

Aus dem Department für Experimentelle und Klinische  
Pharmakologie und Pharmakogenomik der Universität Tübingen

Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie

## **Das Adaptorprotein SLy2 beim Multiplen Myelom**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Fleischmann, Marie-Therese**

**2020**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Beer-Hammer
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Grünebach

Tag der Disputation: 15.10.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1. B-Zellen.....</b>	<b>6</b>
1.1.1. Subtypen und Aufgaben der B-Zellen.....	6
1.1.2. Differenzierung zu Plasmazellen und deren Aufgaben .....	8
<b>1.2. Das Multiple Myelom: Symptome, Diagnose und Therapie.....</b>	<b>9</b>
1.2.1. Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) .....	15
<b>1.3. SLy2 – ein Mitglied der SLy-Protein-Familie .....</b>	<b>16</b>
1.3.1. Die Multiplen Myelom Zelllinien JK6L, U266 und RPMI 8226 .....	18
1.3.2. Zellstimulierende Faktoren IL-6 und APRIL .....	19
<b>1.4. HDAC1 und seine Downstream-target Gene .....</b>	<b>20</b>
1.4.1. HDAC1, ein Mitglied der HDAC Familie .....	20
1.4.2. Downstream-target Gene der HDAC1 .....	22
1.4.3. Inhibitoren und Einsatz in der Klinik .....	23
<b>1.5. Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>27</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>28</b>
<b>2.1. Laborgeräte.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2. Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>29</b>
<b>2.3. Chemikalien und biologische Kits .....</b>	<b>32</b>
2.3.1. Chemikalien .....	32
2.3.2. Kits .....	34
<b>2.4. Puffer, Lösungen und Medien .....</b>	<b>35</b>
<b>2.5. Oligonukleotide .....</b>	<b>38</b>
<b>2.6. siRNA .....</b>	<b>38</b>
<b>2.7. Antikörper.....</b>	<b>39</b>
2.7.1. ELISA Antikörper.....	39
2.7.2. Western-Blot Antikörper .....	39
2.7.3. FACS Antikörper .....	39
<b>2.8. Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>40</b>
2.8.1. Kultivierung der humanen Multiplen Myelom Zelllinien JK6L, U266 und RPMI 8226 40	
2.8.2. Stimulation der humanen Multiplen Myelom Zelllinien JK6L, U266 und RPMI 8226 mit IL-6 und APRIL .....	40
2.8.3. FACS-Analyse nach Stimulation mit IL-6 und APRIL in Hunger- und Vollmedium	41
2.8.4. Bestimmung der Zellzahl mittels CASY .....	41
2.8.5. Transfektion mittels Elektroporation.....	42
2.8.6. Transfektion mittels Reagenz.....	43

<b>2.9. Biochemische Methoden</b> .....	<b>44</b>
2.9.1. Bestimmung der SLy2-Proteinkonzentration nach Stimulation .....	44
2.9.2. Gelelektrophorese .....	45
2.9.3. Western Blot .....	46
2.9.4. Detektion der SLy2 Proteinexpression in den humanen Multiplen Myelom Zelllinien JK6L, U266 und RPMI 8226 in Nukleus- und Plasmafraktion .....	48
<b>2.10. Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>50</b>
2.10.1. Bestimmung der mRNA-Menge mittels RT-qPCR .....	50
2.10.2. Analyse der IgLc-Produktion mittels ELISA .....	52
2.10.3. Bestimmung der HDAC-Aktivität nach Stimulation mit IL-6 und APRIL .....	54
<b>2.11. Statistische Analyse</b> .....	<b>54</b>
<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	<b>55</b>
<b>3.1. Stimulation der humanen Multiplen Myelom Zelllinien JK6L, U266 und RPMI 8226 mit IL-6 und APRIL</b> .....	<b>55</b>
3.1.1. Auswirkung der Stimulation auf die gebildete <i>SLy2</i> mRNA und die SLy2 Proteinmenge .....	55
3.1.2. Auswirkung der Stimulation auf die Lokalisation von SLy2 in humanen Multiplen Myelom Zellen der Zelllinien JK6L, U266 und RPMI 8226 .....	60
3.1.3. Auswirkung der Stimulation auf die Proliferation der humanen Multiplen Myelom Zelllinien JK6L, U266 und RPMI 8226 .....	63
3.1.4. Auswirkung der Stimulation auf die Sekretion von IgLc .....	68
<b>3.2. Transfektion der RPMI 8226 Zellen mit siRNA</b> .....	<b>70</b>
3.2.1. Änderungen im mRNA-Gehalt von <i>SLy2</i> nach Transfektion mit siRNA .....	71
3.2.2. Änderungen im Proteingehalt von SLy2 nach Transfektion mit siRNA .....	73
3.2.3. Änderungen der Sekretion von IgLc nach Transfektion mit siRNA .....	74
3.2.4. Änderung der Proliferation der humanen Multiplen Myelom Zelllinie RPMI 8226 nach Transfektion mit siRNA .....	76
<b>3.3. Interaktion von HDAC1 oder seiner Downstream-target Gene mit SLy2</b> .....	<b>78</b>
3.3.1. Beeinflussung der Enzymaktivität der HDAC1 durch Interaktion von HDAC1 und SLy2 nach Stimulation .....	78
3.3.2. Enzymaktivität der HDAC1 durch Interaktion von HDAC1 und SLy2 nach Transfektion mit siRNA .....	79
3.3.3. Auswirkung der Stimulation auf das Downstream-target Gen <i>p57</i> .....	80
3.3.4. Auswirkung der Stimulation auf das Downstream-target Gen <i>p21</i> .....	82
3.3.5. Auswirkung der Stimulation auf die Downstream-target Gene <i>p53</i> , <i>p27</i> und <i>STAT3</i> .....	84
3.3.6. Auswirkung der siRNA Transfektion auf die Downstream-target Gene <i>p21</i> , <i>p57</i> , <i>p53</i> , <i>p27</i> und <i>STAT3</i> .....	87
<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>90</b>
<b>4.1. Proliferation der Multiplen Myelom Zellen</b> .....	<b>90</b>
<b>4.2. Aktivität der HDAC1 und Beeinflussung seiner Downstream-target Gene</b> .....	<b>91</b>
4.2.1. Aktivität der HDAC1 .....	91
4.2.2. Die Downstream-target Gene von HDAC1 .....	92
4.2.3. Interaktion von HDAC1 und seiner Downstream-target Gene mit SLy2 nach Transfektion mit siRNA .....	95

4.3.	Die IgLc-Produktion als Malignitätsfaktor des Multiplen Myeloms .....	96
4.4.	Ausblick und klinische Relevanz des SLy2-Proteins .....	97
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	99
6.	LITERATURVERZEICHNIS .....	100
7.	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL .....	105
8.	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	106
9.	DANKSAGUNGEN .....	107

# 1. Einleitung

## 1.1. B-Zellen

### 1.1.1. Subtypen und Aufgaben der B-Zellen

B-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems und entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark. Dabei entstehen zunächst die frühen Pro-B-Zellen. In diesen findet die D-J-Rekombination der schweren Ketten der Immunglobuline statt [1]. In den späten Pro-B-Zellen kommt es dann zur V-D-J-Rekombination der schweren Ketten. Dadurch entwickeln sich die Prä-B-Zellen. Man unterscheidet die Prä-B-Zellen in große Prä-B-Zellen und kleine Prä-B-Zellen. In den großen Prä-B-Zellen wird die schwere Kette des B-Zell-Rezeptors zusammen mit einer Ersatzform der leichten Kette auf der Zelloberfläche exprimiert. In diesem Stadium kommt es zu mehreren Zellteilungen, wodurch die kleinen Prä-B-Zellen entstehen. Diese tragen keinen Prä-B-Zell-Rezeptor mehr. In diesem Stadium findet die V-J-Rekombination der leichten Ketten statt. Hat diese erfolgreich stattgefunden, treten die Zellen ins Stadium der unreifen B-Zellen ein. Hier exprimieren die B-Zellen vollständige IgM-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Durch alternatives Spleißen entstehen daraus reife B-Zellen. Diese können auch IgD-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche tragen. Für das Wachstum und die Differenzierung zu unreifen B-Zellen der pro/prä-B Zellen ist der Prä-B-Zell-Rezeptor und IL-7-Rezeptor wichtig. [1]

B-Zellen vermitteln vor allem die humorale Immunantwort und produzieren zu diesem Zweck als Plasmazellen Immunglobuline. Man unterscheidet in der Maus B-1a, B-1b, B-2 und Marginalzonen-B-Zellen, beim Mensch B-1, B-2 und Marginalzonen B-Zellen [2-5]. Diese Zelltypen zeigen unterschiedliche Oberflächenmarker und erfüllen unterschiedliche Teilaufgaben in der Immunantwort. Die B-1b und die Marginalzonen-B-Zellen sind für eine schnelle T-Zell-unabhängige Immunantwort wichtig und bilden so eine Möglichkeit die Zeit zwischen der frühen und späten adaptiven Immunantwort zu überbrücken.

Zusätzlich zeigen sie eine verstärkte Neigung, schnell in Plasmazellen zu differenzieren. Die B-2 Zellen dagegen bilden T-Zell-abhängig in der späten Phase der Immunabwehr hoch affine Antikörper [5]. Die Antikörper bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. Diese sind miteinander über Disulfidbrücken kovalent verbunden. Die schweren Ketten werden aus einer variablen und drei (IgG, IgA) bzw. vier (IgM, IgE) konstanten Domänen gebildet. Dagegen besteht die leichte Kette aus einer variablen und einer konstanten Domäne. Der V-Abschnitt ist dabei jeweils die variable Domäne, während die konstante Domäne C-Abschnitt genannt wird. Die variable Domäne der Antigenbindungsstelle wird durch die V-D-J-Rekombination immer wieder neu rearrangiert, sodass immer neue Antikörper produziert werden können. Bei den leichten Ketten besteht die variable Domäne aus dem V- und dem J-Segment. Das D-Segment kommt bei der variablen Region der schweren Ketten zusätzlich dazu. Zufällig wird einmal pro Zelle entschieden, welches Allel rekombiniert wird. Dies hat zur Folge, dass das zweite Allel nicht mehr abgelesen werden kann. Es entstehen so Millionen von Möglichkeiten, wie die variable Region der Antikörper aufgebaut ist.

Der B-Zell-Rezeptor (BCR) ist aus zwei Bestandteilen aufgebaut. Zum einen hat er eine Ligandenbindungsfunktion, welche aus einem gebundenen Antikörper besteht. Zusätzlich hat der BCR eine Signaltransduktionsfunktion. Diese löst nach Aktivierung des BCR eine intrazelluläre Signalkaskade aus. Dadurch werden verschiedene Botenstoffe freigesetzt, die u.a. zur Rekrutierung von T-Zellen und zur Differenzierung beitragen.

Nachdem die B-Zellen in Keimzentren oder extrafollikulären Regionen Antigenen ausgesetzt waren, werden diese aktiviert. Die Keimzentren sind dabei vor allem für die T-Zell-abhängige Immunantwort gegen Protein-Antigene wichtig. Sie formieren sich durch die zelluläre Interaktion von antigen-aktivierten B-Zellen, follikulären T-Helferzellen und follikulären dendritischen Zellen. Es kann aber auch T-Zell-unabhängig zur Formation von Keimzentren kommen [1]. Man geht davon aus, dass in den Keimzentren ein besonderes Mikromilieu geschaffen wird, das es den aktivierten B-Zellen erlaubt zu reifen B-Zellen zu differenzieren.

In den B-Zellen im Keimzentrum kann es zu Somatischer Hypermutation (SHM) und zum Isotypenwechsel der Antikörper kommen. Dadurch werden hochaffine Antikörper gegen die Antigene gebildet. Durch die SHM kann die Affinität der Antikörper gegenüber ihren Antigenen weiter gesteigert werden. In der Differenzierung von unreifen zu reifen B-Zellen hat der Isotypenwechsel stattgefunden. Die so veränderten und gut angepassten B-Zellen können dann zu Plasmazellen oder langlebigen B-Gedächtniszellen differenzieren. Die B-Gedächtniszellen sorgen dafür, dass es im Falle eines erneuten Antigenkontakts, zu einer schnelleren sekundären Immunantwort kommt.

### 1.1.2. Differenzierung zu Plasmazellen und deren Aufgaben

Plasmazellen sind als Zellen, die eine Ig-Sekretion aufweisen, definiert, die dabei allerdings nicht proliferieren. Sie sind postmitotisch [6]. Auch innerhalb der Plasmazellpopulation gibt es große Unterschiede. So unterscheiden sich die Plasmazellen die T-Zell-abhängig gebildet wurden, von denen die T-Zell-unabhängig entstanden sind. Auch die Lokalisation innerhalb eines Organismus, an denen die Plasmazellen entstanden sind, beeinflusst den Plasmazelltyp. Plasmazellen aus der Milz unterscheiden sich von Plasmazellen aus dem Darm und Plasmazellen aus inflammatorischen Geweben sind anders als Plasmazellen aus sekundären lymphatischen Organen [6].

Für die Differenzierung von Plasmazellen aus reifen B-Zellen sind verschiedene Transkriptionsfaktoren nötig. Die B-Zellen differenzieren dabei über das Stadium des Plasmablasten zur Plasmazelle. Plasmablasten sezernieren bereits Antikörper, sind aber noch teilungsfähig. Zu den benötigten Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung gehören Pax5, Bcl6, und Blimp-1. Die Genexpression von reifen B-Zellen und Plasmazellen schließen sich zum Teil gegenseitig aus. Die Reduktion der B-Zell-Genexpression ist eine der Voraussetzungen zur Differenzierung zur Plasmazelle. So zeigen z.B. alle B-Zell-Stadien eine hohe Pax5 Expression, dies ist in Plasmazellen jedoch kaum zu



finden. Außerdem inhibiert Pax5 die Transkription von Genen, die wichtig für die Plasmazell-Entwicklung sind. Eine Pax5 Expression schließt somit die Plasmazell-Differenzierung aus und muss zuvor reduziert werden [6]. Neben dem Verringern von B-Zell-Transkriptionsfaktoren müssen die Plasmazell-Transkriptionsfaktoren hochreguliert werden. Dies ist z.B. über die Steigerung von Blimp-1 möglich, da dies ein wichtiges Element der vollständigen Plasmazell-Differenzierung ist. In Mäusen ohne Blimp-1 zeigte sich, dass hier die Plasmazellen nur das Pre-Plasmablast-Stadium erreichen konnten [6]. Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor in Plasmazellen ist Irf4. Dieser ist ebenfalls für eine vollständige Differenzierung zu Plasmazellen nötig und fördert den Isotypenwechsel im Keimzentrum [6]. Auch einige andere Gene werden nur im Keimzentrum exprimiert und dienen der Differenzierung zur Plasmazelle. STAT3, OBF-1 und Oct2 fügen Signale von T-Zellen und Zytokinen ein und fördern so die Differenzierung zur Plasmazelle. Bcl6, Cach2 und MTA3 inhibieren die Blimp-1 Aktivität und verhindern so die Differenzierung zu Plasmazellen [6]. Damit die Plasmazellen persistieren können, benötigen sie Kontakt zu Stromazellen. Dieser Kontakt regt dann die Stromazellen zur Produktion von IL-6 an, welches das Überleben von Plasmazellen verbessert [6].

Plasmazellen sezernieren als Teil der humoralen Immunantwort Antikörper in Form von Immunglobulinen. Diese Antikörper entsprechen dabei der Passform des B-Zell-Rezeptors, welcher aktiviert wurde. Die Plasmazellen exprimieren kein MHC II mehr und können daher den T-Helferzellen auch keine Antigene mehr präsentieren. Plasmazellen sind also die letzte Differenzierungsstufe der B-Zellen.

## 1.2. Das Multiple Myelom: Symptome, Diagnose und Therapie

Das Multiple Myelom (MM) ist eine Erkrankung, die aus B-Zellen hervorgeht. Es ist eine hämatopoetische Erkrankung, die durch eine monoklonale Vermehrung von Plasmazellen gekennzeichnet ist. Es gehört zur Gruppe der niedrigmalignen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome. Kommen die Myelom Zellen nur solitär vor, so

spricht man von einem Plasmozytom. Das Multiple Myelom ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters. Das mediane Alter der Patienten bei Diagnosestellung beträgt 73 Jahre. Pro Jahr kommt es in Deutschland etwa zu 7-9 Neuerkrankungen/100.000 Einwohner [7]. Männer sind vom MM etwas häufiger betroffen als Frauen. Die Ätiologie der Erkrankung ist momentan noch ungeklärt. Als Risikofaktoren gelten allerdings ionisierende Strahlung, Pestizide und chronische Infektionen.

Ein Multiples Myelom kann sich über viele verschiedene, teilweise sehr unspezifische, Symptome äußern. Auch die Schwere der Symptome schwankt stark. Etwa 25% der Patienten sind bei Diagnosestellung beschwerdefrei [8]. Häufige Symptome sind:

- Fatigue (ca. 40%)
- Knochenschmerzen (ca. 60%)
- Pathologische Frakturen (ca. 10-20%)
- Infektneigung (ca. 10-20%)
- Gewichtsverlust (ca. 25%)
- Nierenfunktionsverschlechterung (ca. 30%) [9]

Die Myelomniere entsteht durch den toxischen Effekt der Leichtketten auf die Nierentubuli. Zusätzlich können sich weitere Leichtketten in den Basalmembranen der Glomeruli ablagern. Es sollten daher regelmäßige Kontrollen des Gesamt-Eiweiß im Urin überprüft werden, um die Nierenfunktion zu kontrollieren [9].

Es können noch viele weitere Symptome auftreten. Die meisten Symptome sind alleine gesehen eher unspezifisch, was eine Diagnosestellung erschwert.

Meist kommt es beim Multiplen Myelom zu einer vermehrten Produktion von monoklonalen Immunglobulinen oder Teilen von diesen, wie den leichten Ketten. Dies nutzt man, um die Erkrankung einzuteilen. Man unterscheidet so zwischen IgG-, IgA-, IgD-, IgE-, IgM- und Leichtkettenmyelomen. Am häufigsten kommen dabei IgG- und IgA-MM vor [10]. Um den Verlauf einer Multiplen Myelom Erkrankung zu verfolgen, kann die Bestimmung der freien Leichtketten im Serum eingesetzt werden.

Die Diagnose des Multiplen Myeloms erfolgt anhand der Kriterien der International Myeloma Working Group. Um die Diagnose Multiples Myelom stellen zu können, müssen die drei folgenden Kriterien erfüllt sein:

- Der Anteil der klonalen Plasmazellen im Knochenmark liegt bei  $\geq 10\%$ .
- Monoklonales Protein ist im Serum oder im Urin nachweisbar.
- Endorganschäden sind vorhanden. Sie werden über die CRAB-Kriterien definiert.

CRAB steht dabei für Hyperkalzämie (hyper **calcemia**), Niereninsuffizienz (**renal insufficiency**), Anämie (**anemia**) und Knochendestruktion (**bone lesions**) [11].

In laborchemischen Untersuchungen bei Patientien mit Multiplem Myelom zeigte sich eine extrem beschleunigte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG). Dies gilt nicht für das Bence-Jones-Myelom, bei dem es nur zur Ausscheidung von Leichtketten kommt. Hierbei sind die BSG und die Serumelektrophorese in der Regel nicht verändert. Im Urin kann zumeist eine Proteinurie nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich zumeist um Bence-Jones-Proteine, die von einem Urinstreifentest nicht erfasst werden. Die Bence-Jones-Proteine finden sich nicht nur bei Leichtketten-MM, dort treten sie immer auf, sondern treten z.B. auch bei 60% der IgG- und IgA-Myelome auf. Als Prognosefaktor und zur Remissionsbeurteilung werden die freien Leichtketten auch im Serum des Patienten bestimmt.

Das Beta2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2-M) ist ein weiterer prognostischer Marker, der bestimmt werden kann. Seine Höhe korreliert mit der Myelomzellmasse und dem Grad der Niereninsuffizienz.

Das Multiple Myelom wird in drei Stadien nach Salmon und Durie eingeteilt [11], wie in Tabelle 1 dargestellt.

	<b>Stadium I</b> (alle genannten Kriterien müssen erfüllt sein, sonst Stadium II)	<b>Stadium II</b>	<b>Stadium III</b> (min. 1 genanntes Kriterium muss erfüllt sein um Stadium III zu erreichen)
<b>Hämoglobin</b>	> 10 g/dL	weder Stadium I noch III	< 8,5 g/dL
<b>Serumkalzium</b>	normal		erhöht
<b>Knochen</b>	normale Struktur oder ein solitärer Herd (Röntgen)	weder Stadium I noch III	fortgeschrittene Läsionen
<b>Myelomprotein</b>	IgG < 50 g/L (Serum) IgA < 30 g/L (Serum) Bence Jones Protein < 4 g/24h (Urin)	weder Stadium I noch III	IgG > 70 g/L (Serum) IgA > 50 g/L (Serum) Bence Jones Protein > 12 g/24h (Urin)
	Zusatzbezeichnung A		Zusatzbezeichnung B
<b>Nierenfunktion</b>	Kreatinin ≤ 2 mg/dL		Kreatinin >2 mg/dL

Tabelle 1: Klassifikation des Multiplen Myeloms in die drei Stadien nach Salmon und Durie [10].

Diese Einteilung ermöglicht es Rückschlüsse auf die Tumormasse zu ziehen. Allerdings kann anhand der Einteilung nach Salmon-Durie keine Aussage zur Prognose des Patienten getroffen werden [12]. So konnten keine signifikanten Unterschiede in der Überlebenszeit zwischen Patienten in Stadium I und II festgestellt werden. In Stadium III ist das Überleben dagegen deutlich eingeschränkt, allerdings sind sehr variable Verläufe möglich.

Um eine bessere Aussage zur Prognose des Patienten machen zu können, kann das Multiple Myelom anhand des International Staging System (ISS), dargestellt in Tabelle 2, eingeteilt werden [13].

<b>Stadium</b>	<b>Kriterien</b>	<b>Definition</b>	<b>Medianes Überleben (Monate)</b>
<b>I</b>	Niedriges $\beta$ 2-M	$\beta$ 2-M < 3,5 mg/L Albumin $\geq$ 3,5 g/dL	62
<b>II</b>	Weder Stadium I noch III	$\beta$ 2-M < 3,5 mg/L Albumin < 3,5 g/dL oder $\beta$ 2-M = 3,5 mg/L bis < 5,5 mg/L	44
<b>III</b>	Hohes $\beta$ 2-M	$\beta$ 2-M $\geq$ 5,5 mg/L	29

Tabelle 2: Klassifikation des Multiplen Myeloms anhand des International Staging System (ISS) in drei Gruppen [12].

Die mittlere Überlebenszeit beträgt ca. 10 Jahre nach der Erstdiagnose bei Patienten < 65 Jahre. Zur Therapie des Multiplen Myeloms stehen immer noch relativ wenig Möglichkeiten zur Verfügung.

Die Therapie-Indikation wird anhand der CRAB Kriterien gestellt:

- C: Hyperkalziämie > 2,75 mmol/L
- R: Niereninsuffizienz  $\geq$  2,0 mg/dL
- A: Anämie Hb < 10,0 g/L, typischerweise normochrom und normozytär
- B: Knochenbeteiligung

Die Indikation zur Therapie kann bereits bei nur einem vorhandenen Kriterium gestellt werden. Zusätzlich gelten alle Beschwerden, die durch das Multiple Myelom ausgelöst werden und durch eine Therapie gebessert werden können, als Behandlungsindikation. Dazu zählen zum Beispiel Schmerzen, die durch das Multiple Myelom bedingt sind, oder ein Hyperviskositätssyndrom.

Die Therapie des Multiplen Myeloms greift an verschiedenen Stellen der Tumorzellentstehung und Proliferation ein. Momentan geht man davon aus, dass die beste Prognose mit einer Hochdosis-Melphalantherapie und anschließender autologer Stammzelltransplantation erreicht werden kann. Eine Altersgrenze, bis wann ein Patient in die Hochdosis-Therapie eingeschlossen werden kann, konnte bisher nicht festgelegt werden, obwohl sich viele Studien intensiv mit dieser Fragestellung beschäftigt haben [14, 15]. Ob ein Patient für die Hochdosis-Therapie geeignet ist, hängt von seinem gesamten Gesundheitszustand und seiner körperlichen Verfassung ab. Da das Multiple Myelom eine Erkrankung des höheren Lebensalters ist und nicht alle Patienten in die autologe Stammzelltransplantation eingeschlossen werden können, werden dennoch weitere Therapiemöglichkeiten dringend benötigt. Für diese Patienten-Gruppe werden zurzeit Melphalan-haltige Therapien in Kombination mit neuen Substanzen eingesetzt. Zu diesen neuen Substanzen gehören u.a. der Proteasom-Inhibitor Bortezomib und der Immunmodulator Lenalidomid in Kombination mit Dexamethason [16-18]. Diese haben allerdings schwerwiegende Nebenwirkungen. So kann es bei Lenalidomid beispielsweise zu einer Reaktivierung von Virusinfektionen wie Hepatitis B kommen [19]. Trotz der neuen Therapiemöglichkeiten kommt es bei weit über der Hälfte der Patienten zu einem Rezidiv [20].

Als Third-Line Therapie kommt bei einem weit fortgeschrittenen Multiplen Myelom unter anderem der HDAC-Inhibitor Panobinostat zum Einsatz. Über welchen Wirkmechanismus die HDAC-Inhibitoren ihre Wirkung am Multiplen Myelom entfalten, ist zurzeit noch nicht geklärt. Panobinostat ist ein unselektiver HDAC-Inhibitor, der in der Regel in einer Kombinationstherapie zusammen mit Bortezomib und Dexamethason eingesetzt wird [21, 22]. Die häufigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) von Panobinostat sind: Fieber, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Müdigkeit, Appetitmangel und periphere Ödeme. Die HDAC-Inhibitoren führen zu einer relativ kurzwirkenden Therapieverbesserung [21]. Eine Verbesserung in ihrer Wirksamkeit und eine Minderung ihrer UAW wäre also erstrebenswert.

Ergänzend zur Chemotherapie kann eine Strahlentherapie beim Multiplen Myelom zum Einsatz kommen. Auch eine operative Kyphoplastie zur Stabilisierung der Wirbelsäule kann erwogen werden. Dies entspricht allerdings nur einer Symptomlinderung und hat keinen kurativen Ansatz. Generell ist der Einsatz von Bisphosphonaten bei Patienten mit Knochenbeteiligung indiziert. So kann die Rate der Skelett ereignisse deutlich reduziert werden, was eine klare Verbesserung der Lebensqualität bedeutet.

In den letzten Jahren konnten deutliche Fortschritte in der Behandlung des Multiplen Myeloms erreicht werden. Diese Fortschritte reichen allerdings noch nicht für alle Patientengruppen aus.

#### 1.2.1. Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS)

Meistens geht dem Multiplen Myelom eine monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) voraus. Das MGUS ist definiert als ein Nachweis kompletter oder inkompletter, monoklonale Immunglobuline im Serum der Patienten, die dabei allerdings keine klinischen Symptome zeigen. Das MGUS ist also i.d.R. ein Zufallsbefund und hat keinen Krankheitswert. Es sind etwa 1-3% aller Menschen > 50 Jahre davon betroffen. Bei Männern findet sich ein MGUS etwas häufiger als bei Frauen [23].

Etwa 1% der Schwerketten-MGUS geht pro Jahr in ein behandlungsbedürftiges Multiples Myelom oder eine andere lymphoproliferative Erkrankung über [24]. Der wichtigste Risikofaktor für den Progress eines MGUS scheint dabei die Höhe der Paraproteine zu sein, also die monoklonalen Immunglobuline, auch M-Proteine genannt [25]. Liegen die M-Proteinwerte > 25 g/L liegt das Progressionsrisiko nach 20 Jahren bei ca. 50%. Dahingegen liegt das Progressionsrisiko bei M-Protein-Werten < 5 g/L nach 20 Jahren nur bei 15% [25]. Liegt ein Leichtketten-MGUS vor, beträgt das Progressionsrisiko zur lymphoproliferativen Erkrankung nur bei 0,3% pro Jahr.

Patienten bei denen ein MGUS festgestellt wird, werden je nach Risikokonstellation weiter überwacht, um eine lymphoproliferative Erkrankung möglichst frühzeitig erkennen und behandeln zu können.

Trotz der stetigen Weiterentwicklung der Therapien des Multiplen Myeloms werden dringend neue Therapieansätze benötigt. Die dafür nötige Forschung wird u.a. an verschiedenen Zelllinien durchgeführt.

### 1.3. SLy2 – ein Mitglied der SLy-Protein-Familie

In der Veröffentlichung von Noll et al. wurde SLy2 als Tumorsuppressorgen im Multiplen Myelom beschrieben [26]. Dazu wurden die beiden Mausstämme C57BL/6 und C57BL/KaLwRij verglichen. Hierbei zeigte sich in den C57BL/KaLwRij Mäusen, sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene, eine signifikant niedrigere SLy2-Expression, als in den C57BL/6 Mäusen. Es zeigte sich, dass die C57BL/KaLwRij Mäuse spontan ein Multiples Myelom entwickeln können. Dies ist auffällig, da diese spontane Entwicklung eines MM in noch keinem anderen Zusammenhang nachgewiesen werden konnte. So entstand die Hypothese, dass ein Mangel an SLy2 eine Voraussetzung für die Entwicklung eines Multiplen Myeloms ist. Noll et al. haben überprüft, in wie weit sich die Erkenntnisse aus der Maus auch auf den Menschen übertragen lassen. Dabei zeigte sich, dass die SLy2-Expression in Patienten mit Multiplen Myelom, im Vergleich zu Patienten mit MGUS oder zu gesunden Kontrollen signifikant reduziert war. Zudem konnte beobachtet werden, dass SLy2 eine Rolle in der Zelladhäsion und Proliferation der Tumorzellen spielt. Zusammenfassend beschreiben Noll et al. SLy2 als ein Tumorsuppressorgen [26]. Dies steht allerdings im Widerspruch zu früheren Studien, die zeigten, dass SLy2 bei Patienten mit Leukämien oder Multiplen Myelom in gesteigerter Menge vorkommt [27, 28]. Dies könnte jedoch auch durch die große genetische Heterogenität des Multiplen Myeloms erklärt werden. Noll et al. führten dazu Studien mit einem Patientenkollektiv von 34 Patienten durch. Dabei zeigte sich, dass die Patienten mit den niedrigsten SLy2-Werten die schlechtesten Überlebensraten hatten.



Allerdings zeigten die Maus-Experimente von Noll et al. auch, dass nur ein kleiner Prozentsatz der C57BL/KaLwRij Mäuse spontan ein Multiples Myelom entwickelte [26]. Es scheint also noch weitere Mechanismen zu geben, die das Tumorstadium im Multiplen Myelom beeinflussen.

Die SLy-Protein-Familie besteht aus den drei Adaptorproteinen SLy1 (SH3 protein expressed in lymphocytes 1), SASH1 (SAM and SH3 containing 1) und SLy2 (SH3 protein expressed in lymphocytes 2). SLy2 wird auch SAMSN1, NASH1 oder HACS1 genannt [28]. Alle drei Proteine sind sich sehr ähnlich. Sie besitzen alle ein Nukleäres-Lokalisations-Signal (NLS). SLy1 und SLy2 zeigen zusätzlich noch ein Nukleäres-Export-Signal (NES). Alle drei weisen weitere Protein-Protein-Interaktions-Domänen auf. Bei SLy1 und SLy2 findet sich jeweils eine SAM- und eine SH3-Domäne, bei SASH1 sind dagegen zwei SAM-, eine SH3- und eine coiled-coil-Domäne zu finden. Die SAM-Domäne findet sich bei SLy2 in der C-terminalen Region und die SH3-Domäne in der Mitte des Proteins [28].

SASH1 wird in fast allen Geweben exprimiert. SLy1 findet sich dagegen nur in Lymphozyten und spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Aktivierung von Immunzellen, aber auch bei der Infektabwehr und Tumorsurveillance [29-34].

SLy2 wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert. Es findet sich in hämatopoetischen Geweben, Muskel, Herz, Gehirn, Lunge, Pankreas, Endothelzellen und Myelomen [28]. Im humanen Genom, wird *SLy2* auf Chromosom 21q11.2 kodiert und besteht aus mindestens 9 Exons. In der SLy2-kodierenden Region kommt es in hämatopoetischen Tumoren häufiger zu Translokationen. Das SLy2-Protein besteht aus 441 Aminosäuren und ist 49,5 kDA groß [28].

SLy2 weist eine Bindungsstelle für das 14-3-3 Protein auf, welches den Nukleo-Zytoplasmatischen Shift von SLy2 reguliert. Außerdem zeigte sich, dass SLy2 im Nukleus mit dem SAP30/HDAC1-Komplex interagiert und auf diesem Weg die Aktivität von HDAC1 reguliert [35].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die SH3 Domäne des SLy2 von großer Bedeutung für das Ausbreiten und die Polarisierung der B-Zelle ist. Dies konnte auf eine wichtige Rolle von SLy2 bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts zurückgeführt werden. Eine SLy2 Überexpression verhindert dabei, dass die B-Zellen sich vergrößern [36].

Es konnte bereits eine wichtige Rolle für SLy2 in B-Zellen gezeigt werden, im Besonderen in der B-Zellaktivierung und Differenzierung [37]. Darüber hinaus wird SLy2 nach B-Zell-Aktivierung hochreguliert. Diese IL-4 vermittelte Hochregulierung von SLy2 ist dabei STAT6 abhängig [37].

In SLy2-defizienten Mäusen konnte eine gesteigerte Immunantwort gezeigt werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass SLy2 ein Immuninhibitor ist [38]. Es konnte dagegen auch gezeigt werden, dass Mäuse, die SLy2 überexprimieren, niedrigere basale Level an IgM aufweisen und auch weniger stark auf eine Immunisierung mit Pneumokokken reagieren [39].

In der Darstellung von SLy2 als Tumorsuppressorgen oder Proto-Onkogen finden sich kontroverse Studien. So wurde SLy2 zum einen als Tumorsuppressor in Lungenkrebs und im Multiplen Myelom beschrieben [26, 40]. Die Interaktion von SLy2 mit HDAC1 führt zu einer gesteigerten HDAC1-Aktivität [35]. Diese gesteigerte HDAC1-Aktivität führt zu einem verminderten Ablesen seiner Downstream-target-Gene. Diese sind z.B. p21 und p57. Beide wirken als antiproliferative Mediatoren. Über die Interaktion von SLy2 und HDAC1 könnte durch p21 und p57 eine gesteigerte Proliferation vermittelt werden.

Außerdem konnte in früheren Arbeiten nachgewiesen werden, dass SLy2 in einigen Leukämieformen gesteigert exprimiert wird [27, 28].

Allerdings ist SLy2 immer noch ein wenig verstandenes Adaptorprotein dessen weitreichenden Interaktionen weiterer Forschung bedürfen.

#### 1.3.1. Die Multiplen Myelom Zelllinien JK6L, U266 und RPMI 8226

SLy2 kommt in verschiedenen Multiplen Myelom Zelllinien vor, wie z.B. den JK6L, U266 und RPMI 8226 Zelllinien. An diesen wird u.a. weitere Forschung zu SLy2

und seinen Interaktionen betrieben. Dabei handelt es sich um humane Multiple Myelom Zelllinien. Sie wurden alle drei aus männlichen Patienten gewonnen.

Die JK6L Zelllinie exprimiert wenig SLy2 und stammt aus einer hochmalignen Form des Multiplen Myeloms. Im Lichtmikroskop zeigen sich einzelne, runde Zellen.

Auch die U266 Zellen exprimieren wenig SLy2, da hier 100% der CpGs des SLy2-Promotors methyliert sind [26]. Die U266 Zelllinie wurde 1968 ebenfalls aus einer hochmalignen Form des Multiplen Myeloms erzeugt. Der Patient war 53 Jahre alt. Es handelte sich um ein IgE-produzierendes Multiples Myelom. Außerdem produzieren die Zellen IL-6. Im Lichtmikroskopischen Bild zeigen sich runde bis polygonale einzelne oder in Cluster-organisierte Zellen. Die Verdopplungszeit der Zellen beträgt ca. 55 h [41].

Die RPMI 8226 Zellen exprimieren viel SLy2. Hier sind die CpG-Bereiche des SLy2-Promotors nur zu 28% methyliert [26]. Die Zelllinie entstammt einem 61-jährigen Patienten, der die Diagnose Multiples Myelom 1966 erhielt. Es handelte sich dabei um ein niedrigmalignes MM. Die RPMI 8226 Zellen produzieren zudem Leichtketten von  $\lambda$ -Typ. Dies ist bei den anderen beiden Zelllinien nicht bekannt. Im Lichtmikroskop zeigen sich die Zellen einzeln oder in kleinen Ketten und Clustern angeordnet. Die Verdopplungszeit der Zellen beträgt ca. 60-70 h [42, 43].

Eine Mutation des Tumorsuppressorgens pRB (Retinoblastom) findet sich in den U266 und RPMI 8226 Zellen.

### 1.3.2. Zellstimulierende Faktoren IL-6 und APRIL

IL-6 ist ein Entzündungsmediator der auf Chromosom 7p21 kodiert ist. Das Gen besteht aus 5 Exons und das Protein ist 184 Aminosäuren lang. Es ist ein Akute-Phase-Protein und ein Lymphozyten-stimulierender Faktor. Die Bildung von IL-6 wird durch Prostaglandin-E2 verstärkt. Es hat dabei proapoptotische und antiapoptotische Wirkungen auf Leukozyten. Des Weiteren reguliert es die Differenzierung, Proliferation, Polarisierung und IgG-Sekretion von B-Zellen.

IL-6 ist ein wichtiger Wachstumsfaktor in humanen Myelom-Zellen und verhindert deren Apoptose [44]. Seine Funktion vermittelt IL-6 dabei über das dephosphorylierte pRB. Dabei sind die Stromazellen des Knochenmarks (BMSC) die Hauptlieferanten des IL-6. Binden Multiple Myelomzellen an BMSC, induziert dies die IL-6 Synthese und Sekretion. IL-6 fördert parakrin das Wachstum, Überleben und die Medikamentenresistenz der Multiplen Myelomzellen im Milieu des Knochenmarks [45, 46]. IL-6 mRNA und Protein konnte in Myelomzellen von Patienten des MM oder MGUS nachgewiesen werden, nicht jedoch in gesunden Plasmazellen. Dabei korreliert die Serum-IL-6-Konzentration mit der Tumorzellmasse, dem Krankheitsstadium und der Prognose beim Multiplen Myelom [47].

APRIL ist ebenfalls ein zellstimulierender Faktor. Es ist auf Chromosom 17p13.1 kodiert und wird auch CD256 genannt [48]. APRIL ist wichtig für die B-Zellentwicklung und das Langzeitüberleben der Plasmazellen im Knochenmark. APRIL entfaltet seine Wirkung über den TNFRSF17 Rezeptor und kann über die Interaktion mit anderen TNF-Rezeptorfamilien die Apoptose induzieren. Ein monoklonaler anti-APRIL Antikörper befindet sich momentan in einer klinischen Phase I Studie. Er soll zur Therapie des MM eingesetzt werden [49].

## 1.4. HDAC1 und seine Downstream-target Gene

### 1.4.1. HDAC1, ein Mitglied der HDAC Familie

Ein weiterer Mechanismus über den SLy2 wirken kann, ist seine Interaktion mit HDAC1, die von Brandt et al. [35] nachgewiesen werden konnte. Dabei wurde gezeigt, dass durch die Interaktion mit SLy2 die Aktivität der HDAC1 gesteigert werden konnte [35].

HDAC1 ist Teil der HDAC-Familie. Die Histon-Deacetylase (HDAC) ist ein Enzym, welches die Acetylgruppen von Lysin-Resten an N-terminalen Enden von Histonen entfernt. Dadurch kommt es zu einer Verdichtung des Chromatins und die DNA-Transkription wird herunterreguliert. Die Enzyme für die Acetylierung

der Lysin-Reste sind die Histon-Acetyltransferasen (HATs). Beide Enzymgruppen binden nicht direkt an die DNA, sondern werden an bestimmte Lokalisationen innerhalb der DNA rekrutiert und bilden dort mit weiteren Proteinen einen Komplex.

Es gibt elf klassische Zink-enthaltende HDAC-Enzyme, die in vier Untergruppen aufgeteilt werden:

Klasse I HDACs: HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8

Klasse IIa HDACs: HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9

Klasse IIb HDACs: HDAC6, HDAC10

Klasse IV HDAC: HDAC11

HDACs die zinkunabhängig sind, werden der Klasse III zugeteilt. Diese sind dann jedoch NAD<sup>+</sup>-abhängig. Die Sirtuine 1-7 bilden die Klasse III der HDACs.

HDAC1 und HDAC2 sind für die B-Zellentwicklung wichtig. Indem sie an die Promotoren ihrer Downstream-target Gene binden werden diese in geringerem Maße exprimiert. Da die Downstream-target Gene von HDAC1, wie p21 und p57, den Zellzyklus inhibieren, würde eine gesteigerte HDAC1 Aktivität u.a. eine vermehrte Proliferation der Zelle bedingen. HDAC1 und HDAC2 fördern so die Progression von der G1- zur S-Phase. Es konnte beobachtet werden, dass wiederum eine Blockierung von HDAC1 und HDAC2 zu einer Hochregulierung der Downstream-target Gene p21<sup>WAF1/CIP1</sup> und p57<sup>Kip2</sup> führt [50]. Dies bedingt dann einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Sind HDAC1 und HDAC2 vorhanden, binden diese an die Promotoren von p21<sup>WAF1/CIP1</sup> und p57<sup>Kip2</sup> und regulieren so deren Expression. Über diesen Mechanismus regulieren die HDACs die Zellzyklusprogression. Fehlt nur eines der beiden HDACs kann das jeweils andere durch eine gesteigerte Expression den Verlust ausgleichen. In ruhenden Zellen spielt der Verlust von HDAC1 und HDAC2 keine Rolle [50, 51]. HDACs regulieren aber nicht nur die B-Zell-Entwicklung. So spielt HDAC7 eine Schlüsselrolle in der T-Zellreifung [52].

#### 1.4.2. Downstream-target Gene der HDAC1

Downstream-target Gene von HDAC1 werden in ihrer Genexpression durch HDAC1 beeinflusst. HDAC1 bindet dazu an den Promotor seiner Downstream-target Gene und verhindert so deren Transkription. Dadurch kommt es zu einer verminderten Expression dieser Genprodukte.

Ein wichtiges Ziel von HDAC1 und HDAC2 ist der p21-Promotor auf Chromosom 6p21.2. Das Protein p21 inhibiert CDK2 und CDK1 und reguliert so die Zellzyklus Progression von der G1- in die S-Phase. Es kann zu einem Wachstumsarrest und zellulärer Seneszenz führen. Die *p21* Expression wird eng durch p53 kontrolliert. Es gibt jedoch auch eine p53-unabhängige Bildung von p21. Ein von p21 ausgelöster Wachstumsarrest kann zur zellulären Differenzierung führen. Alles in allem entspricht die Wirkung von p21 also eher einer tumorhemmenden Wirkung.

Ein weiteres Downstream-target Gen von HDAC1 ist p27. Dieses bindet und inhibiert die E-CDK2 und D-CDK4 Komplexe. p27 kontrolliert so die Zellzyklusprogression in der G1-Phase. Es weist strukturelle Ähnlichkeiten zu p21 und p57 auf. Extrazelluläre Wachstumsfaktoren, die die Zellteilung fördern, führen generell zu einer verminderten Transkription und Translation von *p27*. Eine Mutation im *p27* Gen führt zu einer unkontrollierten zellulären Proliferation. Es ist also davon auszugehen, dass p27 ein Tumorsuppressorgen ist. Diese These wird auch dadurch unterstützt, dass *p27* in Tumorzellen oft inaktiviert ist [53].

p57, auch Kip2 genannt, ist ein weiteres Downstream-target Gen der HDAC1. Es ist ein negativer Regulator der Zellproliferation und bindet fest an verschiedene G1 Cyclin/cdk-Komplexe. Eine Mutation im *p57* Gen führt zu einer unkontrollierten zellulären Proliferation. *p57* wird damit ebenfalls zu den Tumorsuppressorgen gerechnet.

Der „Wächter des Genoms“, p53, ist ein weiteres Downstream-target Gen der HDAC1. Es ist in allen Wirbeltieren zu finden und reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Zellzykluskontrollgenen. Diese sind an der Apoptose oder der DNA-Reparatur beteiligt. p53 ist auf Chromosom 17p13.1 kodiert. Kommt es zu einer DNA-Schädigung, wird p53 posttranslational stabilisiert und akkumuliert so in der Zelle. Dadurch werden zum einen die DNA-Reparaturmechanismen aktiviert und zum anderen wird der Zellzyklus gestoppt. Dieser Stopp des Zellzyklus wird von p53 über p21 vermittelt. Ist die DNA-Reparatur abgeschlossen, sinkt der p53 Spiegel wieder und der Zellzyklus kann fortgesetzt werden. Ist eine Reparatur der DNA nicht mehr möglich, bleibt das Absinken des p53 Spiegels aus. Es kommt zu einer starken Akkumulation von p53. Zusammen mit weiteren Faktoren führt dies dann zu einer Aktivierung der Apoptose. p53 aktiviert dabei Gene der Bcl-2-Familie, welches die Aktivität der Caspasen induziert. Dadurch kommt es zur Apoptose. p53 ist einer der wichtigsten Tumorsuppressorgene und in fast jeder Tumorentität mutiert.

Ein weiteres Downstream-target Gen von HDAC1 ist das *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) Gen. Aktiviert wird STAT3 durch eine Phosphorylierung durch JAK an seinem Tyrosin 705. Dies kann z.B. durch EGF, IL-5 oder IL-6 ausgelöst werden. STAT3 spielt eine Schlüsselrolle in zellulären Prozessen, wie dem Zellwachstum und der Apoptose. Es ist von einer Tumorsuppressorfunktion des STAT3 auszugehen.

#### 1.4.3. Inhibitoren und Einsatz in der Klinik

Die Wirkung von HDACs kann durch Inhibitoren gehemmt werden. Die HDAC-Inhibitoren haben proapoptotische und antiproliferative Effekte auf Tumorzellen. Zudem induzieren sie die Differenzierung in Leukämiezellen. Sie können die Apoptose über den extrinsischen oder intrinsischen Weg aktivieren und so ihre

zytotoxische Wirkung entfalten. Die HDAC-Inhibitoren scheinen zusätzlich die Tumorzellen für die Zelltod-Signale empfindlicher zu machen.

Der extrinsische Weg der Apoptose wird von den HDAC-Inhibitoren durch die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) in Tumorzellen ausgelöst. Zusätzlich konnte die extrinsische Apoptose durch HDAC-Inhibitoren mit dem TRAIL-R1/R2 und Fas-vermittelten Zelltod in Verbindung gebracht werden [54]. Mit der TRAIL-Induktion korreliert dabei die Induktion des G1-Arrests und der Apoptose. Durch einen knock-down von TRAIL konnte die apoptotische Wirkung von HDAC-Inhibitoren herabgesetzt werden. Dabei wurde die Zellzyklusprogression aber nicht beeinflusst [54]. Den intrinsischen Weg der Apoptose fördern die HDAC-Inhibitoren durch die Hochregulierung von proapoptischen Bcl-2-Familienmitgliedern. Dazu gehören Bax und Bak. Des Weiteren senken die HDAC-Inhibitoren die antiapoptischen Bcl-2-Familienmitglieder wie Bcl-2 und Bcl-xl. HDAC-Inhibitoren arrestieren mitotische Zellen in der G1-Phase. Dieser Effekt wird zumindest zum Teil durch eine Hochregulierung von  $p21^{WAF1/CIP1}$  vermittelt [52]. Ein knock-down von  $p21^{WAF1/CIP1}$  führt zu einem G1-Arrest, hat aber keinen Einfluss auf die von den HDAC-Inhibitoren induzierte Apoptose und nur minimale Auswirkungen auf die Differenzierung [54].

HDAC-Inhibitoren, wie Vorinostat, Entinostat, Mocetinostat, werden aufgrund ihrer antiproliferativen und proapoptischen Effekte schon heute zur Therapie verschiedener Malignome eingesetzt [46, 55, 56]. Dies findet im Moment noch v.a. im Rahmen von Studien statt. Vorinostat (SAHA) ist bereits für die 3. Linie der Therapie des T-Zelllymphoms zugelassen. Es befindet sich in der klinischen Studie zur Therapie des Darmkrebses und HIV. SAHA ist ein HDAC-Inhibitor, der direkt im katalytischen Zentrum der HDACs bindet. SAHA führt zu einer Akkumulation acetylierter Histone im Chromatin des  $p21^{WAF1/CIP1}$  Gens und führt so zu einer gesteigerten  $p21^{WAF1/CIP1}$  Expression. Dabei wird nicht nur die Gen Transkription gesteigert, sondern auch die mRNA und Protein Menge von  $p21^{WAF1/CIP1}$ . Die Expression von *Actin* und *p27* konnte durch SAHA nicht gesteigert werden. SAHA blockiert jedoch die IL-6 Produktion der Knochenmarksstromazellen [46, 57].



Zum Einsatz von Entinostat (MS-275) zur Therapie bei Mammakarzinom, Lungenkarzinom, Darmkarzinom, Pankreaskarzinom und Leukämien finden ebenfalls klinische Studien statt.

Auch Mocentinostat befindet sich in der Phase der klinischen Studien. Es wird beim Follikulären Lymphom, Hodgkin-Lymphom und bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) erprobt. Diese HDAC-Inhibitoren führen, wie andere Chemotherapeutika auch, zu unerwünschten hämatologischen Nebeneffekten, wie Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie. Außerdem kann es zu gastrointestinalen Beschwerden und Fatigue kommen [51, 56].

In Tübingen wird zur Therapie des Multiplen Myeloms Panobinostat eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen nicht-selektiven HDAC-Inhibitor. Panobinostat ist ein Substrat von CYP3A4, hat eine Halbwertszeit (HWZ) von 37 h und eine Bioverfügbarkeit (BV) von 21%. Es wird in der 3. Linie bei weit fortgeschrittenen Erkrankungen in Kombination mit Bortezomib und Dexamethason eingesetzt. Hierbei kann durch Panobinostat eine Verbesserung der Therapieergebnisse erreicht werden. Allerdings ist dieser Erfolg relativ kurz wirksam. Die häufigsten UAWs bei einer Therapie mit Panobinostat sind: Fieber, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Müdigkeit, Appetitmangel, Panzytopenie und periphere Ödeme [22]. HDAC-Inhibitoren sind zur Therapie von hämatologischen Neoplasien einsetzbar, sollten allerdings noch spezifischer verwendet werden können, um die Nebenwirkungen zu minimieren.

Durch den Einsatz von HDAC-Inhibitoren kann die Proteinexpression an Downstream-target Genen von HDAC1 gesteigert werden. So kann z.B. durch SAHA oder Trichostatin A (TSA) die Expression der Downstream-target Proteine p21, p53, p27 und das phosphorylierte Retinoblastom (pRB) Protein in Multiplen Myelomzellen gesteigert werden. Die zytotoxischen Effekte dieser HDAC-Inhibitoren sind unabhängig von Caspase und Calpain [55].

Durch Inkubation der RPMI 8226 und U266 Zellen mit dem HDAC-Inhibitor TSA konnte die p21<sup>WAF1/CIP1</sup> Menge gesteigert werden. Die Induktion der p21<sup>WAF1/CIP1</sup> Menge und der Apoptose ist dabei unabhängig vom Zellstimulator IL-6 [58].

Obwohl IL-6 ein wichtiger Mediator des Zellwachstums und -überlebens von Multiplen Myelom Zellen ist, kann in Zellen, die mit IL-6 stimuliert werden über p21 die Apoptose ausgelöst werden. Somit muss eine Zellstimulation mit IL-6 der Induktion der Apoptose über verschiedene Mechanismen nicht im Weg stehen. Ganz im Gegenteil, wäre es so denkbar, dass durch die Stimulation mit IL-6 über einen Mediator p21 gesteigert werden kann und dadurch über IL-6-Stimulation die Apoptose ausgelöst werden kann.

## 1.5. Zielsetzung der Arbeit

In einigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die SLy2-Expression in Multiplen Myelom-Zellen erhöht ist [27, 28]. In neueren Studien konnte eine niedrige SLy2-Expression in Multiplen Myelom Zellen mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht werden [26]. Höhere SLy2-Expressionen waren hier in gesunden Kontrollprobanden, MGUS-Patienten und Patienten mit weniger aggressiven MM-Varianten zu finden [26].

Zudem interagiert SLy2 mit HDAC1 und steigert so dessen Aktivität [35]. Da dadurch weniger Downstream-target Gene wie p21, p27 und p57 exprimiert werden, sollte es zu einer gesteigerten Proliferation der Tumorzellen kommen.

Aus diesen und weiteren vorangegangenen Publikationen ergibt sich die Frage, ob SLy2 im Multiplen Myelom wirklich als Tumorsuppressor, wie von Noll et al. beschrieben [26], fungiert. Zudem bleibt offen, wie man SLy2 in Multiplen Myelom Zellen steigern kann und welche Auswirkungen seine Interaktion mit HDAC1 auf die Downstream-target Gene hat.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen im Zusammenhang mit den zuvor erbrachten Vorarbeiten die Rolle und Funktionsweise des Adapterproteins SLy2 weiter entschlüsseln.

Dazu soll die Proliferation verschiedener MM-Zelllinien untersucht werden. Zum einen, wenn SLy2 durch Stimulation überexprimiert wird und zum anderen, wenn SLy2 durch siRNA-Transfektion reduziert wird. Ebenso soll die Lokalisation von SLy2 innerhalb der Zelle nach Stimulation mit IL-6 oder APRIL untersucht werden.

Zudem soll die HDAC-Aktivität in stimulierten MM-Zellen bestimmt werden. In diesem Zusammenhang soll auch die Expression der Downstream-target Gene von HDAC1 mittels qPCR analysiert werden. Außerdem soll die IgLc-Produktion in Zellen überprüft werden, die viel SLy2 exprimieren. Anschließend soll die SLy2-Expression durch eine Transfektion mit siRNA gesenkt werden und dieselben Parameter erneut geprüft werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Laborgeräte

Name	Hersteller	Ort
Amaxa Nucleofector II	Lonza	Basel, Schweiz
BD FACScanto II Flow Cytometer	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
Casy	OMNI Life Science	Bremen, Deutschland
Dry bath FB15103	Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Gel Doc Device	BioRad	München, Deutschland
Light Cyclers 480 II	Roche	Mannheim, Deutschland
Mikroskop Primo Vert	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
MS1 Minishaker	IKA	Staufen im Breisgau, Deutschland
MyCycler thermal cyclers	BioRad	München, Deutschland
NanoDrop Lite	Peqlab	Erlangen, Deutschland
peqSTAR 2x Gradient Thermocycler	Peqlab	Erlangen, Deutschland
Power-Pac Basic	BioRad	München, Deutschland
Power-Pac HC	BioRad	München, Deutschland
RM5 230VAC	CAT	Staufen im Breisgau, Deutschland
Rotamax 120	Heidolph	Schwabach, Deutschland
Sunrise	Tecan	Crailsheim, Deutschland
Versa Doc Imaging System 4000MP	BioRad	München, Deutschland
VIBRAX-VXR	IKA	Staufen im Breisgau, Deutschland
Victor 2	Perkin Elmer	Waltham, USA
W12 Wasserbad	Medingen	Arnsdorf, Deutschland
<i>Zellkultur</i>		
CO <sub>2</sub> Incubator	Sanyo	Hamburg, Deutschland
HERAcell	Heraeus	Hanau, Deutschland
HERAsafe HS12 clean bench	Heraeus	Hanau, Deutschland
HERAsafe KS18 clean bench	Thermo scientific	Schwerte, Deutschland

LaminAir HA2448GS	Heraeus	Hanau, Deutschland
<i>Zentrifugen</i>		
Avanti J-26 XP	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
Biofuge fresco	Heraeus	Hanau, Deutschland
Centrifuge 5424R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5430	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5702R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5810R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Heraeus Pico 17	Thermo Scientific	Schwerte, Deutschland
Sprout	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland

## 2.2. Verbrauchsmaterialien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
5ml Polystyrene Round-Bottom Tube 12×75mm style Cat: 352008	Falcon	Berlin, Deutschland
96 well, PCR-Plate, PP, white Cat: 669285	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
AMPLiseal Transparente Microplatten Abdeckfolie 141,3/79,44 mm Cat: 676040	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Casy Cups 22x65 Cat: 5651794	OLS	Bremen, Deutschland
Cell Culture Dishes, PS, 100×20 mm, with vents Cat: 664160	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Costar 96 well EIA/RIA Plate, Flat bottom without lid, high binding Cat: 3590	Corning	New York, USA
PS-Microplatte 96 well, F-Form Cat: 655101	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland

Röhrchen 15 ml Cat: 188271	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Röhrchen 50 ml Cat: 227261	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Zellkultur Multiwellplatte, 6 well Cat: 657160	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Zellkultur Multiwellplatte, 12 well Cat: 665980	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Zellkultur Multiwellplatte, 24 well Cat: 662160	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Zellkultur Multiwellplatte, 96 well, F-bottom Cat: 665180	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
<i>Pipetten</i>		
Aspirationspipette 2 ml, ohne Grad Cat: 710183	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Pipette mit Spitze 2 ml Grad 1/100 ml Cat: 710180	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Pipette mit Spitze 5 ml Grad 1/10 ml Cat: 606180	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Pipette mit Spitze 10 ml Grad 1/10 ml Cat: 607180	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Pipette mit Spitze 25 ml Grad 2/10 ml Cat: 760180	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Pipette mit Spitze 50 ml Grad ½ ml Cat: 768180	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
<i>Pipettenspitzen</i>		
10 µl Pipettenspitzen Cat: 771250	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
10 µl XL Filter Tips Cat: 777261	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland

Pipettenspitzen für Gel Loading mit 25 mm Kapillare Cat: 613-0257	VWR	Ulm, Deutschland
epT.I.P.S. Standard/Bulk 200-300 µl Cat: 003000.900	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl Cat: 70.760.002	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 1000 µl Cat: 70.762	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
Sterile aerosol Pipettenspitzen für 100 µl Cat: 701061	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Sterile aerosol Pipettenspitzen für 1000 µl Cat: 701081	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
<i>Reaktionsgefäße</i>		
PCR SingleCap 8er-Soft Strips 0,2 ml farblos Cat: 710970X	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reaction Tubes, 2 ml Cat: 623 201	Greiner bio-one	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml Cat: 72.690.001	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
Reagiergefäß 2,0 ml Cat: 72.691	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
Safe-lock Tubes 1,5 ml Cat: 0030 120.086	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Safe-lock Tubes 2,0 ml Cat: 0030 120.094	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml Cat: 72.706	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml Cat: 72.695.500	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland

## 2.3. Chemikalien und biologische Kits

### 2.3.1. Chemikalien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
4x Laemmli Sample Buffer Cat: 161-0747	BioRad	München, Deutschland
Acrylamid Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1) Cat: 3029.1	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Amersham Protran Supported 0,45 µm NC Cat: 10600016	GE Healthcare	München, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat Cat: 1.01201.0500	Merck	Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol 50mM	Gibco® Life technologies	Darmstadt, Deutschland
Blue Star Plus Prestained Protein Marker 500 µl Cat: MWP04	Nippon Genetics Europa	Düren, Deutschland
CASY ton Cat: 5651808	OLS	Bremen, Deutschland
cOmplete Tablets; Protease Inhibitor Cocktail Tablets Cat: 04693124001	Roche	Mannheim, Deutschland
Dimethylsulfoxide	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Dulbecco's phosphate buffered saline Cat: D8537 500ml	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
FACS Clean Cat: 340345	BD Bioscience	Mannheim, Deutschland
FACS Flow Cat: 342003	BD Bioscience	Mannheim, Deutschland



FACS Rinse Cat: 340346	BD Bioscience	Mannheim, Deutschland
Fetal Bovine Serum Standard Quality Cat: A15-101 Lot. No A10109-0977	PAA	Pasching, Österreich
HyClone RPMI-1640 Medium (1x) ohne L-Glutamin Cat: SH30096.01	GE Healthcare	München, Deutschland
L-Glutamine 200 mM Cat: M11-004	GE Healthcare	München, Deutschland
Methanol Cat: 20847.307	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Milchpulver Blotting grade Cat: T145-3	Roth	Karlsruhe, Deutschland
N, N, N', N'- Tetramethylethylenediamine (TEMED) 25ml Cat: T9281	Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland
Nuclease-freies Wasser Cat: 1039498	Qiagen	Hilden, Deutschland
Opti-Mem I 1x 500 ml Cat: 31985-047	Gibco® Life technologies	Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin Cat: P4333-20 ml	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
PhosSTOP Cat: 04906845001	Roche	Mannheim, Deutschland
rh APRIL/TNFSF13 recombinant human (HEK239-derived) Cat: 5860-AP	R&D Systems	Wiesbaden, Deutschland
rh IL-6 recombinant human (E.coli-derived) Cat: 206-IL	R&D Systems	Wiesbaden, Deutschland
RPMI 1640 Without L-Glutamine Cat: E15-039	GE Healthcare	München, Deutschland

RPMI 8226 Cell Acalanche Transfection Reagent Cat: EZT-RPMI-1	EZ Biosystems	College Park, USA
TWEEN20 viscous liquid Cat: P1379	Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol Cat: 4227.1	Roth	Karlsruhe, Deutschland

### 2.3.2. Kits

<b>Kit</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
Amaxa Nucleofactor™ Kit V Cat: VACA-1003	Elektroporationskit	Lonza
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents Cat: RPN2106	Western-Blot Detektions Kit	GE Healthcare
DC Protein Assay Kit2 Cat: 500-0112-MSDS	Protein-Beurteilung	BioRad
FITC Mouse Anti-Human Ki-67 Set Cat: 556026	FACS-Analyse	BD Pharmingen
HDAC Assay Kit, Fluorometric Detection Cat: 17-356	HDAC-Aktivitätsbestimmung	Merck Millipore
High capacity cDNA Reverse Transcription Kit Cat: 4368814	cDNA Synthese	Applied Biosystems
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Cat: 78835	Fraktionierung	Thermo Scientific
NucleoSpin RNA Cat: 740955.50	RNA-Isolation	Machery-Nagel

SensiFAST SYBR No-ROX Mix, 2x Cat: BIO-98020	Mastermix für qPCR	Bioline
SignalFire™ Elite ECL Reagent Cat: 12757S	Western-Blot Detektions Kit	Cell Signaling
SuperSignal West Femto Maximum sensitivity Substrate Cat: 34096	Western-Blot Detektions Kit	Thermo Scientific
TMB Substrate Kit Cat: 34021	ELISA Detektions Kit	Thermo Scientific
Transkription Factor Buffer Set Cat: 562574	Intrazelluläre FACS-Analyse	BD Pharmingen
Transkriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit Cat: 05 091 284 001	cDNA Synthese	Roche

## 2.4. Puffer, Lösungen und Medien

Antikörper-Lösungspuffer	10 mM HEPES 0,5 M NaCl 1% BSA (w/v) 0,2% Tween20 (v/v) 0,02% Na <sub>3</sub> N (w/v)
APS	10% Ammoniumperoxodisulfat H <sub>2</sub> O
ELISA Blocking Puffer	100 ml PBS 1% BSA (w/v)
ELISA Coating Puffer	5 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 45 mM NaHCO <sub>3</sub> pH 9,0

ELISA Proben Puffer	500 ml PBS 0,01% BSA (w/v) 0,01% CaCl <sub>2</sub> (w/v) 0,01% MgCl <sub>2</sub> (w/v) 20 mM β-Mercaptoethanol
ELISA Waschpuffer	20 ml 10x PBS 2 l Aqua dest. 2 ml Tween
Erythrozytenlyse-Puffer	0,155 M NH <sub>4</sub> Cl 0,01 M KHCO <sub>3</sub> 0,1 mM EDTA-Lösung
Kulturmedium JK6L, U266, RPMI 8226 Vollmedium	500 ml RPMI 1640 Medium 10% FCS (v/v) 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x) 2 mM L-Glutamin
Hungermedium	500 ml RPMI 1640 Medium 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x) 2 mM L-Glutamin
Sammelgel (6%)	4,5 ml Sammelgelpuffer 3 ml H <sub>2</sub> O 1,5 ml Acrylamid 90 µl APS 8 µl TEMED
Sammelgelpuffer	0,25 M Tris 0,2% SDS pH 5,8

SDS Laufpuffer (10x)	30,3 g Tris 144,2 g Glycin 10 g SDS 1000 ml H <sub>2</sub> O pH 8,3-8,8
TBS-T (10x)	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,1% Tween20 (v/v)
Transferpuffer	700 ml Aqua dest. 100 ml 10x Running Buffer 200 ml Methanol
Trenngel (12%)	9 ml Trenngelpuffer 1,8 ml H <sub>2</sub> O 7,2 ml Acrylamid 135 µl APS 45 µl TEMED
Trenngelpuffer	0,75 M Tris 0,2% SDS (w/v) pH 8,8
Zelllysepuffer	50 mM Tris 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1% NP-40 (v/v) Complete Mini (Protease-Inhibitor Tablette) PhosSTOP (Phosphatase-Inhibitor Tablette)

## 2.5. Oligonukleotide

Alle Primer die hier aufgeführt sind, wurden von biomers.net Ulm, Deutschland bezogen.

Zielgen	Länge [nt]	Sequenz 5'-3'	Tm [°C]
beta-actin left	18	ccgacaggatgcagaagg	60
beta-actin right	20	aggaaagacacccacctga	59
GAPDH right	19	cacctccccatggtgtct	52
GAPDH-left	22	ccccggttctataaattgagc	54
IgLC left	19	cagctacctgagcctgacg	59
IgLC right	20	gacctggcagctgtagcttt	59
p21 left	20	ccgaagtcagttcctgtgg	60
p21 right	19	catgggttctgacggacat	59
p27 left	22	tttgacttgcataagagaagc	59
p27 right	22	agctgtctctgaaaggacatt	59
p53 left	20	agtctagagccaccgtccag	59
p53 right	18	agtgacccggaaggcagt	60
P57 left	20	ctccttcccccttctctcg	60
P57 right	18	tccatcgtggatgtgctg	60
SLy2 left	20	cctcttgattcgccacaca	59
SLy2 right	20	cgaaattcccaaaaactgctg	60
STAT3 left	21	cccttgattgagagtcagag	51
STAT3 right	20	aagcggctatactgctggtc	51

nt: Nukleotide

Tm: Schmelztemperatur

## 2.6. siRNA

Name	Hersteller	Ort
SAMSN1 Silencer® Select Pre-designed siRNA ID: S34418 Cat: 4392420	Ambion	Schwerte, Deutschland

siGENOME Control Pool Non-Targeting #1 Cat: D-001206-13-05	Dharmacon	München, Deutschland
siGENOME Control siRNA Human GAPDH Duplex Cat: D-001140-01-05	Dharmacon	München, Deutschland
siGENOME SMARTpool Human SAMSN1 Cat: M-004229-01	Dharmacon	München, Deutschland
Silencer® Select GAPDH siRNA (Hs, Mm; Rn) Cat: 4390849	Ambion	Schwerte, Deutschland
Silencer® Select Negative Control #1 siRNA Cat: 4390843	Ambion	Schwerte, Deutschland

## 2.7. Antikörper

### 2.7.1. ELISA Antikörper

Antikörper	Hersteller	Spezies	Klon
Anti-Human light chain $\lambda$ Cat: 555793	BD Pharmingen	Maus	
Biotin anti-human Ig light chain $\lambda$ Cat: 316604	Biolegend	Maus	MHL-38
Streptavidin HRP Cat: 554066	BD Pharmingen		

### 2.7.2. Western-Blot Antikörper

Antikörper	Hersteller	Spezies
Anti-Rabbit IgG HRP-linked Antikörper Cat: 7074S	Cell Signal	Ziege
Anti-Lamin A/C Antikörper Cat: 2032S	Cell Signal	Hase
Monoklonaler Anti- $\beta$ -Actin antibody Cat: A2228-200UL	Sigma-Aldrich	Maus
Monoklonaler Anti-GAPDH (14C10)-Antikörper Cat: 2218S	Cell Signal	Hase
Polyklonaler anti-SAMSN1 Antikörper Cat: NBP1-52845	Novus Biologicals	Hase
Polyklonaler Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP Cat: P0161	Dako	Hase

### 2.7.3. FACS Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Spezies	Klon	Hersteller
Anti-Human Ki-67 Cat: 51-36524X	FITC	Maus	B56	BD Pharmingen
IgG1, $\kappa$ Isotype Control Cat: 51-35404X	FITC	Maus	MOPC-21	BD Pharmingen

## 2.8. Zellbiologische Methoden

### 2.8.1. Kultivierung der humanen Multiplen Myelom Zelllinien JK6L, U266 und RPMI 8226

Die humanen Multiplen Myelom Zelllinien JK6L, U266 und RPMI 8226 wurden zweimal in der Woche umgesetzt. Als Medium wurde RPMI-1640 oder HyClone RPMI-1640 von GE Healthcare verwendet. Dazu wurden die Zellen in 15 ml Röhren pipettiert und anschließend für 5 min bei 500g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und dann die Zellen wieder im Vollmedium resuspendiert. Die JK6L und U266 Zellen wurden in der Regel 1:12, die RPMI 8226 1:8 umgesetzt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.8.2. Stimulation der humanen Multiplen Myelom Zelllinien JK6L, U266 und RPMI 8226 mit IL-6 und APRIL

Die humanen Multiplen Myelom Zelllinien JK6L, U266 und RPMI 8226 wurden in 6 well Platten mit  $2 \cdot 10^6$  Zellen/well oder in 24 well Platten mit  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen/well ausgesät und anschließend über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Um die Zellen auszuzählen, wurden diese 1:5 mit Trypanblau verdünnt und anschließend in einer Zählkammer mit dem Kammerfaktor  $10^4$  ausgezählt. Am nächsten Tag wurden sie mit je  $10 \text{ ng/ml}$  IL-6, APRIL bzw. mit beiden Stimulanzien stimuliert. In die unstimulierte Kontrolle wurde stattdessen die jeweilige Menge an Medium gegeben.

Die so stimulierten 6 well Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.



### 2.8.3. FACS-Analyse nach Stimulation mit IL-6 und APRIL in Hunger- und Vollmedium

Um die Proliferation der Zelllinien zu messen, wurde eine Ki-67 Färbung und anschließende FACS-Analyse aller Zelllinien durchgeführt. Bevor die Zellen stimuliert wurden, wurden die JK6L und RPMI 8226 Zellen an Tag 1 in Hungermedium umgesetzt. An Tag 5 wurden dann  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen/well in je 10 wells einer 24 well Platte ausgesät. Diese wurden dann an Tag 6 wie oben beschrieben stimuliert. Die Färbung und Analyse fand an Tag 7 statt. Bei der U266 Zelllinie wurde dieser Zyklus verkürzt. Die U266 Zellen wurden bereits an Tag 4 ausgesät, an Tag 5 stimuliert und an Tag 6 analysiert.

Für die Analyse wurden die FACS-Röhrchen auf Eis gestellt und die Zellen aus den stimulierten 24 well Platten in die Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Röhrchen für 5 min mit 500g bei 4°C zentrifugiert und nach Herstellerangaben eine Ki-67 Färbung durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend mittels FACS analysiert.

### 2.8.4. Bestimmung der Zellzahl mittels CASY

Zur Analyse der Zellzahl wurden je sieben Petrischalen pro Zelllinie in Hungermedium ausgesät und über 72 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Röhrchen überführt und für 5 min bei 500g und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in Hungermedium resuspendiert. Nun wurden die Zellen mit Hilfe einer Zählkammer ausgezählt. Anschließend wurden jeweils vier 6 well Platten mit  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro well ausgesät und mit IL-6, APRIL oder beidem stimuliert. Als Kontrolle für die Messung dienten unstimulierte Zellen. Für die Messung wurden 10 ml Casy-Flüssigkeit in ein Casy-Röhrchen gegeben und dann 10 µl der Zellen zugegeben. Für die Zelllinien wurden verschiedene Messprogramme verwendet, wie in Tabelle 3 dargestellt.

	<b>Eval. Cursor</b>	<b>Norm. Cursor</b>
<b>JK6L</b>	9,88 – 39,88 µm	6,38 – 39,88 µm
<b>U266</b>	10,63 – 30,00 µm	6,50 – 30,00 µm
<b>RPMI 8226</b>	9,88 – 39,88 µm	6,38 – 39,88 µm

Tabelle 3: Messbereiche des CASY bei den verschiedenen Zelllinien. Der Evaluation Cursor gibt den Messbereich an, aus welchem die Messergebnisse berechnet werden. Er entspricht v.a. den vitalen Zellen. Aus dem Bereich des Normalization Cursors werden die prozentualen Angaben berechnet. Er umfasst zusätzlich zum Eval. Cursor die avitalen Zellen.

Die Messung am CASY wurde an vier aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt, wobei bei jeder Zelllinie immer eine unstimulierte Probe und je eine Probe der stimulierten Zellen gemessen wurde. Für jede Messung, also jeden Tag, wurde dafür eine andere der gesäten 6 well Platten verwendet.

#### 2.8.5. Transfektion mittels Elektroporation

Zur Vorbereitung der Elektroporation wurden die Zellen in 6 well Platten ausgesät. Dazu wurden je  $5 \cdot 10^5$  Zellen pro well in P/S-freies Medium über Nacht zur Proliferation ausgesät.

Am nächsten Tag wurden die Zellen aus der 6 well Platte entnommen und in kleine Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 500g und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaut und das Pellet mit 1ml kaltem PBS gewaschen. Nun wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 90g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die siRNA in der benötigten Menge (20pmol) 1:10 mit PBS verdünnt.

Für die Elektroporation wurde das Nucleofactor Kit V von Amaxa verwendet. Nach dem Zentrifugieren wurden die Überstände aus den Reaktionsgefäßen abgenommen und die Zellen in 100 µl der Nucleofactor-Solution resuspendiert. Diese musste zuvor auf Raumtemperatur gebracht werden. Nun wurden 10 µl der siRNA-Verdünnung zugegeben und mit Gel-load Spitzen in die gekühlten

Küvetten überführt. Anschließend wurden die Küvetten im Amaxa mit den Programmen CD34 cells human U-008 oder G-015 bearbeitet. In einer frischen 6 well Platte wurden je 2 ml des P/S-freien Mediums vorlegt. Davon wurden 500 µl entnommen und die Küvette durchgespült. Anschließend wurden die Zellen aus der Küvette mit Gel-load Spitzen in die 6 well Platten überführt. Die 6 well Platten wurden nun für 24-48 h inkubiert.

Das Gelingen der Elektroporation wurde anschließend mit einer RT-qPCR überprüft.

#### 2.8.6. Transfektion mittels Reagenz

Die 6 well Platten wurden für die Transfektion wie unter 2.8.5. beschrieben vorbereitet.

Pro well, das transfiziert werden sollte, wurde ein Reaktionsgefäß vorbereitet. Darin wurden 200 µl des Opti-Mem Mediums vorgelegt. Nun wurde, je nach gewünschter Menge, siRNA zugegeben. Dann wurde das Reaktionsgefäß gevortext. Anschließend wurde auch das Transfektionsreagenz gevortext und davon zwischen 1,0-5,0 µl zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde erneut gevortext und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde dann tröpfchenweise in die wells gegeben. Die 6 well Platten wurden anschließend für 5 min bei 300g und Raumtemperatur zentrifugiert und für 24 h bei 37°C inkubiert.

Der Erfolg der Transfektion wurde anschließend mit einer RT-qPCR überprüft.

## 2.9. Biochemische Methoden

### 2.9.1. Bestimmung der SLy2-Proteinkonzentration nach Stimulation

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde ein Western-Blot durchgeführt. Dazu wurden die stimulierten Zellen aus den 6 well Platten lysiert. Hierzu wurden die Zellen aus den jeweiligen wells in ein 15 ml Röhrchen überführt und anschließend 5 min bei 500g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und mit je 4 ml kaltem PBS gewaschen. Daraufhin wurde erneut 5 min bei 500g und 4°C zentrifugiert und dann der Überstand abgesaugt.

Der Lysepuffer bestand aus 1,8 ml Zellysepuffer mit 100 µl PhosSTOP und 100 µl Proteinase-Inhibitor. Die Zellen wurden in je 150 µl dieses Lysepuffers resuspendiert und in safe-lock Reaktionsgefäße überführt. Auf Eis lysierten die Zellen für ca. 1 h und wurden zwischendurch einmal gemischt. Anschließend wurden sie für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in frische Reaktionsgefäße pipettiert.

Auf die Lyse folgte die Proteinbestimmung. Hierfür wurde der Bio-Rad DC™ Protein Assay verwendet. Dazu wurden in eine Mikroplatte zuerst 5 µl der Probe bzw. des BSA als Standard gegeben. Danach wurden 25 µl eines Mix aus Reagent A (1 ml) und Reagent S (20 µl) zugegeben. Anschließend wurden 200 µl des Reagent B beigefügt.

Nach 15 min Inkubationszeit wurde die Mikroplatte photometrisch gemessen. Die Referenzwellenlänge betrug dabei 540 nm, die Messung fand bei 700 nm statt. Nun wurde in einem Reaktionsgefäß die Proteinmenge auf meistens 25 µg verdünnt und 4x Laemmli Sample-Buffer zugegeben. Dieser 4x Laemmli Sample Buffer musste zuvor 10:1 mit β-Mercaptoethanol versetzt werden. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 94°C erhitzt und kurzfristig bei -20°C gelagert.

### 2.9.2. Gelelektrophorese

Die Acrylamid-Gele bestanden aus einem 6% Sammelgel und einem 12% Trenngel. In Tabelle 4 ist die Zusammensetzung für zwei Mini-Gele dargestellt.

	12 % Trenngel	6 % Sammelgel
<b>Wasser</b>	1,8 ml	3 ml
<b>Puffer</b>	9 ml	4,5 ml
<b>Acrylamid</b>	7,2 ml	1,5 ml
<b>APS</b>	135 µl	90 µl
<b>TEMED</b>	45 µl	8 µl

Tabelle 4: Inhaltstoffe für zwei Mini-Acrylamid-Gele.

Zuerst wurde das Trenngel in die Kammern gegossen und dann mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Linie zu erhalten. Das Gel härtete 30-60 min aus. Vor der Zugabe des Sammelgels, wurde das Isopropanol abgegossen und das Gel einmal mit Aqua dest. gespült. Das Aqua dest. wurde ebenfalls abgegossen. Reste die dadurch nicht beseitigt werden konnten, wurden mit einem Streifen Filterpapier entfernt. Nun wurde zur Sammelgellösung das APS und TEMED zugegeben. Die Sammelgellösung wurde in die Kammern gegossen und dann die Kämmen eingesetzt. Das Gel härtete 30-60 min aus und wurde in feuchten Tüchern im Kühlschrank gelagert.

Um die Gele zu laden, wurden diese in eine Kammer eingespannt, welche dann mit ca. 1 l SDS Running Puffer aufgefüllt wurde. Die Kämmen wurden nun vorsichtig entfernt und die Taschen mit Proben (25 µl) bzw. Molekulargewichtsmarker (5 µl; 2,5 µl) von Genetics beladen. Nun wurde das Gel mit 60 V für ca. 30-45 min laufen gelassen, bis die Proben im Sammelgel eine gerade Linie ergaben. Anschließend lief das Gel nochmals für 60-90 min bei 120 V.

### 2.9.3. Western Blot

Nachdem das Gel durchgelaufen war, wurde ein Wet-Blot aufgebaut. Hierzu musste pro Gel vorbereitet werden:

- 2x 5 Papiere
- 1 Membran (Amersham Protran Supported 0,4 $\mu$ m; NC#1060016)
- Keil
- Pinzette
- 2x weiße Wannen
- 2x weiße Flies
- Transferpuffer (700ml Aqua dest.; 100ml 10x Running Puffer; 200ml Methanol)
- 1x 50ml Röhrchen

An den Membranen wurde vorsichtig der Ladeanfang mit einer gestrichelten Linie markiert, sowie mit dem zu detektierenden Protein beschriftet.

Die Kammer, sowie eine der Wannen, wurden mit Transferpuffer aufgefüllt. Beim Aufbauen des Wet-Blots wurde darauf geachtet, dass alle Komponenten gut mit Transferpuffer durchtränkt waren. Nun wurde die Kasette der Kammern von schwarz nach weiß wie folgt aufgebaut:

- 1x weißes Flies
- 5x Papier
- 1x Gel
- 1x Membran
- 5x Papier
- 1x weißes Flies

Beim Gel wurde oben das Sammelgel mit den Taschen und unten der Rest des blauen Farbstoffes abgetrennt. Am Ladeanfang wurde die untere Ecke abgetrennt. Diese fehlende Ecke musste dann vorne rechts auf dem feuchten Papier zum Liegen kommen.

Bei der Membran musste die Beschriftung des Ladeanfangs an der fehlenden Ecke des Gels liegen. Dazu wurde die Membran mit der Beschriftung nach unten auf das Gel gelegt.

Nun wurden mit Hilfe eines großen Röhrchens eventuelle Luftblasen herausgedrückt. Anschließend wurde die Kassette geschlossen und in die Kammer eingesetzt. Dabei musste die schwarze Seite der Kassette zu der schwarzen Seite der Kammer zeigen. Der Western-Blot wurde nun im Kühlraum für 1 h 15 min geblottet. Pro Gel wurden 100 mA Strom angelegt.

Nach dem Blotten wurde alles auseinander gebaut und an den Membranen die entsprechenden Banden des Molekulargewichtsmarkers mit Kugelschreiber angezeichnet. Daraufhin wurden die Membranen einmal kurz in TBS-T gewaschen.

Für zwei Membranen benötigte man 40 ml Milchlösung. Dazu wurden 2 g Milchpulver in einem 50 ml Röhrchen abgewogen und mit TBS-T auf 40 ml aufgefüllt. Die Membranen wurden nun mit dieser Milchlösung bedeckt und bei Raumtemperatur für 1 h auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Milchlösung abgegossen und die Membranen nochmals 10 min in TBS-T gewaschen. Währenddessen wurden die Primär-Antikörper aufgetaut. Für diesen wurden zuvor in einem 50 ml Röhrchen 5 ml des Antikörperverdünnungspuffers gegeben. Je nach benötigter Verdünnung wurde der jeweilige Primär-Antikörper zugegeben. Nun wurden die Membranen in die entsprechenden 50 ml Röhrchen eingelegt, wobei die Seite mit der Beschriftung der Membran nach Innen in das Röhrchen zeigte. Über Nacht wurde das Röhrchen bei +4,0°C auf einem Rollbrett inkubiert.

Wenn auf einer Membran mehrere Proteine detektiert werden sollten, so wurden die Membranen geteilt. Dies war nur möglich, wenn sich die zu detektierenden Proteine in ihrer Größe stark genug unterschieden.

Am nächsten Tag wurden die Membranen aus den Röhrchen genommen und dreimal 10 min mit TBS-T bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend wurden alle Membranen mit den entsprechenden sekundären Antikörpern behandelt. Dazu wurden 5 ml der 5%igen Milch-TBS-T-Lösung in ein 50 ml Röhrchen gegeben und für eine 1:2000 Verdünnung 2,5 µl des sekundären Antikörpers zugegeben.

Die Membranen wurden in die Röhren mit den entsprechenden sekundären Antikörpern gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Rollbrett inkubiert. Danach wurden die Membranen wieder dreimal 10 min mit TBS-T bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gewaschen.

Als nächstes folgte die Entwicklung des Western-Blots. Dazu wurden pro Membran 0,5 ml des Entwicklers benötigt. Zuerst wurden die Membranen immer mit dem halbsensitiven Entwickler ECL entwickelt. Dazu wurden die beiden ECL-Komponenten 1:1 gemischt und auf den Membranen in Höhe der zu erwartenden Bande verteilt. Der Entwickler wirkte 30-60 sec ein. Anschließend wurde mit dem VersaDoc über das Programm Quantiti One beta-version gemessen. Dabei wurde eine schwarze Platte eingelegt.

Bei Membranen bei denen durch die Entwicklung mit ECL noch kein Signal zu erkennen war, wurde mit dem Supersensitiven Entwickler Super Signal<sup>®</sup> West Femto Maximum Sensitivity Substrate oder SignalFire Elite ECL Reagent entwickelt. Auch hier wurden die beiden Komponenten 1:1 gemischt und 0,5 ml pro Membran benötigt. Bevor der Entwickler auf die Membran gegeben wurde, wurden diese nochmals kurz in TBS-T gewaschen.

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit Corel PHOTO-Paint x4 und Image J.

Die Messwerte der Zielproteine wurden dabei immer ins Verhältnis zu  $\beta$ -Actin derselben Probe gesetzt. Dabei wurden für die Messungen mehrere Membranen parallel inkubiert.

#### 2.9.4. Detektion der SLy2 Proteinexpression in den humanen Multiplen Myelom Zelllinien JK6L, U266 und RPMI 8226 in Nukleus- und Plasmafraktion

Zur Vorbereitung wurden vier Petrischalen pro Zelllinie mit 12 Mio Zellen pro Schale ausgesät. Diese wurden dann über Nacht inkubiert und am folgenden Tag mit 10<sup>ng/ml</sup> IL-6, APRIL oder beidem stimuliert. Dabei wurde pro Zellline auch eine Petrischale als unstimulierte Kontrolle angelegt. In diese wurde lediglich die entsprechende Menge an Medium ohne Stimulanzen gegeben. Nach weiteren



24 h wurde die Fraktionierung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen aus den Petrischalen in Röhrchen überführt und für 5 min bei 500g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände abgegossen und die Zellen mit 4 ml kaltem PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen nochmals für 5 min bei 500g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände auf den Zellen wurden möglichst trocken abgesaugt.

Für die Fraktionierung wurde das Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagens verwendet. Es wurde dabei streng nach dem angegebenen Protokoll verfahren. Die Fraktionen wurden bei -80°C gelagert werden.

Um die Expression an Proteinen innerhalb der Fraktionen zu bestimmen, wurde ein Western-Blot durchgeführt, wie er unter 2.9.1. beschrieben ist. Als Bezugsgröße für die gemessene SLy2 Menge wurde hierbei allerdings GAPDH für die Zytoplasma-Fraktion und Lamin A/C für die Nukleus-Fraktion verwendet.

#### 2.9.5. Präadsorption des SLy2-Antikörpers

Um die Affinität des verwendeten Antikörpers im Western-Blot für SLy2 zu erhöhen, wurde eine Präadsorption des Antikörpers durchgeführt. Dabei wurde nach einem Protokoll von Harlow und Lane ein Acetonpuder hergestellt [59]. Hierzu wurden Milz, Gehirn, Thymus und Knochenmark aus zwei SLy2-defizienten Mäusen entnommen. Anschließend wurde mit einem Zellsieb eine Zellsuspension hergestellt. Mit den Milzen und dem Knochenmark wurde eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt. Die Milzsuspension inkubierte 3 min und die Knochenmarksuspension 1 min bei Raumtemperatur im Erythrozytenlyse-Puffer. Nun wurden diese Suspensionen mit je 5 ml PBS aufgefüllt und für 5 min mit 500g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und daraufhin alle Zellen gepoolt. Zu den 0,94 g der Organe wurden 2 ml 0,9 % NaCl-Lösung zugegeben. Diese wurde für 5 min in Eiswasser gekühlt und dann mit 8 ml gekühltem Aceton pro 2 ml Zellsuspension gemischt. Dann wurde das Gemisch für 30 min bei 4°C inkubiert und währenddessen alle 10 min gevortext. Durch das Aceton wurden der Suspension die Lipide entfernt und die Zellen so

dehydratisiert, dadurch präzipitierten die Proteine. Anschließend wurde das Gemisch bei 10.000g und 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt zur Entfernung der Lipide wurde noch zweimal wiederholt. Danach wurde das Pellet auf einem trockenen Filterpapier dünn verteilt und getrocknet. Der fertige Acetonpuder wurde bei -20°C gelagert.

Um eine Antikörperlösung zu präadsorbieren, wurde diese für 30 min bei 4°C mit 1 % (w/v) des Acetonpuders in einem Überkopfschüttler inkubiert. Um unlösliche Bestandteile zu entfernen wurde das Gemisch anschließend bei 10.000g und 4°C für 10 min zentrifugiert und im Überstand der präadsorbierte Antikörper abgenommen.

## 2.10. Molekularbiologische Methoden

### 2.10.1. Bestimmung der mRNA-Menge mittels RT-qPCR

Um die mRNA-Menge zu bestimmen, wurde eine quantitative real time PCR verwendet. Dazu wurden die Zellen aus den 6 well Platten entnommen und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurden sie für 5 min bei 500g und 4°C zentrifugiert. Es wurden 700 µl von den Überständen abgenommen und für einen ELISA eingefroren. Die restlichen Überstände wurden abgegossen und die Pellets in 4 ml kalten PBS gewaschen. Anschließend wurden sie für 5 min bei 500g und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt. Die Arbeitsfläche und die Pipetten wurden gut mit Ethanol gereinigt. Zum Pipettieren wurden nur gestopfte Spitzen verwendet. Die RNA Extrahierung wurde nach der Anleitung im NucleoSpin<sup>®</sup> RNA-Kit von Macherey-Nagel durchgeführt.

Nach der Isolierung der RNA wurde die RNA-Konzentration mit dem NanoDrop bestimmt. Dabei wurde als Referenz das RNase-freie Wasser aus dem Kit verwendet. Es wurden jeweils 1,5 µl der Proben gemessen.

Zur cDNA-Synthese wurde ein Kit von AB und einmalig ein Kit von Roche verwendet. Die RNA musste zumeist um 1:5 verdünnt werden, da die RNA-Konzentrationen in den Proben zu hoch war. Dazu wurden zu 20 µl des

Nuklease-freien Wassers 5 µl RNA zugegeben. Bei beiden Kits wurde wieder streng nach Protokoll vorgegangen. Es wurden möglichst 500 ng RNA umgeschrieben.

Für das Kit von AB wurde folgendes Protokoll für den Thermocycler verwendet:

- 10 min 25°C
- 2 h 37°C
- 5 min 85°C
- Hold 4°C

Nachfolgend wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Für die qPCR wurde alles unter der Sterilbank pipettiert. Da 500 ng RNA in cDNA umgeschrieben wurden, muss diese erst weiter verdünnt werden. Die Proben wurden mit 80 µl Nuklease-freiem Wasser (H<sub>2</sub>O<sub>NF</sub>) auf 100 µl aufgefüllt.

Anschließend mussten die Proben noch je nach zu bestimmender mRNA teilweise weiterverdünnt werden, wie in Tabelle 5 dargestellt.

<b>Ziel mRNA</b>	<b>cDNA Konzentration</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Zyklen</b>
<b><i>β-Actin</i></b>	5 ng/µl	∅	45
<b><i>GAPDH</i></b>	5 ng/µl	∅	55
<b><i>IgLc</i></b>	0,125 ng/µl	1:40 (120µl H <sub>2</sub> O <sub>NF</sub> + 3µl cDNA)	45-55
<b><i>p21</i></b>	5 ng/µl	∅	45
<b><i>p27</i></b>	5 ng/µl	∅	45
<b><i>p53</i></b>	5 ng/µl	∅	45
<b><i>p57</i></b>	0,5 ng/µl	1:10 (90µl H <sub>2</sub> O <sub>NF</sub> + 10µl cDNA)	45
<b><i>SLy2</i></b>	5 ng/µl	∅	55-65
<b><i>STAT3</i></b>	5 ng/µl	∅	45

Tabelle 5: Verdünnung der cDNA Proben, je nach zu detektierender mRNA. Je nach zu bestimmender mRNA waren unterschiedlich viele PCR-Zyklen notwendig, um ein Signal zu erfassen.

Die Primer sowie das SYBR Green wurden auf Eis aufgetaut. Im Stock des Primers sind 100  $\mu\text{M}$  enthalten, da für die qPCR nur 10  $\mu\text{M}$  benötigt wurden, wurden die Primer 1:10 verdünnt. Dazu wurden zu 90  $\mu\text{l}$  des Nuklease-freien Wassers 10  $\mu\text{l}$  des Primers gegeben. Nun folgte die Herstellung eines Mastermixes. Der Mastermix enthielt dabei pro well:

- 5  $\mu\text{l}$  SYBR-Green,
- je 0,4  $\mu\text{l}$  des forward und des reverse Primers
- 1,7  $\mu\text{l}$  Nuklease-freies Wasser.

In die speziellen 96 well Platten wurden erst 7,5  $\mu\text{l}$  des Mastermixes vorlegt und dann 2,5  $\mu\text{l}$  der entsprechenden cDNA zugegeben. Anschließend wurde die Platte mit einer Klebefolie abgeklebt und bei 1000g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde die Platte im Light Cycler mit folgendem Programm gemessen:

- Prä-Inkubation ein Zyklus mit 95°C für 5 min
- Amplifikation
  - 10 sec 95°C
  - 10 sec 60°C
  - 10 sec 72°C
- Schmelzkurve
- Abkühlen

Mit den Messwerten wurde eine „Advanced Relative Quantification“ durchgeführt.

### 2.10.2. Analyse der IgLc-Produktion mittels ELISA

Am Vorabend des eigentlichen Experiments musste die ELISA Platte gecoated werden. Dazu wurde der ELISA Coating Puffer 1:100 mit dem Coating-Antikörper Anti-Human Light Chain  $\lambda$  gemischt. Pro well wurden dann 70  $\mu\text{l}$  dieser Antikörperlösung mit einer Multikanalpipette vorgelegt. Nun wurde die Platte mit einer Folie abgeklebt und über Nacht bei +4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Platte ausgeschüttelt und dreimal mit ELISA Waschpuffer gewaschen. Nun wurde die Platte ausgeschlagen und es wurden je 200 µl ELISA Blocking Puffer in die wells geben. Anschließend wurde die Platte für 1 h bei Raumtemperatur auf den Schüttler gestellt. Dazu wurde die Platte wiederum mit Folie abgeklebt. Nun ließ man die gesammelten Überstände auf Eis auftauen. Dann wurden die Proben mit dem ELISA Proben Puffer 1:10.000 verdünnt. Die ELISA Platten wurden wieder dreimal mit ELISA Waschpuffer gewaschen und anschließend ausgeschlagen. Für den BLANK wurde Vollmedium in 1:10.000 Verdünnung im ELISA Proben Puffer verwendet. Nun wurden je well 70 µl Probe bzw. BLANK zugeben. Die ELISA Platten wurden wieder mit der Folie abgeklebt und für 2 h bei Raumtemperatur auf den Schüttler gestellt.

Danach wurde der Biotin-Antikörper 1:800 mit dem ELISA Blocking Puffer verdünnt. Die ELISA Platten wurden wieder dreimal mit ELISA Waschpuffer gewaschen und anschließend ausgeschlagen. Nun wurden je well 70 µl der Biotin-Antikörper-Verdünnung zugeben und die Platten wiederum mit der Folie abgeklebt. Anschließend wurden die Platten für 1 h bei Raumtemperatur auf den Schüttler gestellt.

Als nächstes wurde der SA-HRP-Antikörper 1:200 mit dem ELISA Blocking Puffer verdünnt. Nun wurde die Platte erneut dreimal mit ELISA Waschpuffer gewaschen und anschließend ausgeschlagen. Auch hier wurde wieder pro well 70 µl der Antikörper-Verdünnung zugeben. Die Platte wurden mit der Folie abgeklebt und für 30 min bei Raumtemperatur auf den Schüttler gestellt.

Nachfolgend wurde die Platte wieder dreimal mit ELISA Waschpuffer gewaschen. Vor dem letzten Ausschlagen wurden die TMB Komponenten 1:1 gemischt. Nun wurde die Platte ausgeschlagen und je well 70 µl TMB zugeben. Während eine blaue Farbreaktion entsteht, wurde die Platte mit einem Tuch abgedeckt. Um die Reaktion abzustoppen, wurde je well 70 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugeben. Daraufhin schlug die Farbreaktion in Gelb um. Die Platte wurde nun photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Referenzwellenlänge betrug dabei 540 nm.

### 2.10.3. Bestimmung der HDAC-Aktivität nach Stimulation mit IL-6 und APRIL

Für die Messungen wurden die gleichen Protein-Lysate wie bei 2.9.4. verwendet. Um die HDAC-Aktivität zu messen, wurde das HDAC Assay Kit von Millipore verwendet. Es wurde dabei streng nach dem vorgegebenen Protokoll vorgegangen.

Zuerst wurde in jedes well 10 µl des HDAC Assay Buffers gegeben. Dann wurde entweder 15 µl der Probe oder der HeLa Nuclear Extract Positivkontrolle oder 15 µl des HDAC Assay Buffers als Negativkontrolle zugeben. Nun wurde die Platte 10 min bei 30°C inkubiert, bis die wells die gewünschte Temperatur von 30°C angenommen hatten. Anschließend wurden 15 µl des HDAC Assay Substrates zugeben und gründlich gemischt. Dann wurde die Platte bei 30°C 60 min inkubiert. Währenddessen wurde die Activator Solution vorbereitet. Dazu wurde diese mit dem HDAC Assay Buffer 20x-fach verdünnt und 4 µM Trichostin A zugeben. Von dieser Mischung wurden je well 20 µl zugeben und gründlich gemischt. Nun wurde die Platte bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Innerhalb von 60 min wurde die Platte dann bei einer Extinktion von 390 nm und einer Emission von 460 nm gemessen.

### 2.11. Statistische Analyse

Statistische Analysen und Abbildungen wurden mit GrapPad Prism erstellt und sind jeweils in den Legendes aufgeführt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Stimulation der humanen Multiplen Myelom Zelllinien JK6L, U266 und RPMI 8226 mit IL-6 und APRIL

Es konnte nachgewiesen werden, dass die SLy2-Expression bei der Aktivierung von B-Zellen ansteigt [37]. Ein wichtiger Wachstumsfaktor der Multiplen Myelomzellen ist IL-6 [45, 47]. Auch die APRIL-Spiegel sind beim Multiplen Myelom erhöht [49]. Daher sollte untersucht werden, ob durch diese beiden Zellstimulatoren die SLy2 Expression in den Multiplen Myelom Zellen beeinflusst werden kann.

Die drei Zelllinien wurden wie unter 2.8.2. beschrieben mit  $10^{ng/ml}$  stimuliert. Als Stimulanzen dienten dabei IL-6, APRIL oder die Kombination aus beiden. Die Stimulanzen sollten dabei das Wachstum und die Proliferation der Zellen anregen. IL-6 stellt eines der Schlüsselenzyme beim Übergang von der angeborenen Immunität zur erworbenen Immunität dar. Es ist ein Akute-Phase-Protein und ist ein Lymphozyten-stimulierender-Faktor. Es hat dabei proapoptotische und antiapoptotische Wirkungen auf Leukozyten. IL-6 kann in B-Zellen die Differenzierung, Proliferation und Polarisierung regulieren. APRIL ist ein Proliferationsfaktor, der wichtig für das Langzeitüberleben von Plasmazellen ist. Außerdem spielt es eine entscheidende Rolle in der B-Zellentwicklung.

#### 3.1.1. Auswirkung der Stimulation auf die gebildete SLy2 mRNA und die SLy2 Proteinmenge

Zunächst sollte überprüft werden, ob die Stimulation der Proliferation der Multiplen Myelom Zelllinien Veränderungen der SLy2 mRNA Menge hervorruft (Abb. 1). Bei allen drei Zelllinien wurde die mRNA-Menge der stimulierten Zellen auf Menge der unstimulierten Kontrolle normiert und als relative Expression dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die drei Zelllinien unterschiedlich auf die Stimulation reagieren. In den JK6L Zellen zeigte sich durch die Stimulation mit IL-6 oder APRIL eine leichte, aber nicht signifikante Steigerung der SLy2 mRNA

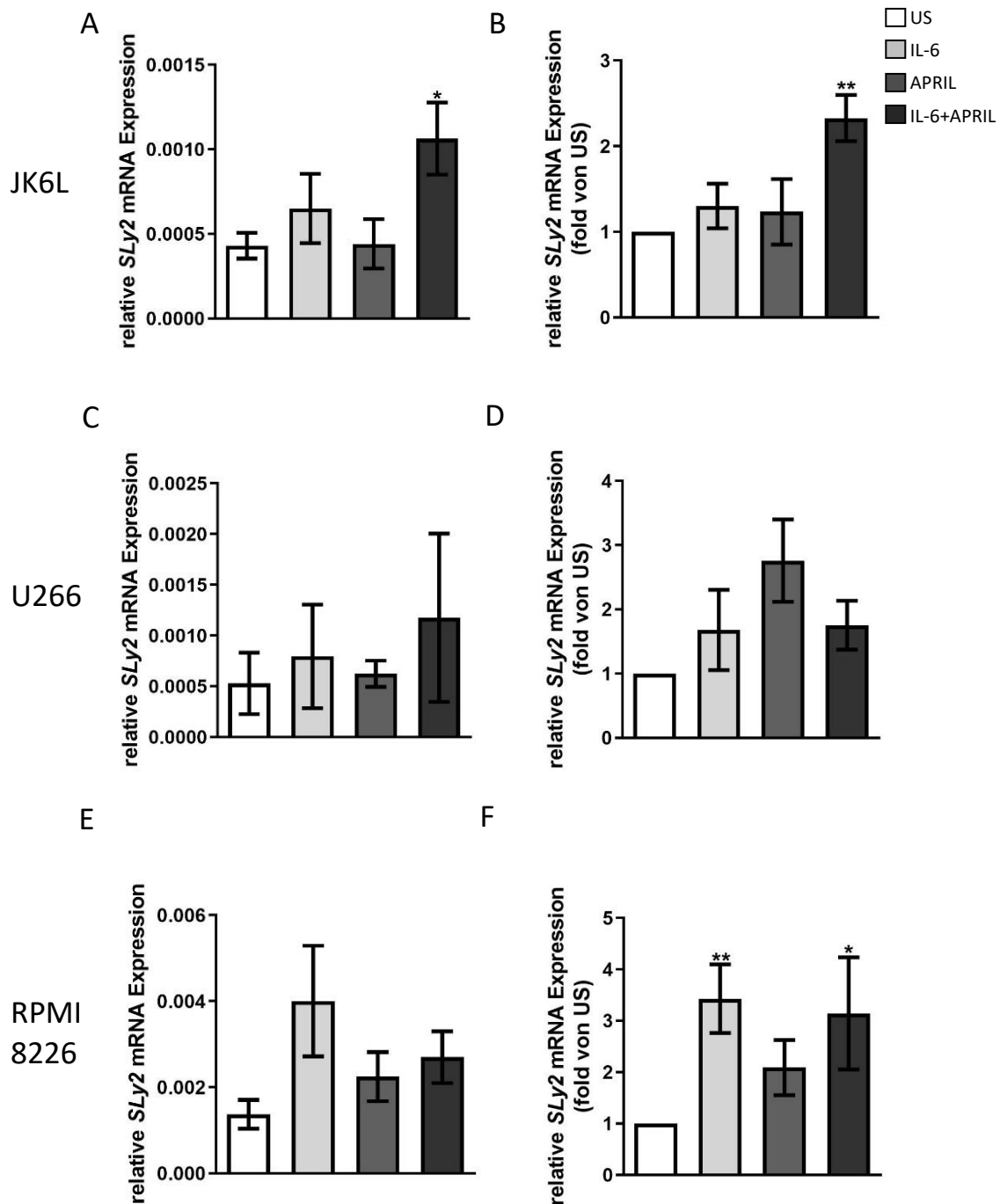
Menge. Die Kombination aus IL-6 und APRIL führte zu einer signifikant erhöhten Menge an *SLy2* mRNA (Abb. 1A). In der Darstellung der Ergebnisse als Verhältnis der stimulierten Proben zur unstimulierten Kontrolle treten diese Ergebnisse noch deutlicher hervor (Abb. 1B).

Bei der U266 Zelllinie zeigt sich die Tendenz einer gesteigerten *SLy2* mRNA Menge bei allen drei Stimuli (Abb. 1C). Diese Tendenz ist dabei ebenfalls für die Kombination von IL-6 und APRIL am stärksten. Auch die in den U266 Zellen gemessene Menge an *SLy2* mRNA wurde wieder im Verhältnis auf die unstimulierte Kontrolle dargestellt (Abb. 1D). In dieser zeigt sich eine klare Steigerung der *SLy2* mRNA Menge durch die Stimulation, welche nicht signifikant ist.

Bei den RPMI 8226 Zellen zeigte sich eine *per se* höhere Konzentration an *SLy2* mRNA. Diese konnte durch die Stimulation weiter gesteigert werden (Abb. 1E). Am Größten war dabei der Effekt bei der Stimulation durch IL-6 alleine. Dieses Bild zeigt sich auch in der Darstellung als Verhältnis der stimulierten Proben zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 1F). Hierbei zeigte sich eine hoch signifikante Steigerung durch die Stimulation mit IL-6. In fast dem gleichen Maße scheint auch die Stimulation durch die Kombination aus IL-6 und APRIL zu wirken. Auch hier zeigte sich eine signifikante Steigerung.

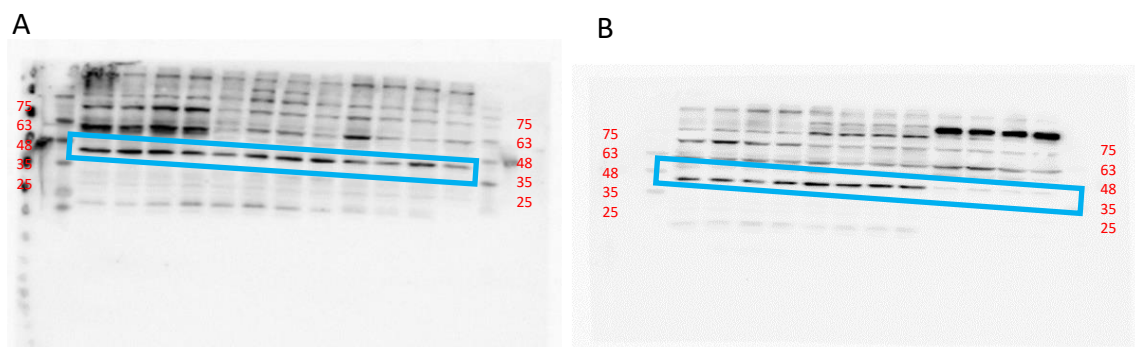
Für alle drei Zelllinien konnte eine Steigerung der *SLy2* mRNA-Menge durch mindestens eines der Zellwachstumsstimulanzen oder ihre Kombination gezeigt werden. Eine signifikante Steigerung der *SLy2* mRNA-Menge zeigte sich für die JK6L und RPMI 8226 Zellen.





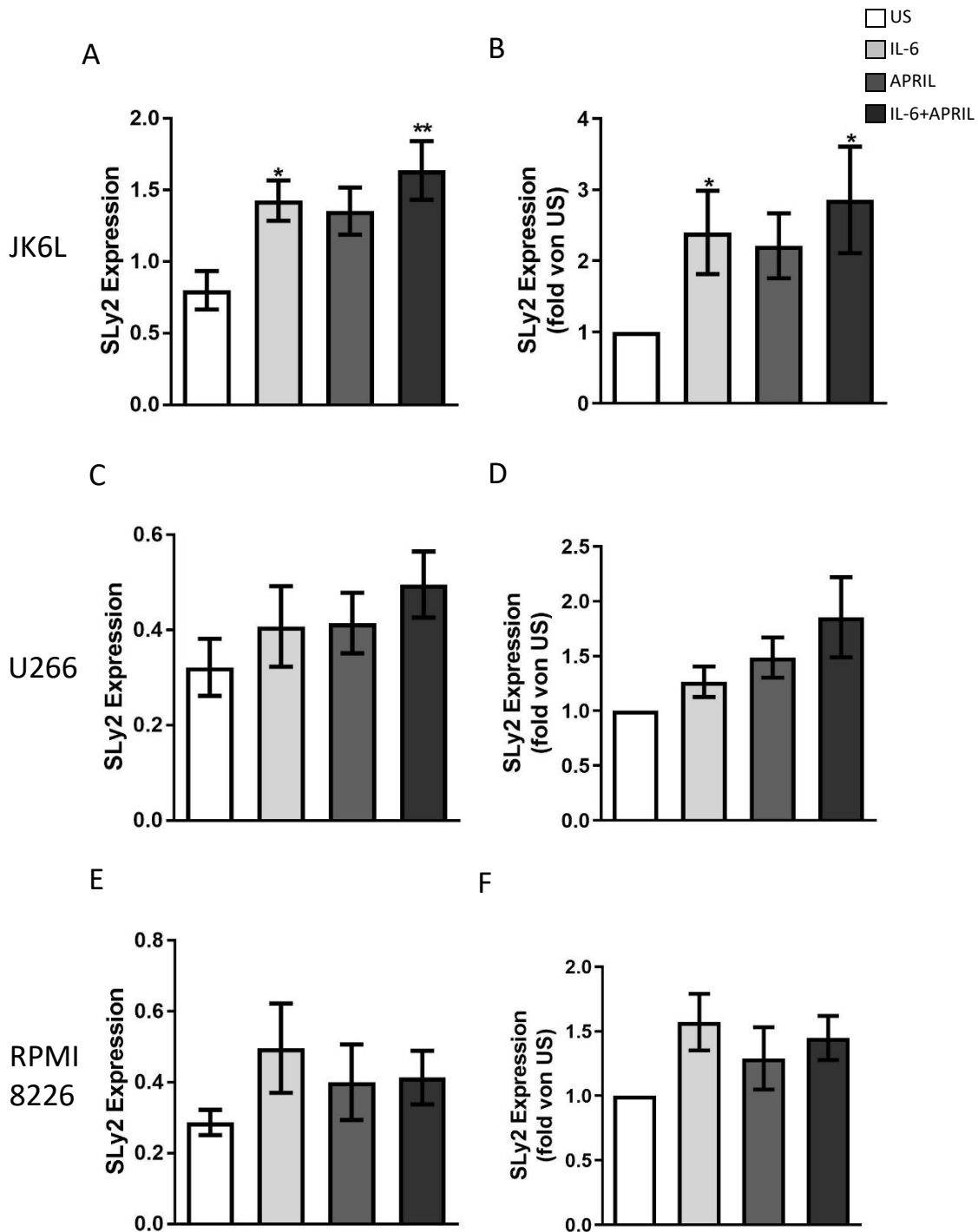
**Abbildung 1: Bestimmung der *SLy2* mRNA-Menge** in (A) der JK6L Zelllinie (n=10), (C) der U266 Zelllinie (n=8) und (E) der RPMI 8226 Zelllinie (n=8). Die Zellen wurden in Zellkultur für 24h entweder unstimuliert (US) oder mit  $10^6$   $ng/ml$  des jeweiligen Stimulans inkubiert. Daraufhin wurde die RNA aus den Zellen extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mit dieser cDNA wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Bestimmung der *SLy2* mRNA Menge als Verhältnis der stimulierten Proben zu unstimulierten Kontrollen in (B) der JK6L Zelllinie (n=10), (D) der U266 Zelllinie (n=8) und (F) der RPMI 8226 Zelllinie (n=8). Quantitative Auswertung mittels *One way Anova*, *Dunn's Multiple Comparison Test* zeigt Mittelwert +/- SEM. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz (\*\*P<0,01; \*P<0,05).

Nachfolgend sollte nun überprüft werden, ob die gesteigerte *SLy2* mRNA Menge durch die Stimulation auch Auswirkungen auf den Gehalt an *SLy2* Protein in der Zelle hat. Hierzu wurden alle drei Zelllinien nach Stimulation mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Im Verlauf dieser Experimente zeigte sich, dass der *SLy2* Antikörper zum Teil sehr unspezifisch gebunden hatte. Allerdings konnten wir beobachten, dass die unspezifische Bindung schwächer wurde, je häufiger die Antikörperlösung verwendet wurde. Daher entschlossen wir uns den Antikörper nach einem Protokoll von Harlow&Lane zu präadsorbieren [59]. Dabei wurden aus *SLy2* K.o.-Mäusen Zellsuspensionen hergestellt. Daraus wurde ein Aceton-Puder gewonnen, mit welchem der *SLy2*-Antikörper behandelt wurde. Dadurch konnte eine höhere Spezifität des Antikörpers erreicht werden (Abb. 2). In der Auswertung wurden auch die Experimente des nicht-präadsorbierten Antikörpers miteingeschlossen.



**Abbildung 2: Membran eines Western Blots** zur *SLy2* Proteinbestimmung, bei dem (A) die Membran mit dem nicht-präadsorbierten Antikörper inkubiert wurde. (B) Membran eines Western Blots zur *SLy2* Proteinbestimmung, welche mit dem präadsorbierten Antikörper inkubiert wurde. Die blaue Umrandung zeigt den Bereich, der zur Auswertung verwendet wurde. Die roten Zahlen geben die Größe der Proteinpartikel in kDa an.

Für die JK6L Zellen zeigte sich eine signifikante Steigerung der *SLy2* Protein-Menge für die Stimulation mit IL-6 und der Kombination aus IL-6 und APRIL. Auch durch die Stimulation mit APRIL alleine scheint die *SLy2* Proteinmenge in nicht signifikanter Weise gesteigert. Dies stellt sich auch in der Darstellung als Verhältnis der stimulierten Proben zur unstimulierten Kontrolle so dar.



**Abbildung 3: Bestimmung der Sly2 Proteinmenge** in (A) der JK6L Zelllinie (n=10), (C) der U266 Zelllinie (n=13) und (E) der RPMI 8226 Zelllinie (n=12). Die Zellen wurden in Zellkultur für 24h entweder unstimuliert (US) oder mit 10<sup>ng/ml</sup> des jeweiligen Stimulans inkubiert. Daraufhin wurde die Proteinmenge an Sly2 mittels Western-Blot bestimmt. Bestimmung der Sly2 Proteinmenge als Verhältnis der stimulierten Proben zu unstimulierten Kontrollen in (B) der JK6L Zelllinie (n=10), (D) der U266 Zelllinie (n=13) und (F) der RPMI 8226 Zelllinie (n=12) Quantitative Auswertung mittels *One way Anova, Dunn's Multiple Comparison Test* zeigt Mittelwert +/- SEM. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz (\*\*P<0,01; \*P<0,05).

Für die U266 Zellen konnte ebenfalls eine Steigerung des SLy2 Proteins durch die Stimulation gezeigt werden. Diese ist nicht signifikant. Ähnlich stellt es sich in der Darstellung als Verhältnis der stimulierten Proben zur unstimulierten Kontrolle dar. Auch hier ist eine steigernde Tendenz zu erkennen.

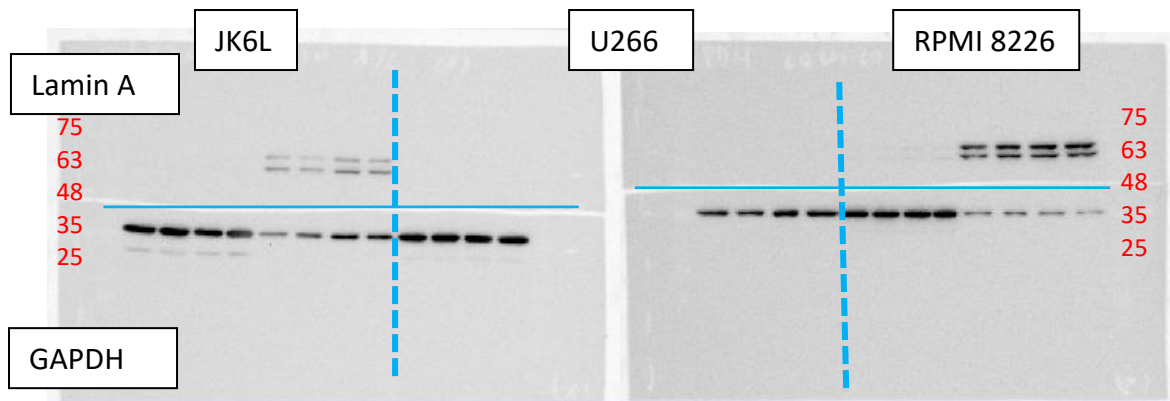
In der RPMI 8226 Zelllinie zeigt sich für alle drei Formen der Stimulation eine klare Tendenz die SLy2 Menge zu steigern. Keine der Steigerungen ist signifikant. In der Normierung der Messwerte auf die unstimulierte Kontrolle stellt es sich ebenfalls so dar, dass für die Stimulation eine Tendenz zur SLy2 Proteinsteigerung besteht. Wiederrum ist die Steigerung nicht signifikant.

In der Western-Blot-Analyse konnte also gezeigt werden, dass auch die Proteinmenge an SLy2 auf die Stimulation mit IL-6 und APRIL reagiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die Menge an *SLy2* mRNA als auch die Proteinmenge durch die Stimulation positiv beeinflussbar ist. In allen drei Multiplen Myelom Zelllinien konnte die SLy2 Konzentration gesteigert werden, auch wenn sich die Zelllinien in ihrer Reaktion doch klar und teilweise stark unterscheiden.

### 3.1.2. Auswirkung der Stimulation auf die Lokalisation von SLy2 in humanen Multiplen Myelom Zellen der Zelllinien JK6L, U266 und RPMI 8226

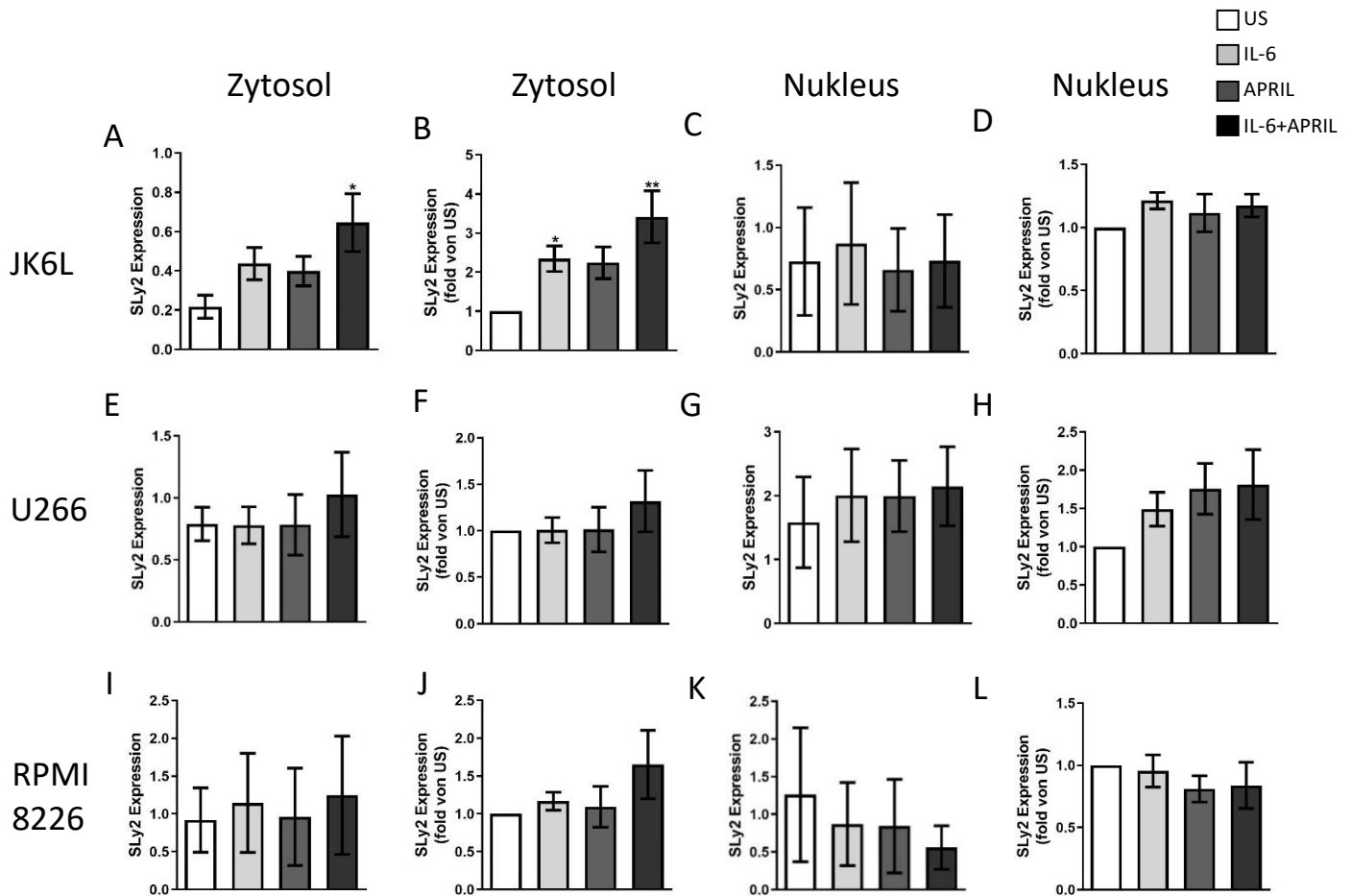
In der Arbeit von Brandt et al. konnte gezeigt werden, dass SLy2 phosphorylierungsabhängig an 14-3-3 Proteine bindet, wodurch die NLS-Sequenz des SLy2 überdeckt wird [35]. Dadurch verbleibt SLy2 im Zytosol. Es sollte überprüft werden, ob und wie sich die Lokalisation von SLy2 innerhalb der Zelle durch die Stimulation verändert. Bei den vorangegangenen Experimenten wurde jeweils nur die gesamte Zellmasse betrachtet und diese nicht nach Zytoplasma und Nukleus Fraktion aufgetrennt. Dies wurde nun in einem weiteren Schritt analysiert (Abb. 4 und 5).



**Abbildung 4: Entwickelte Membranen der Fraktionierung.** Der obere Abschnitt wurde mit einem Lamin A/C-Antikörper entwickelt, der untere mit dem GAPDH-Antikörper. Es zeigt sich, dass für die U266 Zellen keine Lamin A/C Banden mit bloßem Auge erkennbar sind.

In diesem Beispiel-Blot ist in der oberen Bildhälfte jeweils die Membran, die mit dem Lamin A-Antikörper inkubiert wurde abgebildet und unten die Membranen, die mit dem GAPDH-Antikörper inkubiert wurden. Die drei Zelllinien JK6L, U266 und RPMI 8226 sind zur übersichtlicheren Darstellung durch die blaue gestrichelte Linie getrennt. Am rechten und linken Bildrand ist jeweils die Größe des Molekulargewichtsmarkers in Rot beschriftet. Es zeigt sich, dass auch in den Nukleus-Fractionen, die durch ein Vorhandensein von Lamin A gekennzeichnet sind, eine schwache GAPDH-Band nachweisbar ist. In den U266 Zellen ist keine Lamin A Bande nachweisbar, auch in der Nukleus-Fraktion.

Es zeigte sich für die JK6L Zelllinie eine klare, signifikante Steigerung der SLy2 Protein-Menge im Zytosol durch die Stimulation mit der Kombination aus IL-6 und APRIL (Abb. 5A und 5C). Ähnlich stellte sich auch die Steigerung der SLy2 Protein-Menge in der gesamten Zelle dar. In der Darstellung der Messwerte als Verhältnis der stimulierten Proben zur unstimulierten Kontrolle der Zytosol-Fraktion stellt sich ein ähnliches Bild dar (Abb. 5B und 5D). Auch hier ist eine signifikante Steigerung der SLy2 Proteinmenge durch die Stimulation mit der Kombination aus IL-6 und APRIL zu erkennen. Zusätzlich zeigt sich eine signifikante Steigerung durch die Stimulation mit IL-6 alleine. In der Nukleus Fraktion stellt sich kein klares Bild dar. Hierbei hat es den Anschein, dass die SLy2 Konzentration, durch alle drei Stimulationen leicht gesteigert werden kann.



**Abbildung 5: Bestimmung der SLy2 Proteinmenge in der Zytosol und Nukleus Fraktion.** In der Zytosol Fraktion von (A) der JK6L Zelllinie (n=5), (E) der U266 Zelllinie (n=5) und (I) der RPMI 8226 Zelllinie (n=9); und der Nukleus Fraktion von (C) der JK6L Zelllinie (n=5), (G) der U266 Zelllinie und (K) der RPMI 8226 Zelllinie (n=9). Die Zellen wurden in Zellkultur für 24h entweder unstimuliert (US) oder mit  $10^{ng/ml}$  des jeweiligen Stimulans inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in eine Zytosol- und eine Nukleus-Fraktion getrennt und die jeweilige SLy2-Proteinmenge mittels Western-Blot bestimmt. Bestimmung der SLy2 Proteinmenge in den Fraktionen als Verhältnis der stimulierten Proben zur unstimulierten Kontrolle der Zytosol Fraktion (B) der JK6L Zelllinie (n=5), (F) der U266 Zelllinie (n=5) und der RPMI 8226 Zelllinie (n=9); und der Nukleus Fraktion (D) der JK6L Zelllinie (n=5), (H) der U266 Zelllinie und (L) der RPMI 8226 Zelllinie (n=9). Quantitative Auswertung mittels *One way Anova*, *Dunn's Multiple Comparison Test* zeigt Mittelwert +/- SEM. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz (\*\*\*P<0,001; \*\*P<0,01; \*P<0,05).

In der U266 Zelllinie war die Funktionalität der Fraktionierung fraglich. Im Western-Blot zeigte sich für die U266 Zelllinie in der Nukleus-Fraktion keine Lamin A/C-Bande, welche ja als Nachweis und Bezug für die Nukleus-Fraktion dienen sollte (Abb. 4). Zwar waren bei allen drei Zelllinien die Lamin A/C-Banden schwach ausgeprägt, aber für die U266-Zelllinien mit bloßem Auge nicht sichtbar.

Es wurde der Bereich ausgewertet, in dem die Lamin A/C-Bande zu erwarten war.

Die U266 Zellen zeigten weder in der Zytosol- noch in der Nukleus-Fraktion durch die Stimulation eine signifikante Steigerung der SLy2 Protein-Menge (Abb. 5E und 5G). In der Darstellung als Verhältnis der stimulierten Proben zur unstimulierten Kontrolle scheint sich zwar eine Tendenz abzuzeichnen, diese ist jedoch nicht signifikant (Abb. 5F und H).

In den RPMI 8226 Zellen zeigte sich in der Zytosol-Fraktion relativ betrachtet eine Steigerung der SLy2 Menge (Abb. 5I und 5J). Diese Steigerung ist nicht signifikant. In der Nukleus-Fraktion sinkt die SLy2 Menge mit der Stimulation (Abb. 5K und L). Auch dies ist nicht signifikant. Diese Ergebnisse könnten allerdings darauf hindeuten, dass in den RPMI 8226 Zellen durch die Stimulation SLy2 aus dem Nukleus ins Zytosol verbracht wird oder im Zytosol verbleibt.

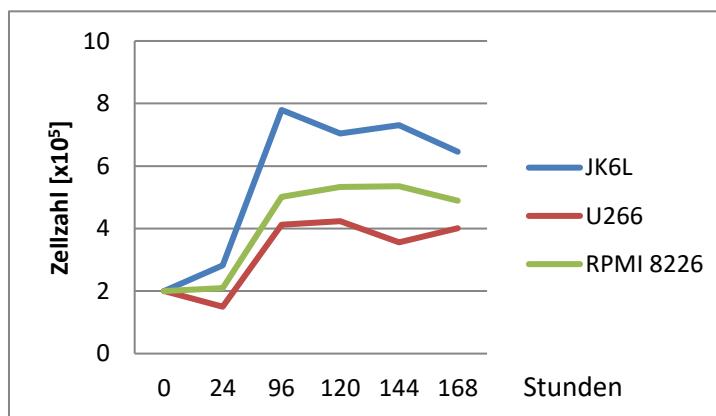
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die Stimulation die SLy2 Menge im Zytosol meist gesteigert werden konnte. In der Nukleus-Fraktion lässt sich keine eindeutige Aussage für alle drei Zelllinien machen.

### 3.1.3. Auswirkung der Stimulation auf die Proliferation der humanen Multiplen Myelom Zelllinien JK6L, U266 und RPMI 8226

Die Proliferationsrate von Leukämiezellen ist klinisch ein wichtiges Malignitätskriterium und beeinflusst oft die Prognose des Patienten. Daher sollte untersucht werden, ob die Steigerung der SLy2 Menge durch die Stimulation auch einen Effekt auf das Proliferationsverhalten der Zellen hat. Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurde eine Ki-67 Färbung der Zelllinien durchgeführt. Die Methode der Stimulation und Messung musste dabei für die einzelnen Zelllinien erst optimiert werden. Da die drei Zelllinien von sich aus so stark proliferierten, waren in den Messungen zunächst keine Unterschiede zwischen den Stimulationen zu erkennen. Um festzustellen, wann die

Zellproliferation stagniert, wurden die Zellen in Hungermedium mit 0% FCS ausgesät und dann mit Hilfe des CASY die Anzahl der Zellen bestimmt.

Diese Messung ergab, dass die Zellzahl v.a. in den ersten 96 h stark zunimmt, dann aber auf einem hohen Niveau stagniert (Abb. 6). Die folgende Ki-67 Messung sollte innerhalb dieses Plateaus stattfinden. Innerhalb der ersten 96 h scheint die Proliferation aller drei Zelllinien so stark zu sein, dass Unterschiede nur schwer messbar scheinen. Hat die Zellzahl ein stabiles Niveau erreicht, scheinen Unterschiede in der Proliferationsrate, die durch die Stimulation ausgelöst wurden, einfacher detektierbar zu sein.



**Abbildung 6: Messungen der Zellzahlen der Multiplen Myelom Zelllinien im CASY über sieben Tage.** Es wurde der Zeitpunkt bestimmt, an dem die JK6L, U266 und RPMI 8226 Zelllinien in Hungermedium nicht mehr weiter proliferieren.

Aus diesen Messungen wurde dann ein Protokoll für die Ki-67 Messung am Durchflusszytometer erstellt:

- Am ersten Tag wurden die Zellen in Petrischalen mit Hungermedium ausgesät.
- Am fünften Tag wurden  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen pro well in einer 24 well Platte mit Hungermedium ausgesät.
- Am sechsten Tag wurden die Zellen mit IL-6, APRIL oder der Kombination aus beidem stimuliert. Alle Zellen wurden weiter in Hungermedium inkubiert. Auch das Stimulans wurde in Hungermedium gelöst.

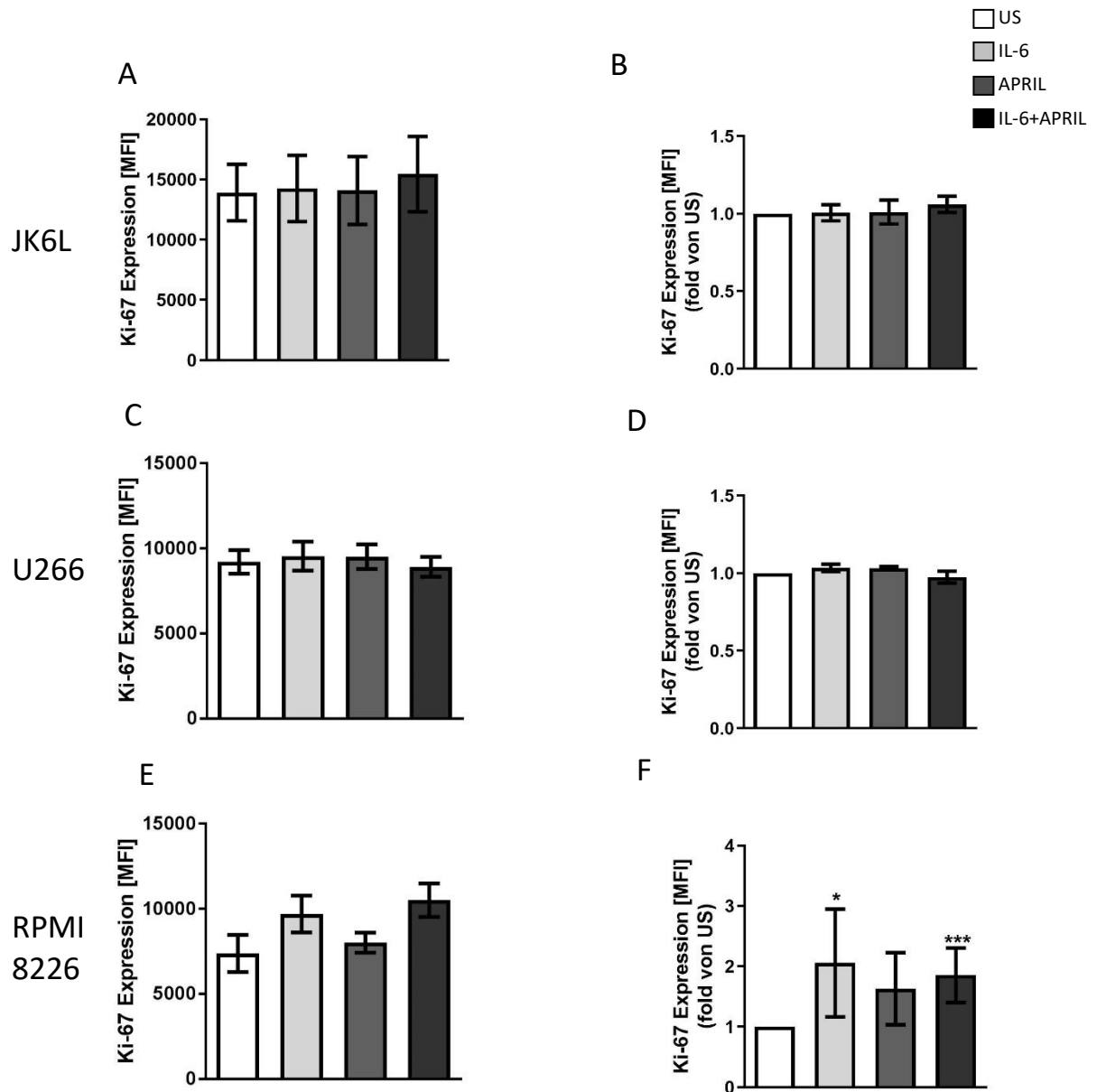


- Am siebten Tag erfolgten dann die Färbung mit Ki-67 und die Messung am Durchflusszytometer.

Dieses Schema wurde so für die JK6L und RPMI 8226 Zellen angewendet. Für die U266 Zellen wurde der Zyklus um einen Tag verkürzt. Das heißt, die Zellen wurden bereits am vierten Tag in 24 well Platten gesät, am fünften Tag stimuliert und dann bereits am sechsten Tag gefärbt und gemessen.

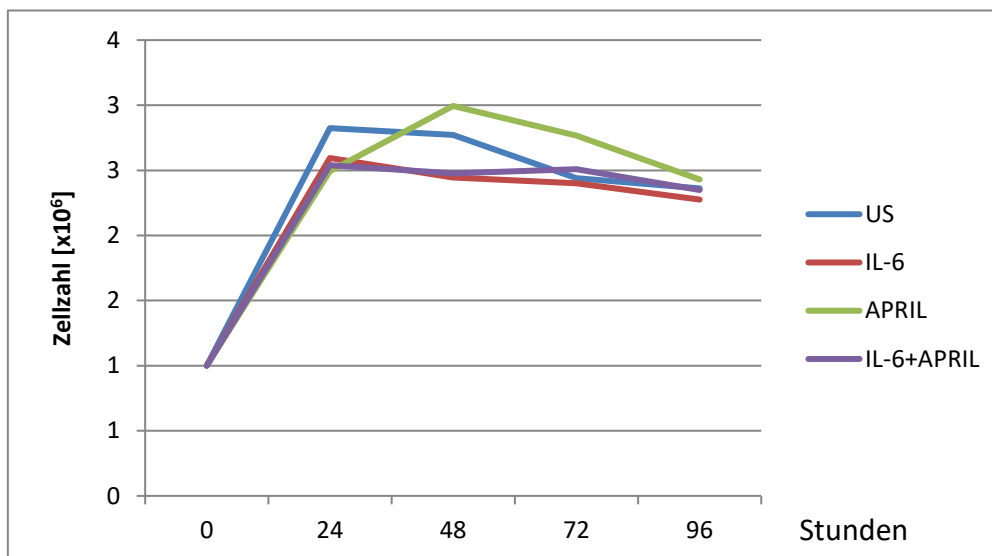
Für die JK6L (Abb. 7A, 7B) und U266 (7C, 7D) Zelllinien konnte hierbei keine Veränderung des Proliferationsverhaltens festgestellt werden.

Dies gilt nicht für die RPMI 8226 Zellen. Hierbei zeigte sich, dass durch die Stimulation eine klare Tendenz zur gesteigerten Proliferation besteht (Abb. 7E). In der Darstellung als Verhältnis der stimulierten Proben zur unstimulierten Kontrolle tritt dies noch stärker hervor (Abb. 7F). Dabei zeigt sich durch die Stimulation mit IL-6 eine signifikante Steigerung der Proliferationsrate. Auch bei der Kombination aus IL-6 und APRIL zeigt sich eine hoch signifikante aber geringere Steigerung der Proliferationsrate.



**Abbildung 7: Bestimmung der Proliferationsrate** in (A) der JK6L Zelllinie (n=7), (C) der U266 Zelllinie (n=5) und (E) der RPMI 8226 Zelllinie. Hierfür wurden die Zellen zunächst für einige Tage in Hungermedium ohne FCS inkubiert. Die JK6L und die RPMI 8226 Zellen wurden für jeweils 6 Tage im Hungermedium gehalten. Die U266 Zellen wurden nur für 5 Tage in Hungermedium inkubiert. Dann wurden die Zellen in Zellkultur für 24h mit  $10^{ng/ml}$  des jeweiligen Stimulans inkubiert. Das Stimulans war dabei auch in Hungermedium gelöst. Anschließend wurde in den Zellen Ki-67 angefärbt und so die Proliferationsrate im Durchflusszytometer analysiert. Bestimmung der Ki-67 Expression als Verhältnis der stimulierten Proben zu unstimulierten Kontrollen in (B) der JK6L Zelllinie (n=7), (D) der U266 Zelllinie (n=5) und (F) der RPMI 8226 Zelllinie (n=9). Quantitative Auswertung mittels *One way Anova*, *Dunn's Multiple Comparison Test* zeigt Mittelwert  $\pm$  SEM. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz (\*\* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \* $P < 0,05$ ).

Um auszuschließen, dass die gesteigerte SLy2 Menge erst zu einem späteren Zeitpunkt zu einer verminderten Proliferation führt, wurden die CASY Experimente im Hungermedium mit den RPMI 8226 Zellen über einen längeren Zeitraum wiederholt. Dafür wurden die RPMI 8226 Zellen in Hungermedium ausgesät und nach 72 h in vier 6 well Platten mit je einer Millionen Zellen pro well ausgesät. Sofort wurden die Zellen mit IL-6, APRIL oder beidem stimuliert. Anschließend wurde die Zellzahl alle 24 h mit dem Casy bestimmt.



**Abbildung 8: Bestimmung der Zellzahl der RPMI 8226 Zelllinie nach Stimulation in Hungermedium über 72 h.** Hierfür wurden die Zellen zunächst für 6 Tage in Hungermedium ohne FCS inkubiert. Dann wurden die Zellen in Zellkultur für 24h mit  $10^{ng/ml}$  des jeweiligen Stimulans inkubiert. Das Stimulans war dabei auch in Hungermedium gelöst. Anschließend wurde die Zellzahl alle 24h im Casy gemessen (n=1).

Hier zeigte sich, dass die Zellzahl innerhalb der ersten 24 h stark anstieg, dann aber stagnierte (Abb. 8). Es zeigte sich außerdem ein leichter, aber nur sehr geringer Rückgang der Zellzahl. Dies kann allerdings auch auf das weitere Inkubieren der Zellen in Hungermedium und das damit verbundene Zellsterben zurückzuführen sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch diese Experimente nicht vollständig geklärt werden konnte, ob die SLy2 Menge Einfluss auf das Wachstum der Multiplen Myelom Zellen hat. Zwar steigt die Wachstumsrate

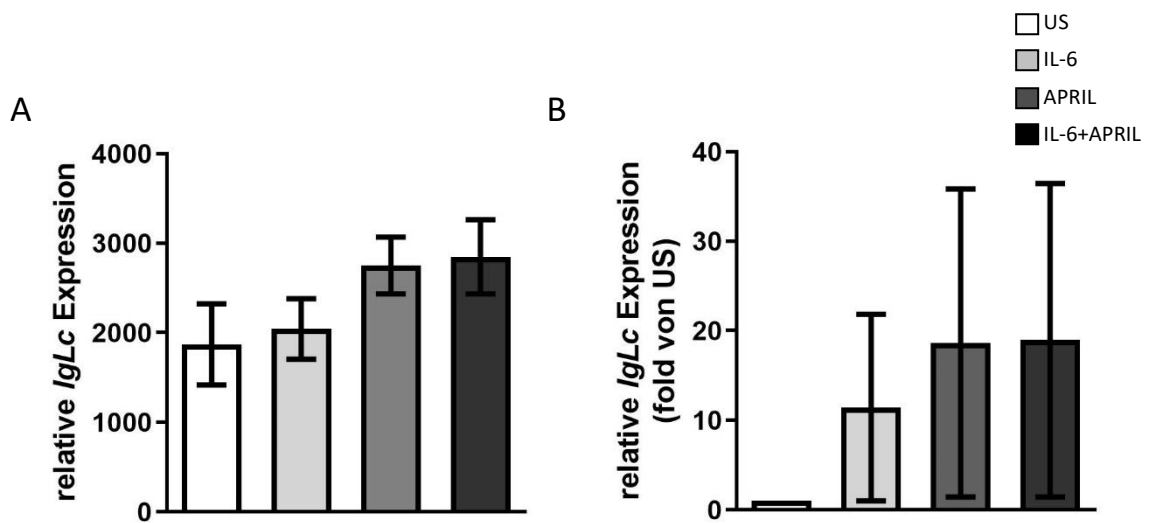
zunächst stark an, stagniert dann aber. Ob diese Stagnation allerdings auf SLy2 zurückzuführen ist, konnte nicht ausreichend geklärt werden.

Alles in allem konnte durch die Stimulation nur die Proliferationsrate der RPMI 8226 Zellen eindeutig beeinflusst werden. Die anderen Zelllinien, sowie die Wachstumsraten zeigten keine eindeutigen Ergebnisse.

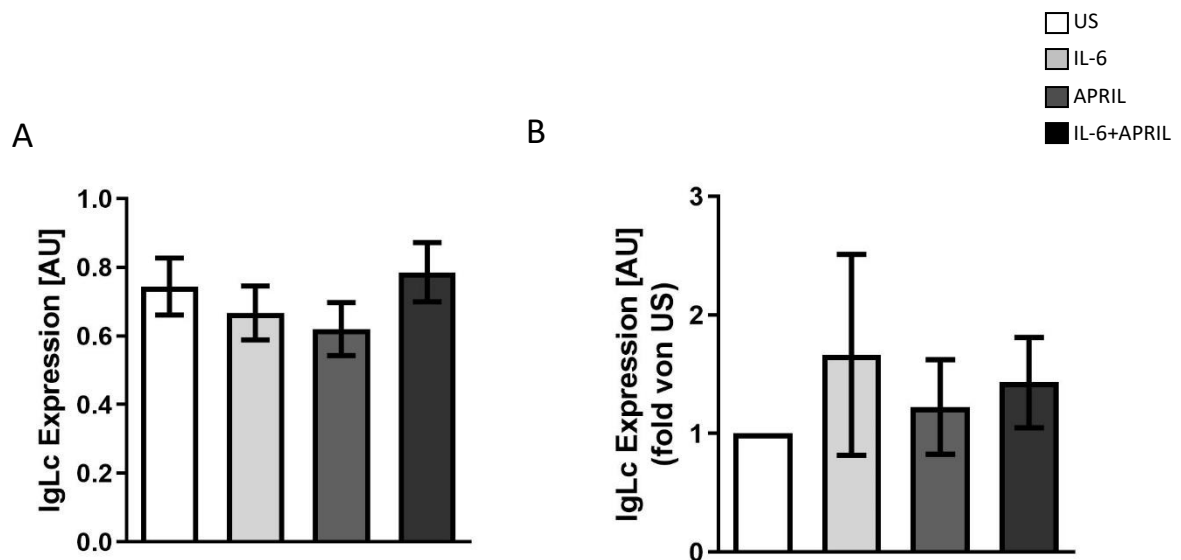
#### 3.1.4. Auswirkung der Stimulation auf die Sekretion von IgLc

Es ist bekannt, dass die RPMI 8226 Zelllinie IgLc Antikörper produziert [60]. Diese monoklonalen Antikörper, auch Paraproteine genannt, stellen einen wesentlichen Malignitätsfaktor des Multiplen Myeloms dar. Um zu überprüfen, wie sich die Antikörperproduktion auf die Stimulation verhält, wurde zunächst die *IgLc* mRNA Menge bestimmt. Da es keine Untersuchungen zu JK6L und U266 gab, wurde auch überprüft, ob diese beiden Zelllinien *IgLc* mRNA produzieren. Es zeigte sich jedoch, dass diese beide Zelllinien nur sehr geringe Mengen an *IgLc* mRNA produzieren, weshalb sich im Folgenden ganz auf die RPMI 8226 Zellen konzentriert wurde.

Hier zeigte sich, dass durch die Stimulation die *IgLc* Expression tendenziell gesteigert werden konnte (Abb. 9A). Diese Steigerung ist nicht signifikant. Das gleiche Bild zeigt sich in der Darstellung der stimulierten Proben im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 9B).



**Abbildung 9: Bestimmung der IgLc-mRNA-Menge** (A) in RPMI 8226 Zellen Die Zellen wurden in Zellkultur für 24h entweder unstimuliert (US) oder mit  $10^6$   $ng/ml$  des jeweiligen Stimulans inkubiert. Daraufhin wurde die RNA aus den Zellen extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mit dieser cDNA wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. (n=8). (B) Bestimmung der IgLc mRNA Menge als Verhältnis der stimulierten Proben zu unstimulierten Kontrollen (n=8). Quantitative Auswertung mittels *One way Anova, Dunn's Multiple Comparison Test* zeigt Mittelwert +/- SEM.



**Abbildung 10: Bestimmung der IgLc Menge** aus (A) dem Überstand der RPMI 8226 Zellen (n=16). Hierzu wurden die RPMI 8226 Zellen in Zellkultur für 24h mit  $10^6$   $ng/ml$  des jeweiligen Stimulans inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Zellkulturüberstand für die Durchführung des ELISA verwendet. (B) Bestimmung der IgLc Menge als Verhältnis der stimulierten Proben zur unstimulierten Kontrolle (n=16). Quantitative Auswertung mittels *One way Anova, Dunn's Multiple Comparison Test* zeigt Mittelwert +/- SEM.

Um die IgLc Produktion weiter zu quantifizieren, sollte außerdem die IgLc Menge mittels ELISA bestimmt werden. Dabei zeigten sich keine eindeutigen Ergebnisse (Abb. 10A).

In der Darstellung der stimulierten Proben im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle, zeigt sich die Tendenz, dass mit der IL-6 Stimulation auch die IgLc Menge vermehrt werden konnte (Abb. 10B). Dieses Ergebnis stellt sich nicht als signifikant dar. Es konnte also kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Stimulation und IgLc Zunahme gezeigt werden.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass durch die Stimulation der RPMI 8226 Zellen die *IgLc* mRNA Produktion tendenziell gesteigert werden konnte. Ähnlich verhält es sich mit der IgLc Menge, die mittels ELISA quantifiziert werden konnte. Hierbei konnte die Menge über eine Stimulation mit IL-6 erhöht werden. Diese erhöhte Produktion von Antikörperbestandteilen würde auf eine gesteigerte Malignität hindeuten, was mit einer Tumorsuppressorfunktion von SLY2 nur schwer vereinbar wäre.

### 3.2. Transfektion der RPMI 8226 Zellen mit siRNA

Es ist bekannt, dass die RPMI 8226 Zellen im Gegensatz zu den JK6L und U266 Zellen, eine hohe Expression von SLY2 aufweisen [26, 28]. Um die SLY2 Menge zu reduzieren, sollten die RPMI 8226 Zellen mit siRNA transfiziert werden. Hierfür war allerdings noch kein Protokoll etabliert. Zunächst wurde versucht die SLY2-Expression mit verschiedenen Verhältnissen von Transfektionsreagenz und siRNA in den RPMI 8226 Zellen zu senken. Der Erfolg einer Transfektion sollte dabei mit einer RT-qPCR nachgewiesen werden. Hierzu wurde die Menge an SLY2 in den transfizierten Zellen mit der Menge in den kontrolltransfizierten Zellen verglichen. Um zusätzlich den Erfolg der Transfektion an sich zu bestimmen, wurden auch die kontrolltransfizierten Zellen mit den GAPDH-siRNA-transfizierten Zellen auf ihren GAPDH Wert hin verglichen.

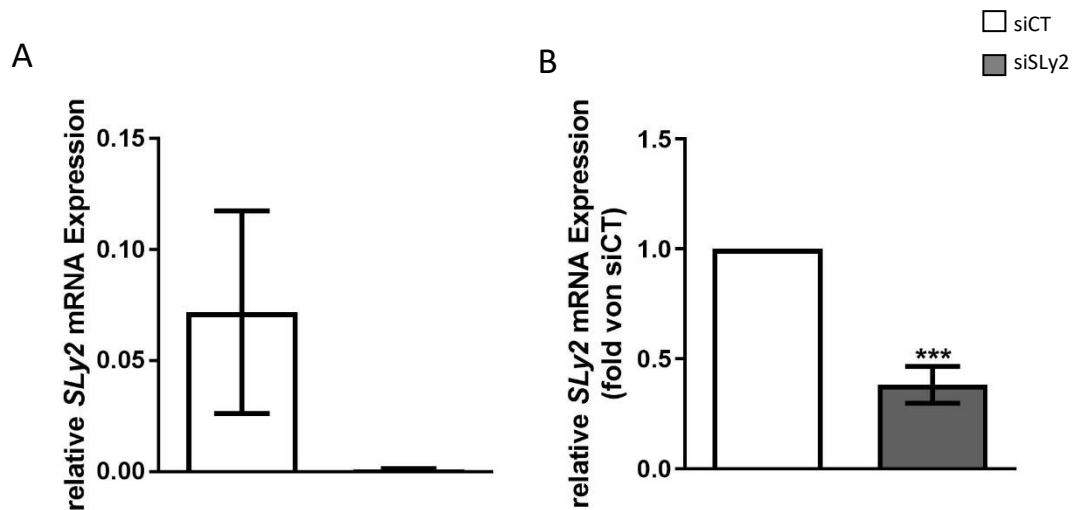
Zuerst ließ sich bei der Transfektion mittels Transfektionsreagenz von EZ Biosystems kein Erfolg verzeichnen, sodass als nächstes eine Transfektion mittels Amaxa-Elektroporation angestrebt wurde. Hierfür wurden verschiedene Programme für die Transfektion der RPMI 8226 Zellen verwendet. Der Erfolg der Elektroporation sollte auf die gleiche Weise, mittels RT-qPCR, überprüft werden. Auch hier konnte jedoch mit den Programmen U-008 und G-015 keine deutliche Reduktion der *SLy2* mRNA Expression erreicht werden.

Im nächsten Schritt wurden die Transfektions-Experimente mit einer neuen siRNA wiederholt. Doch auch hier zeigte sich weder in der Elektroporation noch in der Transfektion mittels Reagenz eine Verminderung der Expression der *SLy2* mRNA noch der Kontroll mRNA von GAPDH.

Da auch die Kontrollexperimente negativ verlaufen sind, wurden neue RPMI 8226 Zellen verwendet und die Transfektion mittels Reagenz wiederholt. Hier zeigte sich nun eine deutliche Reduktion der *SLy2* Expression in den *SLy2*-siRNA-transfizierten Zellen im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen. Die stärkste Reduktion der Expression konnte dabei mit 40 pmol der siRNA und 2,0 µl oder 3,5 µl des Transfektionsreagenzes erreicht werden. Mit diesem Protokoll wurden die folgenden Experimente dann durchgeführt.

### 3.2.1. Änderungen im mRNA-Gehalt von *SLy2* nach Transfektion mit siRNA

Nachdem die Zellen wie oben beschrieben mit siRNA transfiziert wurden, wurde ihre *SLy2* mRNA Menge mittels RT-qPCR gemessen. Dies diente gleichzeitig dazu, festzustellen, ob eine Transfektion erfolgreich war. In die Auswertung wurden daher nur Experimente aufgenommen, in denen die Transfektion zu einer Reduktion der *SLy2* mRNA Menge geführt hat. Hierbei zeigte sich nun, dass durch die Transfektion mit siRNA die *SLy2* mRNA Menge auf ein Minimum gesenkt werden konnte (Abb. 11A). In der Darstellung als Verhältnis der Probe zur unstimulierten Kontrolle stellt sich diese *SLy2*-Reduktion als signifikant dar (Abb. 11B).



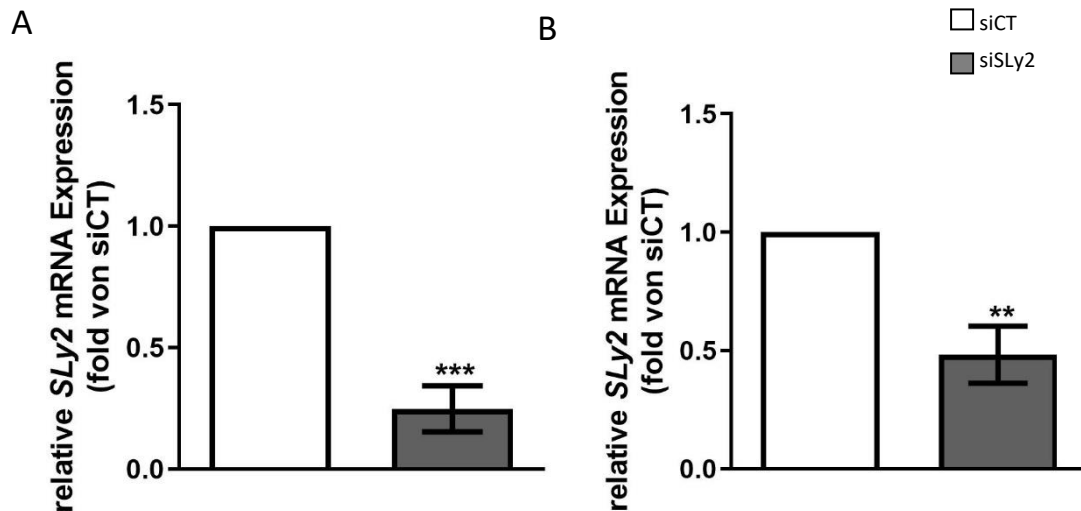
**Abbildung 11: Bestimmung der *SLy2* mRNA-Menge nach Transfektion mit siRNA** in (A) den RPMI 8226 Zellen (n=14). Die Zellen wurden mit 2,0  $\mu$ l und 3,5  $\mu$ l des Transfektionsreagenzes für RPMI 8226 Zellen und 40 pmol der siRNA transfiziert. Daraufhin wurde die RNA aus der Zellkultur extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mit dieser cDNA wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. (B) Bestimmung der *SLy2* mRNA Menge als Verhältnis der kontrolltransfizierten Proben zu siSLy2 transfizierten Proben (n=14). Quantitative Auswertung mittels *t* test zeigt Mittelwert  $\pm$  SEM. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz (\*\*\*)  $P < 0,0001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ ).

In den meisten Experimenten konnte die *SLy2* mRNA Menge deutlich gesenkt werden. Es konnte also eine zuverlässige Methode zur Transfektion der RPMI 8226 Zellen etabliert werden.

Es stellte sich dabei so dar, dass die Transfektionen mit 2,0  $\mu$ l Transfektionsreagenz zu einer stärkeren Reduktion der *SLy2* mRNA Menge geführt hat (Abb. 12A), als die Transfektion mit 3,5  $\mu$ l Reagenz (Abb. 12B). Bei der Transfektion mit 2,0  $\mu$ l konnte die *SLy2* Expression auf ca. 40% reduziert werden. Bei der Transfektion mit 3,5  $\mu$ l des Transfektionsreagenz konnte die *SLy2* Expression nur auf ca. 60% reduziert werden. Diese war dafür die zuverlässigere Methode der Transfektion. Bei insgesamt je zehn Transfektionsversuchen konnte die *SLy2* Expression bei einer Transfektion mit 3,5  $\mu$ l des Transfektionsreagenz insgesamt acht Mal erfolgreich durchgeführt werden, während bei der Transfektion mit 2,0  $\mu$ l des Transfektionsreagenz nur sechs Mal eine Reduktion der *SLy2* Expression erreicht werden konnte. In den



nachfolgenden Experimenten wurden Zellen nach Transfektionen mit 2,0 µl und 3,5 µl Reagenz verwendet.



**Abbildung 12: Bestimmung der SLy2 mRNA-Menge in den RPMI 8226 Zellen nach Transfektion mit siRNA.** Sie wurden mit 40 pmol der siRNA inkubiert und (A) 2,0 µl des Transfektionsreagenzes transfizierten. Darstellung als Verhältnis der kontrolltransfizierten Probe zur siSLy2 transfizierten Probe (n=6). (B) 3,5 µl des Transfektionsreagenzes transfizierten Zellen. Darstellung als Verhältnis der kontrolltransfizierten Proben zu siSLy2 transfizierten Proben (n=8). Daraufhin wurde die RNA aus der Zellkultur extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mit dieser cDNA wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Quantitative Auswertung mittels *t* test zeigt Mittelwert +/- SEM. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz (\*\*\*P<0,0001; \*\*P<0,01; \*P<0,05).

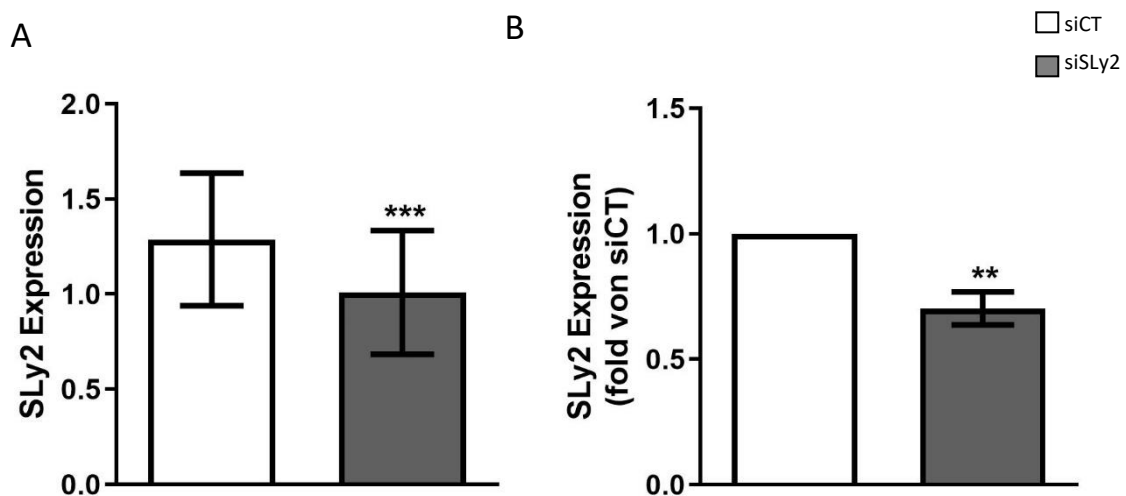
Somit konnten die RPMI 8226 Zellen zuverlässig und nachweisbar transfiziert werden.

### 3.2.2. Änderungen im Proteingehalt von SLy2 nach Transfektion mit siRNA

Im nachfolgenden Schritt sollte nun überprüft werden, ob nicht nur die SLy2 mRNA, sondern auch die SLy2 Protein Menge mit der siRNA Transfektion reduziert werden kann. Dies würde bedeuten, dass durch die Transfektion auch alle weiteren Reaktionen, die durch das SLy2 Protein bedingt sind, beeinflussbar wären. Daher wurden mit Zellen aus Experimenten, in denen zuvor mittels

RT-PCR nachgewiesen werden konnte, dass die *SLy2* mRNA reduziert wurde, Western-Blot Analysen durchgeführt. Damit sollte überprüft werden, ob die Transfektion auch Auswirkungen auf die Proteinmenge von *SLy2* hat.

In der Western-Blot Analyse zeigte sich, dass wie auch schon die *SLy2* mRNA Menge, die *SLy2* Protein-Menge auf 60% reduziert werden konnte (Abb. 13A). Dies stellt sich hoch signifikant dar. Auch in der Darstellung als Verhältnis der *SLy2* transfizierten Proben zu kontrolltransfizierten Proben ist die Differenz hoch signifikant (Abb. 13B).



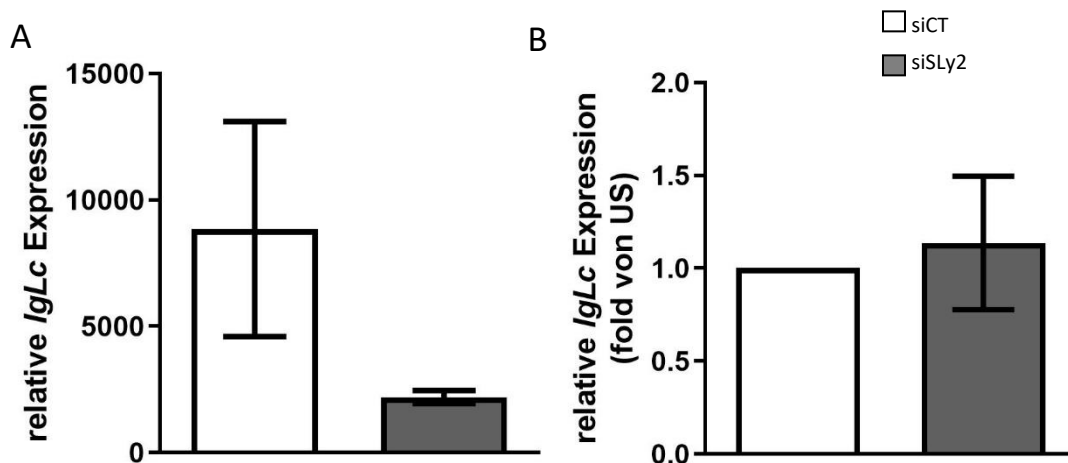
**Abbildung 13: Bestimmung der *SLy2* Proteinmenge nach Transfektion mit siRNA** in (A) der RPMI 8226 Zellen (n=7). Die Zellen wurden mit 2,0  $\mu$ l und 3,5  $\mu$ l des Transfektionsreagenzes für RPMI 8226 Zellen und 40 pmol siRNA transfiziert. Daraufhin wurde die Proteinmenge an *SLy2* mittels Western-Blot bestimmt. (B) Bestimmung der *SLy2* Proteinmenge als Verhältnis der kontrolltransfizierten Proben zu den siSLy2 transfizierten Proben (n=7). Quantitative Auswertung mittels *t* test zeigt Mittelwert  $\pm$  SEM. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz (\*\*\*P<0,0001; \*\*P<0,01; \*P<0,05).

Abschließend lässt sich also sagen, dass auch die *SLy2* Proteinmenge durch die Transfektion reduziert werden konnte. In einem nächsten Schritt sollte nun getestet werden, welchen Einfluss dies auf zelluläre Funktionen hat.

### 3.2.3. Änderungen der Sekretion von IgLc nach Transfektion mit siRNA

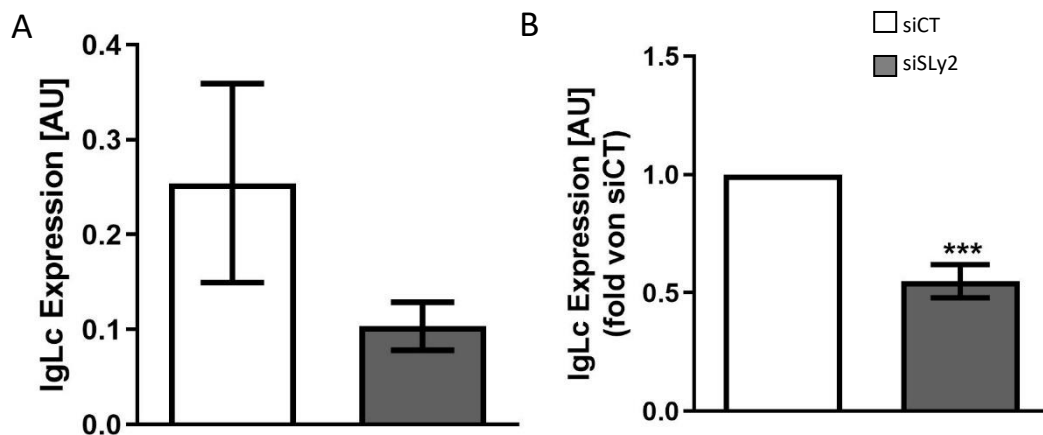
Die IgLc Menge konnte in den RPMI 8226 Zellen durch die Stimulation tendenziell gesteigert werden. Daher sollte nun überprüft werden, ob diese Steigerung auf

eine erhöhte SLy2 Konzentration zurückzuführen ist. In den vorhergehenden Experimenten konnte dargestellt werden, dass durch die Transfektion mit siRNA die SLy2 mRNA- und Protein-Menge gesenkt werden konnte. Daher sollte nun aus diesen Zellen auch die *IgLc* mRNA bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass die *IgLc* mRNA-Menge in den SLy2-siRNA-transfizierten Zellen tendenziell gesenkt werden konnte (Abb. 14A). Allerdings unterlag die *IgLc* mRNA-Menge der kontrolltransfizierten Zellen großen Schwankungen. Daher stellt es sich in der Darstellung der *IgLc* mRNA-Menge als Verhältnis der kontroll-siRNA-transfizierten Zellen zu den SLy2-siRNA-transfizierten Zellen so dar, dass durch die Transfektion die *IgLc* mRNA-Menge nicht verändert wurde (Abb. 14B).



**Abbildung 14: Bestimmung der *IgLc* mRNA-Menge nach Transfektion mit siRNA** in (A) den RPMI 8226 Zellen (n=11). Die Zellen wurden mit 2,0  $\mu$ l und 3,5  $\mu$ l des Transfektionsreagenzes für RPMI 8226 Zellen und 40 pmol der siRNA transfiziert. Daraufhin wurde die RNA aus der Zellkultur extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mit dieser cDNA wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. (B) Bestimmung der *IgLc* mRNA Menge als Verhältnis der kontrolltransfizierten Proben zu siSLy2 transfizierten Proben (n=11). Quantitative Auswertung mittels *t* test zeigt Mittelwert +/- SEM.

Um diesen Effekt genauer zu analysieren wurde die *IgLc* Menge auch mittels ELISA bestimmt. Hier zeigte sich, dass durch die Transfektion mit SLy2-siRNA die Menge an *IgLc* deutlich reduziert werden konnte (Abb. 15A). In der Darstellung als Verhältnis der kontrolltransfizierten Zellen zu den SLy2-siRNA transfizierten Zellen ist diese Reduktion hoch signifikant (Abb. 15B).



**Abbildung 15: Bestimmung der IgLc Menge nach Transfektion mit siRNA aus dem Überstand** der (A) RPMI 8226 Zellen (n=9). Die Zellen wurden mit 2,0  $\mu$ l und 3,5  $\mu$ l des Transfektionsreagenzes für RPMI 8226 Zellen und 40 pmol der siRNA transfiziert. Nach Zentrifugation wurde der Zellkulturüberstand für die Durchführung des ELISA verwendet. (B) Bestimmung der IgLc Menge als Verhältnis der kontrolltransfizierten Proben zu siSLy2 transfizierten Proben (n=9). Quantitative Auswertung mittels *t* test zeigt Mittelwert +/- SEM. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz (\*\*\*) $P < 0,0001$ ; \*\*) $P < 0,01$ ; \*) $P < 0,05$ .

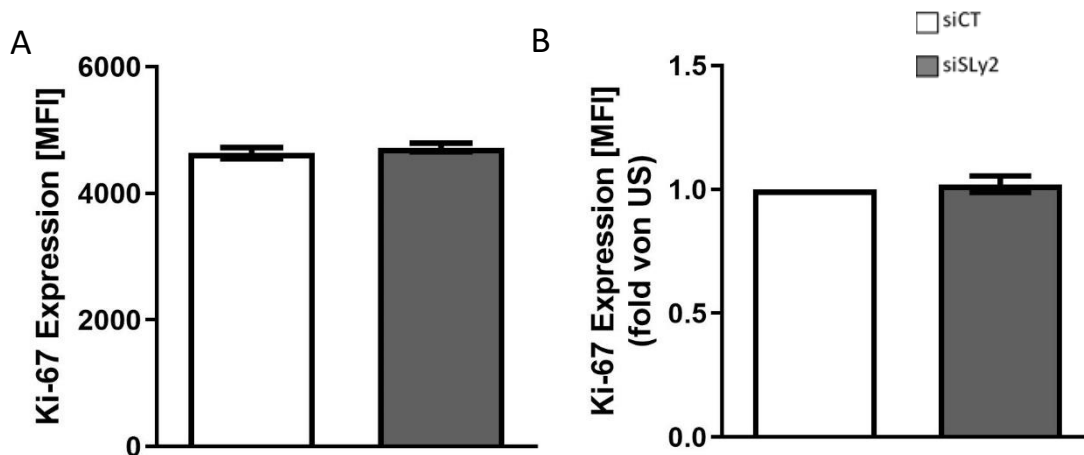
Die IgLc Produktion einer Multiplen Myelom Erkrankung stellt einen ihrer wesentlichen Malignitätsfaktoren dar. Eine geringere IgLc Produktion in Abwesenheit von SLy2 würde eine Tumorsuppressorfunktion von diesem also eher nicht stützen. Allerdings ist anzumerken, dass durch die Transfektion mit SLy2-siRNA keine vollständige Reduktion der SLy2 Expression erreicht werden konnte. Es kann also nicht sicher davon ausgegangen werden, dass durch die Transfektion mit SLy2-siRNA alle untergeordneten Signalwege erreicht werden können.

#### 3.2.4. Änderung der Proliferation der humanen Multiplen Myelom Zelllinie RPMI 8226 nach Transfektion mit siRNA

Bei der Analyse der Proliferationsrate der stimulierten RPMI 8226 Zellen zeigte sich, dass diese mit der Stimulation anstieg. In einem nächsten Schritt sollte nun bestimmt werden, ob diese gesteigerte Proliferation auf die erhöhte SLy2 Menge durch Stimulation zurückzuführen ist.

Dazu wurden die Zellen der RPMI 8226 Zelllinie nach sechs tägiger Inkubation in Hungermedium transfiziert. Für die Transfektion wurden 2,0 µl und 3,5 µl des Transfektionsreagenzes für RPMI 8226 Zellen und 40 pmol der jeweiligen siRNA verwendet. Der Erfolg der Transfektion mit siRNA wurde wieder in einer qPCR überprüft. Es wurden nur die Experimente in die Auswertung eingeschlossen, bei denen die *SLy2* Expression durch *SLy2*-siRNA reduziert werden konnte. Anschließend wurde wieder eine Ki-67 Färbung durchgeführt und so die Proliferationsrate der Zellen bestimmt.

Dabei zeigte sich, dass es keine Unterschiede zwischen den kontrolltransfizierten Zellen und den *SLy2*-siRNA-transfizierten Zellen gab. Beide Ansätze zeigten eine etwa gleich starke Proliferationsrate. Somit scheint der Proliferationsanstieg der stimulierten RPMI 8226 Zellen nicht auf die gesteigerte *SLy2*-Menge zurückzuführen zu sein. Allerdings zeigte sich durch die, mit der Transfektion erreichte, verminderte *SLy2*-Menge auch keine Erhöhung der Proliferationsrate. Hier scheint es eher so, als ob *SLy2* keinen Einfluss auf die Proliferation der RPMI 8226 Zellen hat.



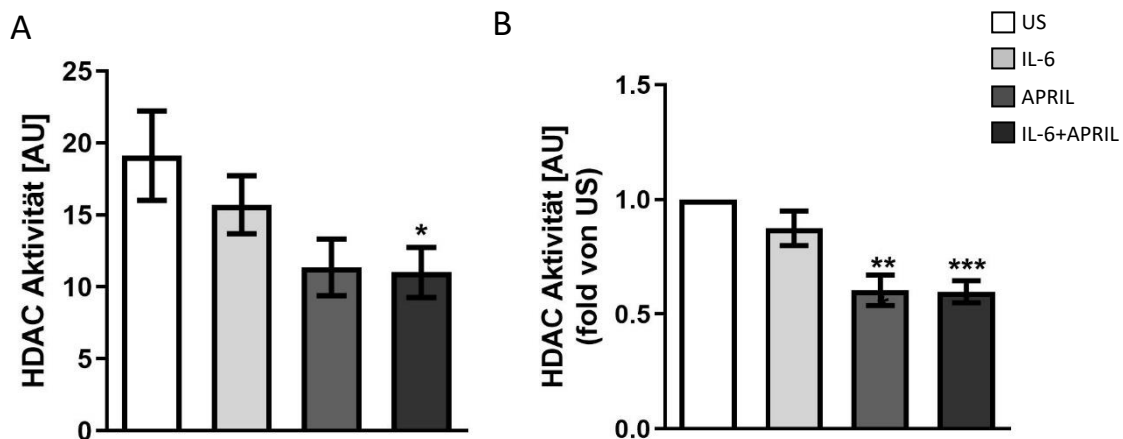
**Abbildung 16: Bestimmung der Poliferationsrate nach Transfektion mit siRNA** in (A) den RPMI 8226 Zellen (n=4). Hierfür wurden die Zellen zunächst für 6 Tage in Hungermedium ohne FCS inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 2,0 µl und 3,5 µl des Transfektionsreagenzes für RPMI 8226 Zellen und 40 pmol der siRNA transfiziert. Daraufhin wurde in den Zellen Ki-67 angefärbt und die Proliferationsrate im Durchflusszytometer analysiert. (B) Bestimmung der Ki-67 Expression als Verhältnis der kontrolltransfizierten Proben zu siSLy2 transfizierten Proben (n=4). Quantitative Auswertung mittels *t* test zeigt Mittelwert +/- SEM.

### 3.3. Interaktion von HDAC1 oder seiner Downstream-target Gene mit SLy2

#### 3.3.1. Beeinflussung der Enzymaktivität der HDAC1 durch Interaktion von HDAC1 und SLy2 nach Stimulation

In der Arbeit von Brandt et al. konnte gezeigt werden, dass SLy2 mit HDAC1 interagiert. Eine Ko-Expression von SLy2 und HDAC1 führte dabei zu einem Anstieg der HDAC1 Aktivität [35]. Es sollte daher nun überprüft werden, ob die HDAC Aktivität bei einer gesteigerten SLy2 Menge durch die Stimulation zu beeinflussen ist. Dazu wurde das HDAC Assay Kit von Millipore verwendet. Als Proben dienten die RPMI 8226 Proteinlysate der Western-Blot Analysen der SLy2 Proteinmengen. Da diese zuvor einige Zeit im Kühlschrank gelagert worden waren, wurde zunächst die Proteinmenge bestimmt. Es wurden jeweils 20 ng Protein in der HDAC Aktivitätsanalyse eingesetzt. Bei einem Experiment war die Proteinkonzentration nicht ausreichend, daher wurden nur 10 ng eingesetzt. Dies wurde in der Auswertung berücksichtigt.

In der RPMI 8226 Zelllinie zeigt sich, dass mit der Stimulation, die HDAC Aktivität sinkt (Abb. 17A). Besonders stark zeigt sich dieser Effekt bei der Stimulation mit APRIL oder der Kombination von IL-6 und APRIL. Bei der Stimulation mit beiden Zytokinen zeigt sich eine signifikante Reduktion. Noch stärker tritt diese in der Darstellung der Werte als Verhältnis der stimulierten Proben zur unstimulierten Kontrolle hervor (Abb. 17B). Hier zeigt sich eine signifikante Senkung der HDAC Aktivität für die Stimulation mit APRIL und der Kombination aus IL-6 und APRIL. Alles in allem zeigt sich, dass durch die Stimulation die HDAC Aktivität gesenkt wurde. Dies entspricht nicht dem, was wir nach der Darstellung von Brandt et al. erwartet hatten [35]. Durch die gesenkte HDAC Aktivität, müsste es zu einer gesteigerten Aktivität der Downstream-target Gene kommen. Dies würde dann zu einer verminderten Proliferation führen. Das Verhalten der Downstream-target Gene wurde daher in einem weiteren Schritt überprüft.

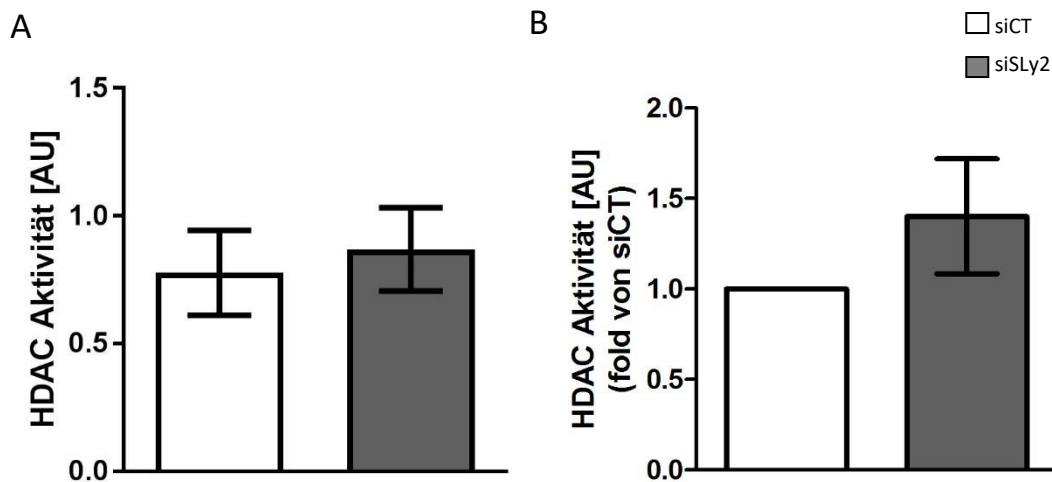


**Abbildung 17: Bestimmung der HDAC Aktivität** in (A) der RPMI 8226 Zelllinie (n=8). Die Zellen wurden in Zellkultur für 24h unstimuliert (US) oder mit  $10^6$  ng/ml des jeweiligen Stimulans inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen lysiert. Aus den Proteinlysaten wurde die HDAC Aktivität bestimmt. (B) Bestimmung der HDAC Aktivität als Verhältnis der stimulierten Proben zu unstimulierten Kontrollen (n=8). Quantitative Auswertung mittels *One way Anova, Dunn's Multiple Comparison Test* zeigt Mittelwert +/- SEM. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz (\*\*\*P<0,001; \*\*P<0,01; \*P<0,05).

### 3.3.2. Enzymaktivität der HDAC1 durch Interaktion von HDAC1 und SLy2 nach Transfektion mit siRNA

Um zu überprüfen, ob die oben beschriebene verminderte HDAC Aktivität auf SLy2 zurückzuführen ist, sollte die HDAC Aktivität nun auch in SLy2-siRNA transfizierten Zellen bestimmt werden.

Hierbei zeigte sich die Tendenz, dass nach Reduktion der SLy2 Menge die HDAC Aktivität steigt (Abb. 18A). Das gleiche Bild zeigt sich auch in der Darstellung als Verhältnis der SLy2-siRNA transfizierten Proben zu den kontrolltransfizierten Proben (Abb. 18B). Dies würde die These stützen, dass durch SLy2 die HDAC Aktivität gesenkt werden kann. Dadurch wäre eine erhöhte Menge der Downstream-target Gene der HDAC1 bedingt, was zu einer verminderten Proliferation führen würde. So könnte die Hypothese von SLy2 als Tumorsuppressorgen gestützt werden. Allerdings ist dabei zu beachten, dass die Ergebnisse nicht signifikant sind. Es zeigt sich lediglich die Tendenz, dass die HDAC Aktivität in den SLy2-siRNA transfizierten Zellen ansteigt.



**Abbildung 18: Bestimmung der HDAC Aktivität nach Transfektion mit siRNA** in (A) den RPMI 8226 Zellen (n=9). Die Zellen wurden mit 2,0  $\mu$ l und 3,5  $\mu$ l des Transfektionsreagenzes für RPMI 8226 Zellen und 40 pmol der siRNA transfiziert. Daraufhin wurden die Zellen lysiert. Aus den Proteinlysaten wurde die HDAC Aktivität bestimmt. (B) Bestimmung der HDAC Aktivität als Verhältnis der stimulierten Proben zur unstimulierten Kontrolle (n=9). Quantitative Auswertung mittels *t test* zeigt Mittelwert +/- SEM.

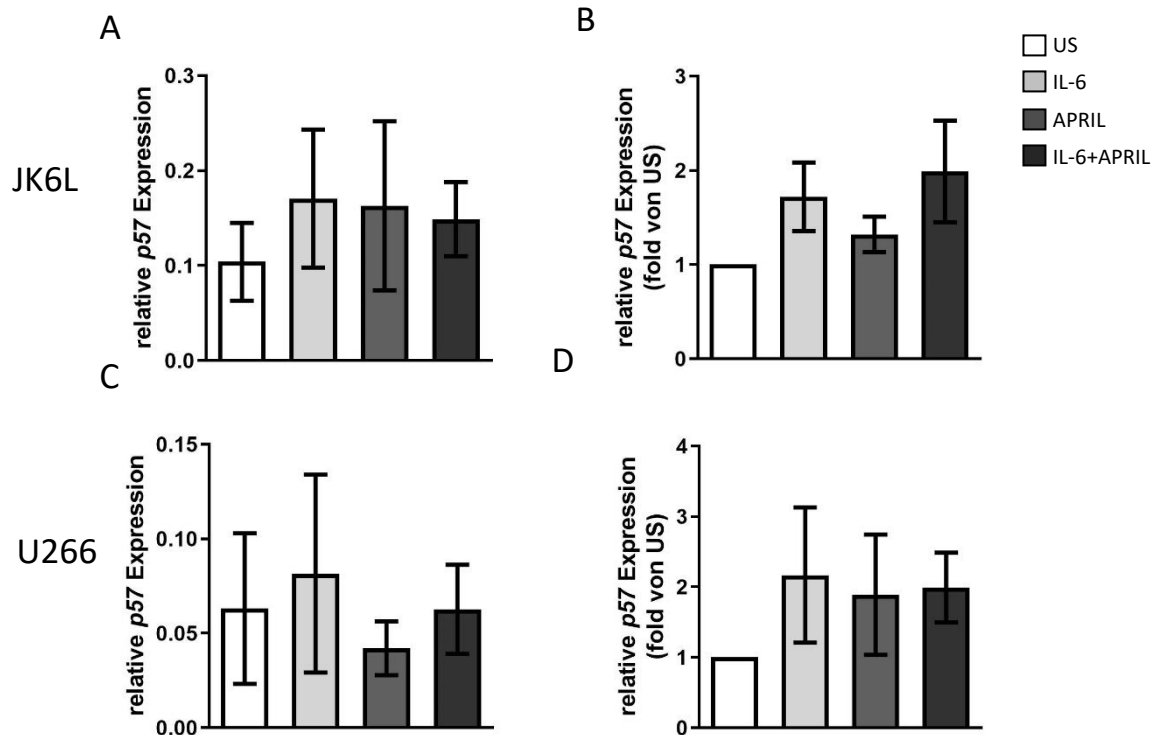
### 3.3.3. Auswirkung der Stimulation auf das Downstream-target Gen *p57*

Um die Auswirkung von SLy2 auf HDAC1 genauer zu ermitteln, wurde die Expression der Downstream-target Gene von HDAC1 quantifiziert. Der von Brandt et al. [35] gezeigte Anstieg der HDAC1 Aktivität sollte zu einer verminderten Expression an Downstream-target Genen führen. Durch diese verringerte Menge der Downstream-target Gene sollte eine gesteigerte Proliferation bedingt sein, da die zellzyklusinhibierende Wirkung der Downstream-target Gene verringert wird.

Zu diesen Downstream-target Genen zählt unter anderem *p57*. Bei *p57* handelt es sich um einen negativen Regulator der Zellproliferation, in dem es verschiedene G1 Cyclin/CdK-Komplexe fest bindet. Zunächst wurde die *p57* Expression in allen drei Zelllinien bestimmt (Abb. 19). Hierbei ließ sich in den JK6L Zelllinien die Tendenz erkennen, dass mit der Stimulation auch die Menge an *p57* zunimmt. Diese Ergebnisse waren nicht signifikant. In der Darstellung als



Verhältnis der stimulierten Proben zur unstimulierten Kontrolle zeigte sich ein übereinstimmendes Bild.



**Abbildung 19: Bestimmung der p57 mRNA-Menge** in (A) der JK6L Zelllinie (n=7) und (C) der U266 Zelllinie (n=8). Die Zellen wurden für 24h unstimuliert (US) oder mit  $10 \text{ ng/ml}$  des jeweiligen Stimulans inkubiert. Daraufhin wurde die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mit dieser cDNA wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Bestimmung der p57 mRNA Menge als Verhältnis der stimulierten Proben zu unstimulierten Kontrollen in (B) der JK6L Zelllinie (n=7) und (D) der U266 Zelllinie (n=8). Quantitative Auswertung mittels *One way Anova*, *Dunn's Multiple Comparison Test* zeigt Mittelwert  $\pm$  SEM.

Ähnliches ergab sich bei den U266 Zellen (Abb. 19). Hier zeigte sich allerdings nur in der Darstellung als Verhältnis der stimulierten Proben zur unstimulierten Kontrolle eine Tendenz, dass die p57 mRNA Menge gesteigert werden konnte. Auch diese Ergebnisse sind allerdings nicht signifikant. Dies passt allerdings zu den in Abbildung 7 gezeigten Proliferationsraten. Hier konnte für die JK6L und die U266 Zelllinie ebenfalls keine signifikante Veränderung beobachtet werden.

Bei den RPMI 8226 Zellen stellt sich ein gänzlich anderes Bild dar (Abb. 21). Hier wurde die p57 Expression in den Zellen durch die Stimulation mit IL-6 und der Kombination aus IL-6 und APRIL verringert. In der Darstellung als Verhältnis der

stimulierten Proben zur unstimulierten Kontrolle war diese Reduktion hoch signifikant. Dies würde damit übereinstimmen, was erwartet wurde. Da ja durch die Stimulation mit IL-6 oder der Kombination aus IL-6 und APRIL die *SLy2* mRNA Menge ebenfalls signifikant gesteigert werden konnte, müsste dies zu einer gesteigerten Aktivität von HDAC1 führen. Diese gesteigerte HDAC1-Aktivität sollte dann wiederum zu einer gesenkten Menge der Downstream-target Gene führen. Dadurch sollte die Proliferation der Zellen gesteigert werden. Dies würde allerdings nicht für eine Tumorsuppressorfunktion von *SLy2* sprechen.

#### 3.3.4. Auswirkung der Stimulation auf das Downstream-target Gen *p21*

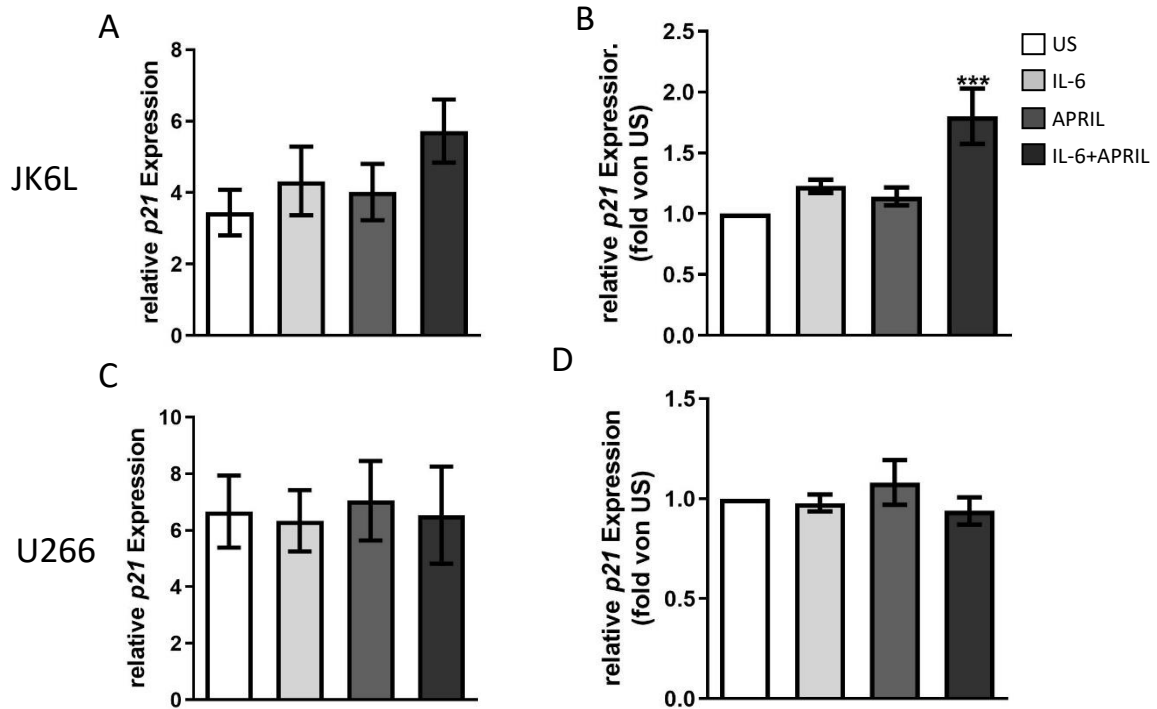
Ein weiteres Downstream-target Gen von HDAC1 ist *p21*. Dieses inhibiert CDK2 und CDK1 wodurch es die Zellzyklus Progression im Stadium G1 und S reguliert. Es verhält sich häufig ähnlich wie *p57*, sodass davon auszugehen war, dass sich hier ein ähnliches Ergebnis für die einzelnen Zelllinien wie bei der Messung von *p57* ergeben sollte.

Für die JK6L Zellen trifft dies zu (Abb. 20). Hier zeigt sich für *p21* ein ähnliches Bild wie für *p57*. Es zeigte sich allerdings in der Darstellung als Verhältnis der stimulierten Proben zur unstimulierten Kontrolle eine starke, signifikante Steigerung der *p21* Expression durch die Stimulation der Kombination aus IL-6 und APRIL.

Für die U266 Zelllinie konnte keine eindeutige Veränderung der *p21* Expression durch die Stimulation gemessen werden (Abb. 20). Auch dies passt wieder zu den fast unveränderten Proliferationsraten, wie sie in Abbildung 7 für die JK6L und die U266 Zelllinien gezeigt sind.

Die RPMI 8226 Zellen zeigten ein gegensätzliches Bild, als es die Experimente mit *p57* erwarten ließen (Abb. 21). Hier stellte es sich so dar, dass sich durch die Stimulation mit IL-6 und der Kombination aus IL-6 und APRIL eine Tendenz zur Steigerung der *p21* Expression zeigte. Dies steht im Gegensatz zu den

Ergebnissen der Quantifizierung der *p57* mRNA Menge. Da beides Downstream-target Gene von HDAC1 sind, war davon auszugehen, dass sie sich ähnlich verhalten würden.



**Abbildung 20: Bestimmung der *p21* mRNA-Menge** in (A) der JK6L Zelllinie (n=7) und (C) der U266 Zelllinie (n=7). Die Zellen wurden für 24h unstimuliert (US) oder mit 10  $\text{ng/ml}$  des jeweiligen Stimulans inkubiert. Daraufhin wurde die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mit dieser cDNA wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Bestimmung der *p21* mRNA Menge als Verhältnis der stimulierten Proben zu unstimulierten Kontrollen in (B) der JK6L Zelllinie (n=7) und (D) der U266 Zelllinie (n=7). Quantitative Auswertung mittels *One way Anova*, *Dunn's Multiple Comparison Test* zeigt Mittelwert +/- SEM. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz (\*\*\*) $P < 0,001$ ; \*\*) $P < 0,01$ ; \*) $P < 0,05$ ).

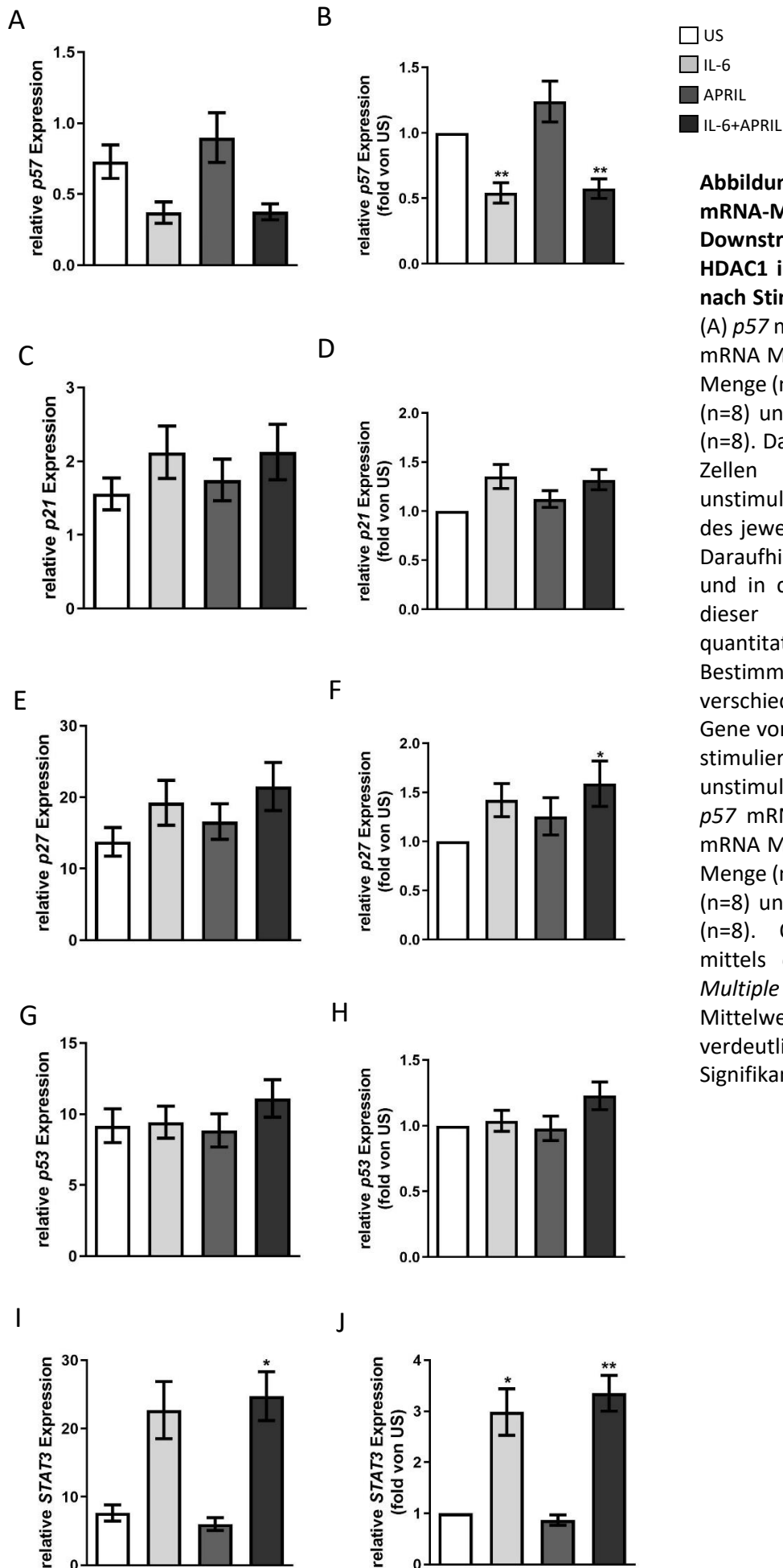
Außerdem entsprach dieses Ergebnis nicht der zu erwarteten Senkung der Downstream-target Gen Expression, die sich durch eine gesteigerte HDAC1-Aktivität ergeben müsste. Im Gegensatz dazu, würde die durch eine vermehrte *p21* Expression gesenkte Proliferation die These unterstützen, dass SLy2 ein Tumorsuppressorgen ist.

### 3.3.5. Auswirkung der Stimulation auf die Downstream-target Gene *p53*, *p27* und *STAT3*

In einem nächsten Schritt sollte verifiziert werden, wie sich weitere Downstream-target Gene von HDAC1 in den RPMI 8226 Zellen nach der Stimulation verhalten. Hierfür wurde die Expression von *p53*, *p27* und *STAT3* überprüft. Damit sollte überprüft werden, wie die Expression weiterer Downstream-target Gene von HDAC1 durch die Stimulation beeinflusst werden kann. Kann die Expression gesteigert werden, wie bei *p21*, oder verringert sich die Expression der mRNA wie bei *p57*. Die anderen beiden Zelllinien, JK6L und U266, wurden hierbei nicht weiter untersucht, da sich bei ihnen keine konkreten Ergebnisse ergaben.

Ein weiteres bekanntes Downstream-target Gen von HDAC1 ist *p27*. Dieses kontrolliert die Zellzyklusprogression in G1, indem es E-CDK2 und D-CDK4 bindet und inhibiert. Strukturell ist es ähnlich zu *p21* und *p57*. Auf die Stimulation reagierte *p27* ähnlich wie *p21* (Abb. 21). Es zeigte sich die klare Tendenz, dass die *p27* mRNA Menge durch die Stimulation mit IL-6 oder der Kombination aus IL-6 und APRIL gesteigert werden konnte. In der Darstellung als Verhältnis der stimulierten Proben zur unstimulierten Kontrolle zeigte sich erneut durch die Stimulation mit der Kombination aus IL-6 und APRIL eine signifikante Expressionssteigerung von *p27*.

*p53* ist eines der wichtigsten Gene für die Entstehung maligner Tumoren aller Art. Es wird auch „der Wächter des Genoms“ genannt. Kommt es zu einer DNA-Schädigung, wird *p53* posttranslational stabilisiert und kann sich so in der Zelle akkumulieren. Dadurch werden zum einen DNA-Reparatur-Mechanismen aktiviert und zum anderen der Zellzyklus gestoppt, indem *p53* die Expression von *p21* induziert. Für die Menge an *p53* mRNA konnte dabei gezeigt werden, dass sich diese durch die Stimulation tendenziell steigern ließ (Abb. 21). Genauso stellte es sich auch in der Darstellung der Werte als Verhältnis der stimulierten Proben zur unstimulierten Kontrolle dar. Dies wäre eine ähnliche Reaktion, wie sie auch *p21* und *p27* gezeigt hatten.



**Abbildung 21: Bestimmung der mRNA-Menge verschiedener Downstream-target Gene von HDAC1 in der RPMI 8226 Zelllinie nach Stimulation.** Bestimmung der (A) p57 mRNA Menge (n=8), (C) p21 mRNA Menge (n=8), (E) p27 mRNA Menge (n=7), (G) p53 mRNA Menge (n=8) und (I) STAT3 mRNA Menge (n=8). Dazu wurden die RPMI 8226 Zellen in Zellkultur für 24h unstimuliert (US) oder mit 10<sup>ng/ml</sup> des jeweiligen Stimulans inkubiert. Daraufhin wurde die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mit dieser cDNA wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Bestimmung der mRNA Menge verschiedener Downstream-target Gene von HDAC1 als Verhältnis der stimulierten Proben zu unstimulierten Kontrollen der (B) p57 mRNA Menge (n=8), (D) p21 mRNA Menge (n=8), (F) p27 mRNA Menge (n=7), (H) p53 mRNA Menge (n=8) und (J) STAT3 mRNA Menge (n=8). Quantitative Auswertung mittels *One way Anova*, *Dunn's Multiple Comparison Test* zeigt Mittelwert +/- SEM. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz (\*\*P<0,01; \*P<0,05).

Als weiteres Downstream-target Gen wurde *STAT3* analysiert. *STAT3* spielt in zellulären Prozessen, wie dem Zellwachstum und der Apoptose, eine Schlüsselrolle. Bei *STAT3* konnte der stärkste Effekt nachgewiesen werden. Die *STAT3* mRNA Expression in den RPMI 8226 Zellen wurde durch die Stimulation mit der Kombination aus IL-6 und APRIL signifikant gesteigert. Auch in der Darstellung der Werte als Verhältnis der stimulierten Proben zur unstimulierten Kontrolle zeigt sich dieses Bild. Hier stellt sich auch die Expressionssteigerung durch IL-6 als signifikant dar.

Alles in allem wiesen die drei weiteren gemessenen Downstream-target Gene *p53*, *p27* und *STAT3* eine ähnliche Reaktion auf die Stimulation auf, wie es bei *p21* der Fall war. Weshalb *p57* so gegensätzlich durch die Stimulation beeinflusst wurde, ist noch nicht geklärt. Hierfür wären weitergehende Untersuchungen nötig. Für die vier anderen Downstream-target Gene scheint es aber so zu sein, dass ihre mRNA durch die Stimulation gesteigert wird. Durch diese gesteigerte Menge an *p21*, *p27*, *p53* und *STAT3* sollte es zu einer verringerten Proliferationsrate kommen, da alle diese Downstream-target Gene den Zellzyklus negativ beeinflussen. Diese verminderte Proliferation würde die These von SLy2 als Tumorsuppressorgen stützen. Allerdings konnte in den vorangegangenen Experimenten keine verminderte Proliferationsrate der Multiplen Myelom Zelllinien gezeigt werden. Die negative Beeinflussung des Zellzyklus würde eigentlich auch auf *p57* zutreffen.

Eine gesteigerte Expression der Downstream-target Gene könnte durch eine verringerte HDAC1-Aktivität bedingt sein. Diese verringerte Aktivität wiederum könnte auf eine verminderte Interaktion von SLy2 mit HDAC1 zurückzuführen sein und müsste so auf einen verringerten SLy2-Gehalt hinweisen. In den zuvor beschriebenen Experimenten konnte jedoch klar gezeigt werden, dass durch die Stimulation mit IL-6, APRIL oder der Kombination aus IL-6 und APRIL die SLy2 Expression, sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene gesteigert werden konnte. Dies stellt aber nur einen der möglichen Mechanismen dar. Ob es noch weitere, dieses System beeinflussende Regulatoren gibt, ist zurzeit noch unbekannt.

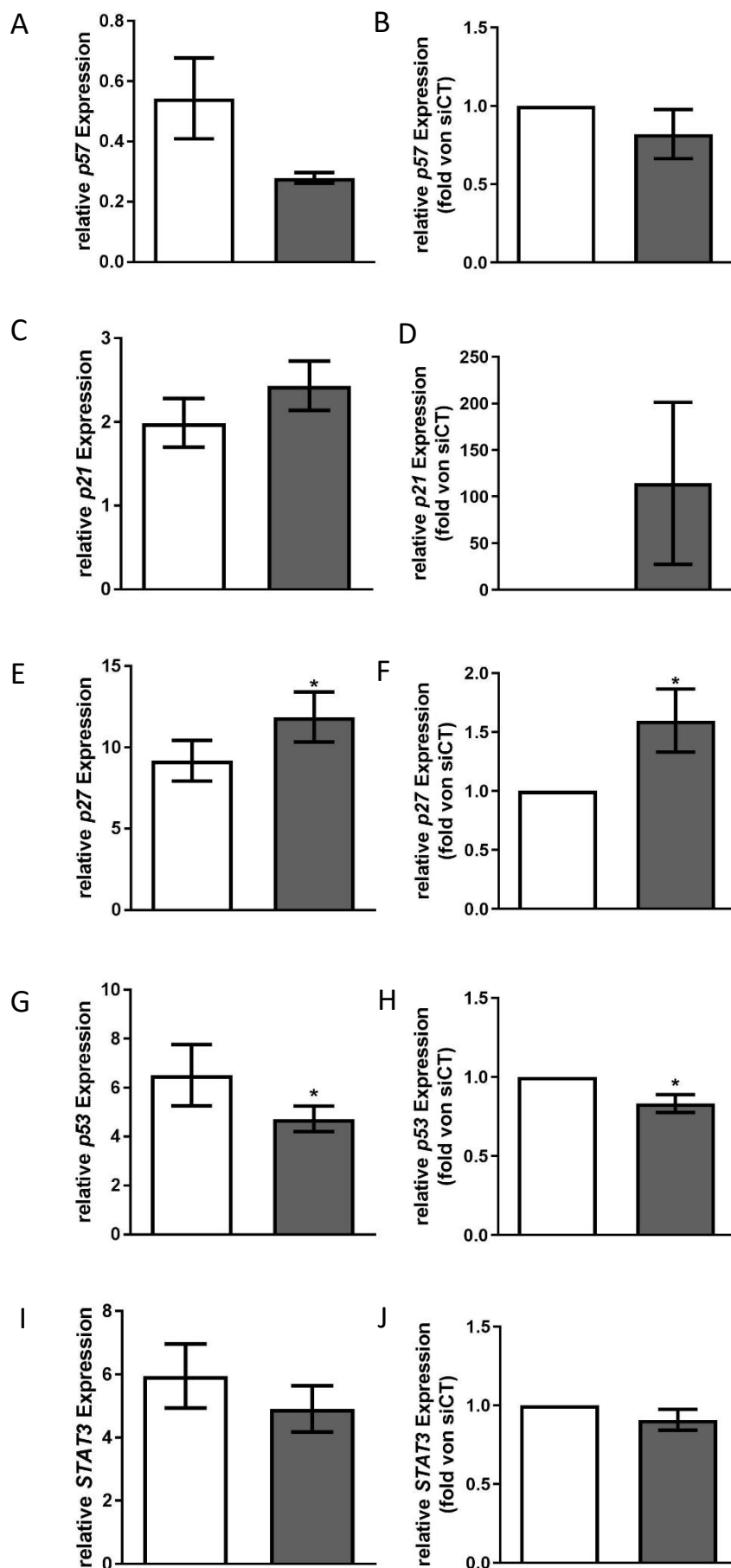
### 3.3.6. Auswirkung der siRNA Transfektion auf die Downstream-target Gene *p21*, *p57*, *p53*, *p27* und *STAT3*

Um zu überprüfen, ob die durch die Stimulation gemessene gesteigerte Menge an Downstream-target Genen auf die erhöhte Menge an SLy2 zurückzuführen ist, wurden die Messungen in SLy2-siRNA-transfizierten Zellen durchgeführt. Dazu wurden die RPMI 8226 Zellen über sechs Tage in Hungermedium gehalten. Dann wurden die Zellen mit 2,0 µl und 3,5 µl des Transfektionsreagenzes und 40 pmol der jeweiligen siRNA transfiziert. Nach 24 h wurde die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mit dieser wurde eine RT-qPCR durchgeführt. So wurden die Downstream-target Gene von HDAC1 untersucht.

Für *p57* hat es den Anschein, dass durch die SLy2-siRNA die *p57* mRNA reduziert werden kann (Abb. 22A). Dies zeigt sich auch, in der Darstellung als Verhältnis der SLy2-siRNA transfizierten Proben zu kontrolltransfizierten Proben. Hier zeigt sich der Effekt allerdings nicht deutlich. Insgesamt zeichnet sich nur eine Tendenz ab. Die Werte sind nicht signifikant.

Bei *p21* stellt sich ein gegensätzliches Bild dar. Hier scheint es, dass durch die Herabsetzung von SLy2 bei der Transfektion mit siRNA die *p21* mRNA ansteigt (Abb. 22C). Dies stellt sich auch in der Darstellung der Werte als Verhältnis der SLy2-siRNA transfizierten Proben zu kontrolltransfizierten Proben so dar. Auch hier ist aber zu beachten, dass es sich dabei lediglich um eine Tendenz handelt. Eine signifikante Steigerung der *p21* mRNA konnte nicht gezeigt werden.

Bei der Analyse der *p27* mRNA Menge der transfizierten Zellen zeigt sich ein ähnliches Bild, wie für die *p21* mRNA Menge (Abb. 22E). Durch die Transfektion mit siRNA kommt es zu einem signifikant höheren Wert an *p27* mRNA. Das gleiche Bild zeigt sich in der Darstellung als Verhältnis der SLy2-siRNA transfizierten Proben zu kontrolltransfizierten Proben.



**Abbildung 22: Bestimmung der mRNA-Menge verschiedener Downstream-target Gene von HDAC1 in der RPMI 8226 Zelllinie nach siRNA Transfektion.** Bestimmung der (A) *p57* mRNA Menge (n=15), (C) *p21* mRNA Menge (n=15), (E) *p27* mRNA Menge (n=15), (G) *p53* mRNA Menge (n=15) und (I) *STAT3* mRNA Menge (n=15). Dazu wurden die RPMI 8226 Zellen mit 2,0  $\mu$ l und 3,5  $\mu$ l des Transfektionsreagenzes für RPMI 8226 Zellen und 40 pmol der siRNA transfiziert. Daraufhin wurde die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mit dieser cDNA wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Bestimmung der mRNA Menge verschiedener Downstream-target Gene von HDAC1 als Verhältnis der kontroll-transfizierten Proben zu siSLy2 transfizierten Proben, der (B) *p57* mRNA Menge (n=15), (D) *p21* mRNA Menge (n=15), (F) *p27* mRNA Menge (n=15), (H) *p53* mRNA Menge (n=15) und (J) *STAT3* mRNA Menge (n=15). Quantitative Auswertung mittels *t test* zeigt Mittelwert +/- SEM. Sternchen verdeutlichen statistische Signifikanz (\* $P < 0,05$ ).



Die Menge an *p53* mRNA dagegen scheint durch die Transfektion gesenkt zu werden (Abb. 22G). Es zeigt sich hier ein ähnliches Bild wie bei *p57*. Durch die Transfektion wurde die *p53* mRNA in den SLy2-siRNA transfizierten Zellen signifikant gesenkt. Auch in der Darstellung als Verhältnis der SLy2-siRNA transfizierten Proben zu kontrolltransfizierten Proben zeigt sich eine signifikante Senkung der *p53* mRNA (Abb. 2H).

Für *STAT3* zeigt sich durch die Transfektion mit SLy2-siRNA keine signifikante Beeinflussung der *STAT3* mRNA (Abb. 22I). Auch in der Darstellung als Verhältnis der SLy2-siRNA transfizierten Proben zu kontrolltransfizierten Proben kann keine signifikante Veränderung der *STAT3* mRNA beobachtet werden (Abb. 2J).

Diese Ergebnisse zeigen, dass *p27* in Abwesenheit von SLy2 signifikant ansteigt, während *p53* signifikant abfällt. *p21* zeigt ebenfalls die Tendenz in Abwesenheit von SLy2 vermehrt exprimiert zu werden, während *p57* vermindert exprimiert wird. In Abwesenheit von SLy2 würde also durch *p53* eine gesteigerte und durch *p27* eine verringerte Proliferation vermittelt werden.

Ob SLy2 also die Proliferation über die Downstream-target Gene von HDAC1 signifikant beeinflussen kann, muss durch weitere Experimente geklärt werden.

## 4. Diskussion

### 4.1. Proliferation der Multiplen Myelom Zellen

Bei den meisten Tumorentitäten gilt der Grundsatz, dass mit einer gesteigerten Proliferation auch die Malignität des Tumors steigt. Daher wird heute bei vielen Tumorentitäten in der standardisierten Immunohistochemie der Proliferationsmarker MIB-1 mitbestimmt, welcher angibt, wie viele Zellen Ki-67 exprimieren [61-63]. Auch beim Multiplen Myelom (MM) spielt die Proliferationsrate eine wichtige Rolle. Eine Grundvoraussetzung für die Definition des Multiplen Myeloms ist, dass >10% klonale Plasmazellen im Knochenmark nachweisbar sind. Diese klonalen Zellen entstehen in der Regel durch Proliferation aus einer einzelnen Tumorzelle [11, 64].

SLy2 wurde von Noll et al. als Tumorsuppressorgen beschrieben [26]. Daher sollte ein negativer Einfluss von SLy2 auf die Proliferation von Multiplen Myelom Zelllinien untersucht werden. Eine gesteigerte SLy2 Protein Menge sollte nachfolgend zu einer verringerten Proliferation führen. Es konnte gezeigt werden, dass die *SLy2* mRNA-Menge in den MM-Zellen durch eine Stimulation mit IL-6 und der Kombination aus IL-6 und APRIL teilweise signifikant gesteigert werden konnte. Dies bestätigt vorhergehende Ergebnisse, die eine gesteigerte Expression von SLy2 durch B-Zell-Stimulation gezeigt haben [37]. Dies würde bedeuten, dass durch die Stimulation mit IL-6 und APRIL die Proliferation der MM-Zellen hätte verringert werden sollen. Es zeigte sich aber entweder keine Veränderung der Proliferationsrate, wie bei den JK6L und den U266 Zellen, oder eine gesteigerte Proliferationsrate, wie es bei den RPMI 8226 Zellen der Fall war.

Die verwendeten Stimulanzen IL-6 und APRIL wirken in den MM-Zellen nicht nur auf SLy2, sondern entfalten ihre Wirkung über sehr viele Mechanismen. Beides sind Wachstumsstimulatoren. Sie regen also beide die Zellproliferation an.

In der Überprüfung, ob eine verzögerte Wirkung des SLy2 einsetzt, zeigte sich, dass die Zellzahl der MM-Zellen nach Stimulation ca. 24-48 h später stagnierte. Eine Abnahme der Zellzahl konnte aber nicht verzeichnet werden. Bei diesem

Experiment wurden die Zellen allerdings auch nach der Stimulation weiter in Hungermedium mit 0% FCS gehalten, da sich zuvor gezeigt hatte, dass eine Bestimmung der Proliferationsrate im Vollmedium nicht möglich war, da die MM-Zellen hier zu stark proliferierten. Die festgestellte Stagnation des Wachstums könnte also auch auf den Mangel an FCS der MM-Zellen zurückzuführen sein und nicht auf einen Einfluss der gesteigerten SLy2 Menge.

In den Experimenten mit SLy2-siRNA-transfizierten RPMI 8226 Zellen zeigte sich kein Unterschied in der Proliferationsrate zwischen SLy2-siRNA-transfizierten Zellen und kontrolltransfizierten Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die zuvor gesehene gesteigerte Wachstumsrate der RPMI 8226 Zellen nicht auf eine gesteigerte SLy2 Menge zurückzuführen ist. Durch die Transfektion mit SLy2-siRNA konnte die SLy2-Menge signifikant reduziert werden. Wäre also eine gesteigerte SLy2 Menge der Auslöser für die vermehrte Proliferationsrate, so müsste diese nach der Transfektion mit siRNA in den kontrolltransfizierten Zellen im Verhältnis zu den SLy2-siRNA-transfizierten Zellen gesteigert sein. Somit muss die gesteigerte Proliferationsrate der RPMI 8226 Zellen nach Stimulation mit IL-6 und der Kombination aus IL-6 und APRIL auf andere Zellmechanismen zurückzuführen sein.

## 4.2. Aktivität der HDAC1 und Beeinflussung seiner Downstream-target Gene

### 4.2.1. Aktivität der HDAC1

Brandt et al. haben gezeigt, dass SLy2 mit HDAC1 interagiert [35]. SLy2 konnte dabei die Aktivität von HDAC1 in ko-transfizierten HEK293T Zellen steigern [35]. Es sollte daher überprüft werden, wie sich HDAC1 in der MM-Zelllinie RPMI 8226 verhält. Durch die Stimulation mit IL-6 und APRIL wurde zwar die SLy2 Menge gesteigert, allerdings nahm die HDAC-Aktivität durch die Stimulation mit APRIL oder der Kombination aus IL-6 und APRIL ab. In den mit SLy2-siRNA-transfizierten Zellen zeigte sich keine signifikante Änderung der HDAC-Aktivität. Es zeigte sich die Tendenz, dass die SLy2-siRNA-transfizierten Zellen eine

höhere HDAC-Aktivität aufweisen, als die kontrolltransfizierten Zellen. Dies würde bedeuten, dass eine gesteigerte HDAC-Aktivität durch eine Verminderung von SLy2 vermittelt würde. Diese Ergebnisse würden eher für eine Tumorsuppressorfunktion von SLy2 sprechen. Würde durch eine gesteigerte SLy2 Expression die HDAC-Aktivität gesenkt, so würde dies zu einer verminderten Proliferation der Tumorzellen führen. Dadurch wäre das Tumorfortschreiten geringer. Diese Ergebnisse würden denen von Brandt et al. zum Teil widersprechen, da hier eine gesteigerte HDAC1-Aktivität durch SLy2 gezeigt wurde [35]. Allerdings muss bedacht werden, dass bei Brandt et al. HDAC1 geprüft wurde, während in den hier beschriebenen Experimenten die Gesamtheit der HDACs gemessen wurde. Da aber bereits die Klasse I HDACs starke Unterschiede in ihrer Funktion aufweisen, ist ein direkter Vergleich der Experimente kaum möglich [65]. So führt z.B. ein homozygoter Knockout von HDAC1 bei Mäusen zum embryonalen Tod, während HDAC2 und 3 dabei hochreguliert werden [66]. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Aufgaben von HDAC1 nicht vollständig durch andere HDACs kompensiert werden können. Sie alle scheinen individuelle Funktionen zu haben. Daher sollte in zukünftigen Experimenten die spezifische Aktivität von HDAC1 und 2 genauer untersucht werden.

#### 4.2.2. Die Downstream-target Gene von HDAC1

HDAC1 hat viele unterschiedliche Downstream-target Gene. Dazu gehören unter anderem p21, p27, p53, p57 und STAT3, die durch HDAC1 reguliert werden. Sie alle hemmen die Proliferation, wenn sie vermehrt exprimiert werden. Eine gesteigerte HDAC1 Expression führt zu einer geringeren Menge seiner Downstream-target Gene und dadurch zu einer gesteigerten Proliferation.

In humanen MM-1S Zellen konnte nachgewiesen werden, dass eine Inkubation der Zellen mit dem breiten HDAC-Inhibitor Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA), auch Varinostat genannt, zu einer Suppression der Proliferation und des Überlebens der Zellen führt. Gleichzeitig wurde dabei eine Hochregulierung des

proapoptotischen Faktors p53 festgestellt [46]. Hieraus könnte man eine antiapoptotische und proliferationsfördernde Funktion der HDACs im MM ableiten. Daher wollten wir überprüfen wie sich die verringerte HDAC-Expression auf die Expression seiner verschiedenen Downstream-target Gene in stimulierten RPMI 8226 Zellen auswirkt.

Es zeigte sich, dass p21 und p57 unterschiedlich auf die Stimulation mit IL-6, APRIL oder der Kombination aus beidem reagiert haben. Die Menge an p21 konnte durch IL-6 oder die Kombination aus IL-6 und APRIL gesteigert werden, während die von p57 bei Stimulation mit IL-6 oder der Kombination aus IL-6 und APRIL signifikant reduziert wurde. p57 ist ein Cyclinkinase-Inhibitor (CKI), der zu einem Zellzyklusarrest führen kann, wenn er akkumuliert [67]. In früheren Arbeiten zeigte sich, dass HDAC1 und HDAC2 beide direkt an den Promotor des p57-Gens binden können und so seine Expression supprimieren können [50]. Zudem konnte in neuronalen Zellen gezeigt werden, dass eine Reduktion von p27 zu einer Steigerung der p57 mRNA-Level führt [68]. Vorausgesetzt, dies würde auch umgekehrt funktionieren, dass eine gesteigerte p27 mRNA-Menge die p57-Expression hemmt und es sich von neuronalen Zellen auf B-Zellen übertragen ließe, könnte es also auch einen direkten Zusammenhang zwischen den Downstream-target Genen geben, ohne von den HDACs direkt beeinflusst zu sein. Um die genauen Zusammenhänge zwischen der Reduktion der p57 Expression durch die Stimulation und die verringerte HDAC-Aktivität durch die Stimulation aufklären zu können, ist eine Bestimmung der gesamten HDAC-Aktivität zu ungenau. So wird die Aktivität von über zehn verschiedenen HDACs bestimmt und es ist keine genaue Aussage zu spezifischen HDAC-Mitgliedern möglich.

p21 ist ebenfalls ein CKI. Es reguliert die Zellzyklusprogression von Stadium G1 zu Stadium S. Durch eine erhöhte Expression kommt es zum Wachstumsarrest und zur zellulären Differenzierung. Metastasierte Mamma-Karzinome zeigen jedoch in ihren Primärtumoren und ihren Metastasen stark erhöhte p21 Expressionen trotz einer gesteigerten Proliferation [69]. Man kann also nicht *per se* von einem antiproliferativen Effekt von p21 ausgehen.

Die weiteren Downstream-target Gene von HDAC1 zeigten bei der Stimulation mit IL-6 und APRIL eher ein ähnliches Verhalten wie p21. Auch ihre mRNA-Menge konnte durch die Stimulation gesteigert werden. Hierzu gehört u.a. wie bereits erwähnt p27. Dieses gehört zu einer Gruppe von CKIs und hemmt das Fortschreiten des Zellzyklus [67]. Zusammen mit der verminderten HDAC-Aktivität durch die Stimulation mit IL-6 und APRIL stieg die p27-Expression in den RPMI 8226 Zellen an. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Experimenten überein. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch ein Abschalten von HDAC2 die Proteinmenge von p27 gesteigert werden konnte [70]. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass gezeigt wurde, dass die p27-Expression allein der Kontrolle von HDAC2 unterliegt [70].

Zu den Downstream-target Genen von HDAC1 gehört auch das *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) Gen. Zytoplasmatische STAT Proteine fungieren als Signalweitergeber von transmembranären Rezeptoren, wie z.B. dem IL-6 Rezeptor. Sie werden bei ihrer Aktivierung v.a. durch die Januskinase (JAK) phosphoryliert und bilden dann Homo- und Heterodimere. So translozieren sie dann in den Kern und regulieren die Gentranskription [71]. Auch hier zeigte sich, dass mit der SLy2-Induktion über IL-6 auch die STAT3 Expression signifikant gesteigert wurde. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Experimenten überein, bei welchen gezeigt werden konnte, dass IL-6 ein wichtiger Aktivator von STAT3 in humanen MM-Zellen ist [72]. Des Weiteren ist zu beachten, dass STAT3 in U266 Zellen und im Knochenmark von MM-Patienten konstitutiv aktiviert wird [73]. In den RPMI 8226 Zellen scheint STAT3 zwar nicht konstitutiv aktiviert zu werden, kann aber durch IL-6 stark induziert werden. In früheren Experimenten ging allerdings eine Induktion der STAT3-Aktivität mit einer verstärkten HDAC1-Aktivität einher [70, 74]. Es ist aber zu bedenken, dass in unseren Experimenten lediglich die Expression von STAT3 bestimmt wurde und nicht sein Phosphorylierungsstatus. Die STAT3 Expression allein spiegelt aber nicht notwendigerweise den Aktivitätsstatus von STAT3 im Zytoplasma wieder. Es dürften daher noch weitere Experimente notwendig sein, die dann zusätzlich den Aktivierungsstatus von STAT3 im Zytoplasma unter IL-6-Stimulation in RPMI 8226 Zellen bestimmen. So kann eine direkte

Korrelation der Transkriptionsregulation von STAT3 und seines zyttoplasmatischen Phosphorylierungsstatus erhoben werden.

Zusammenfassend deutet eine Induktion von STAT3 bei gleichzeitiger Reduktion von p57 eher auf eine Hochregulierung von HDAC1 hin. Da ja nur die Gesamtaktivität der HDACs bestimmt wurde, könnte eine spezifische Veränderung der HDAC1-Aktivität überdeckt worden sein. So könnte z.B. v.a. eine verminderte HDAC2-Aktivität die Messung verändern. Diese stark verminderte HDAC2-Aktivität würde die Induktion der p27-Expression erklären. Eine verstärkte HDAC1-Aktivität allein, wäre also in der Messung der HDAC-Gesamtaktivität nicht immer sichtbar. Der Einsatz weiterer Experimente mit spezifischerer Messung der einzelnen HDACs ist also unverzichtbar, um die Bedeutung unserer Ergebnisse zu klären.

#### 4.2.3. Interaktion von HDAC1 und seiner Downstream-target Gene mit SLy2 nach Transfektion mit siRNA

In einem nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob es eine Verbindung zwischen der Änderung der HDAC-Aktivität und der Hochregulierung von SLy2 gibt. Dazu wurde über eine siRNA-Transfektion der SLy2 Gehalt in den RPMI 8226 Zellen reduziert. Durch den Einsatz von SLy2-spezifischer siRNA konnte eine signifikante Reduktion der SLy2-Expression im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen erreicht werden. Dies zeigte sich sowohl auf mRNA-Ebene wie auch auf Proteinebene. Dabei zeigte sich, dass die HDAC-Aktivität bei einer gesenkten SLy2-Menge im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen ansteigt. Dies stützt die Hypothese, dass die SLy2-Expression die HDAC-Regulation negativ beeinflusst. Die Expression der Downstream-target Gene p21, p57 und STAT3 wurden durch die Verringerung von SLy2 nicht signifikant beeinflusst. Lediglich die p53 und p27 mRNA-Menge konnte signifikant durch die Reduktion von SLy2 beeinflusst werden. Das Expressionslevel von p27 konnte dabei in Abwesenheit von SLy2 gesteigert werden, während p53 ohne SLy2 geringer exprimiert wird. Hierbei ist zu beachten, dass bei beiden Downstream-target Genen zuvor eine signifikante

Änderung durch die Stimulation festgestellt werden konnte. Es ist also ein signifikanter Effekt durch die Reduktion von SLy2 zu sehen, dieser kann allerdings durch die Stimulation und damit eine Steigerung von SLy2 nicht hervorgerufen werden.

Bei diesen Ergebnissen muss beachtet werden, dass durch die Transfektion mit siRNA kein komplettes Abschalten von SLy2 erreicht werden konnte, sondern lediglich eine Reduktion von SLy2 auf mRNA und Proteinebene. Es ist also davon auszugehen, dass noch weiterhin SLy2 Aktivität vorhanden ist, welche die Aussagekraft der Daten schwächt. Zusammenfassend wäre es also wichtig, ein komplettes Abschalten von SLy2 zu erreichen und daraufhin die Experimente zu wiederholen. So würden sich weitere Informationen zur Rolle von SLy2 bei der Regulation von HDAC ergeben.

Abschließend lässt sich festhalten, dass SLy2 in den RPMI 8226 Zellen signifikant hochreguliert wird. Dies ist von einer Verminderung der Gesamtaktivität der HDACs begleitet, was signifikante Veränderungen in der Expression der HDAC-target Gene mit sich bringt. Um weitere Informationen zum Zusammenhang von SLy2 und der HDAC Regulation zu gewinnen, sollten Experimente durchgeführt werden, welche sich speziell auf einzelne Mitglieder der HDAC-Familie konzentrieren. Insbesondere HDAC1 ist dabei hervorzuheben.

### 4.3. Die IgLc-Produktion als Malignitätsfaktor des Multiplen Myeloms

Die IgLc bzw. die Immunglobulinproduktion allgemein ist Teil der Klassifikation des Multiplen Myeloms. Steigt der Gehalt an Immunglobulinen im Blut zu stark an, verändert dies die Hämodynamik des Blutes und es kann vermehrt zu thromboembolischen Ereignissen, wie Lungenembolie oder Herzinfarkt kommen, aber auch Nierenversagen tritt häufiger auf [9]. Die Leichtketten werden normalerweise im tubulären Segment des Nephrons eliminiert. Hier werden die Leichtketten durch Endozytose aufgenommen, was in diesen Zellen zur



Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 führt [9]. Beim MM überschreitet die Produktion der Leichtketten die Kapazität des tubulären Segments, sodass sie auch in späteren Segmenten der Niere noch vorkommen. Dort bilden die Leichtketten Tamm-Horsfall-Proteine und führen zu tubulären Obstruktionen. So kommt es dann zum Nierenversagen.

Es ist beschrieben, dass die Serum-IL-6-Konzentration von Patienten mit MM mit der Tumorzellmasse und dem Krankheitsstadium korreliert [47]. Dies zeigt sich auch daran, dass bereits bei Patienten mit MGUS IL-6 exprimiert wird, allerdings in geringeren Konzentrationen als beim MM. IgLc-exprimierende Zellen von Patienten mit MGUS oder MM exprimieren IL-6 mRNA in höheren Konzentrationen als IgLc-negative Zellen, obwohl auch diese IL-6 mRNA in geringer Mengen exprimieren [47]. IL-6 wird also in Anwesenheit von IgLc-exprimierenden Zellen vermehrt gebildet. Eine Stimulation mit IL-6 scheint also nicht das adäquate Mittel zu sein, um die IgLc-Expression SLy2 abhängig zu gestalten. Es wären also noch weitere Experimente mit anderen Stimulanzien nötig. Diese sollten die Eigenschaft haben, SLy2 zu induzieren, aber keine direkten Einwirkungen auf die IgLc-Menge zu haben. Dies ist bei IL-6 nicht gegeben.

#### 4.4. Ausblick und klinische Relevanz des SLy2-Proteins

Frühere Studien haben gezeigt, dass HDAC-Inhibitoren in humanen MM-Zellen die Apoptose induzieren. Zudem erhöhen sie die Sensitivität dieser Zellen gegenüber konventionellen Chemotherapien. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine HDAC-Deregulation in die Krankheitsschwere und die Zellresistenz der Tumorzellen involviert ist [46]. Daher scheint es unabdingbar zu sein, weitere Informationen zur Inhibition und Regulation von HDACs zu sammeln, wie zum Beispiel die Inhibition durch das Adaptorprotein SLy2.

Da auch die Immunglobulinproduktion für das Outcome Multipler Myelom Patienten eine entscheidende Rolle spielt, wäre es auch hier sinnvoll, einen Mechanismus zu kennen, mit dem die Immunglobulinproduktion gesenkt werden

kann. 30% der MM-Patienten entwickeln eine Myelomniere [11], welche zum Tod führen kann. Daher ist es entscheidend, frühzeitig die Produktion der Immunglobuline zu hemmen, um diese Komplikationen zu vermeiden. Ob es dafür ebenfalls einen über SLy2 vermittelten Mechanismus gibt, ist nach unseren Experimenten noch nicht klar. Dafür müssen sich weitere Versuche anschließen, in denen IL-6 unabhängig die SLy2 Konzentration gesteigert werden sollte. Alles in allem hat das Multiple Myelom trotz großer Fortschritte in der Therapie noch eine schlechte Prognose, sodass dringend weitere Forschungsarbeiten notwendig sind.

## 5. Zusammenfassung

Das SH3-Lymphozytenprotein 2 (SLy2) bildet zusammen mit SLy1 und SASH1 die SLy-Protein-Familie. SLy2 besitzt eine NLS und eine NES Sequenz und weist eine SAM- (sterile alpha motive) und eine SH3- (src homology 3)-Domäne für Protein-Protein-Interaktionen auf. Es wird in vielen Geweben und Zellen exprimiert, wie hämatopoetisches Gewebe, Muskel, Herz, Gehirn, Lunge, Pankreas und Endothelzellen. SLy2 gehört zu einer Gruppe von Genen, welche bei Multiplen Myelom (MM)-Patienten häufig mutiert ist. Das Multiple Myelom ist eine hämatopoetische Erkrankung, die durch die klonale Vermehrung von Plasmazellen gekennzeichnet ist. Die Rolle von SLy2 im intrazellulären Signalweg der Plasmazellen ist unklar. Ebenso, wie seine Beteiligung an der Entstehung des Multiplen Myeloms.

Die vorliegende Arbeit zeigt das Expressions-Profil von SLy2 in verschiedenen humanen MM-Zelllinien nach Stimulation mit IL-6, APRIL und der Kombination aus beidem. Dabei zeigt sich, dass durch die Stimulation SLy2 auf mRNA und Proteinebene in den JK6L Zellen gesteigert werden konnte. Dies gilt für die RPMI 8226 Zellen nur auf mRNA Ebene. Zudem diskutieren wir die Beteiligung von SLy2 an der HDAC-vermittelten Genexpression im Multiplen Myelom. Hierbei zeigte sich, dass die HDAC-Aktivität durch die Stimulation mit IL-6, APRIL oder der Kombination aus beidem signifikant gesenkt werden konnte. Die Expression von *p57* mRNA konnte durch diese Stimulation signifikant gesenkt werden, während die von *p27* und *STAT3* signifikant gesteigert wurde. Auch der Einfluss von SLy2 auf die IgLc-Produktion der humanen MM-Zelllinie RPMI 8226 wurde überprüft. Diese änderten sich durch die Stimulation mit IL-6, APRIL oder der Kombination aus beidem nicht signifikant. Die Verteilung von SLy2 innerhalb der Zelle nach Stimulation mit IL-6, APRIL und der Kombination aus beidem, wurde mittels Fraktionierung der Zelllysate in Zytoplasma- und Nukleus-Fraktion geklärt. Es zeigten sich dabei, keine signifikanten Veränderungen durch die Stimulation. Des Weiteren wurde auch die Auswirkung der SLy2-Expression auf die Proliferation der humanen MM-Zelllinien untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikant gesteigerte Proliferation der RPMI 8226 Zellen durch die Stimulation.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Kurosaki, T., *B-lymphocyte biology*. Immunol Rev, 2010. **237**(1): p. 5-9.
2. Kantor, A.B., *The development and repertoire of B-1 cells (CD5 B cells)*. Immunol Today, 1991. **12**(11): p. 389-91.
3. Kantor, A.B., et al., *Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(8): p. 3320-4.
4. Ghosn, E.E., et al., *Distinct progenitors for B-1 and B-2 cells are present in adult mouse spleen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(7): p. 2879-84.
5. Martin, F., A.M. Oliver, and J.F. Kearney, *Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens*. Immunity, 2001. **14**(5): p. 617-29.
6. Oracki, S.A., et al., *Plasma cell development and survival*. Immunol Rev, 2010. **237**(1): p. 140-59.
7. Koch-Institut, R., *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. 2017, Robert Koch-Institut.
8. Friese, C.R., et al., *Diagnostic delay and complications for older adults with multiple myeloma*. Leuk Lymphoma, 2009. **50**(3): p. 392-400.
9. Dimopoulos, M.A., et al., *Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma*. Leukemia, 2008. **22**(8): p. 1485-93.
10. Kyle, R.A., et al., *Review of 1027 Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma*. Mayo Clinic Proceedings, 2003. **78**(1): p. 21-33.
11. Herold, G., ed. *Innere Medizin : eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. 2015, Herold: Köln. 1002 S.
12. Boyd, K.D., et al., *A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial*. Leukemia, 2011. **26**: p. 349.
13. Greipp, P.R., et al., *International Staging System for Multiple Myeloma*. Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(15): p. 3412-3420.
14. Straka, C., et al., *The Effects of Induction Chemotherapy and High-Dose Melphalan with Tandem Autologous Transplantation in Multiple Myeloma: The Prospective Randomized DSMM 2 Study*. Blood, 2007. **110**(11): p. 446.
15. Ballester, G., M.T. Tirona, and O. Ballester, *Hematopoietic stem cell transplantation in the elderly*. Oncology (Williston Park), 2007. **21**(13): p. 1576-83; discussion 1587, 1590-1, 1606.
16. San Miguel, J.F., et al., *Bortezomib plus Melphalan and Prednisone for Initial Treatment of Multiple Myeloma*. New England Journal of Medicine, 2008. **359**(9): p. 906-917.
17. Benboubker, L., et al., *Lenalidomide and Dexamethasone in Transplant-Ineligible Patients with Myeloma*. New England Journal of Medicine, 2014. **371**(10): p. 906-917.
18. Durie, B.G., et al., *Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed*

- myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial.* Lancet, 2017. **389**(10068): p. 519-527.
19. Hussain, S., et al., *Bortezomib induced hepatitis B reactivation.* Case Rep Med, 2014. **2014**: p. 964082.
  20. Offidani, M., et al., *Expert Panel Consensus Statement for Proper Evaluation of First Relapse in Multiple Myeloma.* Current Hematologic Malignancy Reports, 2019.
  21. Richardson, P.G., et al., *Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone in previously treated multiple myeloma: outcomes by prior treatment.* Blood, 2016. **127**(6): p. 713-21.
  22. Miguel, J.S., et al., *Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial.* The Lancet Oncology, 2013. **14**(11): p. 1055-1066.
  23. Kyle, R.A., et al., *Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance.* N Engl J Med, 2006. **354**(13): p. 1362-9.
  24. Kyle, R.A. and S.V. Rajkumar, *Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering multiple myeloma: emphasis on risk factors for progression.* Br J Haematol, 2007. **139**(5): p. 730-43.
  25. Rajkumar, S.V., et al., *Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance.* Blood, 2005. **106**(3): p. 812-7.
  26. Noll, J.E., et al., *SAMSN1 is a tumor suppressor gene in multiple myeloma.* Neoplasia, 2014. **16**(7): p. 572-85.
  27. Kassambara, A., et al., *Genes with a spike expression are clustered in chromosome (sub)bands and spike (sub)bands have a powerful prognostic value in patients with multiple myeloma.* Haematologica, 2012. **97**(4): p. 622-30.
  28. Claudio, J.O., et al., *HACS1 encodes a novel SH3-SAM adaptor protein differentially expressed in normal and malignant hematopoietic cells.* Oncogene, 2001. **20**(38): p. 5373-7.
  29. Beer, S., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel SH3 protein (SLY) preferentially expressed in lymphoid cells.* Biochim Biophys Acta, 2001. **1520**(1): p. 89-93.
  30. Beer, S., et al., *Impaired immune responses and prolonged allograft survival in Sly1 mutant mice.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9646-60.
  31. Arefanian, S., et al., *Deficiency of the adaptor protein SLY1 results in a natural killer cell ribosomopathy affecting tumor clearance.* Oncoimmunology, 2016. **5**(12).
  32. Schäll, D., et al., *SLY1 regulates T-cell proliferation during Listeria monocytogenes infection in a Foxo1-dependent manner.* European Journal of Immunology, 2015. **45**(11): p. 3087-3097.
  33. Reis, B., K. Pfeffer, and S. Beer-Hammer, *The orphan adapter protein SLY1 as a novel anti-apoptotic protein required for thymocyte development.* BMC Immunol, 2009. **10**: p. 38.

34. Scheikl, T., et al., *Reduced notch activity is associated with an impaired marginal zone B cell development and function in Sly1 mutant mice*. Molecular Immunology, 2009. **46**(5): p. 969-977.
35. Brandt, S., et al., *Sly2 targets the nuclear SAP30/HDAC1 complex*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(9): p. 1472-81.
36. von Holleben, M., et al., *Immunoinhibitory adapter protein Src homology domain 3 lymphocyte protein 2 (Sly2) regulates actin dynamics and B cell spreading*. J Biol Chem, 2011. **286**(15): p. 13489-501.
37. Zhu, Y.X., et al., *The SH3-SAM adaptor HAC1 is up-regulated in B cell activation signaling cascades*. J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 737-47.
38. Wang, D., et al., *Enhanced adaptive immunity in mice lacking the immunoinhibitory adaptor Hacs1*. Faseb j, 2010. **24**(3): p. 947-56.
39. Schmitt, F., et al., *Sly2 controls the antibody response to pneumococcal vaccine through an IL-5Ralpha-dependent mechanism in B-1 cells*. Eur J Immunol, 2015. **45**(1): p. 60-70.
40. Yamada, H., et al., *Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at 21q11-21 in human lung cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 2008. **47**(9): p. 810-8.
41. Manniello, A., et al., *Cell Line Data Base: structure and recent improvements towards molecular authentication of human cell lines*. Nucleic Acids Research, 2008. **37**(suppl\_1): p. D925-D932.
42. Drexler, H.G. and Y. Matsuo, *Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of multiple myeloma and plasma cell leukemia*. Leuk Res, 2000. **24**(8): p. 681-703.
43. Matsuoka, Y., et al., *Production of free light chains of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma*. Proc Soc Exp Biol Med, 1967. **125**(4): p. 1246-50.
44. Chen, Y.H., et al., *Growth inhibition of a human myeloma cell line by all-trans retinoic acid is not mediated through downregulation of interleukin-6 receptors but through upregulation of p21(WAF1)*. Blood, 1999. **94**(1): p. 251-9.
45. Urashima, M., et al., *Interleukin-6 promotes multiple myeloma cell growth via phosphorylation of retinoblastoma protein*. Blood, 1996. **88**(6): p. 2219-27.
46. Mitsiades, N., et al., *Molecular sequelae of histone deacetylase inhibition in human malignant B cells*. Blood, 2003. **101**(10): p. 4055-62.
47. Sati, H.I., et al., *Interleukin-6 is expressed by plasma cells from patients with multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance*. Br J Haematol, 1998. **101**(2): p. 287-95.
48. Hahne, M., et al., *APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth*. J Exp Med, 1998. **188**(6): p. 1185-90.
49. Dulos, J., et al., *Abstract 2645: Development of a first in class APRIL fully blocking antibody BION-1301 for the treatment of multiple myeloma*. Cancer Research, 2017. **77**(13 Supplement): p. 2645-2645.
50. Yamaguchi, T., et al., *Histone deacetylases 1 and 2 act in concert to promote the G1-to-S progression*. Genes Dev, 2010. **24**(5): p. 455-69.

51. Wilting, R.H., et al., *Overlapping functions of Hdac1 and Hdac2 in cell cycle regulation and haematopoiesis*. *Embo j*, 2010. **29**(15): p. 2586-97.
52. Sweet, M.J., et al., *HDAC inhibitors: modulating leukocyte differentiation, survival, proliferation and inflammation*. *Immunol Cell Biol*, 2012. **90**(1): p. 14-22.
53. Viglietto, G., M.L. Motti, and A. Fusco, *Understanding p27(kip1) deregulation in cancer: down-regulation or mislocalization*. *Cell Cycle*, 2002. **1**(6): p. 394-400.
54. Nebbioso, A., et al., *Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells*. *Nat Med*, 2005. **11**(1): p. 77-84.
55. Fandy, T.E., et al., *Interactive effects of HDAC inhibitors and TRAIL on apoptosis are associated with changes in mitochondrial functions and expressions of cell cycle regulatory genes in multiple myeloma*. *Neoplasia*, 2005. **7**(7): p. 646-57.
56. Kaufman, J.L., et al., *Histone deacetylase inhibitors in multiple myeloma: rationale and evidence for their use in combination therapy*. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2013. **13**(4): p. 370-6.
57. Richon, V.M., et al., *Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(18): p. 10014-9.
58. Lavelle, D., et al., *Histone deacetylase inhibitors increase p21(WAF1) and induce apoptosis of human myeloma cell lines independent of decreased IL-6 receptor expression*. *Am J Hematol*, 2001. **68**(3): p. 170-8.
59. Harlow, E. and D. Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. 1999: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
60. Phipps, J.E., et al., *Inhibition of pathologic immunoglobulin-free light chain production by small interfering RNA molecules*. *Experimental Hematology*, 2010. **38**(11): p. 1006-1013.
61. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: From the known and the unknown*. *Journal of Cellular Physiology*, 2000. **182**(3): p. 311-322.
62. Sawhney, N. and P.A. Hall, *Ki67—Structure, function, and new antibodies*. *The Journal of Pathology*, 1992. **168**(2): p. 161-162.
63. Rishi, M., et al., *Detection of growth fraction in tumors by Ki67 monoclonal antibody in cytologic smears: A prospective study of 40 cases*. *Diagnostic Cytopathology*, 1993. **9**(1): p. 52-58.
64. Fairfield, H., et al., *Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2016. **1364**(1): p. 32-51.
65. Gregorette, I., Y.-M. Lee, and H.V. Goodson, *Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis*. *Journal of Molecular Biology*, 2004. **338**(1): p. 17-31.
66. Lagger, G., et al., *Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression*. *The EMBO journal*, 2002. **21**(11): p. 2672-2681.
67. Golias, C.H., A. Charalabopoulos, and K. Charalabopoulos, *Cell proliferation and cell cycle control: a mini review*. *International Journal of Clinical Practice*, 2004. **58**(12): p. 1134-1141.

68. Itoh, Y., et al., *The Cyclin-dependent Kinase Inhibitors p57 and p27 Regulate Neuronal Migration in the Developing Mouse Neocortex*. 2007. **282**(1): p. 390-396.
69. Wei, C.Y., et al., *Expression of CDKN1A/p21 and TGFBR2 in breast cancer and their prognostic significance*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. **8**(11): p. 14619-29.
70. Pang, M., et al., *Histone deacetylase 1/2 mediates proliferation of renal interstitial fibroblasts and expression of cell cycle proteins*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2011. **112**(8): p. 2138-2148.
71. Levy, D.E. and J.E. Darnell Jr, *STATs: transcriptional control and biological impact*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002. **3**: p. 651.
72. Schwarze, M.M.K. and R.G. Hawley, *Prevention of Myeloma Cell Apoptosis by Ectopic *bcl-2* Expression or Interleukin 6-mediated Up-regulation of *bcl-x**. *Cancer Research*, 1995. **55**(11): p. 2262.
73. Catlett-Falcone, R., et al., *Constitutive Activation of Stat3 Signaling Confers Resistance to Apoptosis in Human U266 Myeloma Cells*. *Immunity*, 1999. **10**(1): p. 105-115.
74. Gupta, M., et al., *Regulation of STAT3 by histone deacetylase-3 in diffuse large B-cell lymphoma: implications for therapy*. *Leukemia*, 2012. **26**(6): p. 1356-1364.



## **7. Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie unter Betreuung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Sandra Beer-Hammer durchgeführt.

Sämtliche Versuche wurden, nach Einarbeitung durch Frau Dr. rer. nat. Fee Schmitt und Claudia Müller von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, die Arbeit selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

## 8. Veröffentlichungen

**IL-6-mediated Stimulation of RPMI 8226 Cells induces Upregulation of the inhibitory Adaptor SLy2 and is accompanied by Alterations in HDAC-Target Gene Expression**

Jennifer Jaufmann, Marie-Therese Fleischmann, Fee Schmitt, Sandra Beer-Hammer

*bei Neoplasia eingereicht*

## 9. Danksagungen

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit einen wesentlichen Beitrag geleistet haben.

An erster Stelle geht mein ganz besonderer Dank an Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer. Die kontinuierliche Betreuung und Beratung haben mir sehr geholfen. Ihre geduldige und kritische Begleitung hat in größtem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg bedanken, dass ich diese Arbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Uniklinikums Tübingen anfertigen durfte.

Auch beim IZKF Promotionskolleg der medizinischen Fakultät möchte ich mich bedanken. Sie haben es mir ermöglicht ein Freisemester zu nehmen und so meine Arbeit maßgeblich voranbringen zu können.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für die Hilfsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit. Besonders möchte ich mich bei Dr. Fee Schmitt bedanken, die mich so herzlich eingelernt hat. Auch Claudia Müller, Renate Riehle und Daniel Schäll gilt mein herzlicher Dank für die Begleitung und Unterstützung bei allen möglichen aufkommenden Problemen. Zudem möchte ich mich auch bei Jennifer Jaufmann für die Zusammenarbeit bei der Erstellung der Publikation bedanken.