A9	9970
A10	84600

**Abb. 10** YB-1 Gehalt in malignem Aszites bestimmt mittels ELISA

## 5.5 YB-1 Gehalt im Serum und Plasma gesunder Probanden bestimmt mittels ELISA

Alle 12 Blutproben stammen von gesunden Spendern. Es wurden 6 Blutproben männlicher Probanden sowie 6 Blutproben weiblicher Probanden gemessen. Von jedem Proband wurden eine Plasma- sowie eine Serum-Probe gewonnen. Die Proben wurden in der Verdünnung 1:2 sowie 1:10 auf die Platte aufgetragen. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte aus diesen Verdünnungen. Eine Proteinbestimmung wurde nicht durchgeführt. Die gemessenen Werte haben die Einheit HeLa-Zelläquivalente/ml.

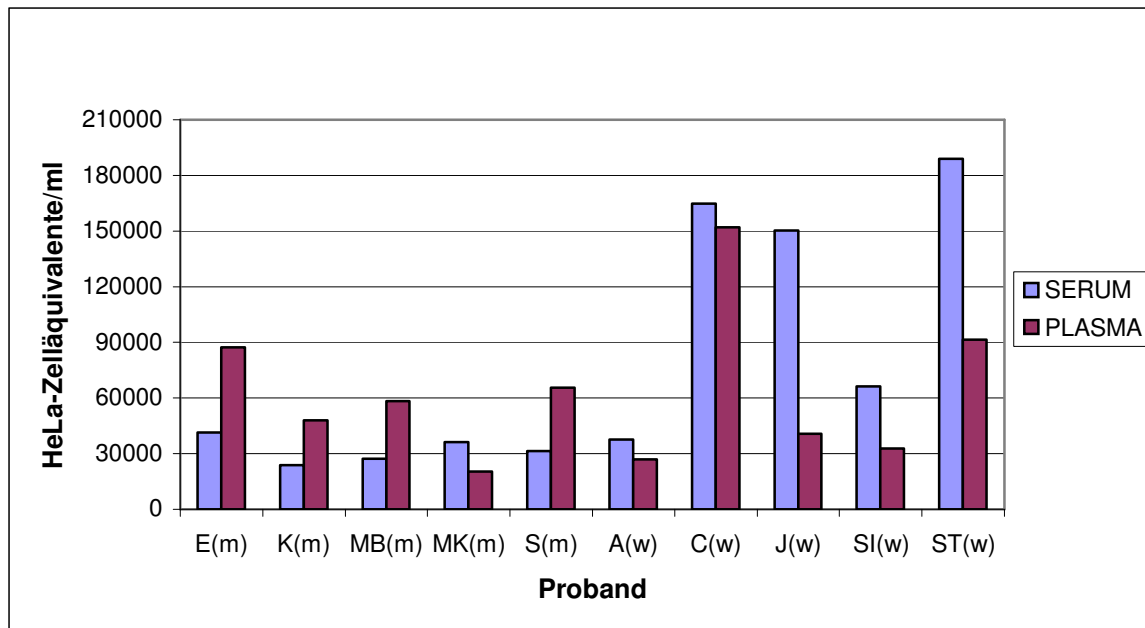
Die Serumproben zeigten einen medianen YB-1 Gehalt von 39495 (23740-189100) HeLa-Zelläquivalenten/ml. Der Mittelwert lag bei 76824 HeLa-Zelläquivalenten/ml (Standardabweichung  $\pm$  64688). Die Plasmaproben zeigten einen medianen YB-1 Gehalt von 52950 (20400-152020) HeLa-Zelläquivalenten/ml. Der Mittelwert lag bei 62280 HeLa-Zelläquivalenten/ml (Standardabweichung  $\pm$  39624).

Aufgeteilt nach Männern und Frauen ergab sich in den Serumproben der Frauen ein medianer YB-1 Gehalt von 150480 (37750-189100) HeLa-Zelläquivalenten/ml mit einem Mittelwert von 121660 HeLa-Zelläquivalenten/ml (Standardabweichung  $\pm$  65882). In den Plasmaproben fand sich bei den Frauen ein medianer YB-1 Gehalt von 40470 (26820-152020) HeLa-Zelläquivalenten/ml mit einem Mittelwert von 68724 HeLa-Zelläquivalenten/ml (Standardabweichung  $\pm$  53149).

Bei den Männern fand sich in den Serumproben ein medianer YB-1 Gehalt von 31550 (23740-41240) HeLa-Zelläquivalenten/ml mit einem Mittelwert von 31988 HeLa-Zelläquivalenten/ml (Standardabweichung  $\pm$  7007). Die Plasmaproben zeigten einen medianen YB-1 Gehalt von 58140 (20400-87400) HeLa-Zelläquivalenten/ml sowie einen Mittelwert von 55836 HeLa-Zelläquivalenten/ml (Standardabweichung  $\pm$  24574).

**Tab. 10** YB-1 Gehalt im Serum und Plasma gesunder Probanden bestimmt mittels ELISA

Proband	Geschlecht	Serum HeLa-Zelläquivalente/ml	Plasma HeLa-Zelläquivalente/ml
E	m	41240	87400
K	m	23740	47760
MB	m	27100	58140
MK	m	36310	20400
S	m	31550	65480
A	w	37750	26820
C	w	164810	152020
J	w	150480	40740
SI	w	66160	32590
ST	w	189100	91450



**Abb. 11** YB-1 Gehalt im Serum und Plasma gesunder Probanden bestimmt mittels ELISA

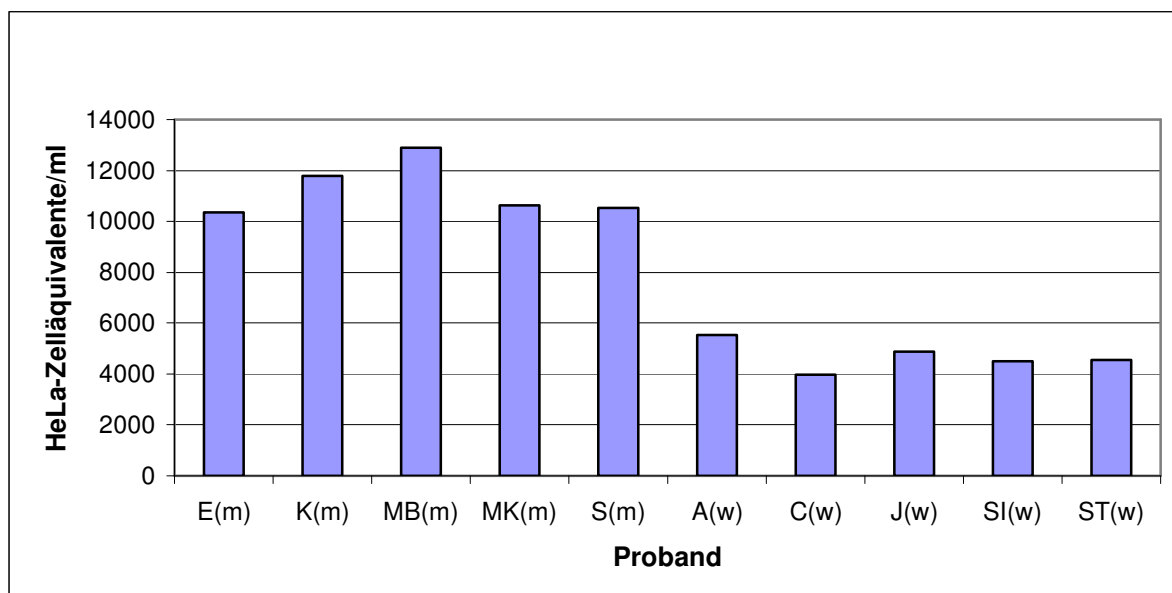
## 5.6 YB-1 Gehalt in Leukozytenlysaten gesunder Probanden bestimmt mittels ELISA

Es wurden insgesamt 12 Leukozytenlysate gesunder Spender untersucht, die aus den Blutproben von 6 männlichen und 6 weiblichen Probanden gewonnen wurden. Es wurden jeweils 100 µl der Leukozytenlysate ( $1,5 \times 10^6$  Zelläquivalente/ml) in der Verdünnung 1:2 sowie 1:10 auf die Platte aufgetragen. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte aus diesen Verdünnungen. In den Leukozytenlysaten fand sich ein YB-1 Gehalt mit einem Median von 7950 (3980-12890) HeLa-Zelläquivalenten/ml. Der Mittelwert lag bei 7963 HeLa-Zelläquivalenten/ml (Standardabweichung  $\pm 3548$ ).

Aufgeteilt nach Männern und Frauen ergab sich für die Frauen ein Medianwert des YB-1 Gehalts von 4540 (3980-5540) HeLa-Zelläquivalenten/ml mit einem Mittelwert von 4688 HeLa-Zelläquivalenten/ml (Standardabweichung  $\pm 573$ ). Bei den Männern zeigte sich ein medianer YB-1 Gehalt von 10620 (10360-12890) HeLa-Zelläquivalenten/ml, mit einem Mittelwert von 11238 HeLa-Zelläquivalenten/ml (Standardabweichung  $\pm 1086$ ).

**Tab. 11** YB-1 Gehalt in Leukozytenlysaten gesunder Probanden bestimmt mittels ELISA

Proband	Geschlecht	HeLa-Zelläquivalente/ml
E	m	10360
K	m	11800
MB	m	12890
MK	m	10620
S	m	10520
A	w	5540
C	w	3980
J	w	4870
SI	w	4510
ST	w	4540

**Abb. 12** YB-1 Gehalt in Leukozytenlysaten gesunder Probanden bestimmt mittels ELISA

## 5.7 Qualitätsüberprüfungen des ELISAs

### 5.7.1 Kontrolle auf Matrixeffekte der Gewebelysate im ELISA

Zur Überprüfung auf Matrixeffekte wurden die HeLa-Lysate zur Erstellung der Standardkurve in unterschiedlichen Puffern analog des Standard-ELISA Protokolls verdünnt. Zum einen wurde der Standardpuffer aus TBS + 1 % BSA verwendet. Zum anderen wurde

dieser mit Gewebelysat versetzt. Hierbei wurde auf eine mögliche Interaktion mit dem YB-1 aus den HeLa-Zelllysaten geachtet.

### 5.7.1.1 Mammakarzinomgewebelysat und HeLa-Lysat

Hierzu wurden die HeLa-Lysate in drei verschiedenen Puffern verdünnt. Einmal in TBS + 1 % BSA, einmal in TBS + 1 % BSA mit Mammakarzinomgewebelysat in der Verdünnung 1:20 und einmal in TBS + 1 % BSA mit Mammakarzinomgewebelysat in der Verdünnung 1:10. Die blaue Kurve in der Abbildung 13 zeigt die gemessene Standardkurve der HeLa-Lysate, verdünnt in Puffer ohne Gewebelysat. Die rote Kurve zeigt die Standardkurve der HeLa-Lysate verdünnt in Puffer mit Mammakarzinomgewebelysat in der Verdünnung 1:20. Die grüne Kurve zeigt die Standardkurve der HeLa-Lysate, verdünnt in Puffer mit Mammakarzinomgewebelysat in der Verdünnung 1:10.

Bei dem höchsten Gehalt an HeLa-Zelläquivalenten (75000 HeLa-Zelläquivalenten/ml) zeigte sich hierbei in der blauen Kurve, d.h. in der HeLa-Lysat Standardkurve, verdünnt in Puffer ohne Gewebelysat, eine Extinktion von 1,62 (bei 450 nm). Die Extinktion der anderen beiden Kurven, die in Puffer mit Mammakarzinomgewebelysat verdünnt waren, lag bei diesem HeLa-Zelläquivalentengehalt bei 0,17.

**Tab. 12** Mammakarzinomgewebelysat und HeLa-Lysat

HeLa-Zelläquivalente/ml	Extinktion bei 450 nm Puffer	Extinktion bei 450 nm Puffer + Lysat 1:20	Extinktion bei 450 nm Puffer + Lysat 1:10
0	0,124	0,143	0,161
7500	0,510	0,131	0,166
15000	0,790	0,149	0,167
30000	1,181	0,146	0,165
45000	1,431	0,158	0,160
60000	1,523	0,162	0,162
75000	1,624	0,169	0,167

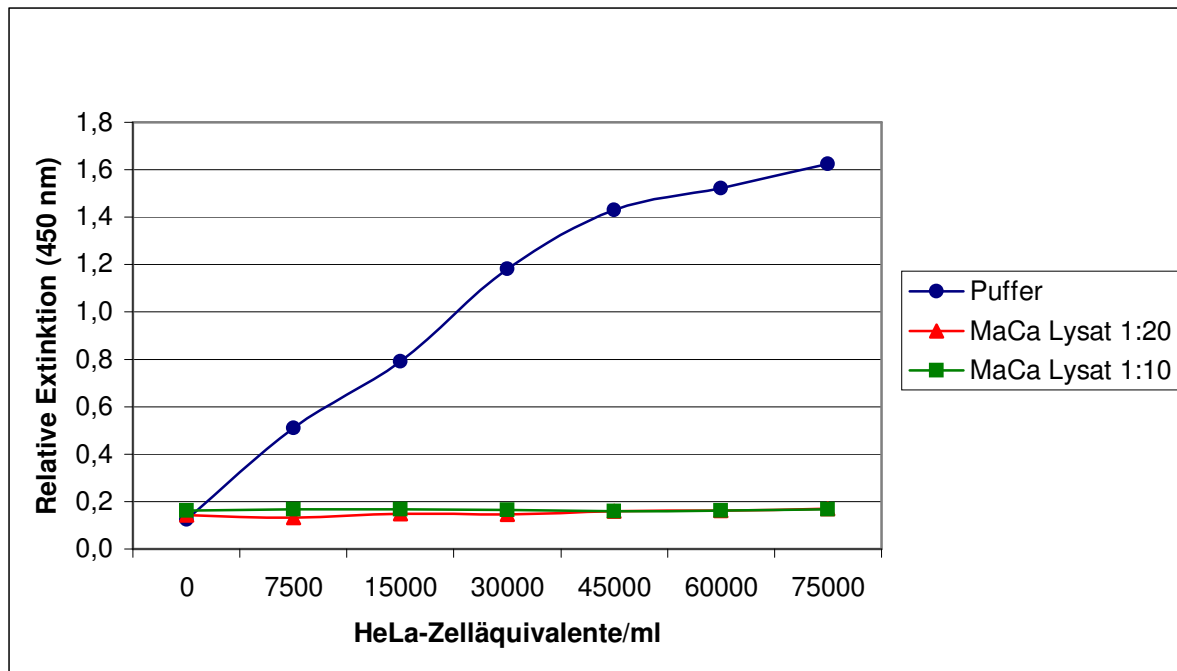


Abb. 13 HeLa-Lysat Standardkurven mit Mammakarzinomgewebelysat

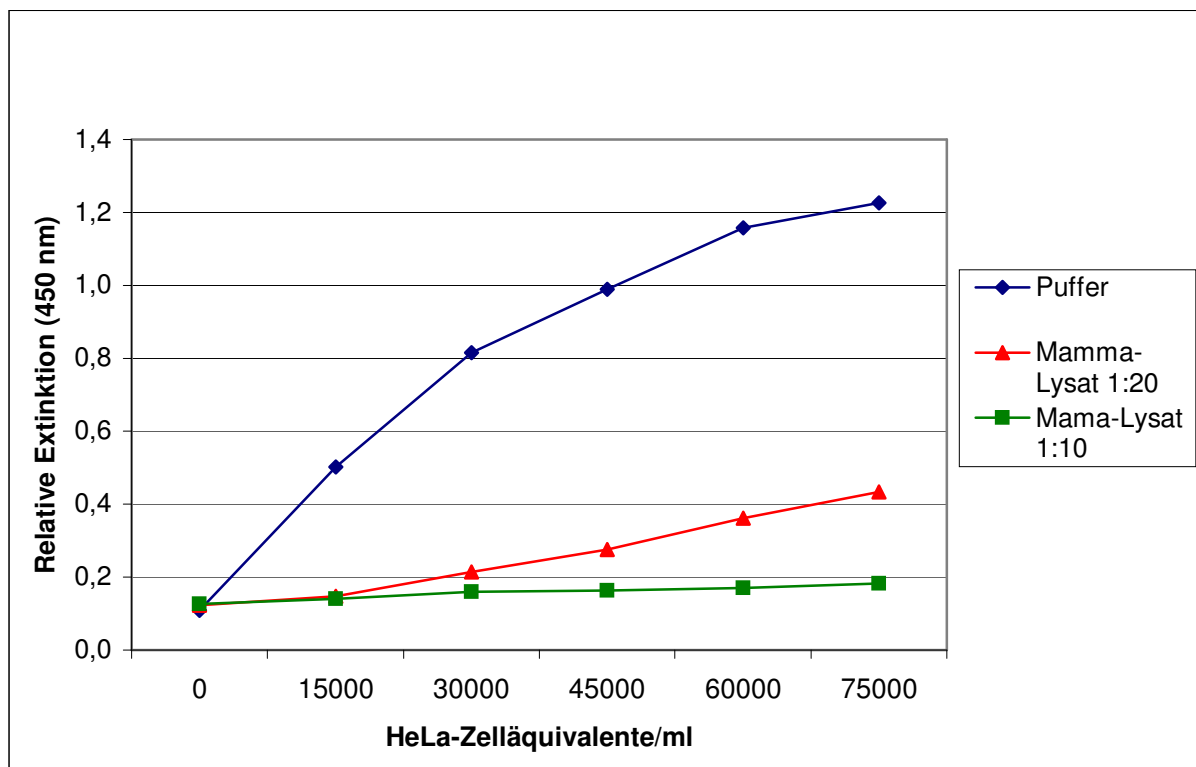
### 5.7.1.2 Benignes Mammagewebelysat und HeLa-Lysat

Zur Überprüfung, ob dieses Phänomen spezifisch für malignes Gewebe ist, wurde derselbe Versuch mit benignen Mammagewebelysaten wiederholt. Die HeLa-Lysate wurden erneut in drei verschiedenen Puffern verdünnt. Einmal in TBS + 1 % BSA, einmal in TBS + 1 % BSA mit benignem Mammagewebelysat in der Verdünnung 1:20 und einmal in TBS + 1 % BSA mit benignem Mammagewebelysat in der Verdünnung 1:10. Die blaue Kurve in der Abbildung 14 zeigt die gemessene Standardkurve der HeLa-Lysate verdünnt in Puffer ohne Gewebelysat. Die rote Kurve zeigt die Standardkurve der HeLa-Lysate verdünnt in Puffer mit benignem Mammagewebelysat in der Verdünnung 1:20. Die grüne Kurve zeigt die Standardkurve der HeLa-Lysate, verdünnt in Puffer mit benignem Mammagewebelysat in der Verdünnung 1:10.

Es zeigte sich bei einem maximalen Gehalt an HeLa-Zelläquivalenten (75000 HeLa-Zelläquivalenten/ml) in der blauen Kurve, verdünnt in Puffer ohne Gewebelysat, eine Extinktion von 1,226 (bei 450 nm), während die Extinktion der roten Kurve, die in Puffer mit benignem Mammagewebelysat 1:20 verdünnt war, bei 0,434 und die der grünen Kurve, die in Puffer mit benignem Mammagewebelysat 1:10 verdünnt war, bei 0,183 lag.

**Tab. 13** Benignes Mammagewebelysat und HeLa-Lysat

HeLa-Zelläquivalente/ml	Extinktion bei 450 nm Puffer	Extinktion bei 450 nm Lysat 1:20	Extinktion bei 450 nm Lysat 1:10
0	0,108	0,122	0,126
15000	0,502	0,148	0,140
30000	0,815	0,214	0,159
45000	0,990	0,276	0,163
60000	1,158	0,362	0,171
75000	1,226	0,434	0,183

**Abb. 14** HeLa-Lysat-Standardkurven mit benignem Mammagewebelysat

### 5.7.1.3 Ovarialkarzinomgewebelysat und HeLa-Lysat

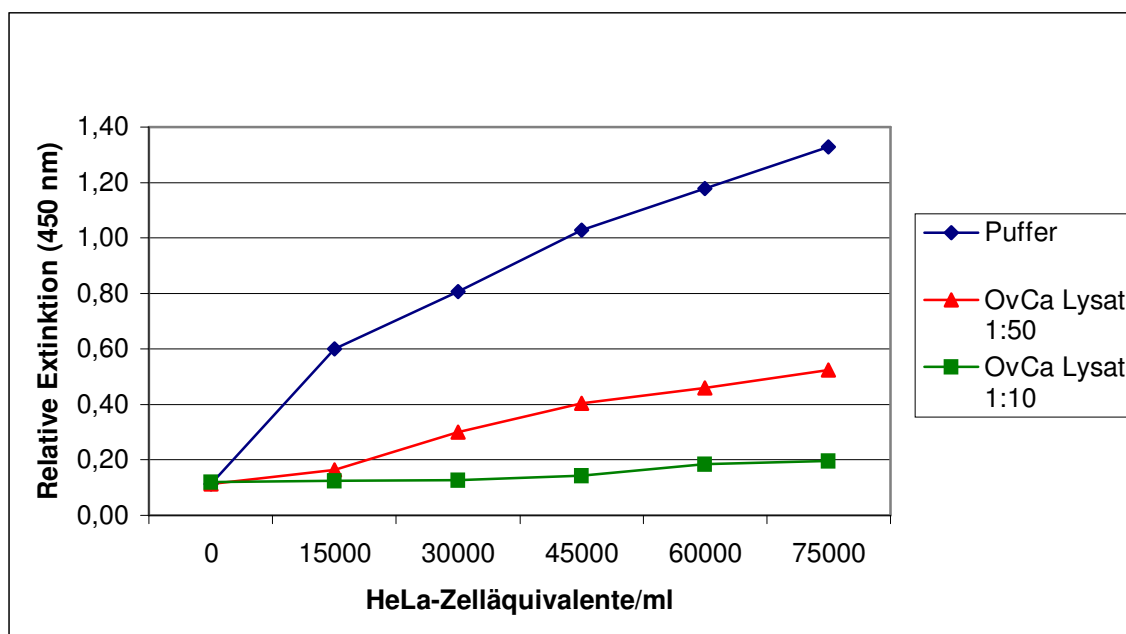
Zur Überprüfung, ob das Phänomen spezifisch für Mammagewebe ist, wurde derselbe Versuch mit Ovarialkarzinomgewebelysat wiederholt. Die HeLa-Lysate wurden erneut in drei verschiedenen Puffern verdünnt. Einmal in TBS + 1 % BSA, einmal in TBS + 1 % BSA mit Ovarialkarzinomgewebelysat in der Verdünnung 1:50 und einmal in TBS + 1 % BSA mit Ovarialkarzinomgewebelysat in der Verdünnung 1:10.



Hierbei zeigte sich bei dem maximalen Gehalt an HeLa-Zelläquivalenten (75000 Zelläquivalente/ml) eine Extinktion in der blauen Kurve mit Puffer ohne Gewebelysat von 1,329, während die Extinktion der roten Kurve, die in Puffer mit Ovarialkarzinomgewebelysat 1:50 verdünnt war, bei 0,524 und die der grünen Kurve, die in Puffer mit Ovarialkarzinomgewebelysat 1:10 verdünnt war, bei 0,195 lag.

**Tab. 14** Ovarialkarzinomgewebelysat und HeLa-Lysat

HeLa-Zelläquivalente/ml	Extinktion bei 450 nm Puffer	Extinktion bei 450 nm Lysat 1:50	Extinktion bei 450 nm Lysat 1:10
0	0,113	0,113	0,120
15000	0,600	0,163	0,124
30000	0,807	0,299	0,127
45000	1,029	0,403	0,144
60000	1,178	0,458	0,185
75000	1,329	0,524	0,195



**Abb. 15** HeLa-Lysat Standardkurven und Ovarialkarzinomgewebelysat

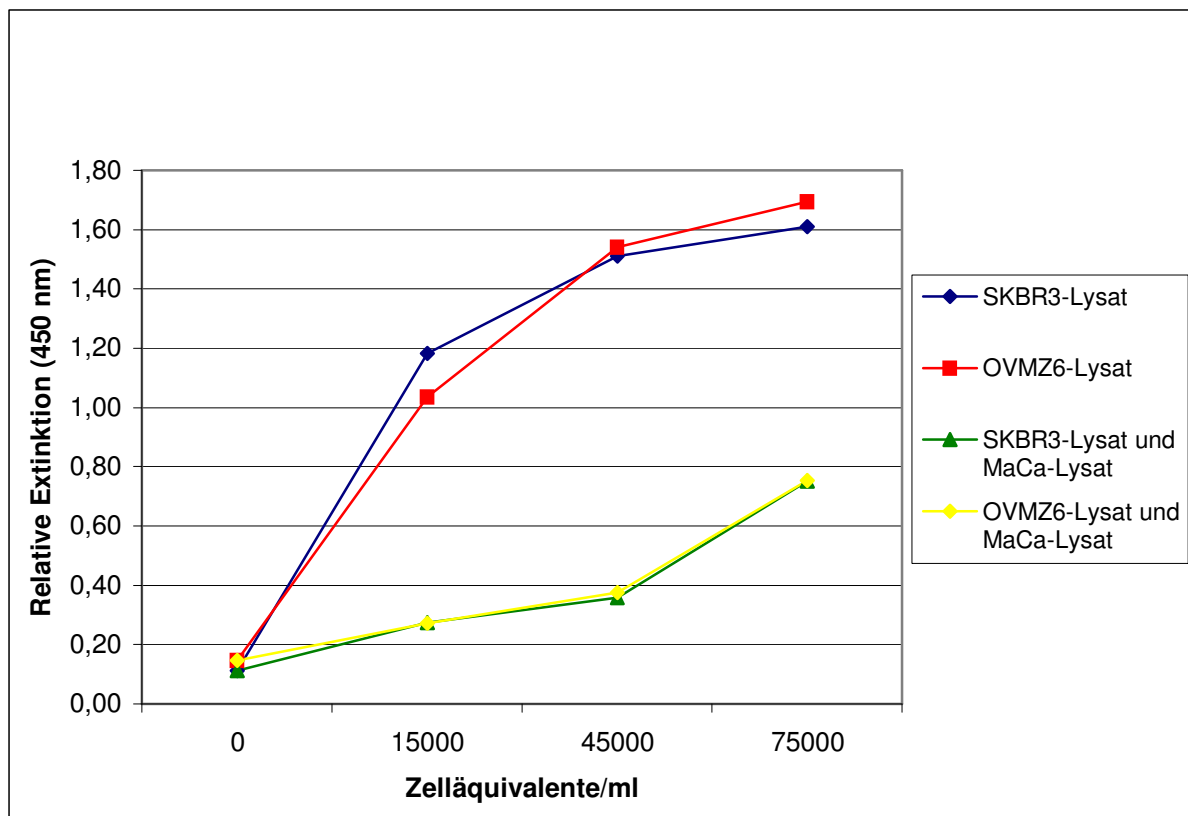
#### 5.7.1.4 Mammakarzinomgewebelysat und SKBR3-Lysat sowie OVMZ6-Lysat

Zur Überprüfung, ob der Effekt spezifisch für HeLa-Lysat ist, wurden Lysate der Zelllinien SKBR3 und OVMZ6 in zwei verschiedenen Puffern verdünnt. Einmal in TBS + 1% BSA und einmal in TBS + 1% BSA mit Mammakarzinomgewebelysat in der Verdünnung 1:20.

Bei einer maximalen Zellzahl von 75000 Zelläquivalenten/ml zeigt sich bei der SKBR3-Lysat Standardkurve mit Puffer ohne Gewebelysat (blaue Kurve in der Abbildung 16) eine Extinktion von 1,609 und bei der OVMZ6-Lysat Standardkurve mit Puffer ohne Gewebelysat (rote Kurve in der Abbildung 16) eine Extinktion von 1,694. Bei der Kurve aus SKBR3-Lysat, die in Puffer mit Mammakarzinomgewebelysat 1:20 verdünnt war (grüne Kurve in der Abbildung 16), zeigte sich bei derselben Zellzahl eine Extinktion von 0,752. Bei der Kurve aus OVMZ6, die in Puffer mit Mammakarzinomgewebelysat 1:20 verdünnt war (gelbe Kurve in der Abbildung 16), zeigte sich eine Extinktion von 0,753.

**Tab. 15** SKBR3-Lysat und OVMZ6-Lysat mit und ohne Mammakarzinomgewebelysat

Zelläquivalente/ml	Extinktion bei 450 nm SKBR3-Lysat	Extinktion bei 450 nm OVMZ6-Lysat	Extinktion bei 450 nm SKBR3-Lysat +MaCa-Lysat	Extinktion bei 450 nm OVMZ6-Lysat +MaCa-Lysat
0	0,113	0,147	0,113	0,147
15000	1,183	1,035	0,274	0,271
45000	1,51	1,541	0,358	0,375
75000	1,609	1,694	0,752	0,753



**Abb. 16** SKBR3-Lysat und OVMZ6-Lysat und Mammakarzinomgewebelysat

### 5.7.1.5 Serielle Verdünnungen von Mammakarzinomgewebelysaten mit und ohne HeLa-Lysat

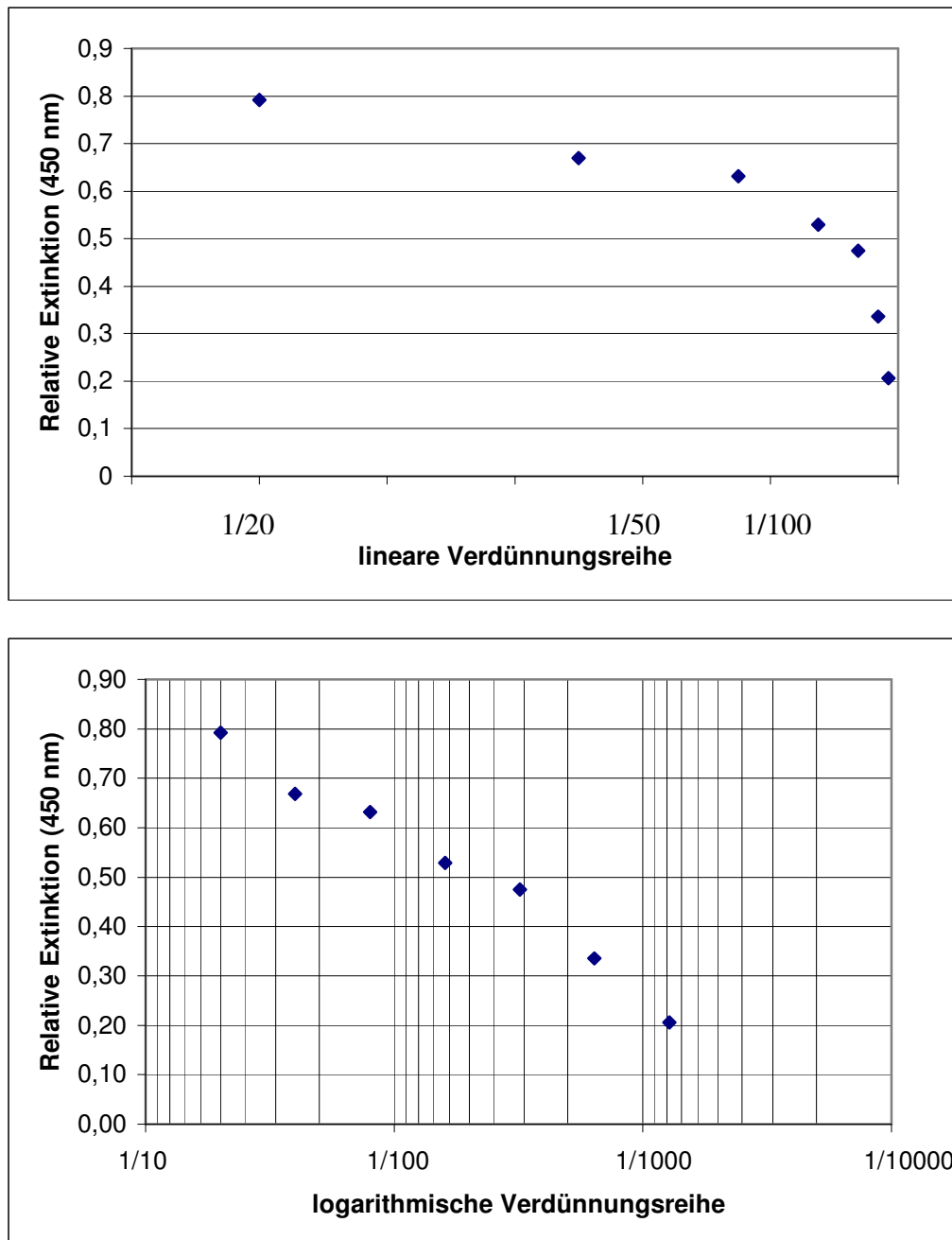
Als weitere Überprüfung auf Matrixeffekte wurde eine serielle Verdünnung von Mammakarzinomgewebelysat jeweils mit und ohne Zugabe von HeLa-Lysat durchgeführt. Das Gewebelysat wurde zunächst 1:20 in TBS + 1% BSA verdünnt. Die weiteren Verdünnungsstufen waren 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 und 1:1280. Dieselbe Verdünnungsreihe wurde ein weiteres Mal unter Zugabe von HeLa-Lysat in einer Endkonzentration von 75000 Zelläquivalenten/ml angefertigt. Die serielle Verdünnung von Mammakarzinomgewebe ohne HeLa-Lysat ergab in der niedrigsten Verdünnungsstufe von 1:20 eine Extinktion bei 450nm von 0,792, was einem YB-1 Gehalt von 310160 HeLa-Zelläquivalenten/ml entspricht, sowie in der höchsten Verdünnungsstufe von 1:1280 eine Extinktion bei 450nm von 0,206, was einem YB-1 Gehalt von 2519510 HeLa-Zelläquivalenten/ml entspricht. Die serielle Verdünnung von Mammakarzinomgewebelysat mit HeLa-Lysat zeigte in der niedrigsten Verdünnungsstufe von 1:20 eine Extinktion bei 450nm von 0,897 sowie in der höchsten Verdünnungsstufe von 1:1280 eine Extinktion bei 450nm von 1,75. Der YB-1 Gehalt wurde hier nicht errechnet, da sich die Extinktionswerte größtenteils außerhalb des linearen Bereichs der Standardkurve befinden.

**Tab. 16** Serielle Verdünnung von Mammakarzinomgewebelysat mit HeLa-Lysat

Verdünnung des Mammakarzinomgewebelysats mit HeLa-Lysat	Extinktion bei 450 nm
1:20	0,897
1:40	0,934
1:80	1,092
1:160	1,285
1:320	1,474
1:640	1,663
1:1280	1,750

**Tab. 17** Serielle Verdünnung Mammakarzinomgewebelysat ohne HeLa-Lysat

Verdünnung des Mammakarzinomgewebelysats ohne HeLa-Lysat	Extinktion bei 450 nm	HeLa-Zelläquivalente/ml
1:20	0,792	310160
1:40	0,669	490590
1:80	0,632	904540
1:160	0,529	1395630
1:320	0,475	2364460
1:640	0,336	2926510
1:1280	0,206	2519510



**Abb. 17** Serielle Verdünnung Mammakarzinomgewebelysat ohne HeLa-Lysat

### 5.7.1.6 Sequentielle Verdünnung von Mammakarzinomgewebelysat und HeLa-Lysat

Zunächst wurde die ELISA-Platte wie üblich mit dem N-terminalen Antikörper gecoatet. Anschließend wurden die entsprechenden Verdünnungen des HeLa-Lysats zur Erstellung der HeLa-Lysat-Standardkurve in Duplikaten aufgetragen. Darüberhinaus wurde in zwei Wells Mammakarzinomgewebelysat in TBS + 1 % BSA 1:20 verdünnt gegeben. Auf derselben Platte wurde in zwei separaten Wells HeLa-Lysat in TBS + 1 % BSA 1:200 verdünnt

aufgetragen. Am nächsten Tag wurden alle Wells 3 x mit TBST gewaschen. Eine Verdünnungsreihe der HeLa-Lysate zur Erstellung der Standardkurve wurde zur Kontrolle nicht gewaschen. Die beiden Wells, in denen sich zuvor Mammakarzinomgewebelysat befand, wurden nun, mit HeLa-Lysat in TBS + 1 % BSA 1:200 verdünnt, über Nacht inkubiert, während die beiden Wells, in denen sich zuvor HeLa-Lysat befand mit Mammakarzinomgewebelysat in TBS + 1 % BSA 1:20 verdünnt, ebenfalls über Nacht inkubiert wurden. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei RT. Die restlichen Schritte folgten dann dem üblichen ELISA-Protokoll.

Die Wells, die zuerst mit Mammakarzinomgewebelysat und anschließend mit HeLa-Lysat inkubiert wurden, zeigten eine Extinktion von 1,346 bei 450 nm. Die Wells, die umgekehrt zuerst mit HeLa-Lysat und anschließend mit Mammakarzinomgewebelysat inkubiert wurden, wiesen eine Extinktion von 0,641 bei 450 nm auf.

**Tab. 18** Sequentielle Verdünnung von Mammakarzinomgewebelysat und HeLa-Lysat

Reihenfolge der Zugabe	Extinktion bei 450 nm
1) Mammakarzinomgewebelysat	
2) HeLa-Lysate	1,346
1) HeLa-Lysat	
2) Mammakarzinomgewebelysat	0,641

### 5.7.2 **Kompetition des YB-1 durch Vorinkubation mit N-terminalem Peptid**

Zunächst wurde die ELISA-Platte wie üblich mit dem N-terminalen Antikörper gecoatet. Anschließend wurden die entsprechenden Verdünnungen des HeLa-Lysats zur Erstellung der HeLa-Lysat-Standardkurve aufgetragen. Darüberhinaus wurde HeLa-Lysat in TBS + 1% BSA 1:200 verdünnt aufgetragen. Außerdem wurde Mammakarzinomgewebelysat, benignes Mammagewebelysat, Aszites und Serum jeweils 1:10 in TBS + 1 % BSA verdünnt aufgetragen. Des Weiteren wurde Ovarialkarzinomgewebelysat und benignes Ovarialgewebelysat in TBS + 1 % BSA 1:50 verdünnt aufgetragen. Es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung der Proben.

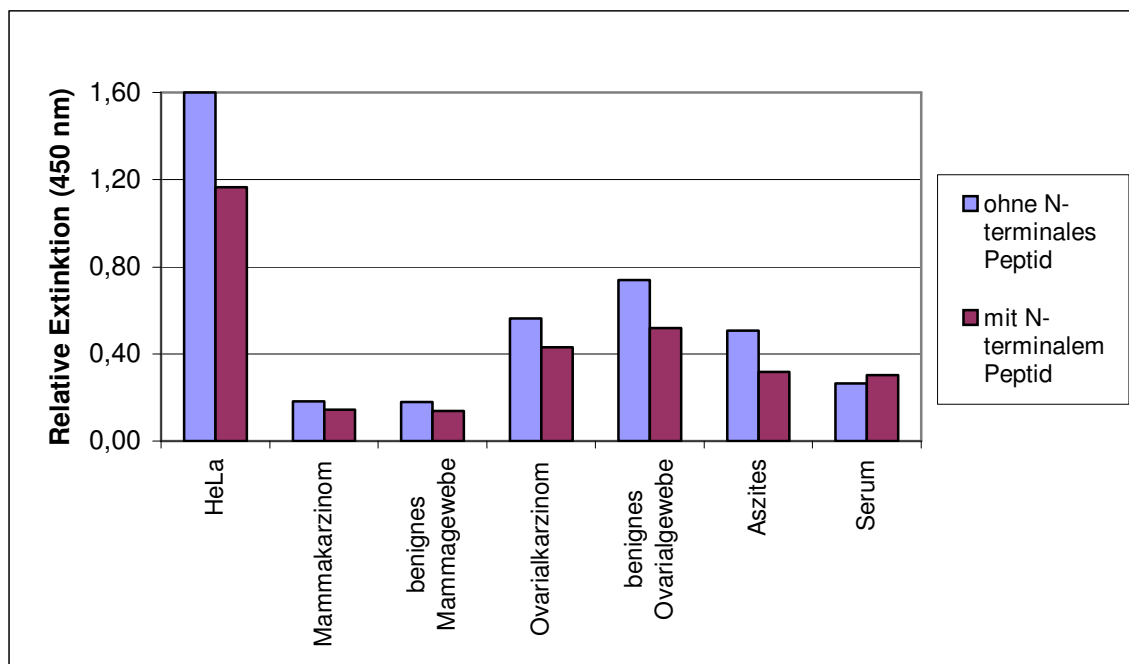
Zunächst wurden die Wells vor Zugabe der jeweiligen Proben mit dem N-terminalen Peptid von YB-1 vorinkubiert. Dazu wurden 50 µl des Peptids, welches in einer Konzentration von 2 µg/ml vorlag, in die Wells gegeben und bei Raumtemperatur für 45 min unter Schaukeln inkubiert. Anschließend erfolgte in die mit dem N-terminalen Peptid vorinkubierten Wells die

Zugabe von je 50 µl der verschiedenen Lysate in einer entsprechend niedrigeren Verdünnung, so dass die Endkonzentration in den Wells den oben genannten Verdünnungen entsprach. Zum Vergleich wurden je 100 µl derselben Proben in den oben genannten Verdünnungen in nicht vorinkubierte Wells gegeben. Die restlichen Schritte folgten dem üblichen ELISA-Protokoll.

Alle Gewebelysate erfuhren nach Vorinkubation mit dem N-terminalen Peptid eine Reduktion ihrer Extinktion. Der gemessene YB-1 Gehalt in Aszites zeigte ebenfalls eine Reduktion. Der YB-1 Wert im Serum wurde hingegen durch das N-terminale Peptid nicht reduziert.

**Tab. 19** Konkurrenz mit N-terminalem Peptid

Proben	Ohne Vorinkubation mit N-terminalem Peptid	Vorinkubation mit N-terminalem Peptid
HeLa-Lysat	1,600	1,165
Mammakarzinomgewebelysat	0,183	0,143
Benignes Mammagewebelysat	0,178	0,139
Ovarialkarzinomgewebelysat	0,564	0,432
Benignes Ovarialgewebelysat	0,741	0,519
Aszites	0,507	0,316
Serum	0,265	0,302



**Abb. 18** Konkurrenz mit N-terminalem Peptid

## 5.8 YB-Gehalt im Mamma- und Ovarialkarzinomgewebe bestimmt mittels Immunhistochemie

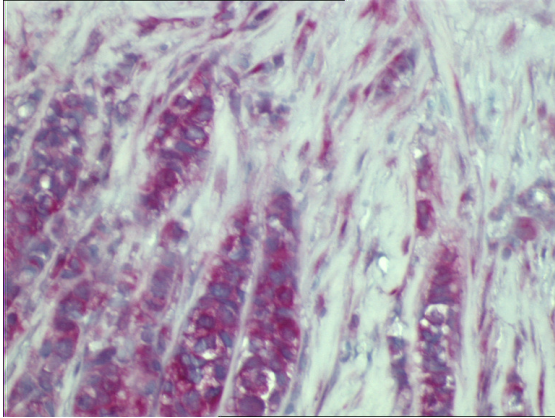
### 5.8.1 YB-1 Gehalt im Mammakarzinomgewebe bestimmt mittels Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung der Mammakarzinomgewebeschnitte erfolgte anhand des weiter oben beschriebenen Färbeprotokolls. Die Beurteilung der Schnitte erfolgte anschließend durch einen Pathologen des Pathologischen Instituts der Technischen Universität München. Die Schnitte wurden hierbei nach dem Remmele-Score beurteilt. Dieser errechnet sich als Produkt der Färbeintensität und dem Anteil positiver Zellen, für die jeweils Punkte vergeben werden (s. Tab. 20). Der Score reicht von 0-12 Punkten. Der Remmele-Score der einzelnen Mammakarzinomgewebeproben ist Tabelle 21 zu entnehmen. Die Abbildungen 18-21 zeigen beispielhafte Fotos für verschiedenes Färbeverhalten.

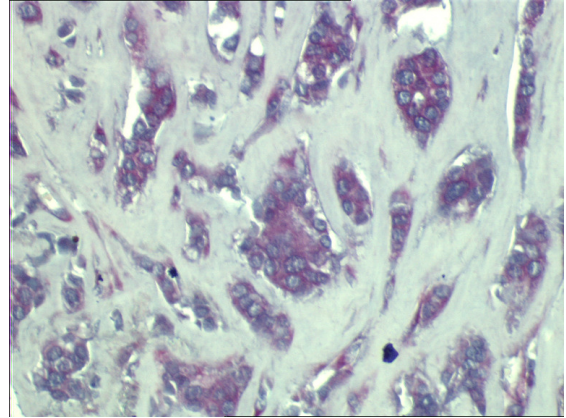
**Tab. 20** Remmele-Score

Punkte	Anteil positiver Zellen in %
0	0
1	1-9
2	10-50
3	51-80
4	81-100

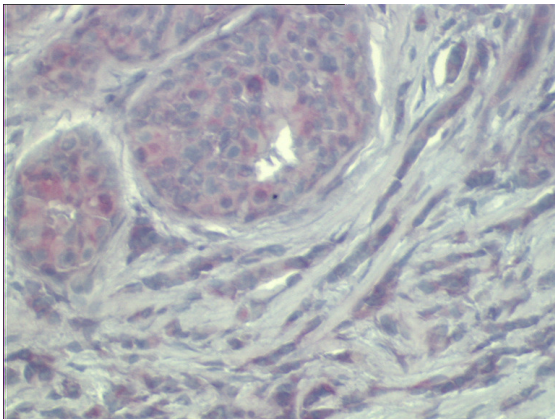
Punkte	Färbeintensität
0	Keine Anfärbung
1	Schwache Anfärbung
2	Mäßige Anfärbung
3	Starke Anfärbung



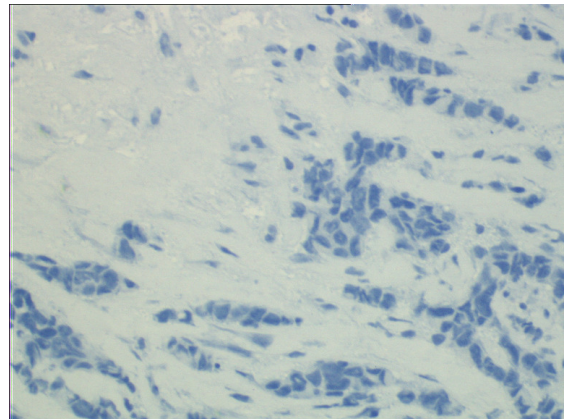
**Abb. 19** Hohe Anfärbung von YB-1  
(Remmele Score 12 Vergrößerung 200x)  
APAAP-Färbung



**Abb. 20** Mittlere Anfärbung von YB-1  
(Remmele Score 8 Vergrößerung 200x)  
APAAP-Färbung



**Abb. 21** Schwache Anfärbung von YB-1  
(Remmele Score 4 Vergrößerung 200x)  
APAAP-Färbung



**Abb. 22** Negativkontrolle  
(Vergrößerung 200x)  
APAAP-Färbung



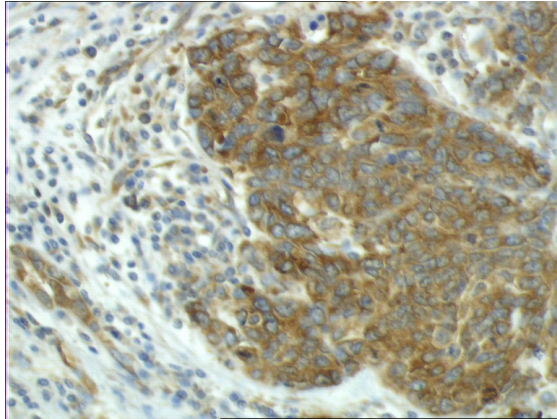
**Tab. 21** YB-1 Gehalt im Mammakarzinomgewebe bestimmt mittels Immunhistochemie

Probennummer	Anteil positiver Zellen in %	Färbeintensität	Remmele-Score
MC1	60	3	9
MC2	0	0	0
MC3	0	0	0
MC4	20	2	4
MC5	0	0	0
MC6	30	2	4
MC7	20	2	4
MC8	30	1	2
MC9	60	2	6
MC10	>80	2	8
MC11	70	3	9
MC12	60	3	9
MC13	20	1	2
MC14	50	3	9
MC15	40	2	4
MC16	>80	2	8
MC17	60	2	6
MC18	70	3	9
MC19	0	0	0
MC20	30	1	2
MC21	>80	2	8
MC22	>80	2	8
MC23	10	1	1
MC24	0	0	0
MC25	0	0	0
MC26	0	0	0
MC27	>80	3	12
MC28	30	2	4
MC29	20	1	2
MC30	0	0	0
MC31	>80	3	12
MC32	0	0	0
MC33	>80	3	12
MC34	10	2	2

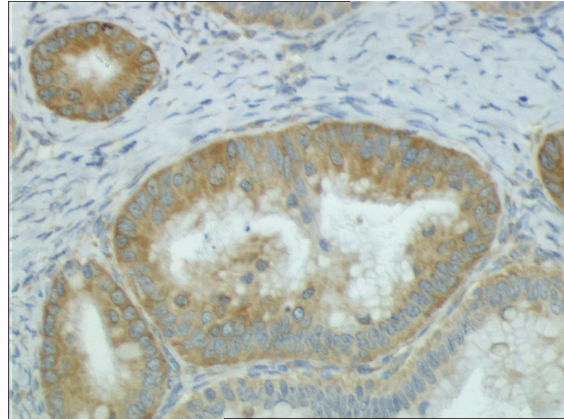
### 5.8.2 YB-1 Gehalt im Ovarialkarzinomgewebe bestimmt mittels Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung der Ovarialkarzinomgewebeschnitte erfolgte anhand des weiter oben beschriebenen Färbeprotokolls. Die Beurteilung der Schnitte erfolgte auch hier durch einen Pathologen des Pathologischen Instituts der Technischen Universität München. Die Schnitte wurden ebenfalls nach dem Remmele-Score beurteilt. Der Remmele-Score der

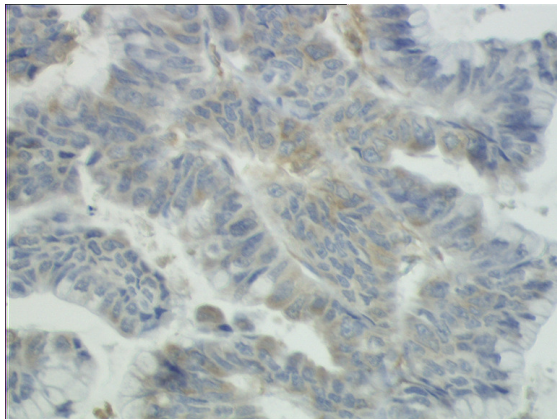
einzelnen Ovarialkarzinomgewebeprobe ist Tabelle 22 zu entnehmen. Von den 29 im ELISA gemessenen Ovarialkarzinomgewebeprobe waren bei 3 Proben (OC5, OC11 und OC28) kein Material für die Anfertigung von Paraffinblöcken vorhanden, so dass hier keine immunhistochemische Färbung erfolgen konnte. Abbildung 19 zeigt beispielhafte Fotos für verschiedenes Färbeverhalten.



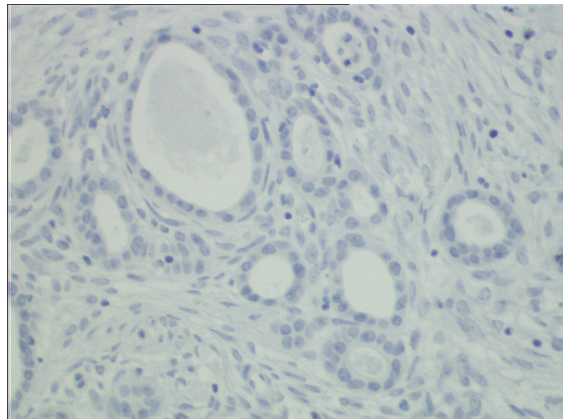
**Abb. 23** Hohe Anfärbung von YB-1  
(Remmele Score 12 Vergrößerung 200x)  
POX-Färbung



**Abb. 24** Mittlere Anfärbung von YB-1  
(Remmele Score 9 Vergrößerung 200x)  
POX-Färbung



**Abb. 25** Schwache Anfärbung von YB-1  
(Remmele Score 4 Vergrößerung 200x)  
POX-Färbung



**Abb. 26** Negativkontrolle  
(Vergrößerung 200x)  
POX-Färbung

**Tab. 22** YB-1 Gehalt im Ovarialkarzinomgewebe bestimmt mittels Immunhistochemie

Probennummer	Anteil positiver Zellen in %	Färbeintensität	Remmele-Score
OC1	>80	3	12
OC2	60	3	9
OC3	50	2	6
OC4	100	2	8
OC5	—	—	—
OC6	>80	3	12
OC7	>80	3	12
OC8	>80	2	8
OC9	>80	2	8
OC10	>80	3	12
OC11	—	—	—
OC12	60	2	6
OC13	>80	2	8
OC14	100	3	12
OC15	70	3	9
OC16	80	3	9
OC17	>80	3	12
OC18	>80	3	12
OC19	>80	2	8
OC20	40	2	4
OC21	60	2	6
OC22	60	2	6
OC23	>80	3	12
OC24	40	3	6
OC25	60	3	9
OC26	>80	3	12
OC27	100	3	12
OC28	—	—	—
OC29	>80	3	12

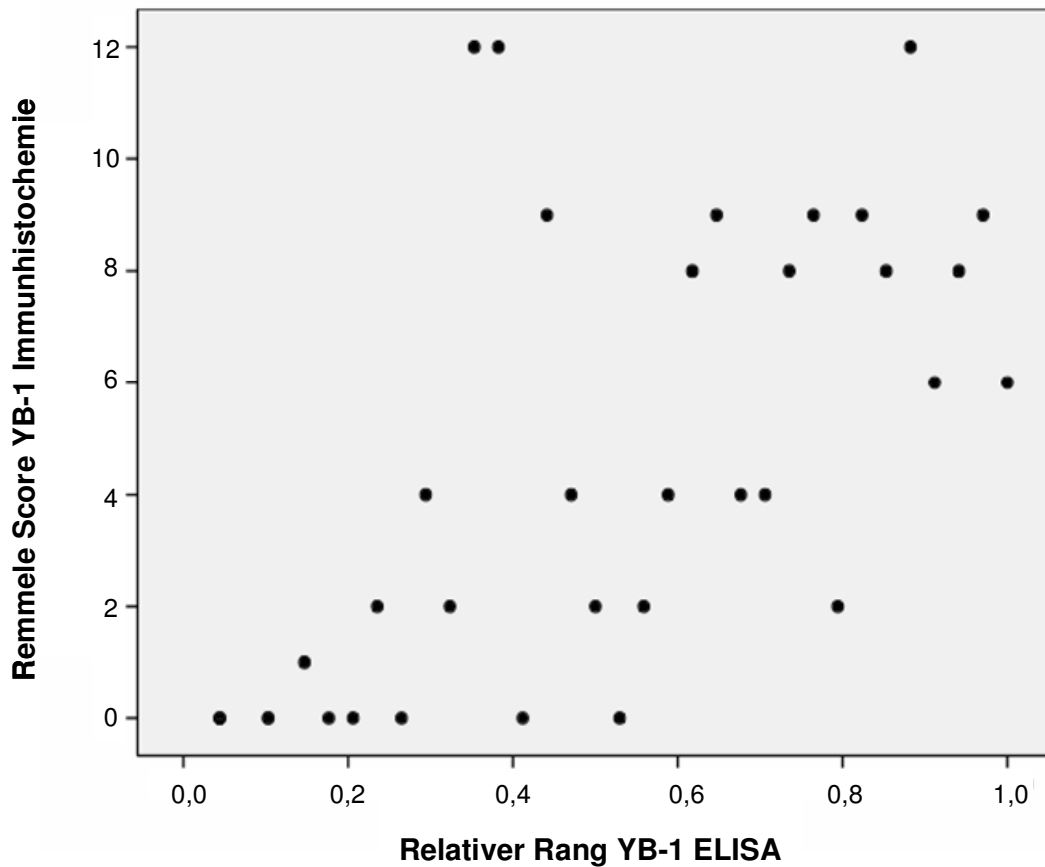
## 5.9 Statistische Auswertung der Daten

### 5.9.1 Statistische Auswertung der Daten beim Mammakarzinom

#### 5.9.1.1 Korrelation des YB-1 Gehalts bestimmt durch ELISA und Immunhistochemie beim Mammakarzinom

Der per ELISA bestimmte YB-1 Gehalt korrelierte statistisch signifikant mit dem per Immunhistochemie bestimmten YB-1 Gehalt. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson betrug 0,621 ( $p < 0,01$ ), die (verteilungsunabhängige) Korrelation nach Spearman zeigte einen

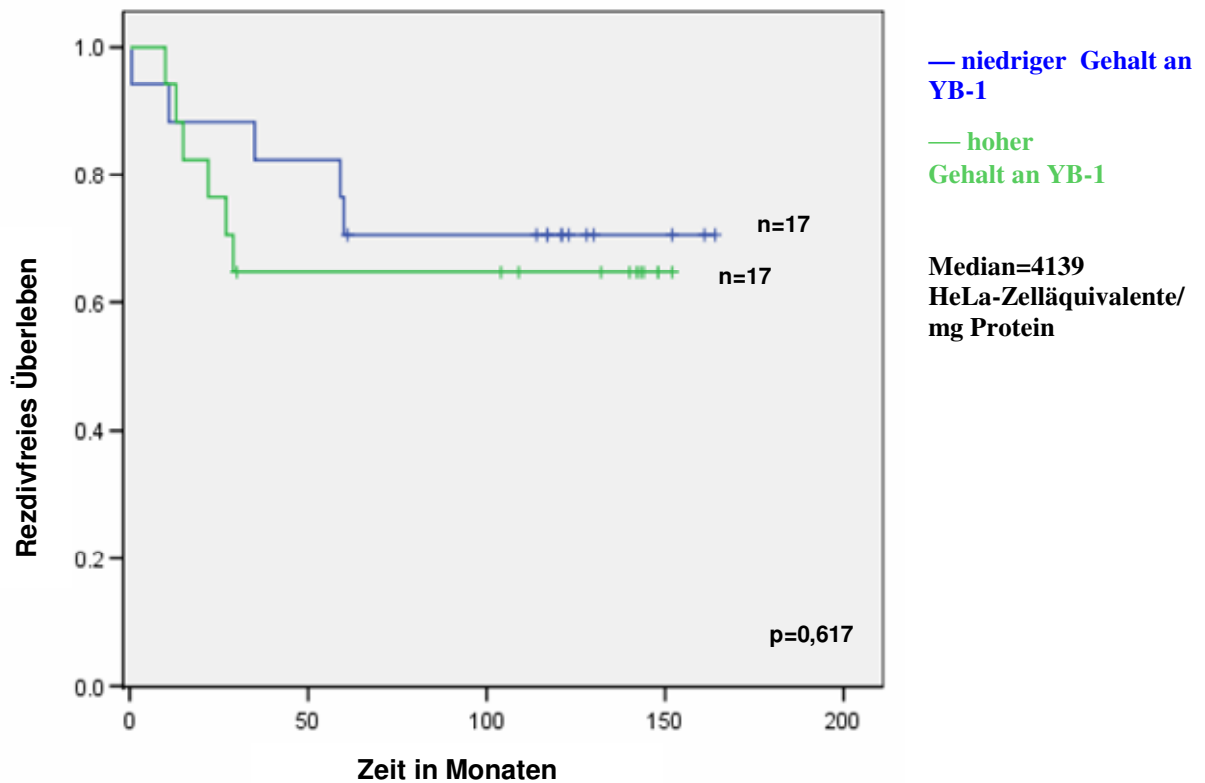
Korrelationskoeffizienten von 0,660 ( $p < 0,01$ ). Dies bedeutet eine mittlere Korrelation des per ELISA bestimmten YB-1 Gehalts mit dem per Immunhistochemie ermittelten YB-1 Gehalt.



**Abb. 27** Korrelation YB-1 Gehalt ELISA mit YB-1 Gehalt Immunhistochemie beim Mammakarzinom

### 5.9.1.2 YB-1 Gehalt bestimmt durch ELISA und rezidivfreies Überleben beim Mammakarzinom

Abb. 28 zeigt die Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens der Patientinnen in Abhängigkeit des per ELISA bestimmten YB-1 Gehalts. Der YB-1 Gehalt wurde hierfür, wie auch für die folgenden statistischen Tests, anhand des Medians in einen hohen und einen niedrigen Bereich eingeteilt. Der Unterschied im rezidivfreien Überleben zwischen beiden Bereichen war gemäß log rank Test statistisch nicht signifikant ( $p=0,617$ ).



**Abb. 28** YB-1 Gehalt ELISA und rezidivfreies Überleben beim Mammakarzinom

()

### 5.9.1.3 YB-1 Gehalt bestimmt durch ELISA und Gesamtüberleben beim Mammakarzinom

Abb.29 zeigt die Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens der Patientinnen in Abhängigkeit des per ELISA bestimmten YB-1 Gehalts. Der Unterschied im Gesamtüberleben zwischen beiden Bereichen war gemäß log rank Test statistisch nicht signifikant ( $p=0,935$ )

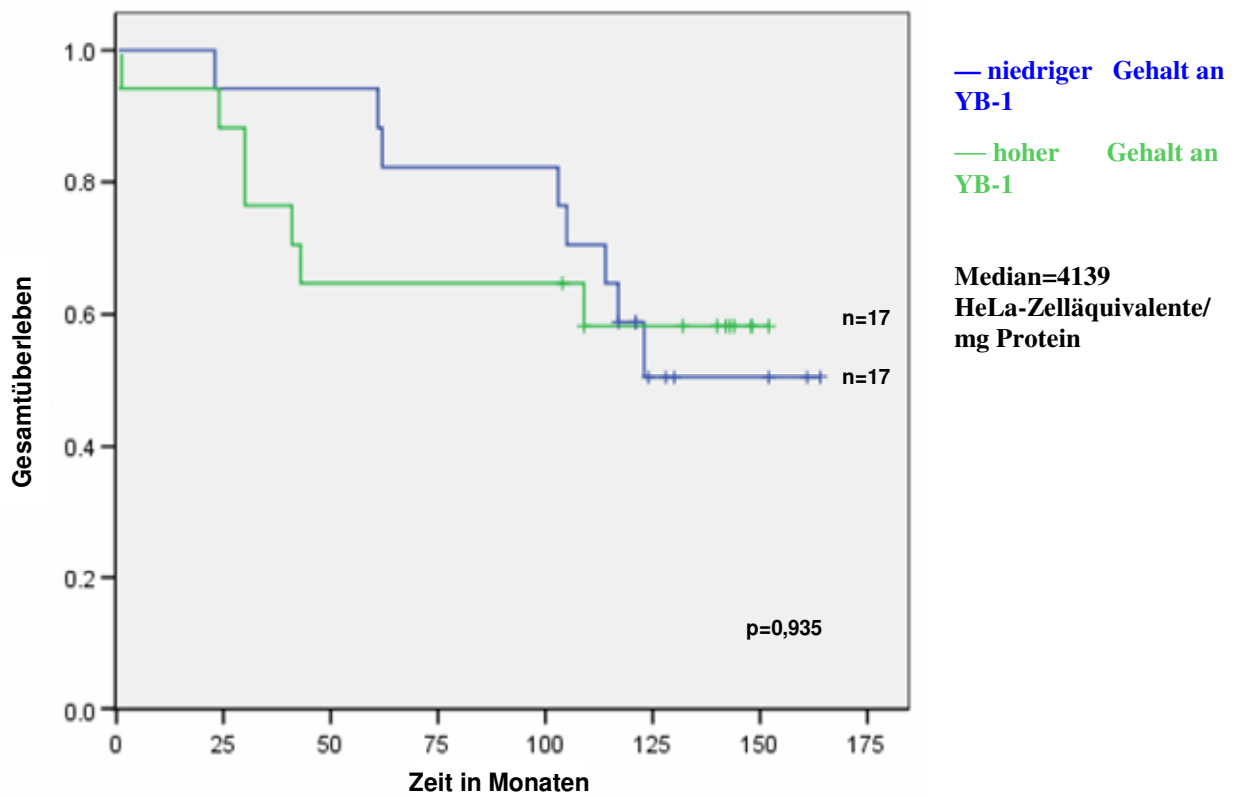
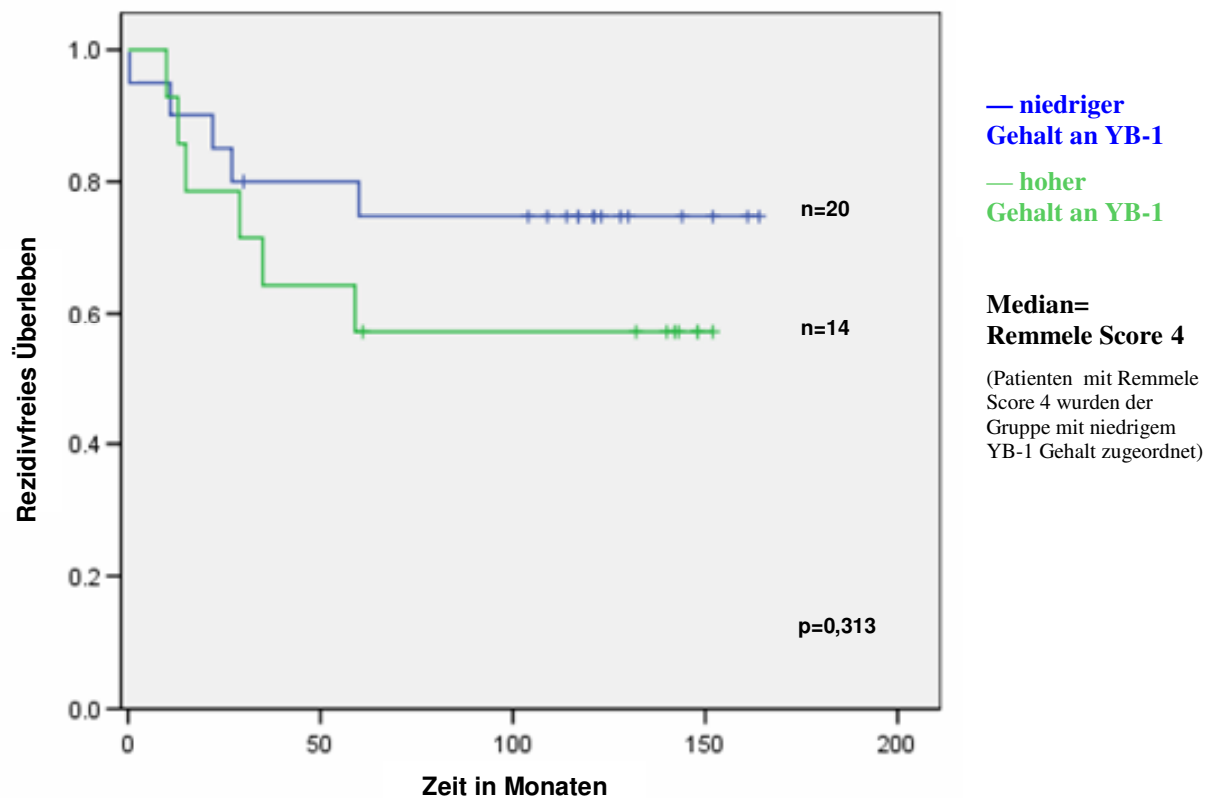


Abb. 29 YB-1 Gehalt ELISA und Gesamtüberleben beim Mammakarzinom

#### 5.9.1.4 YB-1 Gehalt bestimmt durch Immunhistochemie und rezidivfreies Überleben beim Mammakarzinom

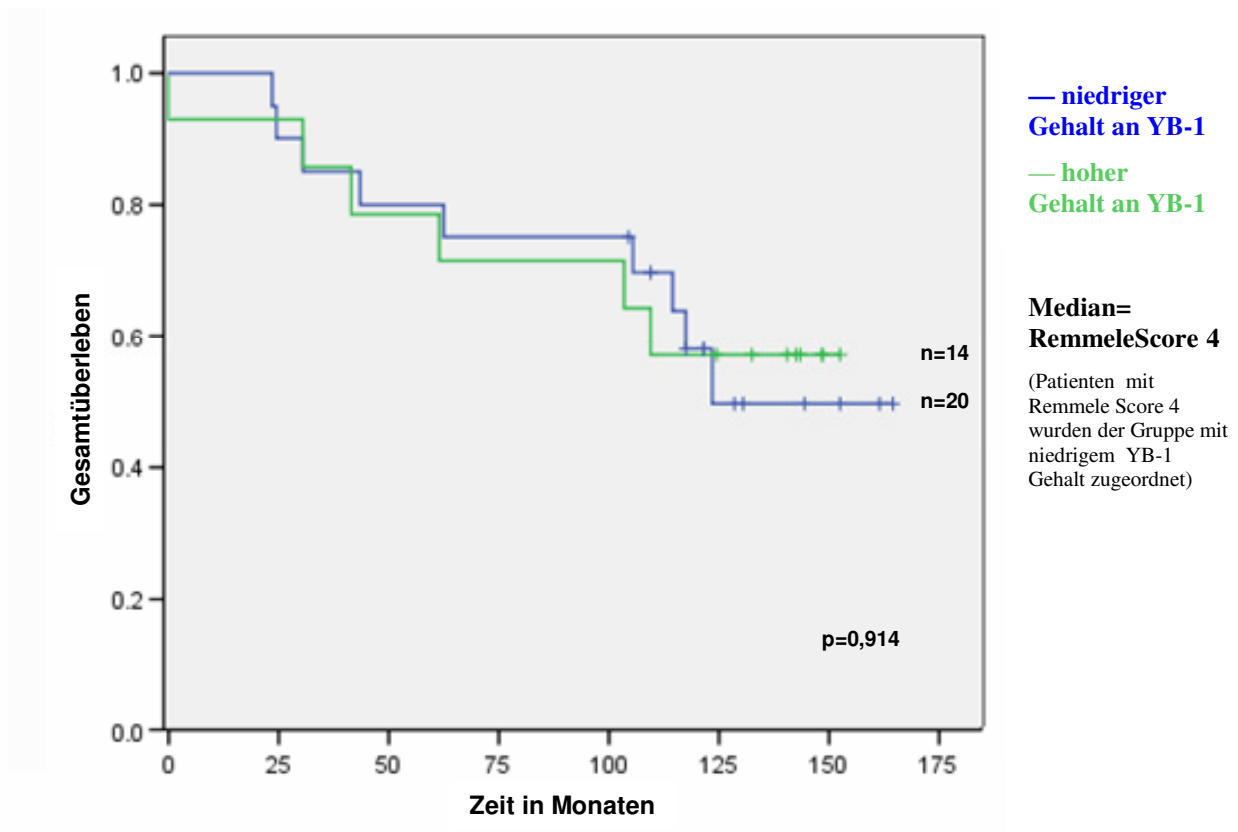
Abb. 30 zeigt die Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens der Patientinnen mit Mammakarzinom in Abhängigkeit des per Immunhistochemie bestimmten YB-1 Gehalts. Der Unterschied im rezidivfreien Überleben zwischen beiden Bereichen war gemäß log rank Test statistisch nicht signifikant ( $p=0,313$ ).



**Abb. 30** YB-1 Gehalt Immunhistochemie und rezidivfreies Überleben beim Mammakarzinom

### 5.9.1.5 YB-1 Gehalt bestimmt durch Immunhistochemie und Gesamtüberleben beim Mammakarzinom

Abb. 31 zeigt die Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens der Patientinnen mit Mammakarzinom in Abhängigkeit des per Immunhistochemie bestimmten YB-1 Gehalts. Der Unterschied im Gesamtüberleben zwischen beiden Bereichen war gemäß log rank Test statistisch nicht signifikant ( $p=0,914$ ).



**Abb. 31** YB-1 Gehalt Immunhistochemie und Gesamtüberleben beim Mammakarzinom

### 5.9.1.6 YB-1 Gehalt und Grading beim Mammakarzinom

Des Weiteren wurde untersucht, ob Patientinnen mit Tumoren eines hohen Gradings einen höheren YB-1 Gehalt zeigten als Patientinnen mit Tumoren eines niedrigen Gradings. Hierzu wurden die Patientinnen in zwei Gruppen unterteilt, zum einen in Patientinnen mit Tumoren des Grading 2 (n=15) und zum anderen in Patientinnen mit Tumoren des Grading 3 (n=18). Tumore des Grading 1 waren nicht vorhanden (s. Tab.1). Es erfolgten zwei separate Berechnungen unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests für für den per ELISA bestimmten YB-1 Gehalt und für den per Immunhistochemie bestimmten YB-1 Gehalt. In beiden Berechnungen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied im YB-1 Gehalt zwischen hohem und niedrigem Grading nach dem Mann-Whitney-U-Test (p=0,361 für YB-1 Gehalt ELISA und p=0,630 für YB-1 Gehalt Immunhistochemie)



### **5.9.1.7 YB-1 Gehalt und Lymphknotenstatus beim Mammakarzinom**

Weiterhin wurde untersucht, ob Patientinnen mit befallenen Lymphknoten einen höheren Gehalt an YB-1 aufwiesen als Lymphknoten-negative Patientinnen. Hierzu wurden die Patientinnen mit Mammakarzinom in zwei Gruppen unterteilt, zum einen in Patientinnen, deren Lymphknoten nicht befallen waren und die somit nodal negativ waren, (n=8) und zum anderen in Patientinnen, die mindestens einen befallenen Lymphknoten aufwiesen und somit nodal positiv waren (n=24) (s. Tab.1). Es erfolgten zwei separate Berechnungen unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests für den per ELISA bestimmten YB-1 Gehalt und für den per Immunhistochemie bestimmten YB-1 Gehalt. In beiden Berechnungen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem YB1 Gehalt nodal positiver und nodal negativer Patientinnen nach dem Mann-Whitney-U-Test ( $p=0,329$  für YB-1 ELISA und  $p=0,462$  für YB-1 Immunhistochemie)

## **5.9.2 Statistische Auswertung der Daten beim Ovarialkarzinom**

### **5.9.2.1 Korrelation des YB-1 Gehalts bestimmt durch ELISA und Immunhistochemie beim Ovarialkarzinom**

Die Korrelation zwischen den per ELISA bestimmten sowie den per Immunhistochemie bestimmten YB-1 Werten beim Ovarialkarzinom war mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von 0,260 statistisch nicht signifikant ( $p=0,199$ ). Der Korrelationskoeffizient nach Spearman betrug 0,241 und war ebenfalls statistisch nicht signifikant ( $p=0,235$ )

### **5.9.2.2 YB-1 Gehalt bestimmt durch ELISA und rezidivfreies Überleben beim Ovarialkarzinom**

Abb. 32 zeigt die Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens beim Ovarialkarzinom in Abhängigkeit des per ELISA bestimmten YB-1 Gehalts. Es fand sich keine statistische signifikante Verschlechterung des rezidivfreien Überlebens für Patientinnen mit hohem YB-1 Gehalt im log rank Test ( $p=0,686$ ).

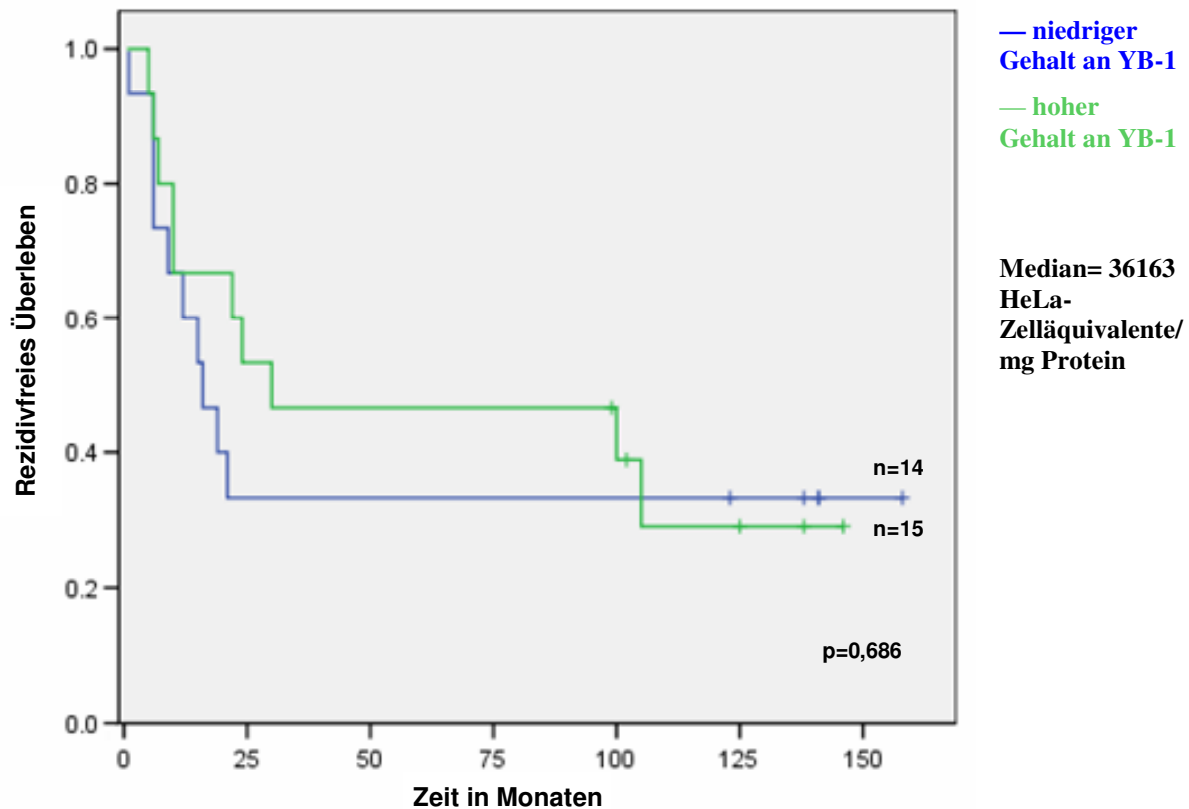
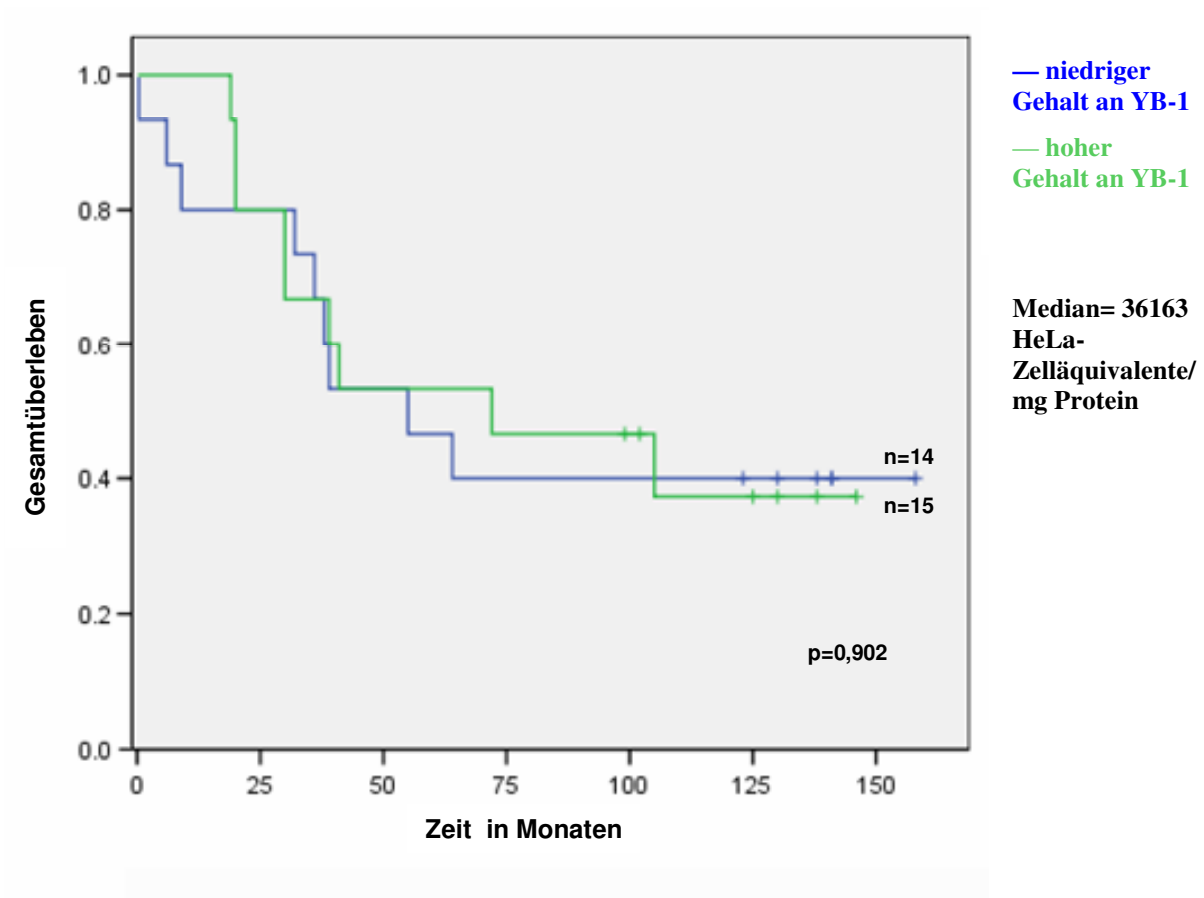


Abb. 32 YB-1 Gehalt ELISA und rezidivfreies Überleben beim Ovarialkarzinom

### 5.9.2.3 YB-1 Gehalt bestimmt durch ELISA und Gesamtüberleben beim Ovarialkarzinom

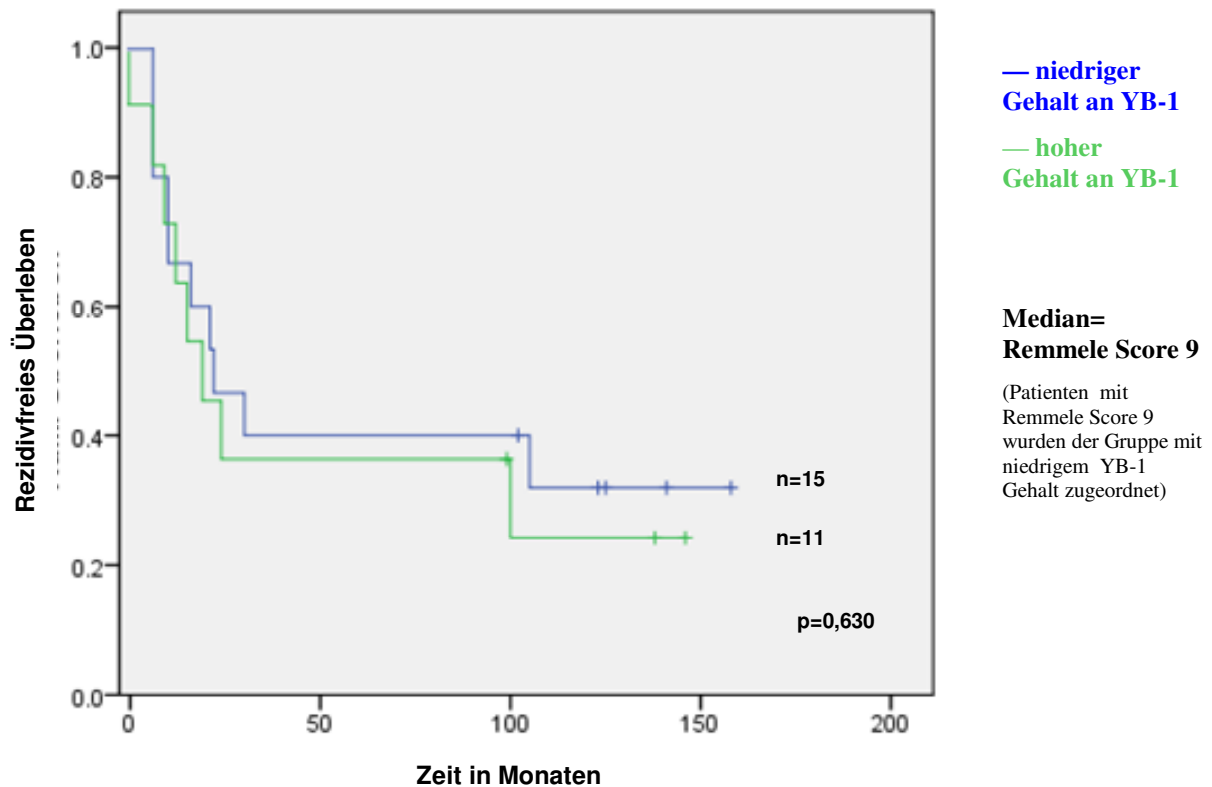
Abb. 33 zeigt die Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens beim Ovarialkarzinom in Abhängigkeit des per ELISA bestimmten YB-1 Gehalts. Es fand sich keine statistisch signifikante Verschlechterung des Gesamtüberlebens für Patientinnen mit hohem YB-1 Gehalt im log rank Test ( $p=0,902$ ).



**Abb. 33** YB-1 Gehalt ELISA und Gesamtüberleben beim Ovarialkarzinom

#### 5.9.2.4 YB-1 Gehalt bestimmt durch Immunhistochemie und rezidivfreies Überleben beim Ovarialkarzinom

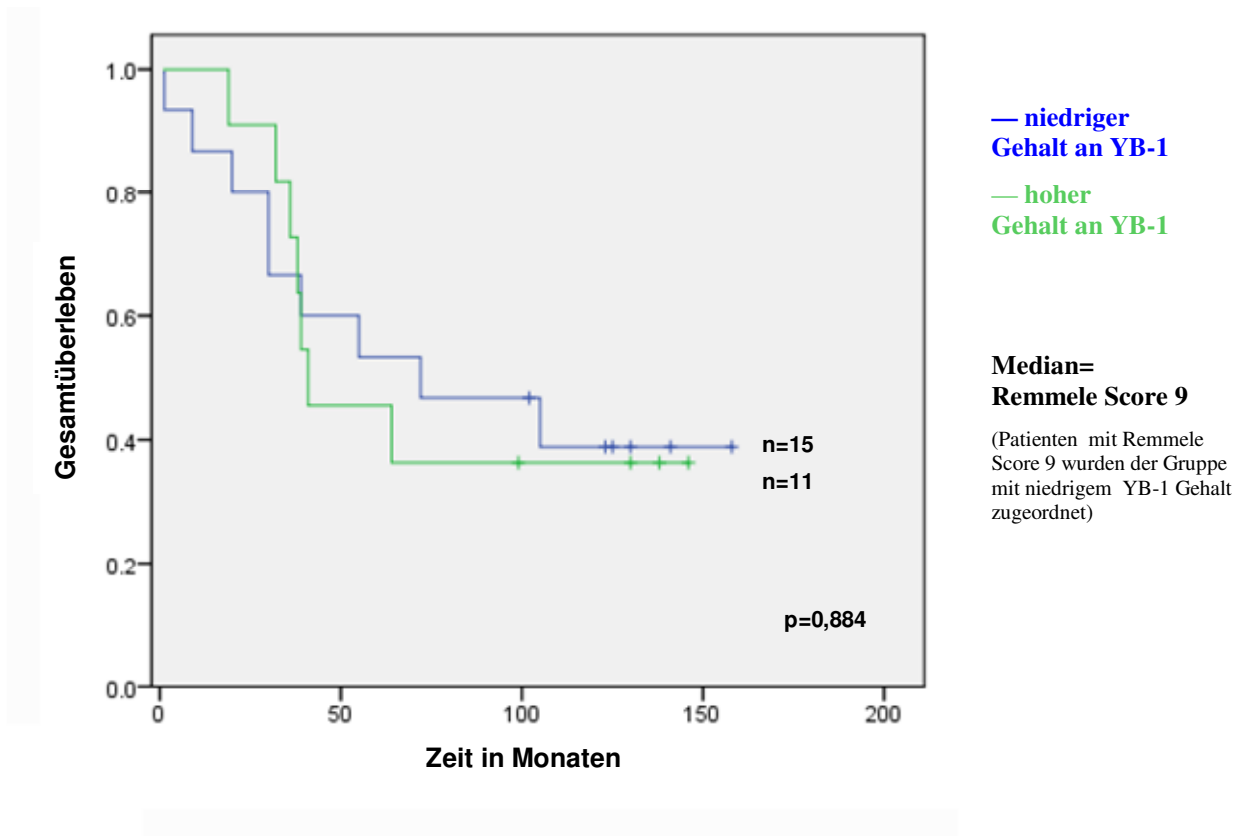
Abb. 34 zeigt die Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens beim Ovarialkarzinom in Abhängigkeit des per Immunhistochemie bestimmten YB-1 Gehalts. Es fand sich keine statistische signifikante Verschlechterung des rezidivfreien Überlebens für Patientinnen mit hohem YB-1 Gehalt im log rank Test ( $p=0,630$ ).



**Abb. 34** YB-1 Gehalt Immunhistochemie und rezidivfreies Überleben beim Ovarialkarzinom

### 5.9.2.5 YB-1 Gehalt bestimmt durch Immunhistochemie und Gesamtüberleben beim Ovarialkarzinom

Abb. 35 zeigt die Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens beim Ovarialkarzinom in Abhängigkeit des per Immunhistochemie bestimmten YB-1 Gehalts. Es fand sich keine statistisch signifikante Verschlechterung des Gesamtüberlebens für Patientinnen mit hohem YB-1 Gehalt im log rank Test ( $p=0,884$ ).



**Abb. 35** YB-1 Gehalt Immunhistochemie und Gesamtüberleben beim Ovarialkarzinom

### 5.9.2.6 YB-1 Gehalt und Grading beim Ovarialkarzinom

Auch im Ovarialkarzinom wurde untersucht, ob Patientinnen mit Tumoren eines hohen Gradings einen höheren YB-1 Gehalt zeigten als Patientinnen mit Tumoren eines niedrigen Gradings. Hierzu wurden die Patientinnen in zwei Gruppen unterteilt, zum einen in Patientinnen mit Tumoren eines niedrigen Gradings, zu dem Grading 1 und 2 zählten (für ELISA n=13; für Immunhistochemie n=10) und zum anderen in Patientinnen mit Tumoren eines hohen Gradings, zu dem Grading 3 und 4 zählten (für ELISA und für Immunhistochemie n=14). Es erfolgten zwei separate Berechnungen unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests für den per ELISA bestimmten YB-1 Gehalt und für den per Immunhistochemie bestimmten YB-1 Gehalt.

Hierbei zeigte sich für den per Immunhistochemie bestimmten YB-1 Gehalt ein signifikanter Unterschied zwischen der Patientengruppe mit hohem Grading und der Patientengruppe mit niedrigem Grading. So zeigten die Patientinnen mit Ovarialkarzinomen des Gradings 3 und 4 einen höheren Gehalt an YB-1 als die Patientinnen mit Ovarialkarzinomen des Gradings 1

---

und 2 ( $p=0,031$ ). Für den per ELISA bestimmten YB-1 Gehalt war der Unterschied statistisch gerade nicht mehr signifikant ( $p=0,061$ ).

#### **5.9.2.7 YB-1 Gehalt und FIGO-Stadium beim Ovarialkarzinom**

Weiterhin wurde untersucht, ob Patientinnen mit einem hohen FIGO Stadium einen höheren Gehalt an YB-1 aufwiesen als Patientinnen mit einem niedrigen FIGO Stadium. Hierzu wurden die Patientinnen in zwei Gruppen unterteilt, zum einen in Patientinnen mit einem hohen FIGO Stadium das Stadium 3 und 4 einschloss und zum anderen in Patientinnen mit einem niedrigen FIGO Stadium, das Stadium 1 und 2 beinhaltete. Es erfolgten zwei separate Berechnungen unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests für den per ELISA bestimmten YB-1 Gehalt und für den per Immunhistochemie bestimmten YB-1 Gehalt.

In beiden Berechnungen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied im YB-1 Gehalt zwischen den Patientengruppen mit hohem und niedrigem FIGO Stadium nach dem Mann-Whitney-U-Test (für ELISA  $p=0,870$  und für Immunhistochemie  $p=0,106$ )

## 6. Diskussion

### 6.1 YB-1 Gehalt in Zelllinien

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien handelt es sich ausschließlich um humane Tumorzelllinien. In allen untersuchten Zelllinienlysaten fand sich im ELISA ein erwartungsgemäß hoher Gehalt an YB-1. Dieses Ergebnis bestätigt die bisherigen Daten aus der Literatur, die zeigen, dass YB-1 eine wichtige Rolle im Zellwachstum spielt und somit eine erhöhte Expression in den meisten proliferierenden Geweben zu finden ist. YB-1 aktiviert das Zellwachstum durch Kontrolle der Transkription verschiedener Zielgene, die eine entscheidende Rolle in der Zellproliferation spielen wie zum Beispiel „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA) (Ise et al, 1999), „DNA topoisomerase II $\alpha$ “ (Gu et al, 2001), „DNA polymerase  $\alpha$ “ (En-Nia et al, 2005), „epidermal growth factor receptor“ und „thymidine kinase“ (Ladomery und Sommerville, 1995/Kohno et al, 2005) sowie verschiedene Zykline (Jürchott et al, 2003).

Der hohe zelluläre Gehalt an YB-1 unter Proliferationsbedingungen zeigt sich unter anderem in der erhöhten YB-1 Expression in fetalem Gewebe. Hier finden sich sehr hohe YB-1 Werte in Herz, Muskel, Leber, Lunge, Gehirn und Nebenniere (Spitkovsky et al, 1992). Aber auch adultes Gewebe zeigt eine erhöhte YB-1 Expression unter Proliferationsbedingungen. So zeigt sich in der adulten Leber ein hoher YB-1 Gehalt nach Gewebeschaden bedingt durch partielle Hepatektomie (Ito et al, 1994) oder chemisch induziertem Schaden (Grant und Deeley, 1993). Außerdem zeigt das proliferierende Kompartiment der kolorektalen Mukosa eine erhöhte YB-1 Expression (Shibao et al, 1999). Eine vermehrte YB-1 Expression beobachtet man auch nach verschiedenen mitotischen Stimuli. Ein Beispiel hierfür findet man in der Immunantwort, in der die Vermehrung antigenspezifischer T-Zellen einen essentiellen Bestandteil darstellt. Die klonale Expansion dieser Zellen findet durch Interleukin-2 (IL-2) Stimulation statt. Untersuchungen zeigten, dass YB-1 nach IL-2 Stimulation deutlich höher exprimiert wird und somit eine Rolle in der Vermehrung der Lymphozyten zu spielen scheint (Sabath et al, 1990). Des Weiteren scheint YB-1 während der T-Zell-Aktivierung zur Stabilisierung der IL-2 mRNA beizutragen (Chen et al, 2000).

Einen weiteren Hinweis erbrachten Ito et al 1994, indem sie ruhende Fibroblasten durch Zugabe von Serum aktivierten und dazu brachten in die S-Phase einzutreten. Diese aktivierten Fibroblasten zeigen eine Induktion von Genen der Y-box bindenden Familie (Ito et al, 1994).

Außerdem zeigen thrombinstimulierte endotheliale Zellen eine erhöhte YB-1 Expression. Thrombin bewirkt die Induktion verschiedener Gene in endothelialen Zellen, die zu einer vermehrten Proliferation und Aktivierung führen. Ein Protein das hierbei eine wichtige Rolle spielt ist im Zytoplasma der endothelialen Zellen lokalisiert und wurde zunächst als „thrombin-inducible nuclear factor“ (TINF) beschrieben. Dieses Protein wird durch Thrombin aktiviert und in den Nukleus transportiert (Scarpatic und DiCorleto, 1996). Dieser TINF wurde später als YB-1 identifiziert (Stenina et al, 2000).

Eine weitere wichtige Untersuchung zur Überprüfung der Bedeutung von YB-1 für das Zellwachstum lieferten Uchiumi et al. Sie kreierte YB-1 knock-out-Mäuse. Aus Mäuseembryonen dieser Linie gewonnene Fibroblasten, zeigten ein reduziertes Wachstum sowie eine reduzierte Zelldichte (Uchiumi et al, 2006). Ein Mechanismus, über den YB-1 den Zellzyklus und somit das Zellwachstum reguliert, ist die Kontrolle der Transkription von Zyklin A und Zyklin B1 (Jürchott et al, 2003). Der Ablauf des Zellzyklus wird von der Aktivität zahlreicher zyklinabhängiger Kinasen kontrolliert. Die Zykline, zu denen auch Zyklin A und Zyklin B1 zählen, dienen hierbei als regulatorische Untereinheiten (Pines und Hunter, 1992). Jürchott et al zeigten 2003, dass YB-1 während der G1/S-Phase des Zellzyklus in den Kern transportiert wird. Hierfür ist sowohl der „charged zipper“ als auch die CSD notwendig. Im Nukleus aktiviert YB-1 die Transkription von Zyklin A und B1 und beeinflusst auf diesem Weg den Zellzyklus und damit das Zellwachstum. Unkontrollierte YB-1 Expression könnte somit über die Expression von Zyklin A zu kontaktunabhängiger Zellproliferation führen und damit zur Tumorentstehung beitragen (Jürchott et al, 2003). Michalides et al zeigten 2002, dass eine Überexpression von Zyklin A bei Patientinnen mit Mammakarzinom mit einer schlechteren Prognose sowie einem schlechteren Ansprechen auf eine Tamoxifen Therapie verbunden ist (Michalides et al, 2002).

Die Zelllinienlysate in der vorliegenden Arbeit wurden aus Zellen gewonnen, die sich in einem Konfluenzgrad von etwa 80% befanden, das heißt aus Zellen, die sich noch im Wachstum befanden. Da es sich bei den verwendeten Zelllinien um humane Krebszellen handelte, die somit über ein sehr ausgeprägtes Wachstum verfügen, waren die mittels ELISA bestimmten YB-1 Werte entsprechend hoch. Der mediane YB-1 Gehalt aller Zelllinien lag bei  $2,4 \times 10^6$  HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein. Interessanterweise zeigten jedoch nicht nur die Zelllinien der soliden Tumoren einen hohen Gehalt an YB-1 sondern auch die Zelllinien, die aus Multiplen Myelomen gewonnen wurden. Der YB-1 Gehalt dieser Zelllinien lag mit einem



Median von  $9,1 \times 10^6$  HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein sogar deutlich über dem der soliden Tumoren mit einem Median von  $1,9 \times 10^6$  HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein.

Das Multiple Myelom ist eine klonale maligne Erkrankung der terminal differenzierten B-Zelle, d.h. der Antikörper sezernierenden B-Zelle. Die Erkrankung ist bis auf Ausnahmen im Knochenmark lokalisiert. Über die Rolle von YB-1 in nicht soliden Tumoren liegen bisher noch keine ausreichenden Daten aus der Literatur vor. Es finden sich jedoch einige Hinweise darauf, dass YB-1 auch in Erkrankungen des blutbildenden Systems involviert ist. So konnten Yokoyama et al 2003 zeigen, dass YB-1 in erythrozytären Zellen von Patienten mit refraktärer Anämie hoch exprimiert wird (Yokoyama et al, 2003). Die refraktäre Anämie ist eine Unterform des Myelodysplastischen Syndroms, einer heterogenen, erworbenen, klonalen Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Einen Hinweis dafür, dass YB-1 in der Hämatopoese, bzw. in der Erythropoese eine Rolle spielt, fand sich in einer Studie von Ashizuka et al, die nachwies, dass YB-1 mit dem „iron binding protein 2“ (IRP2) interagiert und über dessen Interaktion mit dem „iron responsive element“ (IRE) in der Translation des Ferritin Gens mitwirkt (Ashizuka et al, 2002). Da IREs in vielen Genen vorkommen, die in der Hämbiosynthese und dem Eisenmetabolismus eine Rolle spielen, könnte YB-1 somit in der Erythropoese mitwirken (Yokoyama et al, 2003). Weitere, im Folgenden dargestellte, Untersuchungen bekräftigen diese Hypothese.

In der Hämatopoese sind die sogenannten GATA Transkriptionsfaktoren von essentieller Bedeutung. So spielt GATA-1 eine wichtige Rolle in der Erythropoese (Tsai et al, 1989). Ein knockdown des GATA-1 Gens führt zu einem Reifungsstopp und zu einer Transformation der Erythroblasten (Suwabe et al, 1998/Takahashi et al, 1998) Yokoyama et al konnten zeigen, dass YB-1 in GATA-1 knockdown Mäusen hoch exprimiert wird. Weiterhin wiesen sie nach, dass der YB-1 Promoter durch GATA-1 und GATA-2 reguliert wird. Diese Resultate legen nahe, dass YB-1 eine Rolle in der Erythropoese und hier vor allem in der Dyserythropoese zu spielen scheint (Yokoyama et al, 2003). Des Weiteren zeigten Jürchott et al 2001, dass YB-1 in der Transkription des hämatopoetischen Wachstumsfaktors „Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor“ (GM-CSF) in Jurkat-T-Zellen, Zelllinien von humanen T-Zell-Leukämie-Zellen von Bedeutung ist (Diamond et al, 2001). Außerdem finden sich Hinweise, dass YB-1 in der Genexpression des „humanen T-Zell-Leukämie Virus“ (HTLV-1) involviert ist (Kashanchi et al, 1994). HTLV-1 ist an der Entstehung einer seltenen Bluterkrankung, der adulten T-Zell-Leukämie, beteiligt. Das HTLV-1 ist ein Retrovirus, das zur selben Klasse wie

das „humane Immunodefizienz Virus“ (HIV), dem Erreger von AIDS, gehört. Dies legt wiederum nahe, dass YB-1 auch in der Transkription von HIV eine Rolle spielt (Sawaya et al, 1998/ Ansari et al, 1999).

Der in dieser Arbeit nachgewiesene hohe YB-1 Gehalt in den multiplen Myelom-Zellen legt, auch unter Zusammenschau der oben zitierten Literatur, den Schluss nahe, dass YB-1 auch bei dieser Erkrankung von Bedeutung ist. Anfang 2008 erschien ein Artikel von Chatterjee et al der sich mit der Rolle von YB-1 in Chemotherapieresistenz und Proliferation im multiplen Myelom beschäftigt. Übereinstimmend mit unseren Daten konnte dort gezeigt werden, dass multiple Myelom-Zelllinien in vitro eine starke Überexpression von YB-1 aufwiesen. Darüber hinaus gelang es Ihnen durch einen siRNA vermittelten YB-1 knockdown in diesen Zelllinien einen Rückgang der Proliferation und eine Induktion von Apoptose auszulösen (Chatterjee et al, 2008). Es wäre somit eine interessante Aufgabe, die Rolle von YB-1 in anderen malignen Erkrankungen der Blutzellen und des blutbildenden Knochenmarks zu untersuchen und mit bereits existierenden Daten aus Untersuchungen an soliden Tumoren zu vergleichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden auch die Kulturmediumüberstände der Zelllinien untersucht. In diesen fand sich im Gegensatz zu den Zelllinienlysaten selbst kaum ein Gehalt an YB-1 mit einem Median von 1170 HeLa-Zelläquivalenten/ml. Dieses Ergebnis stimmt mit den bisherigen Daten aus der Literatur überein, in denen auch kein Hinweis für die Sezernierung von YB-1 zu finden war.

## **6.2 YB-1 Gehalt im Mammakarzinom**

Janz et al zeigten 2002, dass hohe Expressionslevel von YB-1 im Brustkrebsgewebe mit einer schlechteren Prognose verbunden sind. Dies gilt sowohl für Patientinnen, die eine postoperative Chemotherapie erhielten, als auch für Patientinnen mit niedrigem Risiko, die keine postoperative Chemotherapie erhielten (Janz et al, 2002). Aus dieser Studie geht hervor dass YB-1 sowohl bei klinischer Medikamentenresistenz als auch bei der Tumoraggressivität im Mammakarzinom eine Rolle spielt.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gewebeproben von 34 Patientinnen mit Mammakarzinom zeigten im ELISA einen sehr unterschiedlichen Gehalt an YB-1. So reichten die Werte von nicht nachweisbarem YB-1 Gehalt bis zu einem YB-1 Gehalt von

107820 HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein. Die zur Kontrolle gemessenen gutartigen Mammagewebeprobe zeigten ebenfalls einen unterschiedlichen YB-1 Gehalt, der von 840 HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein bei einem gesundem Mammagewebe bis zu einem YB-1 Gehalt von 24100 HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein bei einem Fibroadenom reichte. Der mediane YB-1 Gehalt der Mammakarzinomgewebelysate lag mit einem Wert von 4140 HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein über dem Median der benignen Mammagewebelysate mit 2790 HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein. Der Unterschied war jedoch, wahrscheinlich aufgrund der geringen Fallzahl, statistisch nicht signifikant.

Der erhöhte YB-1 Gehalt in manchen Fibroadenomen sowie manchen Proben aus mastopathischem Gewebe lässt sich dadurch erklären, dass YB-1 generell in proliferierenden Geweben, wie bereits weiter oben dargestellt, erhöht ist. Sowohl die Mastopathie als auch das Fibroadenom sind gutartige Erkrankungen der Brust, die jedoch eine hohe Wachstums- und Umbaurate besitzen. Dies wird auch deutlich, wenn man den medianen YB-1 Gehalt des normalen Brustgewebes (1940 HeLa-Zelläquivalente/mg Protein) betrachtet, der unter dem Median der Fibroadenomgewebeprobe (3530 HeLa-Zelläquivalente/mg Protein) sowie dem der Mastopathiegewebeprobe (2700 HeLa-Zelläquivalente/mg Protein) liegt.

Die erhöhten YB-1 Werte in Mammakarzinomgewebe entsprechen den bisher gefundenen Resultaten in der Literatur, bei denen gezeigt wurde, dass YB-1 in verschiedenen Malignomen überexprimiert wird. So ist YB-1 außer in Mammakarzinomen auch in humanen Osteosarkomen (Oda et al, 1998) sowie in kolorektalen Karzinomen (Shibao et al, 1999) erhöht. Eine erhöhte YB-1 Expression findet sich weiterhin in serösen Adenokarzinomen des Ovars (Kamura et al, 1999), in Prostata Karzinomen (Gimenez-Bonafe et al, 2004) und in nasopharyngealen Karzinomen (Fung et al, 2000). In nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen scheint YB-1 ebenfalls hoch exprimiert zu werden (Shibahara et al, 2001). Interessanterweise stellte sich bei einer Untersuchung von Genen, die mit einer Progression im Bronchialkarzinom von Mäusen assoziiert sind, YB-1 als eines dieser Gene heraus (Yao et al, 2002). Auch in Schilddrüsenkarzinomen spielt die Überexpression von YB-1 eine Rolle. In normalen Schilddrüsenfollikelzellen fand sich keine Überexpression von YB-1. In follikulären Tumoren sowie in papillären Schilddrüsenkarzinomen, die eine hochdifferenzierte Form von Karzinomen darstellen, fand sich eine geringe Überexpression. Anaplastische Schilddrüsenkarzinome, die auch die schlechteste Prognose haben, zeigten hingegen eine hohe Überexpression von YB-1. Diese fand sich auch im Zytoplasma, jedoch

noch stärker im Nukleus der entarteten Zellen (Ito et al, 2003). Des Weiteren findet sich ein erhöhter YB-1 Gehalt in malignen Melanomen (Hipfel et al, 2000). Hier zeigte eine kürzlich erschienene Studie von Schiffert et al eine sowohl in vitro als auch in vivo erhöhte YB-1 Expression in malignen Melanomzellen verglichen mit benignen Melanozyten. Darüber hinaus konnte eine nukleäre Translokation von YB-1 in invasiven und metastasierten Melanomzellen nachgewiesen werden. Die Downregulation von YB-1 führte zu einer deutlich reduzierten Proliferationsrate sowie zu einer höheren Zahl an apoptotischem Zelltod. Interessanterweise fand sich auch eine erhöhte Expression von YB-1 in kindlichen Glioblastomen, die zwar seltene aber dafür besonders aggressive Tumoren sind (Faury et al, 2007)

Auch wenn die Unterschiede im YB-1 Gehalt zwischen benignem und malignem Mammakarzinomgewebe in der vorliegenden Arbeit statistisch nicht signifikant waren, so ist doch ein deutlicher Trend zu verzeichnen und man muss davon ausgehen, dass die geringe Fallzahl der Grund für die fehlende Signifikanz ist. Vor allem mit den zahlreichen Daten aus der Literatur, die alle eine erhöhte Expression von YB-1 sowohl im Mammakarzinomgewebe als auch in einer Vielzahl anderer maligner Gewebe, nachwiesen liegt der Schluss nahe, dass auch in den hier untersuchten Gewebeproben eine Überexpression von YB-1 im Tumorgewebe stattfindet. Das besondere hierbei ist jedoch, dass diese erhöhten YB-1 Werte erstmals nicht mit Hilfe der Immunhistochemie sondern mit einem neu entwickelten ELISA gemessen wurden. Zur Validierung der ermittelten Werte wurde deshalb der per ELISA bestimmte YB-1 Gehalt der Mammakarzinomgewebelysate in der vorliegenden Arbeit mit dem immunhistochemisch bestimmten YB-1 Gehalt verglichen. Zwischen den Werten aus beiden Methoden zeigte sich dabei eine statistisch signifikante Korrelation ( $p < 0,01$ ). Dies bedeutet, dass der neu entwickelte ELISA eine Alternative zur bereits erprobten und vielfach verwendeten Immunhistochemie darstellt. Damit steht ein Verfahren zur Verfügung, welches die in der Einleitung bereits aufgeführten Nachteile der Immunhistochemie als alleinige Methode zur Bestimmung des YB-1 Gehalts ausgleichen und die klinische Diagnostik erweitern könnte.

Der YB-1 Gehalt der Mammakarzinomgewebeproben wurde auch in Hinblick auf die Prognose der Mammakarziompatientinnen untersucht. Zunächst wurde untersucht, ob ein hoher Gehalt an YB-1 eine Verkürzung des rezidivfreien Überlebens bewirkt. Das Ergebnis war weder für den per ELISA noch für den per Immunhistochemie bestimmten YB-1 Gehalt

statistisch signifikant. Es ist jedoch ein Trend erkennbar, der eine leicht erhöhte rezidivfreie Überlebenszeit für Mammakarzinompatientinnen mit niedrigem YB-1 Gehalt gegenüber den Patientinnen mit hohem YB-1 Gehalt aufzeigt. Das Fehlen der statistischen Signifikanz könnte an der sehr niedrigen Fallzahl liegen, denn es wurden nur 34 Patientinnen untersucht. Außerdem wurde geprüft, ob ein hoher Gehalt an YB-1 in den Mammakarzinomgewebeprobe eine Verkürzung des Gesamtüberlebens der Patientinnen zur Folge hat. Hierbei konnte allerdings keine statistisch signifikante Überlebenszeitverkürzung durch hohe YB-1 Werte festgestellt werden. Es ist jedoch in den ersten Monaten nach der Operation ein Trend, für ein verbessertes Gesamtüberleben bei niedrigem YB-1 Gehalt, erkennbar, der sich jedoch nach längerer Beobachtungszeit wieder verliert. Auch hier könnte wieder die kleine Fallzahl der Grund für die fehlende statistische Signifikanz sein, da andere Autoren durchaus einen signifikanten Zusammenhang zwischen YB-1 Expression und Überleben aufzeigen konnten. So zeigten, wie bereits weiter oben erwähnt, Janz et al in ihrer Studie, dass Überexpression von YB-1, gemessen per Immunhistochemie, mit einer schlechteren Prognose für Patientinnen mit Mammakarzinom verbunden ist. In dieser Studie wurden die untersuchten Patientinnen in zwei Gruppen unterteilt. Zum einen in eine high-risk Gruppe, die vor allem Lymphknoten positive Patientinnen enthielt und die daher eine postoperative Chemotherapie erhielten und zum anderen in eine low-risk Gruppe, in der fast alle Patientinnen Lymphknoten negativ waren und die somit keine Chemotherapie erhielten. Interessanterweise zeigte sich in dieser Studie in beiden Gruppen eine signifikante Verkürzung des rezidivfreien Überlebens durch YB-1 Überexpression. Dies lässt, unter Betrachtung der Gruppe der Patientinnen, die eine postoperative Chemotherapie erhielten, den Schluss zu, dass YB-1 zum einen in klinischer Chemotherapieresistenz eine Rolle spielt. Zum anderen sieht man in der Gruppe der Patientinnen, die keine Chemotherapie erhielten, dass YB-1 Überexpression aber auch eine erhöhte Tumoraggressivität bedeutet. In dieser Studie konnte YB-1 damit sowohl als prognostischer als auch als prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine Chemotherapie etabliert werden (Janz et al, 2002).

Die fehlende statistische Signifikanz der in dieser Arbeit gewonnenen Daten lässt sich möglicherweise, wie bereits erwähnt, durch die geringe Fallzahl erklären. Sie könnte jedoch auch damit zusammenhängen, dass der ELISA nicht zwischen nukleärer und zytoplasmatischer YB-1 Konzentration unterscheidet. Es wurde zwar gezeigt, dass auch die zytoplasmatische Konzentration von YB-1 zu einem schlechteren klinischen Outcome führt (Janz et al, 2002), jedoch ist es vor allem die nukleäre Lokalisation von YB-1, die eine Rolle

in Tumoraggressivität und Chemotherapieresistenz spielt und die im Mammakarzinom unter anderem zu einer erhöhten Expression des „multidrug resistance 1“ (MDR1) Gens (Bargou et al, 1997) und einem erhöhten Gehalt an P-Glykoprotein (PGP) (Saji et al, 2003) führt. Unterstützend hierzu fanden Shibahara et al eine schlechtere Prognose bei Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom die eine nukleäre YB-1 Expression aufwiesen im Gegensatz zu Patienten, bei denen YB-1 im Zytoplasma lokalisiert war (Shibahara et al, 2001). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigten Gessner et al ebenfalls eine schlechtere Prognose für Patienten mit nukleärer YB-1 Expression im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Gessner et al, 2004). Auch in Synovialkarzinomen ist die nukleäre Expression von YB-1 mit einer erhöhten PGP Expression sowie einer schlechteren Prognose verbunden (Oda et al, 2003). Fujita et al konnten ebenfalls zeigen, dass die nukleäre Lokalisation von YB-1 im Brustkrebs mit einer erhöhten Expression von PGP verbunden ist. Sie fanden darüber hinaus bei Patientinnen, die mit Paclitaxel behandelt wurden eine Translokation von YB-1 aus dem Zytoplasma in den Nukleus. Diese Patientinnen zeigten ein signifikant geringeres Ansprechen auf die Paclitaxel-Therapie (Fujita et al, 2005). Paclitaxel gehört zu den Taxanen, einer Gruppe von Chemotherapeutika, die in der Brustkrebstherapie, insbesondere bei Patientinnen mit hohem Risiko, bei lokal weit fortgeschrittenen Tumor, bei metastasiertem Brustkrebs oder nach einem Rezidiv zum Einsatz kommen. Unter Betrachtung der Literatur ist es somit denkbar, dass nicht nur der Gehalt an YB-1 sondern auch die Lokalisation desselben eine Rolle zu spielen scheint. Da in der vorliegenden Arbeit Gewebelysate verwendet wurden, war eine Unterscheidung des YB-1 Gehalts zwischen den beiden Kompartimenten nicht möglich. Dieses Problem ließe sich jedoch umgehen, indem man anstelle von Gewebelysaten nukleäre Extrakte verwendet. Eventuell wäre damit auch eine bessere Vorhersage der Prognose möglich. Die Herstellung von nukleären Extrakten ist jedoch mit einem hohen technischen Aufwand verbunden, und damit für den klinischen Routinebetrieb eher nicht geeignet.

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem untersucht, ob YB-1 von anderen klinischen, bereits etablierten, Faktoren im Mammakarzinom abhängig ist. So wurde geprüft, ob Patientinnen mit Tumoren eines hohen Gradings auch höhere YB-1 Werte aufwiesen. Dabei ließ sich jedoch weder bei den per ELISA noch bei den per Immunhistochemie bestimmten YB-1 Werten ein statistisch signifikanter Zusammenhang aufzeigen. Weiterhin wurde untersucht, ob lymphknotenpositive Patientinnen einen höheren YB-1 Gehalt zeigten. Es fand sich jedoch auch hier bei keiner der beiden Methoden ein statistisch signifikanter

Zusammenhang. In der Studie von Janz et al konnte gezeigt werden, dass YB-1 unabhängig von anderen tumorbiologischen Faktoren ist. So fand sich zum Beispiel kein Zusammenhang zwischen YB-1 und uPA bzw. PAI-1 Level. In dieser Studie wurde ebenfalls gezeigt, dass kein Zusammenhang zwischen YB-1 und Her2/neu Expression zu bestehen scheint (Janz et al, 2002). Dies steht jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen von Wu et al, die einen signifikanten Zusammenhang zwischen Her2/neu Expression und YB-1 Expression beschrieben (Wu et al, 2006).

Die Daten aus der Literatur zeigen, dass YB-1 eine entscheidende Rolle in der Medikamentenresistenz und Tumoraggressivität beim Mammakarzinom spielt. So ist die Prognose für Patientinnen deren Tumoren YB-1 überexprimieren, in nahezu allen Studien schlechter. In diesen Studien wurde der YB-1 Gehalt mittels Immunhistochemie bestimmt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nun auch eine YB-1 Bestimmung im Mammakarzinom mittels des neu entwickelten ELISAs möglich ist.

### **6.3 YB-1 Gehalt im Ovarialkarzinom**

In der Literatur finden sich viele Hinweise dafür, dass YB-1 auch beim Ovarialkarzinom eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Prognose und der Entwicklung einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika spielt. Da die Behandlung des Ovarialkarzinoms neben der chirurgischen Therapie vor allem auf dem Einsatz von aggressiven Chemotherapieschemata beruht, kommt der Entwicklung einer Resistenz gegenüber diesen Therapeutika eine Schlüsselrolle in der Prognose der Erkrankung zu. Hierbei scheint die Expression von verschiedenen Faktoren eine Rolle zu spielen (van der Zee et al, 1995). Einen dieser Faktoren könnte das in dieser Arbeit untersuchte Protein YB-1 darstellen. In einer Arbeit von Yahata et al zeigten 30% der Ovarialkarzinompatientinnen, die mit Chemotherapieregimen behandelt wurden, welche Cisplatin enthalten, eine Veränderung in ihrer YB-1 Expression. So war in den Primärtumoren im Nukleus kein YB-1 nachweisbar, während die Rezidivtumore eine nukleäre YB-1 Expression aufwiesen (Yahata et al, 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Ovarialkarzinompatientinnen wiesen im Mittel eine hohe YB-1 Expression auf. So lag der Median des YB-1 Gehalts bei 36160 HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein. Der Gehalt an YB-1 bei den Ovarialkarzinompatientinnen lag statistisch signifikant über dem YB-1 Gehalt der Mammakarzinompatientinnen. Unter den untersuchten Ovarialkarzinompatientinnen befand sich eine Patientin, von der sowohl eine

Gewebeprobe des Ovarialkarzinoms als auch eine Probe aus dem umgebenden gesunden Ovar vorlagen. Hier zeigte sich im Ovarialkarzinom ein sehr hoher YB-1 Gehalt von 175790 HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein, während der YB-1 Gehalt im umgebenden gesunden Ovargewebe sehr niedrig bei 2050 HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein lag. Leider waren keine weiteren solcher Paare in unserer Tumorbank vorhanden.

Der Median der benignen Ovarialgewebelysate war zwar mit 6110 HeLa-Zelläquivalenten/mg Protein deutlich niedriger als der Median der Ovarialkarzinogewebelysate. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Ein Kystadenofibrom sowie eine Zyste fielen durch einen sehr hohen Gehalt an YB-1 auf. Ein weiteres Kystadenom zeigte eine leicht erhöhte Expression. Die anderen 3 benignen Ovarialgewebe (1 weitere Zyste sowie 2 weitere Kystadenome) wiesen eine niedrige YB-1 Expression auf. Die hohen YB-1 Konzentrationen in den benignen Ovarialgeweben lassen sich durch die, bereits in dem vorherigen Kapitel erwähnte, erhöhte YB-1 Konzentration in proliferierenden Geweben erklären. Dementsprechend wäre eine bessere Kontrolle die Bestimmung von YB-1 in nicht proliferierendem gesundem Ovarialgewebe. Die YB-1 Expression müsste in diesem Gewebe noch deutlich niedriger liegen, wie beispielsweise aus dem umgebenden gesunden Ovar der oben erwähnten Patientin ersichtlich. Dadurch, sowie durch eine größere Fallzahl könnte möglicherweise ein signifikanter Unterschied zwischen malignem und benignem Gewebe, erkennbar werden. Leider stand uns kein gesundes Ovarialgewebe zur Verfügung. In einer Studie von Tarkowski et al wurden benigne Ovarialzysten sowie Zystadenokarzinome des Ovars mittels Immunhistochemie auf ihren Gehalt an YB-1 untersucht. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen fanden sich in dieser Studie ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede in der YB-1 Expression zwischen benignem und malignem Ovarialgewebe (Tarkowski et al, 2006). Auch in dieser Arbeit wurde kein gesundes Ovarialgewebe untersucht.

Die per ELISA gewonnenen Werte wurden wiederum mit Daten aus der Immunhistochemie verglichen. Im Gegensatz zu den Mammakarzinomproben zeigte sich diesmal keine statistisch signifikante Korrelation. Somit scheint der ELISA in der Untersuchung des Ovarialkarzinoms momentan keine Alternative zur etablierten Immunhistochemie zu sein. Um dies zu verifizieren, sind jedoch Untersuchungen an einem größeren Kollektiv notwendig.



Die statistische Auswertung ergab sowohl für das rezidivfreie als auch für das Gesamtüberleben keine Verschlechterung für Patientinnen mit hohem YB-1 Gehalt. Dies steht im Gegensatz zu der schon oben erwähnten Studie von Kamura et al, die eine signifikant schlechtere Prognose für Patientinnen mit hoher nukleärer YB-1 Expression feststellten (Kamura et al, 1999). Das Fehlen einer Übereinstimmung könnte an der niedrigen Fallzahl liegen. Es könnte aber auch damit zusammenhängen, dass, wie schon im Mammakarzinom berichtet, der ELISA nicht zwischen zytoplasmatischer und nukleärer YB-1 Konzentration unterscheidet, während die Studie von Kamura et al nur die nukleäre Lokalisation von YB-1 berücksichtigte. Diese Studie zeigte auch, dass die simultane Überexpression von YB-1 und PGP im serösen Zystadenokarzinom des Ovars seltener war als im Mammakarzinom und im Osteosarkom (Kamura et al, 1999). Verschiedene Studien wiesen nach, dass es im primären Ovarialkarzinom kein Zusammenhang zwischen PGP Expression und Überleben zu geben scheint (Perez et al, 1993; Arao et al, 1994, Huang et al, 2003). Es könnte somit sein, dass YB-1 im Ovarialkarzinom über andere Mechanismen als über die PGP Überexpression eine Medikamentenresistenz verursacht. Oda et al untersuchten in ihrer Studie ebenfalls die nukleäre Lokalisation von YB-1 im Ovarialkarzinom hinsichtlich der Prognose. Auch sie konnten zeigen, dass im Ovarialkarzinom die nukleäre Expression von YB-1 als unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben fungiert (Oda et al, 2007).

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen fanden jedoch Huang et al ebenfalls keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen YB-1 Expression und Überleben bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Auch die PGP Expression korrelierte in dieser Arbeit nicht mit dem Gesamtüberleben. Für die Ko-Expression von YB-1 und PGP hingegen konnte eine signifikante Verschlechterung des Gesamtüberlebens nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich, dass die Ko-Expression von YB-1 und PGP ebenso ein unabhängiger prognostischer Faktor zu sein scheint wie das klinische Stadium und das Auftreten eines Rezidivs (Huang et al, 2004).

Bei der Untersuchung, ob Patientinnen mit Tumoren eines hohen Gradings auch höhere YB-1-Werte aufweisen, fand sich bei den per Immunhistochemie bestimmten Werten ein signifikant höherer YB-1 Gehalt in der Gruppe der Patientinnen mit hohem Grading ( $p=0,031$ ). Für die per ELISA bestimmten Werte war der Unterschied statistisch gerade nicht mehr signifikant. Es war jedoch ein Trend in dieselbe Richtung zu verzeichnen ( $p=0,061$ ). Bei der Überprüfung, ob Patientinnen mit hohem FIGO Stadium höhere YB-1 Werte zeigen fand

sich bei beiden Methoden kein statistisch signifikanter Unterschied im YB-1 Gehalt bei Patientinnen mit hohem FIGO Stadium verglichen mit Patientinnen mit niedrigem FIGO Stadium. Die bereits weiter oben erwähnte Studie von Tarkowski et al fand übereinstimmend mit unseren Ergebnissen ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen YB-1 Gehalt und FIGO Stadium.

Die widersprüchlichen Ergebnisse in der Literatur sowie die Resultate in der vorliegenden Arbeit, die keinen direkten Zusammenhang zwischen YB-1 Expression und Gesamtüberleben bzw. rezidivfreiem Überleben zeigen konnten, werfen die Frage auf, ob YB-1 im Ovarialkarzinom tatsächlich kausal an der Entstehung eines malignen Phänotyps beteiligt ist oder ob YB-1 dort mehr als ein genereller Faktor für Zellwachstum zu sehen ist (Lu et al, 2005). Dieser These stehen jedoch zahlreiche Studien aus anderen Malignomen entgegen, in denen ein Kausalzusammenhang zwischen YB-1 Expression und Tumorentstehung nahe gelegt wird. So zum Beispiel in der bereits erwähnte Studie von Bergmann et al, die ebenfalls 2005 veröffentlicht wurde. Hierin bewiesen die Autoren in einem transgenen Mausmodell, dass durch YB-1 genetische Instabilität ausgelöst wird, die zur Entstehung von Brustkrebs führte. Die aberrante Expression von YB-1 in den epithelialen Zellen der Brustdrüse der transgenen Mäusen führte zu Zellproliferation mit Mitosefehlern und Zentrosomenamplifikation und schließlich zur Entstehung von invasiven Mammakarzinomen (Bergmann et al, 2005).

Über die Rolle von YB-1 als Schlüsselfaktor zur Entstehung von Chemotherapieresistenz wiederum bestand bisher Einigkeit. Eine neue Studie zeigte jedoch, dass die Ausschaltung von YB-1 durch siRNA zu keiner Änderung der MDR1 Gen Expression führte und auch zu keinem Rückgang des multiresistenten Phänotyps (Kaszubiak et al, 2007). Dies ist jedoch die erste Studie, die keinen Zusammenhang zwischen MDR1 Expression und YB-1 Expression aufzeigen konnte. Daher sollten zuerst weitere Daten gewonnen werden, um diese Hypothese zu bekräftigen. Bis dahin muss weiter von einem Zusammenhang zwischen YB-1 Expression und Multiresistenz von Tumorzellen ausgegangen werden.

Wie aus der vorliegenden Arbeit zu ersehen, scheint der ELISA in der Untersuchung des Ovarialkarzinoms momentan keine Alternative zur etablierten Immunhistochemie zu sein. Außerdem konnte YB-1 nicht als prognostischer Faktor im Ovarialkarzinom identifiziert werden. Die Daten aus der Literatur hierzu sind jedoch ebenfalls widersprüchlich. Deswegen

sollten, wie schon erwähnt, weitere Untersuchungen an größeren Kollektiven erfolgen um zum einen die Rolle von YB-1 im Ovarialkarzinom besser zu verstehen und zum anderen um die Immunhistochemie und den ELISA unter Betrachtung einer größeren Zahl von Fällen verlässlicher vergleichen zu können.

## **6.4 YB-1 Gehalt im malignen Aszites**

Das Ovarialkarzinom geht sehr häufig mit der Bildung von malignem Aszites einher. So ist im FIGO Stadium III bei etwa der Hälfte der Erkrankungsfälle mit einer Aszitesbildung zu rechnen (Maaßen und Pietschmann, 2005). Mit dem neu entwickelten ELISA ist es nun erstmals möglich, auch Flüssigkeiten auf ihren YB-1 Gehalt zu untersuchen. Wäre YB-1 auch im Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen enthalten, ließen sich hieraus möglicherweise Rückschlüsse auf den YB-1 Gehalt der Tumorzellen ziehen. Somit könnte man mit einer einfachen und wenig belastenden Untersuchung, nämlich der Aszitespunktion, einen weiteren Hinweis zur Prognose und damit zur Risikoeinstufung der Patientin gewinnen, um das weitere Therapieregime zu planen.

In den untersuchten Aszitesproben fand sich YB-1 jedoch nur in sehr niedriger Konzentration. Besonders im Vergleich mit den sehr hohen YB-1 Werten die in den Ovarialkarzinomgewebelysaten gemessen wurden, war der YB-1 Gehalt der Aszitesproben vernachlässigbar. Der Nachweis von einem hohen Gehalt an YB-1 im Aszites müsste darauf schließen lassen, dass YB-1 von der Zelle sezerniert wird, da es in solchen Konzentrationen nur auf diesem Weg in den Aszites gelangen könnte. Bisher ist jedoch in der Literatur kein Hinweis auf eine Sezernierung von YB-1 zu finden. Ebenso zeigen die in dieser Arbeit untersuchten Kulturmediumüberstände von Tumorzelllinien kaum einen Gehalt an YB-1, was auch gegen eine Sezernierung von YB-1 spricht. Somit sind die YB-1 Werte im Aszites erwartungsgemäß niedrig, und es kann weiter davon ausgegangen werden, dass YB-1 nicht sezerniert wird. Die geringen Restwerte an YB-1, die im Aszites gefunden wurden, lassen sich am ehesten durch zugrundegegangene Tumorzellen erklären, die regelmäßig im Aszites vorhanden sind. Einen Rückschluss über den YB-1 Gehalt des Aszites auf denjenigen im Ovarialkarzinom lässt sich somit nicht ziehen.

## 6.5 YB-1 Gehalt im Blut

Für die Bestimmung des YB-1 Gehalts des Tumors einer Patientin ist auch unter Verwendung des neu entwickelten ELISAs immer noch die Gewinnung einer Gewebeprobe nötig, aus der die Lysate hergestellt werden. Dazu muss sich die Patientin einer Operation oder einer Stanzbiopsie unterziehen, um Material für die Untersuchung zu gewinnen. Eine weitaus einfachere und für die Patientin weniger belastende Methode wäre die Bestimmung des YB-1 Gehaltes aus dem Blut der Patientin. Bevor jedoch das Blut von Karzinompatientinnen untersucht werden kann, ist es zunächst notwendig durch Untersuchungen am Blut gesunder Probanden den neu entwickelten ELISA auf mögliche Kreuzreaktionen hin zu überprüfen.

In allen untersuchten Serumproben der gesunden Probanden konnte YB-1 nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass YB-1 eventuell während des Gerinnungsvorgangs freigesetzt wird, wurden von denselben Probanden Plasmaproben untersucht, bei denen das Blut durch Zugabe von EDTA vor dem Gerinnen bewahrt wurde. Es zeigte sich, dass auch in den Plasmaproben YB-1 enthalten ist. Da sich diese YB-1 Werte jedoch, im Gegensatz zu den YB-1 Werten aus Gewebelysaten und Aszites, trotz Vorinkubation mit dem N-Peptid nicht supprimieren ließen, bleibt die Frage offen, ob es sich hier tatsächlich um den Nachweis von YB-1 im Blut handelt oder ob es sich nicht viel mehr um eine unspezifische Reaktion mit anderen Bestandteilen des Bluts handelt. Hinweisend für letzteres ist auch die Tatsache, dass sich die YB-1 Werte in Serum- und Plasmaprobe der Probanden teilweise stark unterschieden. Bei einigen Probanden lagen die Werte im Serum höher, was vor allem für die weiblichen Probanden galt, während sie bei den männlichen Probanden eher höher im Plasma waren. Aus den bisher gewonnen Daten lässt sich schließen, dass der YB-1 ELISA nicht zur Bestimmung des YB-1 Werts aus dem Blut geeignet zu sein scheint. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass der ELISA primär für die Anwendung in Gewebelysaten entwickelt wurde. Deswegen sind für die Messung von Blutproben wahrscheinlich Modifikationen notwendig um eine spezifische Reaktion zu erreichen und damit verlässliche Aussagen über den YB-1 Gehalt im Blut zu treffen.

Darüber hinaus wurde mit Hilfe des ELISAs der YB-1 Gehalt in Leukozytenlysaten der gesunden Probanden untersucht. Dabei fanden sich sehr geringe Konzentrationen an YB-1. Die YB-1 Expression in Leukozyten ist bisher unzureichend untersucht. In der Literatur finden sich vor allem Hinweise darauf, dass YB-1 in IL-2 stimulierten Leukozyten hoch exprimiert wird (Sabath et al, 1990). Es sollten somit weitere Untersuchungen an ruhenden

und stimulierten Leukozyten durchgeführt werden, um den hier verwendeten ELISA als Verfahren zur Messung der YB-1 Konzentration in Leukozyten zu etablieren und weitere Erkenntnisse zur Rolle von YB-1 in Leukozyten zu gewinnen.

## **6.6 YB-1 und Matrixeffekte**

Bei der Überprüfung, ob sich im ELISA durch die Lysate verursachte Matrixeffekte finden, die die gewonnenen Werte verfälschen könnten, zeigten sich interessante Kreuzreaktionen. Bei der Mischung der verschiedenen Gewebelysate mit HeLa-Lysat ergab sich immer eine Supprimierung des YB-1 Gehalts durch die Gewebeprobe. Es scheint somit ein Faktor im Gewebelysat vorhanden zu sein, der YB-1 aus HeLa-Lysat bindet. Dieses Phänomen scheint nicht spezifisch für YB-1 aus HeLa-Lysat zu sein, sondern findet sich auch bei YB-1 aus anderen Zelllinienlysaten. Dies zeigt die Untersuchung, in der Gewebelysat sowohl mit SKBR3- als auch mit OVMZ6-Lysaten gemischt wurde. Auch hier wurde der YB-1 Gehalt der Zelllinienlysate durch Mischung mit dem Gewebelysat stark supprimiert. Dieses Phänomen ist auch nicht auf eine Gewebeart beschränkt. So fand es sich sowohl im Mammakarzinomgewebelysat als auch im Ovarialkarzinomgewebelysat. Ebenso ist es nicht für malignes Gewebe spezifisch, da auch das benigne Mammagewebelysat ähnliche Ergebnisse lieferte.

Die Supprimierung des YB-Gehalts ist von der Verdünnungsstufe des Gewebelysats abhängig. Dies zeigte sich durch den deutlich höheren YB-1 Gehalt bei der Mischung von HeLa-Lysat mit 1:50 verdünntem Ovarialkarzinomgewebelysat, im Vergleich zur Mischung mit 1:10 verdünntem Ovarialkarzinomgewebelysat. Ebenso lag der Gehalt an YB-1 aus HeLa-Lysat in dem 1:20 verdünnten benignen Mammagewebelysat höher als in dem 1:10 verdünnten benignen Mammagewebelysat. Unterstützend hierfür sind auch die Ergebnisse der Untersuchung mit seriell verdünnten Mammakarzinomgewebelysat, die zum einen mit Zugabe von HeLa-Lysat und zum anderen ohne Zugabe von HeLa-Lysat durchgeführt wurde. Bei der unter Zugabe von HeLa-Lysat angefertigten Verdünnungsreihe zeigte sich interessanterweise mit zunehmender Verdünnung des Gewebelysats eine stetige Zunahme des YB-1 Gehalts. Es könnte somit ein Faktor im Gewebelysat enthalten sein, der YB-1 aus HeLa-Lysat bindet und damit für die Antikörper maskiert. Die Konzentration dieses Faktors scheint mit höherer Verdünnung abzunehmen. Dadurch wird YB-1 aus HeLa-Lysat wieder frei und steht zur Bindung an die im ELISA eingesetzten Antikörper zur Verfügung.

Um diese Hypothese zu bestätigen wurde eine sequentielle Verdünnung von HeLa- und Gewebelysat erstellt. Hierzu wurde nach Auftragung von HeLa-Lysat auf die ELISA Platte Gewebelysat hinzugeben und vice versa nach Aufbringung von Gewebelysat HeLa-Lysat hinzugefügt. Wird zuerst das Gewebelysat aufgetragen, bindet das YB-1 aus dem Gewebelysat an den an die Platte gebundenen Antikörper. Der Rest des Gewebelysats wird durch das anschließende Waschen herausgespült, was natürlich auch für den im Gewebelysat vorhandenen YB-1 maskierenden Faktor gilt. Bei der anschließenden Zugabe von HeLa-Lysat bindet YB-1 an die Antikörper des ELISA, die noch frei sind. Die Extinktion ist hoch, einem hohen Gehalt an YB-1 entsprechend. Gibt man statt des Gewebelysats zuerst HeLa-Lysat auf die Platte, bindet sich das YB-1 aus dem HeLa-Lysat an die Antikörper der ELISA-Platte. Nach dem das restliche Zelllinienlysat herausgewaschen wurde, folgt die Zugabe von Gewebelysat. Nun kann sich der YB-1 maskierende Faktor an das, an den auf der Platte fixierten Antikörper gebundene, YB-1 binden. Er wird auch durch das anschließende Waschen nicht herausgelöst. Dadurch ist nicht mehr das gesamte YB-1 für den C-terminalen Zweitantikörper erkennbar: Die Extinktion ist deswegen, einem geringen YB-1 Gehalt entsprechend, sehr viel niedriger. Alternativ könnte der Faktor aber auch die Bindung von YB-1 an den, an die Platte gebundenen, N-terminalen Antikörper stören und das bereits gebundene YB-1 so von der Platte ablösen. Beim anschließenden Waschschrift würde der so gebildete Komplex weggespült und dadurch auch eine niedrigere YB-1 Konzentration gemessen werden.

Dies unterstützt die These dass es einen Faktor im Gewebelysat gibt, der YB-1 bindet und damit die für die Antikörper wichtigen Bindungsstellen besetzt. Die Bindung an YB-1 scheint relativ stabil zu sein, da sich der Faktor auch nach mehrmaligem Waschen nicht von YB-1 trennen lässt bzw. dazu in der Lage ist YB-1 aus der Bindung an den N-terminalen Antikörper zu lösen.

Dies wirft die Frage auf, ob der durch den ELISA in den verschiedenen Lysaten gemessene YB-1 Gehalt in Wirklichkeit nicht viel höher liegt. Bei höherer Verdünnung nimmt die Konzentration des Faktors ab. Dies führt dazu, dass der Komplex aus YB-1 und diesem Faktor dissoziiert. In der Folge steht mehr freies YB-1 zur Verfügung und die gemessenen YB-1 Werte müssten deswegen bei steigender Verdünnung relativ zunehmen. Dies wäre eine Erklärung dafür, dass der YB-1 Gehalt im Ovarialkarzinom so hoch über dem YB-1 Gehalt im Mammakarzinom liegt, da die Ovarialkarzinomgewebelysate 1:50 verdünnt wurden,

während die Mammakarzinomgewebelysate nur 1:10 verdünnt waren. Die höhere Verdünnung wurde jedoch gewählt, da die Extinktionen in der 1:10 Verdünnung so hoch waren, dass eine höhere Verdünnung nötig wurde. Die YB-1 Werte des Ovarialkarzinoms lagen somit schon bei der 1:10 Verdünnung über denen des Mammakarzinoms. Daraus folgt, dass die YB-1 Konzentration unabhängig vom Verdünnungseffekt im Ovarialkarzinom deutlich über der im Mammakarzinom liegt

Die serielle Verdünnung des Mammakarzinomsgewebelysats ohne Zugabe von HeLa-Lysat zeigt ebenfalls, dass der YB-1 Gehalt mit steigender Verdünnung relativ zunimmt, bis er schließlich in den letzten Verdünnungsstufen keine großen Schwankungen mehr aufweist, und in der Verdünnung 1:1280 sogar wieder etwas abnimmt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass man, um den genauen Gehalt an YB-1 zu bestimmen, in höheren Verdünnungen messen sollte. Messungen in einem zu hohen Verdünnungsbereich sind jedoch problematisch zu sehen, da sich die Extinktionen dann bei niedrigem YB-1 Gehalt dem Leerwert nähern würden, was eine exakte Bestimmung des YB-1 Gehalts nicht mehr zulässt. Die genaue Ermittlung der richtigen Konzentration der Lysate bleibt somit Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

Eine weitere Aufgabe der künftigen Forschung könnte in der Isolation des YB-1 bindenden Faktors aus den Gewebelysaten liegen. YB-1 ist ein Protein, das mit verschiedensten anderen Proteinen und Genen interagiert. Wie bereits ausführlich erklärt, spielt YB-1 in der Transkription zahlreicher Gene eine Schlüsselrolle und wird auch wiederum in seiner Expression von vielen anderen Faktoren beeinflusst. So führt eine Interaktion von p73 mit c-myc zu einer Aktivierung der YB-1 Expression (Uramoto et al, 2002). C-myc ist ein Protoonkogen, das im Zellwachstum mitwirkt und bei Überexpression eine Rolle in der Tumorgenese und speziell auch in der Entwicklung von Brustkrebs spielt (Sinn et al, 1987/ Shiu et al, 1993/ Escot et al, 1996/ Facchini und Penn, 1998). Aber auch in anderen Karzinomen, wie beim Burkitt Lymphom, beim kleinzelligen Bronchialkarzinom und bei der myeloischen Leukämie scheint die Überexpression von c-myc zur Tumorgenese beizutragen (Ar-Rushdi et al, 1983/ Little et al, 1983/ Collins und Groudine, 1992). Des Weiteren scheint die Überexpression von c-myc in der Entwicklung von Chemotherapieresistenz, insbesondere Resistenz gegenüber Cisplatin, von Bedeutung zu sein (Walker et al, 1996/ Knapp et al, 2003/ Torigoe et al, 2005).

P73, ein naher Verwandter von p53, spielt auch eine Rolle in Chemotherapieresistenz. So steigt der zelluläre Gehalt an p73 unter der Behandlung mit Cisplatin an (Gong et al, 1999). Außerdem scheinen Zelllinien, die p73 überexprimieren, resistent gegenüber DNA-schädigenden Substanzen zu sein (Vikhanskaya et al, 2001). Uramoto et al wiesen nach, dass c-myc zusammen mit p73, die Transkription von YB-1 zu aktivieren scheint. Dies legt die Vermutung nahe, dass einige der biologischen Funktionen von c-myc und p73 über eine Expression von YB-1 ausgeführt werden. Unterstützend für diese Hypothese konnten Uramoto et al zeigen, dass YB-1 nach einer Behandlung mit Cisplatin durch eine Interaktion von p73 mit c-myc hochreguliert wird (Uramoto et al, 2002).

So wie im obigen Beispiel die Interaktion von bestimmten Transkriptionsfaktoren zu einer vermehrten Expression von YB-1 führt interagiert YB-1 selber wiederum mit anderen Transkriptionsfaktoren um die Expression verschiedener Gene zu regulieren. So besteht eine Interaktion von YB-1 mit p53 (Okamoto et al, 2000/ Lasham et al, 2003). Das Tumor Suppressor Gen p53 spielt eine Schlüsselrolle in der Prävention der Entstehung von Tumoren. Es wird auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, da es Zellen mit mutierter oder beschädigter DNA entweder der Apoptose, also dem programmierten Zelltod, zuführt oder einen Wachstumsstopp initiiert, um die Integrität des Genoms zu bewahren und damit der Entstehung von Krebs vorzubeugen (Kastan et al, 1992/ Lane, 1992).

Verschiedene Studien zeigten in den folgenden Jahren, dass YB-1 einige Gene, die auch von p53 kontrolliert werden, in einer entgegengesetzten Art reguliert. So wird zum Beispiel der bereits erwähnte MDR1 Gen Promoter von YB-1 aktiviert (Ohga et al, 1998), während er von p53 unterdrückt wird (Chin et al, 1992). Der Promoter des fas Gens, eines Zelltod assoziierten Gens, wird wiederum von YB-1 unterdrückt (Lasham et al, 2000) und von p53 aktiviert (Tamura et al, 1995). Dies könnte zur der Vermutung führen, dass p53 von YB-1 eventuell negativ reguliert wird. Lasham et al sind dieser Frage in ihrer Arbeit nachgegangen. Sie fanden Hinweise dafür, dass YB-1 tatsächlich die Expression von p53 zu unterdrücken scheint. Weiterhin konnten sie zeigen, dass in Tumorzelllinien, in denen YB-1 reduziert wurde, ein p53 Pfad aktiviert wurde und die Zellen der Apoptose zugeführt wurden (Lasham et al, 2003).

Eine weitere Interaktion von YB-1 mit einem anderen Transkriptionsfaktor findet sich bei der Regulierung der Aktivität des „Matrix Metalloproteinase 2 (MMP 2)/Gelatinase A“ Gen (Matsumoto et al, 2005). So aktiviert YB-1 in einem Zusammenspiel mit dem



Transkriptionsfaktor „activating protein 2 (AP-2)“ die Transkription dieses Gens (Mertens et al, 1998). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch p53 zusammen mit YB-1 und AP-2 die Transkription des MMP-2 Gens aktiviert (Mertens et al, 2001). Dieses Gen kodiert eine Protease, die eine wichtige Rolle in Prozessen wie zum Beispiel Angiogenese, Tumorinvasion und Metastasierung spielt (Mertens et al, 1998). Hohe Level an MMP-2 sind mit Tumoraggressivität und schlechter Prognose bei Patientinnen mit Mammakarzinom und bei Patientinnen mit Endometriuskarzinom assoziiert (Talvensaarimattila et al, 1998/ Honkavuori et al, 2007). Darüber hinaus interagiert YB-1 mit p65 in der Transkription des humanen Polyomavirus JC, eines neurotrophen Virus, dem Erreger der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (Raj et al, 1996). Außerdem interagiert YB-1 auch mit dem multivalenten Zink Finger Faktor CTCF und formt mit diesem Komplexe in vivo (Chernukhin et al, 2000). Wie es scheint, ist auch CTCF in der Tumorgenese involviert. So findet sich eine neu angeordnete Zink Finger Domäne in manchen Brustkrebsproben (Fillipova et al, 1998). Des Weiteren ist CTCF ein Regulator des Onkogens c-myc (Klenova et al, 1993/ Fillipova et al, 1996). Somit könnte auch der Komplex aus CTCF und YB-1 eine Rolle in der Tumorenwicklung spielen.

Es existieren also, wie hier ersichtlich, etliche Transkriptionsfaktoren mit denen YB-1 interagiert und dementsprechend auch im ELISA Komplexe formen könnte, die zu einer Maskierung der Bindungsstellen für die eingesetzten Antikörper führen würden. Deswegen kommen theoretisch alle der oben genannten Proteine als maskierender Faktor in Betracht.

YB-1 ist, wie weiter oben bereits erwähnt, außerdem ein wichtiger Faktor der Translation. Auch hier finden Komplexbildungen statt, die eine YB-1 Bestimmung im ELISA stören könnten. So wurde von Evdokimova et al gezeigt, dass YB-1 ein wichtiger Stabilisator der mRNA ist, der diese vor Degradierung schützt. Diese Funktion wurde der CSD zugesprochen (Evdokimova et al, 2001). Bouvet et al fanden zwei RNA-bindende Domänen von YB-1, wobei sie der CSD eine sequenzspezifische RNA Bindung zusprachen, während der C-terminalen Domäne (CTD) eine unspezifische Interaktion mit RNA zukam (Bouvet et al, 1995). Evdokimova et al konnten 1995 zum ersten Mal zeigen, dass p50, das Kernprotein der zytoplasmatischen „messenger ribonucleoprotein particle“ (mRNP) aus somatischen Zellen ein Mitglied der Y-box bindenden Familie ist (Evdokimova et al, 1995). In weiteren Veröffentlichungen wurde p50 als Synonym für YB-1 verwendet (Evdokimova et al, 2001/ Nekrasov et al, 2003/ Soop et al, 2003). In eukaryontischen Zellen ist die mRNA mit

verschiedenen Proteinen im Zytoplasma assoziiert, mit denen zusammen sie mRNPs bildet. Diese beteiligen sich am RNA „packing“ und sind somit für die Translation sowie für die Lebensspanne der RNA von Bedeutung (Keene 2001/Tourriere et al 2002).

Skabkin et al berichteten, dass YB-1 in multizellulären Organismen ein universelles Hauptstrukturprotein der zytoplasmatischen mRNPs ist, das, abhängig von seiner Konzentration im Verhältnis zur Konzentration an mRNA die Translation entweder stimulieren oder inhibieren kann. So formt es, abhängig von diesem Verhältnis, verschiedene Komplexe. Bei einem niedrigen YB-1/mRNA Verhältnis bindet YB-1 durch seine zwei RNA bindenden Domänen, der CSD und der CTD, als Monomer an die mRNA. Nimmt der Gehalt an YB-1 im Verhältnis zur mRNA Konzentration jedoch zu, verringert sich die CTD Bindung, während die Bindung durch die CSD zunimmt. Hierbei werden die CTDs wieder frei und interagieren untereinander um Multimere zu bilden. Dabei entstehen Moleküle mit einer Größe von 700kDa, die aus etwa 20 YB-1 Molekülen gebildet werden. Hierbei liegen die CTDs im Inneren der gebildeten Moleküle, während die CSDs auf der Oberfläche erscheinen, und dort mit der mRNA interagieren können. In dieser Form sind die Translation-initiiierenden Stellen der mRNA meist maskiert und somit für die Translation nicht zugänglich (Skabkin et al, 2004). Darüber hinaus fanden sich in mehreren Studien Hinweise, dass YB-1 in vivo als Oligomer vorliegt (Tafari und Wolffe, 1992/ MacDonald et al 1995/ Izumi et al 2001/ Gaudreault et 2004).

Diese Resultate zeigen die vielfältige Reaktionsbereitschaft des YB-1 und verdeutlichen die hohe Zahl an möglichen Störfaktoren im ELISA. Ein Komplex, der aus mehreren YB-1 Molekülen besteht, erlaubt keine Unterscheidung der einzelnen Moleküle durch die Antikörper und würde somit falsch niedrige Werte ergeben.

YB-1 interagiert jedoch nicht nur mit Transkriptionsfaktoren und mRNA sondern bindet auch an zahlreiche andere Moleküle. Beispielsweise besteht eine Interaktion von YB-1 mit Aktinfilamenten. Diese Bindung, die über den N-Terminus ausgeübt wird, führt zu einer Bündelung von Aktin (Ruzanov et al, 1999). Ein anderer Faktor, mit dem YB-1 interagiert, ist das Ankerprotein, an das YB-1 im Zytoplasma gebunden ist. So kommen 90 % der YB-1 Proteine im Zytoplasma in Assoziation mit einem Ankerprotein vor (Kohno et al, 2003). Auch neuere Untersuchungen konnten dieses Ankerprotein bisher nicht genau identifizieren. Die Bindungsstelle für dieses Ankerprotein wurde der C-terminalen Domäne zugesprochen

(Koike et al, 1997). So scheint es auf der C-terminalen Domäne ein zytoplasmatisches Retentionssignal (CRS) zu geben. Ob dieses CRS YB-1 im Zytoplasma stabilisiert, durch Interaktion mit mRNA oder anderer Komponenten der mRNP, bleibt jedoch offen und muss noch genauer untersucht werden (Bader und Vogt, 2005).

Während sich YB-1 unter Ruhebedingungen an das Ankerprotein gebunden im Zytoplasma befindet wird es unter Stressbedingungen in den Nukleus transportiert. So führt zum Beispiel UV Strahlung (Koike et al, 1997) und Hyperthermie (Stein et al, 2001) zur Verschiebung von YB-1 in den Nukleus. Auch die Assoziation mit p53 (Zhang et al, 2003), die Phosphorylierung (Uramoto et al, 2003) sowie die Behandlung mit DNA schädigenden Substanzen (Kohno et al, 1992) führen zur Translokation von YB-1 in den Nukleus. Für den Transport in den Kern scheint es ein nukleäres Lokalisations Signal (NLS) zu geben, das auf der C-terminalen Domäne lokalisiert ist (Stenina et al, 2001/ Jürchott et al, 2003/ Bader und Vogt, 2005). Unter Ruhebedingungen überwiegt das CRS vor dem NLS und sorgt für die zytoplasmatische Lokalisation von YB-1 (Jürchott et al, 2003/ Bader und Vogt, 2005). Ein Verlust des CRS oder der RNA Bindung resultiert in einer Translokation von YB-1 in den Nukleus (Bader et al, 2003/ Stenina et al, 2001). Sorokin et al berichteten, dass in Zellen, die mit DNA schädigenden Substanzen behandelt wurden, YB-1 der endoproteolytischen Spaltung durch das 20S Proteasom zugeführt wurde, wobei die C-terminale Domäne mitsamt des CRS abgespalten wurde. Das entstehende N-terminale Polypeptid akkumulierte daraufhin im Nukleus der Zellen (Sorokin et al, 2005). Dieser Mechanismus scheint zur nukleären Lokalisation von YB-1 beizutragen. Da sich jedoch nicht nur proteolytisch gespaltenes YB-1, sondern auch ungespaltenes YB-1 im Nukleus befindet, ist dies sicher nicht der einzige Mechanismus, über den YB-1 im Nukleus akkumuliert.

Die Tatsache, dass eine Spaltung von YB-1 stattfindet, liefert weitere Hinweise dafür, dass der per ELISA bestimmte YB-1 Gehalt möglicherweise nicht den exakten YB-1 Wert widerspiegelt. So kann YB-1 nicht von den C-terminalen Antikörpern erkannt werden, wenn die C-terminale Domäne fehlt. Der gemessene YB-1 Gehalt wäre somit falsch niedrig. Dieses verkürzte YB-1 scheint in der Stressreaktion der Zellen eine entscheidende Rolle zu spielen, da es, wie bereits erwähnt, unter der Behandlung mit DNA schädigenden Substanzen auftritt. In exponentiell wachsenden Zellen fanden Sorokin et al kein verkürztes YB-1 (Sorokin et al, 2005).

Dies wiederum könnte erklären, warum in HeLa-Lysat keine Probleme bei der Bestimmung des YB-1 Gehalts auftraten, da es sich hier um eine exponentiell wachsende Zelllinie handelt in der keine Spaltung stattfindet und deswegen auch kein verkürztes YB-1 vorliegen dürfte.

Möglicherweise könnten die zugegebenen Gewebelysate zu einer solchen Spaltung des YB-1 durch Proteasomen geführt haben. Es wurden jedoch auch benigne Gewebelysate zugegeben, die keiner Behandlung mit schädigenden Agenzien unterzogen wurden. Daher erscheint diese Theorie eher unwahrscheinlich.

Das N-terminale YB-1 verfügt noch über den Hauptteil der Bindungsstellen seiner Liganden. Da sich jedoch einige Bindungsstellen wie die DNA/RNA Bindung, die YB-1 Oligomerisation und die Assoziation mit bestimmten Proteinen, wie z.B. p53, auf der C-terminalen Domäne befinden bzw. diese mit einbeziehen, werden diese Funktionen sehr wahrscheinlich durch die Spaltung beeinflusst (Sorokin et al, 2005). Das verkürzte YB-1 scheint somit andere Funktionen auszuüben, als das YB-1 in voller Länge. So zeigten Stenina et al 2000, dass Thrombin in endothelialen Zellen YB-1 aktiviert und in den Nukleus verschiebt. Sie fanden jedoch im Nukleus nicht das bekannte YB-1 sondern ein 30kDa großes N-terminales Peptid des YB-1 und gingen somit von einer Spaltung des YB-1 aus. Weiterhin konnten sie zeigen, dass dieses gespaltene YB-1 die so genannte „thrombin-response-element“ Sequenz erkennt, nicht jedoch die Y-box Sequenz (Stenina et al, 2000). In weiterführenden Studien konnten sie dann zeigen, dass Thrombin tatsächlich zu einer Spaltung von YB-1 führt. Dieses dissoziiert von seinen inhibierenden Faktoren im Zytosol. Das gespaltene N-terminale Peptid des YB-1 wird in den Nukleus transportiert und scheint dort andere Bindungsstellen als das YB-1 mit ganzer Länge zu besitzen und somit andere Gene zu regulieren (Stenina et al, 2001). Die genaue Funktion und die Untersuchung, welche Gene das gespaltene YB-1 im Gegensatz zu dem YB-1 in voller Länge reguliert, bleibt Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

## 5.7. Ausblick

Insgesamt lässt sich feststellen, dass der in der vorliegenden Arbeit getestete ELISA zur Messung des YB-1 Gehalts im Mammakarzinom geeignet ist. Seine Anwendung im Ovarialkarzinom ist jedoch, aufgrund der fehlenden Korrelation mit Werten aus der Immunhistochemie, momentan nicht zu empfehlen. Allerdings basieren diese Ergebnisse auf einer sehr geringen Fallzahl, so dass eine Überprüfung an einem größeren Patientenkollektiv

---

notwendig ist. Des Weiteren scheint der ELISA in seiner Aussagekraft hinsichtlich der exakten Bestimmung des YB-1 Gehalts aufgrund der erwähnten Matrixeffekte eingeschränkt zu sein. Die so gewonnenen Werte lassen jedoch den Schluss zu, ob der YB-1 Gehalt des Tumors hoch oder niedrig ist. Dies reicht zur klinisch relevanten Einschätzung, ob es sich um einen YB-1 überexprimierenden und somit aggressiveren und eventuell chemotherapieresistenten Tumor handelt, aus. Leider konnte in der vorliegenden Arbeit, vermutlich aufgrund der geringen Fallzahl, keine Aussage hinsichtlich einer schlechteren Prognose für Patientinnen mit hoher YB-1 Expression getroffen werden. Weitere Untersuchungen an einem größeren Kollektiv würden hier verlässlichere Aussagen liefern.

Eine der interessantesten Aufgaben der zukünftigen Forschung liegt darin, den Faktor zu isolieren, der YB-1 bindet. Die Vielzahl an möglichen Kandidaten konnte in der vorliegenden Arbeit nur angeschnitten werden. Die Identifizierung dieses Faktors könnte womöglich zur Entschlüsselung der vielseitigen Funktionen von YB-1 beitragen und eventuell auch einen Ansatz zur medikamentösen Beeinflussung von YB-1 in multiresistenten Tumorzellen darstellen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Analyse von YB-1 wichtige Einsichten in verschiedenste Zellfunktionen, und hier vor allem in das Wachstum von Tumorzellen gewährt. Dieses Wissen könnte Grundlage für die Entwicklung neuer medikamentöser Therapieansätze zur Behandlung verschiedener Malignome sein.

## 7. Literaturverzeichnis

Alvarez M., Paull K., Monks A., Hose C., Lee J.S., Weinstein J., Grever M., Bates S., Fojo T. Generation of a drug resistance profile by quantitation of mdr-1/P-glycoprotein in the cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. *J Clin Invest.* 95 (1995) 2205-2214.

Andrews P.A., Velury S., Mann S.C., Howell S.B. Cis-Diamminedichloroplatinum(II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 48 (1988) 68-73

Ansari S.A., Safak M., Gallia G.L., Sawaya B.E., Amini S., Khalili K. Interaction of YB-1 with human immunodeficiency virus type 1 Tat and TAR RNA modulates viral promoter activity. *J Gen Virol* 80 (1999) 2629-2638.

Arakawa Y., Kajino K., Kano S., Tobita H., Hayashi J., Yasen M., Moriyama M., Arakawa Y., Hino O. Transcription of dbpA, a Y box binding protein, is positively regulated by E2F1: implications in hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 322 (2004) 297-302.

Arao S., Suwa H., Mandai M., Tashiro H., Miyazaki K., Okamura H., Nomura H., Hiai H., Fukumoto M. Expression of multidrug resistance gene and localization of P-glycoprotein in human primary ovarian cancer. *Cancer Res* 54 (1994) 1355-1359.

Ar-Rushdi A., Nishikura K., Erikson J., Watt R., Rovera G., Croce C.M. Differential expression of the translocated and the untranslocated c-myc oncogene in Burkitt lymphoma. *Science* 222 (1983) 390-393.

Asakuno K., Kohno K., Uchiumi T., Kubo T., Sato S., Isono M., Kuwano M. Involvement of a DNA Binding Protein, MDR-NF1/YB-1, in Human MDR1 Gene Expression by Actinomycin D. *Biochem Biophys Res Commun* 199 (1994) 1428-1435.

Ashizuka M., Fukuda T., Nakamura T., Shirasuna K., Iwai K., Izumi H., Kohno K., Kuwano M., Uchiumi T. Novel translational control through an iron-responsive element by interaction of multifunctional protein YB-1 and IRP2. *Mol Cell Biol* 22 (2002) 6375-6383.

Bader A.G., Felts K.A., Jiang N., Chang H.W., Vogt P.K. Y box-binding protein 1 induces resistance to oncogenic transformation by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 12384-12389.

Bader A.G., Vogt P.K. Inhibition of protein synthesis by Y box-binding protein 1 blocks oncogenic cell transformation. *Mol Cell Biol* 25 (2005) 2095-2106.

Bargou R.C., Jürchott K., Wagener C., Bergmann S., Metzener S., Bommert K., Mapara M.Y., Winzer K.J., Dietel M., Dorken B., Royer H.-D. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat Med.* 3 (1997) 447-450.

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. YB-1 Provokes Breast Cancer

through the Induction of Chromosomal Instability That Emerges from Mitotic Failure and Centrosome Amplification. *Cancer Res* 65 (2005) 4078-4087.

Berube S., Provencher L., Robert J., Jacob S., Herbert-Croteau N., Lemieux J., Duchesne T., Brisson J. Quantitative exploration of possible reasons for the recent improvement in breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat.* 103 (2007) 419-431.

Bouvet P., Matsumoto K., Wolffe A.P. Sequence-specific RNA recognition by the Xenopus Y-box proteins. An essential role for the cold shock domain. *J Biol Chem* 270 (1995) 28297-28303.

Bullock K., Blackwell K. Clinical Efficacy of Taxane-Trastuzumab Combination Regimens for HER-2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Oncologist* 13(2008) 515-25.

Chatterjee M., Rancso C., Stühmer T., Eckstein N., Andrulis M., Gerecke C., Lorentz H., Royer H.D., Bargou R.C. The Y-box binding protein YB-1 is associated with progressive disease and mediates survival and drug resistance in multiple myeloma. *Blood* 111 (2008) 3714-3722.

Chaudhary P.M., Roninson I.B. Induction of multidrug resistance in human cancer cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *J Natl Cancer Inst* 85 (1993) 632-639.

Chen C.Y., Gherzi R., Andersen J.S., Gaietta G., Jürchott K., Royer H.D., Mann M., Karin M. Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes Dev* 14 (2000) 1236-1248.

Chernukhin I.V., Shamsuddin S., Robinson A.F., Carne A.F., Paul A., El-Kady A.I., Lobanenkova V.V., Klenova E.M. Physical and functional interaction between two pluripotent proteins, the Y-box DNA/RNA binding factor, YB-1, and the multivalent zinc finger factor CTCF. *J Biol Chem* 275 (2000) 29915-29921.

Chin K.V., Tanaka S., Darlington G., Pastan I., Gottesman M.M. Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. *J Biol Chem* 265 (1990) 221-226.

Chin K.V., Ueda K., Pastan I., Gottesman M.M. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* 255 (1992) 459-462.

Collins S., Groudine M. Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line. *Nature* 298 (1982) 679-81.

Diamond P., Shannon M.F., Vadas M.A., Coles L.S. Cold shock domain factors activate the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter in stimulated Jurkat T cells. *J Biol Chem* 276 (2001) 7943-51.

Didier D.K., Schiffenbauer J., Woulfe S.L., Zacheis M., Schwartz B.D. Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proc Natl Acad Sci* 85 (1988) 7322-7326.

- Eastman A., Schulte N. Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry* 72 (1988) 4730-4734.
- En-Nia A., Yilmaz E., Klinge U., Lovett D.H., Stefanidis I., Mertens P.R. Transcription factor YB-1 mediates DNA polymerase alpha gene expression. *J Biol Chem* 280 (2005) 7702-7711.
- Escot C., Theillet C., Lidereau R., Spyrtos F., Champeme M.H., Gest J., Callahan R. Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 (1986) 4834-4838.
- Evdokimova V.M., Wei C.L., Sitikov A.S., Simonenko P.N., Lazarev O.A., Vasilenko K.S., Ustinov V.A., Hershey J.W., Ovchinnikov L.P. The major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family. *J Biol Chem* 270 (1995) 3186-3192.
- Evdokimova V., Ruzanov P., Imataka H., Raught B., Svitkin Y., Ovchinnikov L.P., Sonenberg N. The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *EMBO J* 20 (2001) 5491-5502.
- Facchini L.M., Penn L.Z. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J* 12 (1998) 633-651.
- Faury D., Nantel A., Dunn S.E., Guiot M.C., Haque T., Hauser P., Garami M., Bogнар L., Hanzely Z., Liberski P.P., Lopez-Aquilar E., Valera E.T., Tone L.G., Carret A.S., Del Maestro R.F., Gleave M., Montes J.L., Pietsch T., Albrecht S., Jabado N. Molecular profiling identifies prognostic subgroups of pediatric glioblastoma and shows increased YB-1 expression in tumors. *J Clin Oncol* 25 (2007) 1196-1208.
- Faustino N.A., Cooper T.A. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 17 (2003) 419-437.
- Filippova G., Fagerlie S., Klenova E., Myers C., Dehner Y., Goodwin G., Neiman P., Collins S., Lobanekov V. An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 2802-2813.
- Filippova G., Lindblom A., Meincke L., Klenova E., Neiman P., Collins S., Doggett N., Lobanekov V. A widely expressed transcription factor with multiple DNA sequence specificity, CTCF, is localized at chromosome segment 16q22.1 within one of the smallest regions of overlap for common deletions in breast and prostate cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 22 (1998) 26-36.
- Fojo A., Hamilton T.C., Young R.C., Ozols R.F. Multidrug resistance in ovarian cancer. *Cancer* 60 (1987) 2075-2080.
- Friche E., Skovsgaard R.F., Nissen N.I. Anthracycline resistance. *Acta Oncol* 28 (1989) 877-881.



- Fukuda T., Ashizuka M., Nakamura T., Shibahara K., Maeda K., Izumi H., Kohno K., Kuwano M., Uchiumi, T. Characterization of the 5'-untranslated region of YB-1 mRNA and autoregulation of translation by YB-1 protein. *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 611-622.
- Fung L.F., Lo A.K., Yuen P.W., Liu Y., Wang X.H., Tsao S.W. Differential gene expression in nasopharyngeal carcinoma cells. *Life Sci* 67 (2000) 923-936.
- Fujita T., Ito K., Izumi H., Kimura M., Sano M., Nakagomi H., Maeno K., Hama Y., Shingu K., Tsuchiya S., Kohno K., Fujimore M. Increased nuclear localization of transcription factor Y-box binding protein 1 accompanied by up-regulation of P-glycoprotein in breast cancer pretreated with paclitaxel. *Clin Cancer Res* 11 (2005) 8837-8844.
- Gaudreault I., Guay D., Lebel M. YB-1 promotes strand separation in vitro of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifications, exhibits endonucleolytic activities and binds several DNA repair proteins. *Nucleic Acids Res* 32 (2004) 316-327.
- Gessner, C., Woischwill C., Schumacher A., Liebers U., Kuhn H., Stiehl P., Jurchott K., Royer H.D., Witt C., Wolff G. Nuclear YB-1 expression as a negative prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Eur Respir J* 23 (2004) 14-19.
- Gimenez-Bonafe P., Fedoruk M.N., Whitmore T.G., Akbari M., Ralph J.L., Ettinger S., Gleave M.E., Nelson C.C. YB-1 is upregulated during prostate cancer tumor progression and increases P-glycoprotein activity. *Prostate* 59 (2004) 227-349.
- Godwin A.K., Meister A., O'Dwyer PJ, Huang C.S., Hamilton T.C., Anderson M.E. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci* 89 (1992) 3070-3074.
- Gong J.G., Costanzo A., Yang H.Q., Melino G., Kaelin W.G. Jr., Levrero M., Wang J.Y. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 399 (1999) 806-809.
- Gottesman M.M., Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62 (1993) 385-427.
- Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. Multidrug resistance in cancer: a role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2 (2002) 48-58.
- Grant C.E., Deeley R.G. Cloning and characterization of chicken YB-1: regulation of expression in the liver. *Mol Cell Biol* 13 (1993) 4186-4196.
- Graumann P.L., Marahiel M.A. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain *Trends Biochem Sci* 23 (1998) 286-290.
- Gu C., Oyama T., Osaki T., Kohno K., Yasumoto K. Expression of Y box-binding protein-1 correlates with DNA topoisomerase I $\alpha$  and proliferating cell nuclear antigen expression in lung cancer. *Anticancer Res* 21 (2001) 2357-2362.

- Hamaquchi K., Godwin A.K., Yakushiji M., O'Dwyer P.J., Ozols R.F., Hamilton T.C. Cross-resistance to diverse drugs is associated with primary cisplatin resistance in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 53 (1993) 5225-5232.
- Hayashi J., Kajino K., Umeda T., Takano S., Arakawa Y., Kudo M., Hino O. Somatic mutation and SNP in the promoter of dbpA and human hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 21 (2002) 847-850.
- Hipfel R., Schittek B., Boddingbauer Y., Garbe C. Specifically regulated genes in malignant melanoma tissues identified by subtractive hybridization. *Br J Cancer* 82 (2000) 1149-1157.
- Honkavuori M., Talvensaaari-Mattila A., Soini Y., Turpeenniemi-Hujanen T., Santala M. MMP-2 expression associates with CA 125 and clinical course in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 104 (2007) 217-221.
- Horn G., Hofweber R., Kremer W., Kalbitzer H.R. Structure and function of bacterial cold shock proteins. *Cell Mol Life Sci* 64 (2007) 1457-1470.
- Huang X., Ushijima K., Komai K., Takemoto Y., Motoshima S., Kamura T., Kohno K. Co-expression of Y-box binding protein-1 and P-glycoprotein as a prognostic marker for survival in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 93 (2004) 287-291.
- Ise T., Nagatani G., Imamura T., Kato K., Takano H., Nomoto M., Izumi H., Ohmori H., Okamoto T., Ohga T., Uchiumi T., Kuwano M., Kohno K. Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Res* 59 (1999) 342-346.
- Ito K., Tsutsumi K., Kuzumaki T., Gomez P.F., Otsu, K., Ishikawa K. A novel growth-inducible gene that encodes a protein with a conserved cold-shock domain. *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 2036-2041.
- Ito Y., Yoshida H., Shibahara K., Uruno T., Nakano K., Takamura Y., Miya A., Kobayashi K., Yokozawa T., Matsuzuka F., Uchimi T., Kuwano M., Miyoshi E., Matsuura N., Kuma K., Miyauchi A. Y-box binding protein expression in thyroid neoplasms: its linkage with anaplastic transformation. *Pathol Int* 53 (2003) 429-433.
- Izumi H., Imamura T., Nagatani G., Ise T., Murakami T., Uramoto H., Torigoe T., Ishiguchi H., Yoshida Y., Nomoto M., Okamoto T., Uchiumi T., Kuwano M., Funa K., Kohno K. Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'→5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Res* 29 (2001) 1200-1207.
- Janz M., Harbeck N., Dettmar P., Berger U., Schmidt A., Jürchott K., Schmitt M., Royer H.-D. Y-Box Factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors Her2, UPA and PAI-1. *Int. J. Cancer* 97 (2002) 278-282.
- Jiang W., Hou Y., Inouye M. CspA, the major cold-shock protein of Escherichia coli, is an RNA chaperone. *J Biol Chem* 272 (1997) 196-202.

- Jones P.G., Inouye M. The cold-shock response – a hot topic. *Mol Microbiol* 11 (1994) 811-818.
- Jürchott K., Bergmann S., Stein U., Walther W., Janz M., Manni I., Piaggio G., Fietze E., Dietel M., Royer H.D. YB-1 as a cell cycle regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J Biol Chem* 278 (2003) 27988-27996.
- Kamura T., Yahata H., Amada S., Ogawa S., Sonoda T., Kobayashi H., Mitsumoto M., Kohno K., Kuwano M., Nakano H. Is nuclear expression of Y box-binding protein-1 a new prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma? *Cancer* 85 (1999) 2450-2454.
- Kashanchi F., Duvall J.F., Dittmer J., Mireskandari A., Reid R.L., Gitlin S.D., Brady J.N. Involvement of transcription factor YB-1 in human T-cell lymphotropic virus type I basal gene expression. *J Virol* 68 (1994) 561-5.
- Kastan M.B., Canman C.E., Leonard C.J. p53, cell cycle control and apoptosis: Implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev* 14 (1995) 3-15.
- Kaszubiak A., Kupstadt A., Müller U., Hausmann R., Holms P.S., Lage H. Regulation of MDR1 Gene Expression in multidrug-resistant cancer cells is independent from YB-1. *Biochem Biophys Res Commun* 357 (2007) 295-301.
- Kaye S.B. Multidrug resistance in breast cancer-is the jury in yet? *J Natl Cancer Inst* 89 (1997) 902-903
- Keene J.D. Ribonucleoprotein infrastructure regulating the flow of genetic information between the genome and the proteome. *Proc Natl Acad Sci* 98 (2001) 7018-7024.
- Klenova E., Nicolas R., Paterson H., Carne A., Heath C., Goodwin G., Neiman P., Lobanenko V. CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken c-myc gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms. *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 7612-7624.
- Kloks C.P., Spronk C.A., Lasonder E., Hoffmann A., Vuister G.W., Grzesiek S., Hilbers C.W. The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1. *J Mol Biol* 316 (2002) 317-326.
- Kloks C.P., Tessari M., Vuister G.W., Hilbers C.W. Cold shock domain of the human Y-box protein YB-1. Backbone dynamics and equilibrium between the native state and a partially unfolded state. *Biochemistry* 43 (2004) 10237-10246.
- Knapp D.C., Mata J.E., Reddy M.T., Devi G.R., Iversen P.L. Resistance to chemotherapeutic drugs overcome by c-Myc inhibition in a Lewis lung carcinoma murine model. *Anticancer Drugs* 14 (2003) 39-47.
- Kohno K., Sato S., Uchiumi T., Takano H., Tanimura H., Miyazaki M., Matsuo K., Hidaka K., Kuwano M. Activation of the human multidrug resistance 1 (MDR1) gene promoter in response to inhibitors of DNA topoisomerases. *Int J Oncol* 1 (1992) 73-77.

- Kohno K., Izumi H., Uchiumi T., Ashizuka M., Kuwano M. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *BioEssays* 25 (2003) 691-698.
- Kohno K., Uchiumi, T., Niina, I., Wakasugi, T., Igarashi, T., Momii, Y., Yoshida, T., Matsuo, K., Miyamoto, N., and Izumi, H. Transcription factors and drug resistance. *Eur J Canc* 41 (2005) 2577-2586.
- Kohno Y., Matsuki Y., Tanimoto A., Izumi H., Uchiumi T., Kohno K., Shimajiri S., Sasguri Y. Expression of Y-box binding protein dbpC/contrin, a potentially new cancer/testis antigen. *Br J Cancer* 94 (2006) 710-716.
- Koike K., Uchiumi T., Ohga T., Toh S., Wada M., Kohno K., Kuwano M. Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett.* 417 (1997) 390-394.
- Kudo S., Mattei M.G., Fukuda M. Characterization of the gene for dbpA, a family member of the nucleic-acid-binding proteins containing a cold-shock domain. *Eur J Biochem* 231 (1995) 72-78.
- Kuwano M., Oda Y., Izumi H., Yang S.-J., Uchiumi T., Iwamoto Y., Toi M., Fujii T., Yamana H., Kinoshita H., Kamura T., Tsuneyoshi M., Yasumoto K., Kohno K. The role of nuclear Y-box binding protein 1 as a global marker in drug resistance. *Mol Cancer Ther* 3 (2004) 1485-1492.
- Labialle S., Gayet L., Marthinet E., Rigal D., Baggetto L.G. Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views. *Biochem Pharmacol* 64 (2002) 943-948.
- Ladomery M., Sommerville J. Binding of Y-box proteins to RNA: involvement of different protein domains. *Nucleic Acids Res* 22 (1994) 5582-5589.
- Ladomery M., Sommerville J. A role for Y-box proteins in cell proliferation. *Bioessays* 1 (1995) 9-11.
- Lane D.P. p53, Guardian of the Genome. *Nature* 358 (1992) 15-16.
- Lasham A., Linridge E., Rudert F., Onrust R., Watson J. Regulation of the human *fas* promoter by YB-1, Pura and AP-1 transcription factors. *Gene* 252 (2000) 1-13.
- Lasham A., Moloney S., Hale T., Homer C., Zhang Y.F., Murison J.G., Braithwaite A.W., Watson J. The Y-box-binding protein, YB1, is a potential negative regulator of the p53 tumor suppressor. *J Biol Chem* 278 (2003) 35516-35523.
- Lee S.J., Xie A., Jiang W., Etchegaray J.P., Jones P.G., Inouye M. Family of the major cold-shock protein, CspA (CS7.4), of *Escherichia coli*, whose members show a high sequence similarity with the eukaryotic Y-box binding proteins. *Mol Microbiol* 11 (1994) 833-839.
- Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396 (1998) 643-649.

- Levenson V.V., Davidovich I.A., Roninson I.B. Pleiotropic resistance to DNA-interactive drugs is associated with increased expression of genes involved in DNA replication, repair and stress response. *Cancer Res* 60 (2000) 5027-5030.
- Lindquist S. The heat shock response. *Annu Rev Biochem* 55 (1986) 1151-1191.
- Little C.D., Nau M.M., Carney D.N., Gazdar A.F., Minna J.D. Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 306 (1983) 194-196.
- Lu Z.H., Books J.T., Ley T.J. YB-1 is important for late-stage embryonic development, optimal cellular stress responses, and the prevention of premature senescence. *Mol Cell Biol* 25 (2005) 4625-4637.
- Maaßen V., Pietschmann D. Veränderungen und Tumoren der weiblichen Geschlechtsorgane, Ovarialtumoren. In: „*Gynäkologie & Geburtshilfe*“, Duale Reihe, Stauber M., Weyerstahl T. (Hrsg), Thieme Verlag, Stuttgart, 2005, 2. Auflage, 279-309.
- MacDonald G.H., Itoh-Lindstrom Y., Ting J.P. The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter. *J Biol Chem* 270 (1995) 3527-3533.
- Marie J.P., Zittoun R., Sikic B.I. Multidrug resistance (mdr1) gene expression in adult acute leukemias: correlation with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood* 78 (1991) 586-592.
- Markman M., Bookman M.A. Second-line treatment of ovarian cancer. *Oncologist* 5 (2000) 26-35.
- Masuda H., Ozols R.F., Lai G.M., Fojo A., Rothenberg M., Hamilton T.C. Increased DNA repair as a mechanism of acquired resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 48 (1988) 5713-5716.
- Matsumoto K., Wolffe A.P. Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol* 8 (1998) 318-323.
- Matsumoto K., Abiko S., Ariga H. Transcriptional regulatory complex including YB-1 controls expression of Mouse Matrix Metalloproteinase-2-Gene in NIH3T3 cells. *Biol Pharm Bull* 28 (2005) 1500-1504.
- Mertens P.R., Alfonso-Jaume M.A., Steinmann K., Lovett D.H. A synergistic interaction of transcription factors AP2 and YB-1 regulates gelatinase A enhancer-dependent transcription. *J Biol Chem* 273 (1998) 32957-32965.
- Mertens P.R., Steinmann K., Alfonso-Jaume M.A., En-Nia A., Sun Y., Lovett D.H. Combinatorial interactions of p53, activating protein 2, and YB-1 with a single enhancer element regulate gelatinase A expression in neoplastic cells. *J Biol Chem* 277 (2002) 24875-24882.

- Michalides R., van Tinteren R., Balkenende A., Vermorken J.B., Benraadt J., Huldij J., van Diest P. Cyclin A is a prognostic indicator in early stage breast cancer with and without tamoxifen treatment. *Br J Canc* 86 (2002) 402-408.
- Minnich W.B., Ovchinnikov L.P. Role of cytoplasmatic mRNP proteins in translation. *Biochemie* 74 (1992) 477-483.
- Miyazaki M., Kohno K., Uchiumi T., Tanimura H., Matsuo K., Nasu M., Kuwano M. Activation of human multidrug resistance-1 gene promoter in response to heat shock stress. *Biochem Biophys Res Commun* 187 (1992) 677-684.
- Nakagawa M., Nomura Y., Kohno K., Ono M., Mizoguchi H., Ogata J., Kuwano M. Reduction of drug accumulation in cisplatin-resistant variants of human prostatic cancer PC-3 cell line. *J Urol* 150 (1993) 1970-1973.
- Nekrasov M.P., Ivshina M.P., Chernov K.G., Kovriqina E.A., Evdokimova M., Thomas A.A., Hershey J.W., Ovchinnikov L.P. The mRNA-binding protein YB-1 (p50) prevents association of the eukaryotic initiation factor eIF4G with mRNA and inhibits protein synthesis at the initiation stage. *J Biol Chem* 278 (2003) 13936-13943.
- Oda Y., Ohishi Y., Basaki Y., Kobavashi H., Hirakawa T., Wake N., Ono M., Nishio K., Kuwano M., Tsuneyoshi M. Prognostic implications of the nuclear localization of Y-box-binding protein 1 and CXCR4 expression in ovarian cancer: Their correlation with activated Akt, LRP/MVP and P-glycoprotein expression. *Cancer Sci* 98 (2007) 1020-1026.
- Oda Y., Ohishi Y., Saito T., Hinoshita E., Uchiumi T., Kinukawa N., Iwamoto Y., Kohno K., Kuwano M., Tsuneyoshi M. Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II alpha expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *J Pathol* 199 (2003) 251-258.
- Oda Y., Sakamoto A., Shinohara N., Ohga T., Uchiumi T., Kohno K., Tsuneyoshi M., Kuwano M., Iwamoto Y. Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 4 (1998) 2273-2277.
- Ohga T., Koike K., Ono M., Makino Y., Itagaki Y., Tanimoto M., Kuwano M., Kohno K. Role of the human Y-box binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin and ultraviolet light. *Cancer Res*, 56 (1996) 4224-4228.
- Ohga T., Uchiumi T., Makino Y., Koike K., Wada M., Kuwano M., Kohno K. Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. *J Biol Chem* 273 (1998) 5997-6000.
- Okamoto T., Izumi H., Imamura T., Takano H., Ise T., Uchiumi T., Kuwano M., Kohno K. Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene* 19 (2000) 6194-6202.
- Pauly M., Ries F., Dicato M. The genetic basis of multidrug resistance. *Pathol Res Pract* 188 (1992) 804-807.

- Perez R.P., Hamilton T.C., Ozols R.F., Young R.C. Mechanisms and modulation of resistance to chemotherapy in ovarian cancer. *Cancer* 71 (1993) 1571-1580.
- Pinedo H.M., Giaccone G. P-glycoprotein – a marker of cancer cell behavior. *N Engl J Med* 333 (1995) 1417-1419.
- Pines J., Hunter T. Cyclins A and B1 in the human cell cycle. *Ciba Found Symp* 170 (1992) 187-196.
- Raffetseder U., Frye B., Rauen T., Jurchott K., Royer H.D., Jansen P.L., Mertens P.R. Splicing factor SRp30c interaction with Y-box protein-1 confers nuclear YB-1 shuttling and alternative splice site selection. *J Biol Chem* 278 (2003) 18241-18248.
- Raj G.V., Safak M., MacDonald G.H., Khalili K. Transcriptional regulation of human polyomavirus JC: evidence for a functional interaction between ReIA (p65) and the Y-box binding protein, YB-1. *J Virol* 70 (1996) 5944-5953.
- Rehm H. Anikörper, Immunologische Nachweistechiken. In: „*Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*“, Rehm H. (Hrsg.), Elsevier Verlag, München, 2006, 5. Auflage, 193-203.
- Ruzanov P.V., Evdokimova V.M., Korneeva N.L., Hershey J.W., Ovchinnikov L.P. Interaction of the universal mRNA-binding protein p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments. *J Cell Sci* 112 (1999) 3487-3496.
- Sabath D.E., Podolins P.L., Comber P.G., Prystowsky M B. cDNA cloning and characterization of interleukin 2-induced genes in cloned T helper lymphocytes. *J Biol Chem* 265 (1990) 12671-12678
- Saji H., Masakazu T., Saji S., Koike M., Kohno K., Kuwano M. Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human breast cancer. *Cancer Letters* 190 (2003) 191-197.
- Sakura H., Maekawa T., Imamoto F., Yasuda K., Ishii S. Two human genes isolated by a novel method encode DNA-binding proteins containing a common region of homology. *Gene* 73 (1998) 499-507.
- Slamon D.J., Leyland-Jones B., Shak S., Fuchs H., Paton V., Bajamonde A., Fleming T., Eiermann W., Wolter J., Pegram M., Baselga J., Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* (2001) 783–792.
- Sawaya B.E., Khalili K., Amini S. Transcription of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) promoter in central nervous system cells: effect of YB-1 on expression of the HIV-1 long terminal repeat. *J Gen Virol* 79 (1998) 239-46.
- Scarpati E., DiCorleto P. Identification of a thrombin response element in the human platelet-derived growth factor B-chain (c-sis) promoter. *J Biol Chem* 271 (1996) 3025-3032.

Scherf U., Ross D.T., Waltham M., Smith L.H., Lee J.K., Tanabe L., Kohn K.W., Reinhold W.C., Myers T.G., Andrews D.T., Scudiero D.A., Eisen M.B., Sausville E.A., Pommier Y., Botstein D., Braun P.O., Weinstein J.N. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 24 (2000) 236-244.

Schindelin H., Mahariel M.A., Heinemann U. Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein. *Nature* 364 (1993) 164-168.

Schröder K., Graumann P., Schnuchel A., Holak T.A., Marahiel M.A. Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif. *Mol Microbio* 16 (1995) 699-708.

Shibahara K., Sugio K., Osaki T., Uchiumi T., Maehara Y., Kohno K., Yasumoto K., Sugimachi K., Kuwano M. Nuclear expression of the Y-box binding protein 1, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer. *Clin Canc Res* 7 (2001) 3151-3155.

Shibahara, K., Uchiumi, T., Fukuda, T., Kura, S., Tominaga, Y., Maehara, Y., Kohno, K., Nakabeppu, Y., Tsuzuki, T., and Kuwano, M. Targeted disruption of one allele of the Y-box binding protein-1 (YB-1) gene in mouse embryonic stem cells and increased sensitivity to cisplatin and mitomycin C. *Cancer Sci* 95 (2004) 348-353.

Shibao K., Takano H., Nakayama Y., Okazaki K., Nagata N., Izumi H., Uchiumi T., Kuwano M., Kohno K., Itoh H. Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas. *Int J Cancer*. 83 (1999) 732-737.

Shittek B., Psenner K., Sauer B., Meier F., Iftner T., Garbe C. The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance. *Int J Cancer* 120 (2007) 2110-2118.

Shiu R.P., Watson P.H., Dubik D. c-myc oncogene expression in estrogen-dependent and -independent breast cancer. *Clin Chem* 39 (1993) 353-355.

Sinn E., Muller W., Pattenqale P., Tepler I., Wallace R., Leder P. Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo. *Cell* 49 (1987) 465-475.

Skabkin M.A., Kiselyova O.I., Chernov K.G., Sorokin A.V., Dubrovin E.V., Yaminsky I.V., Vasiliev V.D., Ovchinnikov L.P. Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1. *Nucleic Acids Res* 32 (2004) 5621-5635.

Sommerville J. Activities of cold-shock domain proteins in translational control. *BioEssays* 21 (1999) 319-325.

Soop T., Nashchekin D., Zhao J., Sun X., Alzhanova-Ericsson A.T., Björkroth B., Ovchinnikov L., Daneholt B. A p50-like Y-box protein with a putative translational role becomes associated with pre-mRNA concomitant with transcription. *J Cell Sci* 116 (2003) 1493-1503.



- Sorokin A.V., Selyutina A.A., Skabkin M.A., Guryanov S.G., Nazimov I.V., Richard C., Th`ng J., Yau J., Sorensen P.H., Ovchinnikov L.P., Edvokimova V. Proteasome-mediated cleavage of the Y-box-binding protein 1 is linked to DNA-damage stress response. *EMBO J* 24 (2005) 3602-3612.
- Spitkovsky D.D., Royer-Pokora B., Delius H., Kisseljev F., Jenkins N.A., Gilbert D.J., Copeland N.G., Royer H.D. Tissue restricted expression and chromosomal localization of the YB-1 gene encoding a 42kD nuclear CCAAT binding protein. *Nucleic Acids Res* 20 (1992) 797-803.
- Stein U., Jürchott K., Walther W., Bergmann S., Schlag P.M., Royer H.D. Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. *J Biol Chem* 276 (2001) 28562-28569.
- Stenina O.I., Poptic E.J., DiCorleto P.E. Thrombin activates a Y box-binding protein (DNA-binding protein B) in endothelial cells. *J Clin Investig* 106 (2000) 579-587.
- Stenina OI, Shaneyfelt KM, DiCorleto P.E. Thrombin induces the release of the Y-box protein dbpB from mRNA: a mechanism of transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001) 7277-7282.
- Suwabe N., Takahashi S., Nakano T., Yamamoto M. GATA-1 regulates growth and differentiation of definitive erythroid lineage cells during in vitro ES cell differentiation. *Blood* 92 (1998) 4108-4118.
- Swamynathan S.K., Nambier A., Guntaka R.V. Role of single-stranded DNA regions and Y-box proteins in transcriptional regulation of viral and cellular genes. *Faseb J* 12 (1998) 515-522.
- Tafari S.R., Wolffe A.P. DNA binding, multimerization, and transcription stimulation by the Xenopus Y box proteins in vitro. *New Biol* 4 (1992) 349-359.
- Takahashi S., Komeno T., Suwabe N., Yoh K., Nakajima S., Nishimura S., Kuroha T., Nagasawa T., Yamamoto M. Role of GATA-1 in proliferation and differentiation of definitive erythroid and megakaryocytic cells in vivo. *Blood* 92 (1998) 434-442.
- Talvensaari-Mattila A., Paakko P., Hoythya M., Blanco-Sequeiros G., Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer* 83 (1998) 1153-1162.
- Tamura T., Aoyama N., Saya H., Haga H., Futami S., Miyamoto M., Koh T., Ariyasu T., Tachi M., Kasuga M., Takahashi R. Induction of Fas-mediated apoptosis in p53-transfected human colon carcinoma cells. *Oncogene* 11 (1995) 1939-1946.
- Tarkowski R., Polak G., Nowakowski A., Wertel I., Kotarski J. YB-1 protein expression in ovarian cancer. *Ginekol Pol* 77 (2006) 458-462.
- Tekur S., Pawlak A., Guellaen G., Hecht N.B. Contrin, the human homologue of a germ-cell Y-box-binding protein: cloning, expression, and chromosomal localization. *J Androl* 20 (1999) 135-144.

- Thieringer H.A., Jones P.G., Inouye M. Cold shock and adaptation. *Bioessays* 20 (1998) 49-57.
- Torigoe T., Izumi H., Ishiquchi H., Yoshida Y., Tanabe M., Yoshida T., Igarashi T., Niina I., Wakasugi T., Imaizumi T., Momii Y., Kuwano M., Kohno K. Cisplatin resistance and transcription factors. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5 (2005) 15-27.
- Tourriere H., Chebli K., Tazi J. mRNA degradation machines in eukaryotic cells. *Biochimie* 84 (2002) 821-837.
- Tsai S.F., Martin D.I.K., Zon L.I., D`Andrea A.D., Wong G.G., Orkin S.H. Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature* 339 (1989) 446-451.
- Uchiumi T., Fotovati A., Sasaquri T., Shibahara K., Shimada T., Fukuda T., Nakamura T., Izumi H., Tsuzuki T., Kuwano M., Kohno K. YB-1 is important for an early stage embryonic development: neural tube formation and cell proliferation. *J Biol Chem* 281 (2006) 40440-40449.
- Uchiumi T., Kohno K., Tanimura H., Matsuo K., Sato S., Uchida Y., Kuwano M. Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation. *Cell Growth Differ* 4 (1993) 147-15.
- Uramoto H., Izumi H., Ise T., Tada M., Uchiumi T., Kuwano M., Yasumoto K., Funa K., Kohno K. p73 Interacts with c-Myc to regulate Y-box-binding protein-1 expression. *J Biol Chem* 277 (2002) 31694-31702.
- Van der Zee A.G., Hollema H.H., de Bruijn H.W., Willemse P.H., Boonstra H., Mulder N.H., Aalders J.G., de Vries E.G. Cell biological markers of drug resistance in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 58 (1995) 165-178.
- Vikhanskaya F., Marchini S., Marabese M., Galliera E., Brogginini M. p73 Overexpression Is Associated with Resistance to Treatment with DNA-damaging Agents in a Human Ovarian Cancer Cell Line. *Cancer Res* 61 (2001) 935-938.
- Walker T.L., White J.D., Esdale W.J., Burton M.A., DeCruz E.E. Tumour cells surviving in vivo cisplatin chemotherapy display elevated c-myc expression. *Br J Cancer* 73 (1996) 610-614.
- Weyerstahl Th., Genz Th. Erkrankungen der Mamma, Mammakarzinom, In: „*Gynäkologie und Geburtshilfe*“, Stauber M., Weyerstahl Th. (Hrsg.), Thieme Verlag, Stuttgart, 2005, 2. Auflage, S. 371-395
- Wilkinson M. F., Shyu A.B. Multifunctional regulatory proteins that control gene expression in both the nucleus and the cytoplasm. *Bioessays* 23 (2001) 775-787.
- Wilusz C.J., Wormington M., Peltz S.W. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2001) 237-246.

- Wistow G. Cold shock and DNA binding. *Nature* 344 (1990) 823-824.
- Wolffe A.P., Tafuri S., Ranjan M., Familari M. The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from *Escherichia coli* to man. *New Biol* 4 (1992) 290-298.
- Wolffe A.P. Structural and functional properties of the evolutionary ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *Bioessays* 16 (1994) 245-251.
- Wu J., Lee C., Yokom D., Jiang H., Cheang M.C., Yorida E., Turbin D., Berquin I.M., Merten P.R., Iftner T., Gilks C.B., Dunn S.E. Disruption of the Y-box binding protein-1 results in suppression of the epidermal growth factor receptor and HER-2. *Cancer Res.* 66 (2006) 4872-4879.
- Yahata H., Kobayashi H., Kamura T., Amada S., Hirakawa T., Kohno K., Kuwano M., Nakano H. Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 128 (2002) 621-626.
- Yao R., Wang Y., Lubet R.A., You M. Differentially expressed genes associated with mouse lung tumor progression. *Oncogene* 21 (2002) 5814-5821.
- Yasen M., Kajino K., Kano S., Tobita H., Yamamoto J., Uchiumi T., Kon S., Maeda M., Obulhasim G., Arie S., Hino O. The up-regulation of Y-box binding proteins (DNA binding protein A and Y-box binding protein-1) as prognostic markers of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 11 (2005) 7354-7361.
- Yokoyama H., Harigae H., Takahashi S., Kameoka J., Miyamura K., Ishizawa K., Kaku M., Sasaki T. High expression of YB-1 gene in erythroid cells in patients with refractory anemia. *Int J Hematol* 78 (2003) 213-218.
- Yokoyama H., Harigae H., Takahashi S., Takahashi S., Furuyama K., Kaku M., Yamamoto M., Sasaki T. Regulation of YB-1 gene expression by GATA transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 303 (2003) 140-145.
- Zhang Y.F., Homer C., Edwards S.J., Hananeia L., Lasham A., Royds J., Sheard P., Braithwaite A.W. Nuclear localization of Y-box factor YB1 requires wild-type p53. *Oncogene* 22 (2003) 2782-2794.

---

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Manfred Schmitt für die interessante Themenstellung, die gute Betreuung sowie die stetige Unterstützung und Hilfe.

Frau Prof. Dr. med. Marion Kiechle danke ich für die Möglichkeit zur Promotion in Ihrer Frauenklinik.

Frau Prof. Dr. med. Nadia Harbeck und Frau Prof. Dr. med. Barbara Schmalfeldt möchte ich für ihre Hilfestellung und insbesondere für die Möglichkeit zur Nutzung der exzellenten Datenbanken danken.

Herrn Prof. Dr. med. Heinz Höfler, Herrn Prof. Dr. med. Falko Fend, Frau Dr. med. Frauke Neff und den Mitarbeitern aus dem Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie danke ich für die Bereitstellung der Zelllinienlysate aus dem Multiplen Myelom sowie für die Begutachtung der immunhistochemischen Schnitte.

Ein großer Dank geht an Frau Karin Mengele für die Vorarbeit am ELISA Protokoll und die exzellente Zusammenarbeit. Darüberhinaus gilt ihr ein ganz besonderer Dank für ihr stets offenes Ohr und ihre ständige Hilfestellung in vielen Belangen.

Frau Christel Schnelldorfer und Frau Alexandra Sturmheit danke ich ebenfalls für die Vorarbeit am ELISA Protokoll sowie für die Hilfe beim Erlernen der technischen Fertigkeiten und die große Geduld.

Frau Daniela Hellmann und Frau Anita Welk gilt ein besonderer Dank bei der Hilfe mit den immunhistochemischen Färbungen und der Datenbank.

Herrn Dr. Ronald Kates danke ich für die großartige Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie und Herrn Philipp Schaller, für die unermüdliche Unterstützung während der Erstellung der Dissertation danken.

Besonders hervorheben möchte ich hier meinen Bruder, Alexander Goedel, den ich im Speziellen für die Hilfe bei der Formatierung sowie für seine Zeit und Geduld danken möchte.