

Aus der Universitätsklinik  
für Nieren- und Hochdruckkrankheiten, Diabetologie und Endokrinologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Das Kälteschockprotein YB-1 vermittelt pro- und anti-  
inflammatorische Effekte in einem Lipopolysaccharid(LPS)-  
induzierten Entzündungsmodell der Maus.**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Julia Schiwietz  
aus München  
Magdeburg 2025

# Dokumentationsblatt

## Bibliographische Beschreibung:

Schiwietz, Julia:

Das Kälteschockprotein YB-1 vermittelt pro- und anti-inflammatorische Effekte in einem Lipopolysaccharid(LPS)-induzierten Entzündungsmodell der Maus. - 2025. - 84 Bl., 21 Abb., 3 Tab., 1 Anh.

## Kurzreferat:

Das Kälteschockprotein *Y-box binding protein-1* (YB-1) ist ein zentraler Mediator in der Regulation von Entzündungsprozessen. Diese Arbeit untersucht die Rolle von YB-1 im systemischen Modell einer Lipopolysaccharid(LPS)-vermittelten Entzündung.

Mäuse mit einem Knock-out des *Ybx1*-Gens weisen nach Verabreichung von LPS eine höhere Überlebensrate auf. Die Abwesenheit von YB-1 führt zu einer geringeren Zytokinfreisetzung. Zudem kann bei *Ybx1*-Knock-out-Tieren eine verringerte Gerinnungsaktivierung und eine verminderte Organschädigung nachgewiesen werden. Erstmals wurde in dieser Arbeit ein Mausstamm mit einer Sekretionsdefizienz für YB-1 generiert. Sekretionsdefiziente Tiere zeigen nach LPS-Gabe eine verstärkte inflammatorische Reaktion, die mit einer erhöhten Letalitätsrate einhergeht.

Diese Arbeit liefert neue Erkenntnisse über die duale Rolle von YB-1 im systemischen Entzündungsgeschehen. Es konnte gezeigt werden, dass intrazelluläres YB-1 pro-inflammatorische Prozesse fördert, während extrazelluläres YB-1 als zentraler anti-inflammatorischer Regulator agiert.

## Schlüsselwörter

*Y-box binding protein-1* (YB-1), Lipopolysaccharide, Knock-in, Knock-out, Sepsis, Sekretion, Kälteschockproteine

Inhalte der vorliegenden Arbeit wurden unter folgenden Titeln auf Kongressen präsentiert:

Kongressbeteiligung mit Vortrag:

Junge Niere, 04.–05. Mai 2018 in Erlangen, Deutschland:

**Schiwietz J**, Brandt S, Mertens PR: Die Endotoxin-induzierte Nierenschädigung wird durch Kälteschockproteine vermittelt.

33. Treffen der *European Renal Cell Study Group*, 24. April 2021 in Magdeburg, Deutschland:

Amann L, Brandt S, **Schiwietz J**, Mertens PR: Enhanced LPS-induced inflammation is dependent on intracellular YB-1.

Kongressbeteiligung mit Poster:

12. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 01.–04. Oktober 2020 in Berlin, Deutschland:

Amann L, Brandt S, **Schiwietz J**, Mertens PR: Enhanced LPS-induced inflammation is dependent on intracellular YB-1.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>vi</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>ix</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Sepsis .....	1
1.1.1 Relevanz der Sepsis.....	1
1.1.2 Pathogenese der Sepsis.....	2
1.2 Kälteschockproteine .....	4
1.2.1 Familie der Kälteschockproteine.....	4
1.2.2 <i>Y-box binding protein-1</i> (YB-1) .....	5
1.3 Rolle von YB-1 in Entzündungsprozessen und der Sepsis .....	9
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	10
<b>2 Material .....</b>	<b>11</b>
2.1 Chemikalien.....	11
2.2 Medikamente .....	12
2.3 Kommerzielle Kits und Reagenzien .....	12
2.4 Puffer und Lösungen .....	13
2.5 Antikörper.....	14
2.6 Primer.....	15
2.7 Verbrauchsmaterialien.....	15
2.8 Geräte .....	16
2.9 Software .....	18
<b>3 Methoden.....</b>	<b>19</b>
3.1 Tierexperimentelle Methoden .....	19
3.1.1 Herstellung der <i>Ybx1<sup>ΔRosaCre</sup></i> - und <i>Ybx1<sup>RosaCreK2A</sup></i> -Tiere.....	19
3.1.2 Tierhaltung .....	22
3.1.3 Versuchsablauf.....	22
3.2 Molekularbiologische Methoden .....	24
3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	24
3.2.2 RNA-Analyse .....	26
3.2.3 Gelelektrophorese .....	28

3.3	Proteinanalytik .....	29
3.3.1	Herstellung von Proteinlysaten aus Gewebe .....	29
3.3.2	Western Blot .....	30
3.4	Histologische Methoden .....	32
3.4.1	Herstellung von Gewebeschnitten .....	32
3.4.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	33
3.4.3	Immunhistochemische Färbung .....	33
3.4.4	Bilderfassung und Auswertung .....	35
3.5	Zytokin-Assays .....	35
3.6	Statistische Auswertung .....	38
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
4.1	Generierung von <i>Ybx1</i> <sup><math>\Delta</math>RosaCre</sup> - und <i>Ybx1</i> <sup>RosaCreK2A</sup> -Tieren .....	39
4.2	Induktion des <i>Ybx1</i> -Knock-outs durch Tamoxifen .....	40
4.3	Phänotypisierung des <i>Ybx1</i> <sup>RosaCreK2A</sup> -Mausstammes .....	41
4.4	Einfluss der LPS-Applikation auf das Überleben von Wildtyp-, <i>Ybx1</i> <sup><math>\Delta</math>RosaCre</sup> - und <i>Ybx1</i> <sup>RosaCreK2A</sup> -Tieren .....	42
4.5	Testung auf das inflammatorische Milieu in den Tierstämmen nach LPS- Applikation .....	44
4.6	Nachweis der Gerinnungsaktivierung nach LPS-Applikation .....	49
4.7	Analyse der durch LPS beeinflussten Organschädigung .....	52
4.8	Schematische Darstellung der Rolle von YB-1 im LPS-induzierten Entzündungsgeschehen .....	54
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>55</b>
5.1	Diskussion der Ergebnisse .....	55
5.2	Limitationen .....	58
5.3	Ausblick .....	58
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>60</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>IX</b>
	<b>Ehrenerklärung .....</b>	<b>X</b>
	<b>Darstellung des Bildungsweges .....</b>	<b>XI</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>XIII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
Ac	Acetyl
Ala	Alanin
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CARHSP1, CHSP1	<i>calcium-regulated heat-stable protein 1</i>
CCL	<i>C-C chemokine ligand</i>
CCR2	<i>C-C chemokine receptor type 2</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLP	<i>cecal ligation and puncture</i>
CRHSP-24	<i>calcium-regulated heat-stable protein 24 kDa</i>
CRS	<i>cytoplasmic retention site</i>
CSD	Kälteschockdomäne
CSDA-CSDE1	<i>cold shock domain A, B, C1, C2, D1, D2, E1</i>
CTD	C-terminale Domäne
DAB	Diaminobenzidin
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DbpA, DbpB, DbpC	DNA-Bindeprotein A, B, C
DIC	<i>disseminated intravascular coagulation</i>
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1A	<i>enhancer factor I subunit A</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERT2	Östrogenrezeptor T2
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
het	heterozygot
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>

Hsp90	<i>heat shock protein 90</i>
i. p.	intraperitoneal
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
IRF3	<i>interferon regulatory factor 3</i>
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KI	Knock-in
KIM-1	<i>kidney injury molecule-1</i>
LBP	LPS-bindendes Protein
LD <sub>50</sub>	mittlere letale Dosis
LIN28A, B	<i>abnormal cell lineage protein 28 homolog A, B</i>
LPS	Lipopolysaccharide
Lys	Lysin
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinasen
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MD2	<i>myeloid differentiation factor 2</i>
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex II
mRNP	<i>messenger ribonucleoprotein</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
Na-Desoxycholat	Natriumdesoxycholat
NF-GMB	<i>nuclear factor that binds the GM-CSF promoter b</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NSEP1	<i>nuclease sensitive element binding protein 1</i>
NTD	N-terminale Domäne
oxyR	<i>oxidative stress regulatory protein</i>
p	phosphoryliert
P	Phosphat
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>

PBST	PBS-Tween
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
qSOFA-Score	<i>quickSOFA-Score</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Ser	Serin
SOFA-Score	<i>Sequential Organ Failure Assessment-Score</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	TRIS- <i>buffered saline</i>
TBST	TBS-Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TIR	<i>toll/interleukin-1 receptor</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TLR4	Toll-like-Rezeptor 4
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
UNR	<i>upstream of N-Ras</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
wt, WT	Wildtyp
YB-1, YB-2	<i>Y-box binding protein-1, -2</i>
Ybx1, Ybx2, Ybx3	<i>Y-box binding protein-1, -2, -3-Gen</i>
ZONAB	<i>ZO-1-associated nucleic acid-binding protein</i>



# Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der LPS-TLR4-Signalkaskade.....	3
Abbildung 2:	Schematische Darstellung von <i>Y-box binding protein-1</i> . ....	6
Abbildung 3:	Regulation der YB-1-Expression und subzellulären Lokalisation.....	9
Abbildung 4:	Generierung des konditionalen <i>Ybx1<sup>RosaCreK2A</sup></i> -Mausstammes. ....	21
Abbildung 5:	Versuchsaufbau des LPS-Toxizitätsmodells. ....	23
Abbildung 6:	Genotypisierung der <i>Ybx1<sup>ΔRosaCre</sup></i> - und <i>Ybx1<sup>RosaCreK2A</sup></i> -Tiere. ....	39
Abbildung 7:	Induktion des <i>Ybx1</i> -Knock-outs durch Tamoxifengabe bei <i>Ybx1<sup>ΔRosaCre</sup></i> -Tieren. ....	40
Abbildung 8:	Überlebenskurven nach LPS-Injektion bei den verschiedenen Genotypen. ....	42
Abbildung 9:	Veränderung des Gesundheitsstatus im Rahmen des LPS-Toxizitätsmodells. ....	43
Abbildung 10:	Regulation der zirkulierenden Zytokinspiegel bei <i>Ybx1<sup>ΔRosaCre</sup></i> -Tieren nach Gabe von LPS. ....	45
Abbildung 11:	Hochregulation inflammatorischer Zytokine bei <i>Ybx1<sup>RosaCreK2A</sup></i> -Tieren nach LPS-Gabe. ....	46
Abbildung 12:	Quantifizierung von IL-6 bei <i>Ybx1<sup>ΔRosaCre</sup></i> - und <i>Ybx1<sup>RosaCreK2A</sup></i> -Tieren nach LPS-Gabe in Plasmaproben und Nierenlysaten. ....	47
Abbildung 13:	IL-6-Transkripte bei den verschiedenen Genotypen nach LPS-Exposition. ....	48
Abbildung 14:	Quantifizierung der Thrombozytenzahl zur Abschätzung einer systemischen Aktivierung des Gerinnungssystems nach LPS-Applikation. ....	49
Abbildung 15:	Fibrinogenablagerung in den Nierengefäßen nach LPS-Gabe. ....	50
Abbildung 16:	Fibrinogenablagerung im LPS-Toxizitätsmodell in der Lunge.....	51
Abbildung 17:	Nierenschädigung unter dem Einfluss von LPS. ....	52
Abbildung 18:	Lungenschäden im Rahmen der LPS-Toxizität. ....	53
Abbildung 19:	Schematische Darstellung der Ergebnisse in den Tiermodellen nach LPS-Applikation. ....	54
Abbildung 20:	Fibrinogenfärbung in den Nierengefäßen nach PBS-Gabe. ....	XIII
Abbildung 21:	Fibrinogenfärbung nach PBS-Gabe in der Lunge.....	XIV

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Nomenklatur der humanen Kälteschockproteine. ....	5
Tabelle 2:	Lokalisation von YB-1 in Zellkompartimenten bei den verschiedenen Mausstämmen. ....	19
Tabelle 3:	Phänotypisierung des <i>Ybx1<sup>RosaCreK2A</sup></i> -Mausstammes hinsichtlich peripherem Blutbild. ....	41

# 1 Einleitung

## 1.1 Sepsis

### 1.1.1 Relevanz der Sepsis

Sepsis ist eine akute, lebensbedrohliche Organdysfunktion, die durch eine fehlgeleitete Immunantwort des Körpers auf eine Infektion verursacht wird. [1] Sie führt zu komplexen physiologischen und biochemischen Veränderungen.

In Deutschland beträgt die jährliche Inzidenz der Sepsis 158 Fälle pro 100.000 Einwohner und steigt durchschnittlich um 7,9 % pro Jahr. Sie ist insbesondere bei Neugeborenen und Älteren ab 85 Jahren hoch. Die Letalität liegt bei 41,7 %. Sepsis-Patienten machen 0,7 % aller stationären Fälle aus. [2]

Die Ursache der Sepsis ist eine Infektion, die eine systemische Immunreaktion auslöst. Neben Bakterien können auch Viren, Pilze und Parasiten als Erreger infrage kommen. Zu den häufigsten Pathogenen gehören gramnegative Bakterien, insbesondere *Escherichia coli* (*E. coli*), sowie grampositive Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, Streptokokken und Pseudomonaden. Auch polymikrobielle Infektionen können eine Sepsis auslösen. [3, 4] Die häufigsten Infektionsorte stellen die Lunge, der Urogenitaltrakt und der Verdauungstrakt dar. [5]

Der Nachweis eines Erregers ist für die Diagnosestellung nicht zwingend erforderlich, eine Verdachtsdiagnose auf Basis typischer klinischer Symptome ist ausreichend. Die Sepsis wird mithilfe des *Sequential Organ Failure Assessment*-Score (SOFA-Score) diagnostiziert. Dieser bewertet die Funktion von Niere, Lunge, Leber und Kreislaufsystem sowie die Thrombozytenzahl und das zentrale Nervensystem. Ein Anstieg um zwei oder mehr Punkte im SOFA-Score definiert eine Sepsis. Alternativ kann der *quickSOFA*-Score (*qSOFA*-Score) zur vereinfachten Diagnostik verwendet werden. Hierbei werden eine erhöhte Atemfrequenz ( $\geq 22/\text{min}$ ), ein erniedrigter systolischer Blutdruck ( $< 100 \text{ mmHg}$ ) und Bewusstseinsstörungen berücksichtigt. Das Vorliegen von mindestens zwei dieser Kriterien weist auf eine Sepsis hin. [6, 7]

Der septische Schock stellt eine schwerwiegende Komplikation dar und ist durch erhebliche Kreislauf- und Stoffwechselstörungen gekennzeichnet. Definitionsgemäß muss trotz adäquater Volumentherapie eine persistierende arterielle Hypotonie mit Katecholaminbedarf bestehen, um einen mittleren arteriellen Blutdruck von mindestens 65 mmHg aufrechtzuerhalten. Zudem muss der Serumlaktatspiegel über 2 mmol/l liegen. [6–8]

Obwohl die Letalität der Sepsis leicht rückläufig ist, nimmt die Inzidenz trotz einer verbesserten medizinischen Versorgung zu. Dies wird unter anderem auf den demographischen Wandel mit einer steigenden Anzahl multimorbider, älterer Patienten zurückgeführt. Auch eine Ausweitung von medikamentösen und intensivmedizinischen Maßnahmen sowie eine häufigere Kodierung

tragen zur steigenden Inzidenz bei. [5, 9] Neben dem Alter spielen Vorerkrankungen eine entscheidende Rolle für den Behandlungserfolg. Langzeitfolgen der Sepsis können kognitive und funktionelle Einschränkungen umfassen. [10]

Trotz intensiver Forschung existiert bislang keine spezifische Therapie zur Vermeidung der überschießenden Immunantwort. Die Behandlung erfolgt primär kausal durch die Gabe von Antiinfektiva. Eine frühzeitige Diagnose und Therapie sind dabei entscheidend: Jede Stunde Verzögerung der Antibiotikagabe erhöht die Letalität um 4 bis 8 %. [11] Eine gezielte Erregerspezifität sowie eine breit abdeckende Antibiotikatherapie sind essenziell. Begleitend werden symptomatische Maßnahmen wie Kreislaufstabilisation durch Volumentherapie und vasoaktive Medikamente, beispielsweise Noradrenalin, durchgeführt. [12]

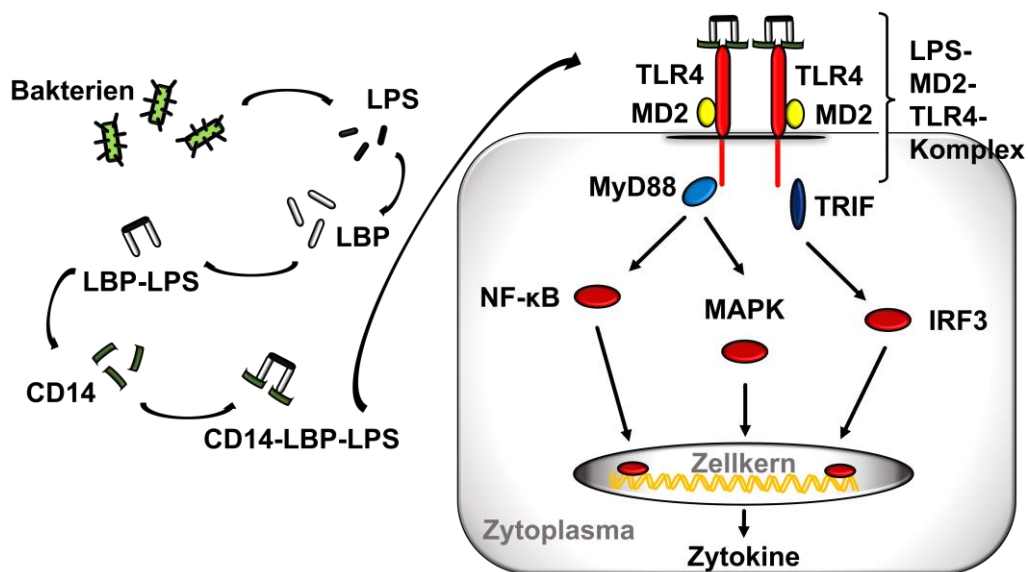
Neben der Belastung für die Betroffenen verursacht die Sepsis erhebliche sozioökonomische Kosten für das Gesundheitssystem. In Deutschland führt sie zu jährlichen Ausgaben von etwa 7,7 Milliarden Euro. [2]

Sepsis ist für 19,7 % aller jährlichen Todesfälle verantwortlich. [13] Weitere Forschungsarbeiten sind notwendig, um die zellulären und molekularen Mechanismen der Sepsis besser zu verstehen.

### 1.1.2 Pathogenese der Sepsis

Zellen des angeborenen Immunsystems sowie Fibroblasten und Epithelzellen erkennen Pathogene durch sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns* [PAMPs]), die sich auf der Oberfläche von Infektionserregern befinden. [14] Diese Muster fehlen in humanem Gewebe und lösen eine Immunantwort des Körpers aus. PAMPs werden von spezifischen Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors* [PRRs]) auf Immunzellen gebunden. Eine wichtige Gruppe der PRRs sind die Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die eine Vielzahl mikrobieller Strukturen erkennen. [15] Geschädigte Zellen setzen Schaden-assoziierte molekulare Muster (*damage-associated molecular patterns* [DAMPs]) frei, die an eigene PRRs binden und als Gefahrensignal dienen. [16] Ein zentrales PAMP ist das Lipopolysaccharid (LPS), das Hauptbestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien ist (Abbildung 1). [17] Lipid A, ein Bestandteil des LPS, wirkt als Endotoxin. [18] LPS bindet im Blut an LPS-bindendes Protein (LBP) und bildet mit *cluster of differentiation*(CD)14 einen Komplex. [19] Der gebildete CD14-LBP-LPS-Komplex wird von Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) gebunden, der in Komplex mit dem akzessorischen Molekül *myeloid differentiation factor 2* (MD2) vorliegt. TLR4 stellt den insbesondere von LPS gebundenen führenden Rezeptor im Rahmen der Sepsis dar. [20–22] Nachdem sich zwei LPS-MD2-TLR4-Komplexe zu einer dimeren Struktur verbunden haben, wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst. Es gibt zwei Hauptsignalwege: den *myeloid differentiation primary response gene 88*(MyD88)- und den *toll/interleukin-1 receptor*(TIR)-

domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$ (TRIF)-abhängigen Weg. [23] Der MyD88-Weg wird an der Plasmamembran aktiviert und induziert die Bildung von *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) sowie mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK). [24, 25] Der TRIF-Signalweg hingegen wird in Endosomen aktiviert und führt zur Aktivierung von *interferon regulatory factor 3* (IRF3). [26] Diese Faktoren regulieren die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie Interleukin(IL)-1, IL-6, Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). [3]



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der LPS-TLR4-Signalkaskade.** LPS als Auslöser einer Sepsis ist Hauptbestandteil der Zellmembran von gramnegativen Bakterien. Es bindet im Blutkreislauf an LBP sowie an CD14. Der gebildete CD14-LBP-LPS-Komplex wird von TLR4 gebunden. TLR4 liegt in Komplex mit MD2 vor. Nachdem sich zwei LPS-MD2-TLR4-Molekülkomplexe zu einer dimeren Struktur verbunden haben, kommt es zur Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade. Zum einen kommt es zur Initiierung des MyD88-Signalweges, der die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und von MAPK fördert. Zum anderen mündet der TRIF-Signalweg in der Aktivierung von IRF3. NF- $\kappa$ B, MAPK und IRF3 fungieren als Transkriptionsfaktoren für Zytokingene. Abkürzungen: *cluster of differentiation*(CD)14; *interferon regulatory factor 3* (IRF3); LPS-bindendes Protein (LBP); Lipopolysaccharide (LPS); mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK); *myeloid differentiation factor 2* (MD2); *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88); *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B); *toll/interleukin-1 receptor*(TIR)-*domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$*  (TRIF); Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) (eigene Darstellung, [22, 23]).

Diese Entzündungsmediatoren verstärken die Immunantwort und fördern die Rekrutierung von Immunzellen, insbesondere neutrophilen Granulozyten und Monozyten, an den Infektionsort. Histamin und Prostaglandine verursachen eine Vasodilatation und erhöhen die Gefäßpermeabilität, was die Rekrutierung erleichtert. [3]

Neben der überschießenden Entzündungsreaktion tritt bei Sepsis-Patienten häufig eine Immunsuppression auf. [27] Diese wird durch endogen freigesetzte anti-inflammatorische Kortikosteroide sowie entzündungshemmende Zytokine, wie IL-10 und *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), vermittelt. [28, 29] Zudem weisen Immunzellen, insbesondere neutrophile

Granulozyten und Monozyten, Störungen in ihrem Stoffwechsel und in der Chemotaxis auf. [30, 31] Die Immunsuppression begünstigt das Auftreten sekundärer opportunistischer Infektionen. [3]

Die Sepsis beeinflusst zudem die Funktion des Endothels. Während einer Sepsis wird das Gefäßendothel systemisch aktiviert, was zu einer verstärkten Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) führt. Dies führt zu massiven Flüssigkeitsverlusten ins Interstitium. Gleichzeitig resultiert die Endothelschädigung in Sauerstoffmangel, der die mitochondriale Funktion beeinträchtigt. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und NO schädigen in hohen Konzentrationen die Mitochondrien und leiten Apoptose ein. [32, 33] Während der Sepsis zeigen verschiedene Immunzellen unterschiedliche Apoptoseraten. [28] Lymphozyten und dendritische Zellen unterliegen vermehrt der Apoptose, was eine zusätzliche Immunsuppression begünstigt. Makrophagen bleiben weitgehend unbeeinflusst, während neutrophile Granulozyten seltener eine Apoptose durchlaufen, was ihre Lebensdauer verlängert und die pro-inflammatorische Reaktion verstärkt. [34–37].

Die Sepsis führt auch zur Aktivierung des Gerinnungssystems. [38] Pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6 steigern die Produktion des Gewebefaktors, der die Gerinnungskaskade aktiviert. [39] Dies kann zur disseminierten intravasalen Koagulopathie (*disseminated intravascular coagulation* [DIC]) führen, die durch Mikrothrombenbildung gekennzeichnet ist. Der übermäßige Verbrauch von Gerinnungsfaktoren sowie die durch TNF- $\alpha$  induzierte Aktivierung des fibrinolytischen Systems erhöhen das Risiko für Blutungen. [29]

Eine balancierte Immunantwort ermöglicht die Eliminierung von Pathogenen und die Gewebereparatur. Im Rahmen der Sepsis jedoch führt eine Fehlregulation zu übermäßiger Zytokinfreisetzung, inadäquater Immunsuppression und verstärkter Gerinnungsaktivierung. [3]

## 1.2 Kälteschockproteine

### 1.2.1 Familie der Kälteschockproteine

Kälteschockproteine sind evolutionär hoch konservierte, multifunktionale Proteine, die in nahezu allen Organismen vorkommen. [40] Sie wurden 1987 in *E. coli* entdeckt und erhielten ihren Namen, da sie bei einem Temperaturabfall von 37 °C auf 10 °C verstärkt exprimiert werden. [41] Diese Proteine enthalten sogenannte Kälteschockdomänen (*cold shock domain* [CSD]), die eine DNA- und RNA-Bindungsfähigkeit besitzen. [42, 43] Dadurch übernehmen sie zahlreiche regulatorische Funktionen. Durch Bindung von DNA im Zellkern beeinflussen sie neben ihrer eigenen Expression die Transkription anderer Gene. Durch RNA-Bindung regulieren sie das Spleißen, die Halbwertszeit und die Translation von Transkripten im Zytoplasma. [44, 45] Nach Sekretion interagieren Kälteschockproteine mit Rezeptoren und beeinflussen verschiedene Signalwege. [46]

Aufgrund ihrer Proteindomänen lassen sich menschliche Kälteschockproteine in 5 Gruppen einteilen (Tabelle 1).

Gen	Protein	Alternative Namen
<i>Ybx1</i>	<b>YB-1</b>	CSDB, DbpB, NSEP1, EF1A
<i>Ybx2</i>	<b>DbpC</b>	Contrin
<i>Ybx3</i>	<b>DbpA</b>	CSDA, ZONAB, oxyR, NF-GMB, YB-2
<i>CARHSP1</i>	<b>CARHSP1</b>	CSDC1, CRHSP-24, CHSP1
<i>CSDC2</i>	<b>PIPPin</b>	
<i>CSDE1</i>	<b>UNR</b>	
<i>LIN28A</i>	<b>LIN28A</b>	CSDD1
<i>LIN28B</i>	<b>LIN28B</b>	CSDD2

**Tabelle 1: Nomenklatur der humanen Kälteschockproteine.** Die Tabelle zeigt die Gen-Bezeichnungen, die Protein-Namen und alternative Namen aller Proteine der 5 Gruppen der humanen Kälteschockproteine. Abkürzungen: *calcium-regulated heat-stable protein 1* (CARHSP1, CHSP1); *calcium-regulated heat-stable protein 24 kDa* (CRHSP-24); *cold shock domain A, B, C1, C2, D1, D2, E1* (CSDA-CSDE1); DNA-Bindeprotein A, B, C (DbpA, DbpB, DbpC); *enhancer factor I subunit A* (EF1A); *abnormal cell lineage protein 28 homolog A, B* (LIN28A, LIN28B); *nuclear factor that binds the GM-CSF promoter b* (NF-GMB); *nuclease sensitive element binding protein 1* (NSEP1); *oxidative stress regulatory protein* (oxyR); *upstream of N-Ras* (UNR); *Y-box binding protein-1, -2, -3* (YB-1, YB-2, Ybx1, Ybx2, Ybx3); *ZO-1-associated nucleic acid-binding protein* (ZONAB) (modifiziert nach Lindquist et al. [46]).

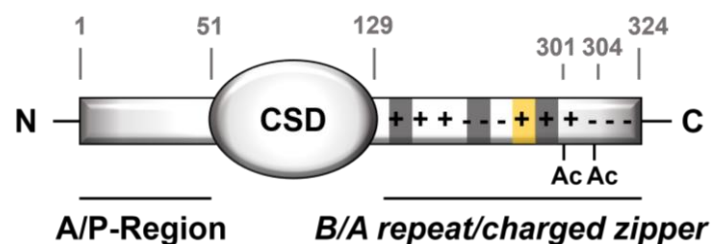
Die beim Menschen am besten untersuchte Gruppe ist die der Y-Box-Bindeproteine (engl. *Y-box binding proteins*). Das bekannteste Mitglied ist das *Y-box binding protein-1* (YB-1, dt. Y-Box-Bindeprotein-1), welches vom *Ybx1*-Gen kodiert wird und auch als DNA-Bindeprotein B (DbpB) bezeichnet wird. Zur gleichen Gruppe gehören das DNA-Bindeprotein A (DbpA), das vom *Ybx3*-Gen kodiert wird und auch YB-2 genannt wird, sowie das DNA-Bindeprotein C (DbpC), welches vom *Ybx2*-Gen kodiert wird und als Contrin bekannt ist. [46–49] Während YB-1 und DbpA ubiquitär exprimiert werden, ist Contrin ausschließlich in Keimzellen zu finden. [50]

### 1.2.2 *Y-box binding protein-1* (YB-1)

#### Struktur

Das *Ybx1*-Gen ist 19 kb lang und befindet sich auf Chromosom 1p34. [51, 52] Es umfasst 8 Exone und 7 Introne und kodiert für ein Protein mit einer Länge von 324 Aminosäuren (Abbildung 2). [52, 53] Die berechnete molekulare Masse des Proteins beträgt 35,9 kDa. [54] Seinen Namen erhielt YB-1 durch die Bindung an die sogenannte Y-Box

im Promotor des Gens für den Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II). [55] Zwischen den Spezies besteht ein hoher Homologiegrad; bei Maus und Mensch unterscheiden sich lediglich 4% der Aminosäuren. [54] YB-1 besitzt drei funktionelle Domänen: Die N-terminale Domäne (NTD) ist eine Alanin(Ala)- und Prolin-reiche Region und wird deshalb auch als A/P-Region bezeichnet. [54] Sie reicht von Aminosäure 1 bis 51. Sie interagiert mit Proteinen und stabilisiert mRNA durch Bindung an Aktinfilamente. [56] Die hochkonservierte CSD ist der zentrale Bestandteil des Proteins. Sie befindet sich zwischen den Aminosäuren 51 und 129. Die CSD beinhaltet mehrere Bindungsstellen für DNA und RNA. [57] Die hydrophile C-terminale Domäne (CTD) enthält alternierende Abschnitte basischer und saurer Aminosäuren, die jeweils ca. 30 Aminosäuren lang sind. Man spricht deshalb auch vom sogenannten *B/A repeat* oder *charged zipper*. Sie reicht von Aminosäure 129 bis 324. Die Funktion der CTD besteht in der Stabilisierung von Protein-Nukleinsäure- sowie Protein-Protein-Interaktionen. [45, 49]



**Abbildung 2: Schematische Darstellung von Y-box binding protein-1.** YB-1 besteht aus insgesamt 324 Aminosäuren und weist drei verschiedene Domänen auf. Die NTD ist eine Alanin- und Prolin-reiche Region, die auch als A/P-Region bezeichnet wird. Die CSD stellt den zentralen Bestandteil des Proteins dar und dient als Bindungsstelle für DNA und RNA. Die hydrophile CTD besteht aus alternierenden Abschnitten basischer und saurer Aminosäuren (schematisch durch Plus- und Minuszeichen dargestellt) und wird auch *B/A repeat* oder *charged zipper* genannt. Die NTD umfasst die Aminosäuren 1 bis 51, die CSD die Aminosäuren 51 bis 129 und die CTD die Aminosäuren 129 bis 324. Innerhalb der CTD befinden sich drei NLS (dunkelgrau dargestellt) und eine CRS (gelb dargestellt). Die Aminosäuren 301 und 304 sind Lysinreste der CTD und stellen zwei Acetylierungsstellen dar, die für die Sekretion von YB-1 notwendig sind. Abkürzungen: Acetyl (Ac); C-terminale Domäne (C, CTD); cytoplasmic retention site (CRS); cold shock domain (CSD); N-terminale Domäne (N, NTD); nuclear localization signal (NLS); Y-box binding protein-1 (YB-1) (eigene Darstellung).

## Lokalisation

YB-1 erfüllt spezifische Funktionen intrazellulär im Zellkern und im Zytoplasma sowie nach Sekretion im Extrazellularraum. Seine Lokalisation wird durch verschiedene Motive innerhalb der CTD und CSD reguliert. Innerhalb der CTD befinden sich drei sogenannte *nuclear localization signals* (NLS): NLS-1 zwischen den Aminosäuren 149 und 156, NLS-2 zwischen 185 und 194 und NLS-3 zwischen 276 und 292. Eine Phosphorylierung von Tyrosin 281 im NLS-3 fördert die nukleäre Translokation von YB-1. [58] Zwischen den Aminosäuren 264 und 290 befindet sich eine *cytoplasmic retention site* (CRS), die für die



zytoplasmatische Verankerung verantwortlich ist. [59, 60] Die zelluläre Verteilung von YB-1 ist zudem zellzyklusabhängig. Während des Übergangs von der G1-Phase in die S-Phase erfolgt eine Translokation von YB-1 aus dem Zytoplasma in den Zellkern. [61] Auch Zellstress kann eine nukleäre Translokation auslösen. [62–64] Darüber hinaus steigt die intranukleäre YB-1-Konzentration während Proliferations- und Differenzierungsprozessen an. [49, 65, 66] Zur Initiierung von DNA-Replikation, DNA-Reparatur, Transkription und prä-mRNA-Spleißen wird YB-1 ebenso in den Zellkern transportiert. Posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Proteolyse und Acetylierung sind weitere Mechanismen, die eine nukleäre Translokation von YB-1 steuern. [54]

## Funktionen

Funktionell ist YB-1 an zahlreichen Prozessen beteiligt. Neben der Bindung an DNA und RNA interagiert es mit einer Vielzahl von Proteinen. Es spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Genexpression. [45, 49, 54]

Im Zellkern ist YB-1 an der DNA-Replikation und -Reparatur, Transkription und am prä-mRNA-Spleißen beteiligt. Ein erhöhter intrazellulärer Gehalt an YB-1 korreliert mit einem Anstieg der für die Replikation essenziellen Faktoren *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), DNA-Topoisomerase II $\alpha$  und DNA-Polymerase  $\alpha$ . [66, 67] YB-1 spielt zudem eine Rolle in verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen. [68–70] Es weist sowohl Exonuklease- als auch Endonukleaseaktivität auf. [71, 72] Darüber hinaus fungiert YB-1 als Transkriptionsfaktor für Gene, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind. [70] Es interagiert mit Proteinen der Basen- und Nukleotid-Exzisionsreparatur sowie der *mismatch*-Reparatur und ist an der Reparatur von DNA-Einzelstrang- und DNA-Doppelstrangbrüchen sowie an der Rekombinations-Reparatur beteiligt. Die Transkriptionsregulation durch YB-1 erfolgt auf drei Wegen: [54] (i.) direkte Bindung an DNA alleine oder mit anderen Transkriptionsfaktoren, (ii.) Wechselwirkung mit Transkriptionsfaktoren zur Modulation ihrer Aktivität, (iii.) Bindung an Promotor-Sequenzen, wodurch die DNA-Bindung anderer Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird. [49] Zudem ist YB-1 am prä-mRNA-Spleißen beteiligt. [44, 73]

Im Zytoplasma ist YB-1 Bestandteil des *messenger ribonucleoprotein* (mRNP)-Komplexes und reguliert die Stabilisierung, Lokalisation und Translation von mRNA. [54] Dies beeinflusst die mRNA-Halbwertszeit, ihre intrazelluläre Verteilung und die Translationsrate. [53] YB-1 stabilisiert mRNA über zwei Mechanismen: (i.) Bildung von YB-1/mRNA-Komplexen, die vor Exoribonukleasen schützen, (ii.) Stabilisierung durch Interaktion mit schützenden Proteinen. Die mRNA-Stabilisierung erfolgt konzentrationsabhängig über Aktinfilamente und Mikrotubuli des Zytoskeletts. [74] Eine niedrige YB-1/mRNA-*ratio* fördert die Bindung an Aktinfilamente, während eine hohe YB-1/mRNA-*ratio* diese Interaktion löst. [56] Umgekehrt verhält es sich mit der Bindung an Mikrotubuli. [75] Die Translationskontrolle durch YB-1 erfolgt ebenso

konzentrationsabhängig: Eine niedrige YB-1/mRNA-*ratio* fördert die Translation, während eine hohe YB-1/mRNA-*ratio* diese hemmt. [76, 77]

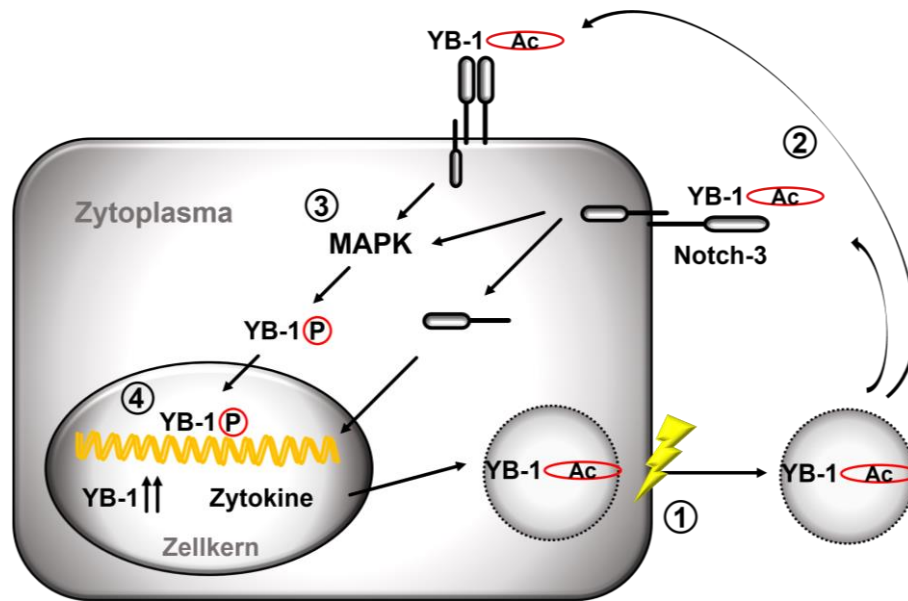
YB-1 wird durch zwei Mechanismen abgebaut: [54] (i.) vollständige Proteolyse durch das 26S-Proteasom nach Ubiquitinierung während der Apoptose, (ii.) Ubiquitin- und ATP-unabhängige partielle Prozessierung durch das 20S-Proteasom unter Zellstress, wodurch ein C-terminales Fragment abgespalten wird, das die CRS entfernt und so die nukleäre Translokation fördert. [78, 79]

### **Sekretion von YB-1**

YB-1 besitzt an den Lysinresten (Lys) 301 und 304 der CTD zwei Acetylierungsstellen, die für die YB-1-Sekretion notwendig sind. [80] Während die klassische Proteinsekretion über das endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Apparat und sekretorische Vesikel erfolgt, wird YB-1 über einen nicht-klassischen Weg sekretiert. [81] Aufgrund des Fehlens kanonischer N-terminaler Signalpeptidsequenzen erfolgte die Freisetzung von YB-1 über endolysosomale Vesikel, die einen proteasomalen Abbau verhindern. [80]

### **Regulation der YB-1-Expression**

YB-1 stimuliert seine eigene Expression über einen *feedforward*-Mechanismus, der als autoregulierte Schleife beschrieben wird (Abbildung 3). Zellstress, wie beispielsweise durch LPS ausgelöst, führt zu einer Sekretion von YB-1. Dieses bindet an spezifische Membranrezeptoren, u. a. an den Rezeptor Notch-3. Hierdurch werden intrazelluläre Kinasen aktiviert und der Rezeptor Notch-3 proteolytisch gespalten. Die freigesetzte intrazelluläre Domäne von Notch-3 transloziert in den Zellkern, wo sie zur Aktivierung von Zielgenen beiträgt. Gleichzeitig phosphorylieren aktivierte Kinasen zytoplasmatisches YB-1, wodurch dessen Translokation in den Zellkern gefördert wird. Im Zellkern induziert phosphoryliertes (p) YB-1 die eigene Expression und wirkt zudem als Transkriptionsfaktor für andere Gene, beispielsweise für Zytokine, die wiederum die Sekretion von YB-1 fördern. [46, 82]



**Abbildung 3: Regulation der YB-1-Expression und subzellulären Lokalisation.** (1) Extrazelluläre Stimuli (z. B. LPS) induzieren die YB-1-Sekretion. (2) Sekretiertes YB-1 bindet an spezifische Membranrezeptoren. (3) Dies führt zur Induktion intrazellulärer Signalkaskaden und zur Kinase-Aktivierung. Aktivierte Kinasen phosphorylieren zytoplasmatisches YB-1 und induzieren seine Kerntranslokation. (4) Im Zellkern aktiviert YB-1 die eigene Expression und reguliert die Transkription anderer Gene, die wiederum eine Sekretion von YB-1 bewirken. Abkürzungen: Acetyl (Ac); Lipopolysaccharide (LPS); mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK); phosphoryliert (p); Y-box binding protein-1 (YB-1) (modifiziert nach Lindquist et al. [46]).

### 1.3 Rolle von YB-1 in Entzündungsprozessen und der Sepsis

Die vielfältigen Funktionen von YB-1 in Entzündungsprozessen wurden bereits vor mehr als 10 Jahren durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Mertens beschrieben. [83] Als Grundlage für die vorliegenden Untersuchungen wurde ein konditionaler Ganzkörper-Ybx1-Knock-out (KO) generiert. Im Modell der tubulointerstitiellen Nephritis zeigte sich bei diesen Mäusen eine reduzierte Immunzellinfiltration der Niere sowie eine verminderte Zytokinproduktion. Zudem wiesen Ybx1-KO-Tiere eine geringere Organschädigung auf. [84] Neben dieser entzündungsfördernden Funktion von YB-1 konnten auch anti-inflammatorische Eigenschaften nachgewiesen werden. Makrophagen mit YB-1-Defizienz zeigten *in vitro* eine verminderte Sekretion von IL-10 als Reaktion auf Entzündungsreize, was auf eine entzündungshemmende Funktion von YB-1 in diesen Zellen hindeutet. [85] Bisher liegen nur wenige Daten zur Funktion von YB-1 in systemischen Entzündungsprozessen wie der Sepsis vor. Hanssen et al. fanden bei Sepsis-Patienten erhöhte YB-1-Konzentrationen im Serum. Sie untersuchten zudem heterozygote (het) Ybx1-KO-Mäuse, die einen um 50 % reduzierten YB-1-Gehalt aufwiesen, in einem LPS-induzierten Sepsismodell. In diesen Mäusen zeigte sich eine abgeschwächte systemische Entzündungsreaktion, eine verringerte durch YB-1 vermittelte Chemotaxis sowie eine reduzierte Organschädigung der Niere. Insgesamt wiesen heterozygote YB-1-defiziente Mäuse nach LPS-Exposition eine erhöhte Überlebensrate

auf. [86] Zudem wurde in diesen Mäusen eine reduzierte IL-10-Produktion nachgewiesen. [87] Es wurde eine durch LPS induzierte Expression und Sekretion von YB-1 nachgewiesen, die über die Bindung an TLR4 vermittelt wird. Die YB-1-Expression im Rahmen einer LPS-induzierten Entzündung ist abhängig von der Phosphorylierung von Serin (Ser) 102, während die Sekretion eine Acetylierung an den Lysinen 301 und 304 erfordert. [80, 86] Ein systemisches Modell einer LPS-induzierten Entzündung bei Ganzkörper-*Ybx1*-KO-Tieren wurde bisher nicht durchgeführt.

## **1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Das Kälteschockprotein YB-1 reguliert lokale und systemische Entzündungsprozesse. Über die Funktion von YB-1 im systemischen Prozess der Inflammation wie der gramnegativen Sepsis liegen bisher nur wenige Daten vor. Bisherige Studien haben gezeigt, dass YB-1 im Verlauf der Sepsis exprimiert und sekretiert wird.

Die zentrale Hypothese dieser Arbeit ist, dass YB-1 den systemischen Entzündungsprozess im Rahmen der Immunantwort auf LPS je nach subzellulärer Lokalisation unterschiedlich beeinflusst. Ziel der vorliegenden Studie ist es daher, die Funktion von YB-1 in einem systemischen Modell der LPS-induzierten Entzündung *in vivo* zu analysieren. Es soll geklärt werden, welche Funktionen intra- und extrazelluläres YB-1 erfüllen.

Um diese Mechanismen differenzieren zu können, wurden zwei experimentelle Mausstämme verwendet: ein konditionaler Ganzkörper-KO für *Ybx1* und ein Mausmodell mit sekretionsdefizientem YB-1. Ausgewertet wurden Unterschiede zwischen den Genotypen hinsichtlich Überleben, inflammatorischem Milieu im Plasma und Gewebe, Aktivierung des Gerinnungssystems sowie Organschäden in Niere und Lunge.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Acrylamid/Bis-Lösung 30%	Serva (Heidelberg)
Agarose	Carl Roth (Karlsruhe)
APS (Ammoniumpersulfat)	Carl Roth (Karlsruhe)
Aqua dest.	-
β-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Borsäure	Bio-Rad (München)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
BSA ( <i>bovine serum albumin</i> )	Carl Roth (Karlsruhe)
Chloroform	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Bio-Rad (München)
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Carl Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol 70 %, vergällt	Otto Fischar GmbH (Saarbrücken)
Ethanol 96 %, vergällt	Otto Fischar GmbH (Saarbrücken)
Ethanol absolut, vergällt	Otto Fischar GmbH (Saarbrücken)
FCS ( <i>fetal calf serum</i> )	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid) 30 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Hämalaun-Lösung, sauer nach Mayer	Carl Roth (Karlsruhe)
Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm (Ulm)
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth (Karlsruhe)
Isotone Kochsalzlösung 0,9 %	B. Braun Melsungen (Melsungen)
KCl (Kaliumchlorid)	AppliChem (Darmstadt)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat)	Carl Roth (Karlsruhe)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat)	Merck (Darmstadt)
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth (Karlsruhe)
Na-Desoxycholat (Natriumdesoxycholat)	Merck (Darmstadt)
Natriumcitrat aus BD Seditainer-Röhrchen	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Nonidet P40	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)

Nuklease-freies Wasser	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Paraffin	AppliChem (Darmstadt)
Paraformaldehyd	Carl Roth (Karlsruhe)
PBS ( <i>phosphate-buffered saline</i> )	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
ProTaqS Clear	Quartett (Berlin)
Roti-Histokitt II	Carl Roth (Karlsruhe)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth (Karlsruhe)
Stickstoff, flüssig	Avantor (Darmstadt)
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth (Karlsruhe)
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris-HCl (Tris-Hydrochlorid)	AppliChem (Darmstadt)
Trizol	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Tween 20	AppliChem (Darmstadt)

## 2.2 Medikamente

ClinOleic 20 %	Baxter (Unterschleißheim)
Isofluran CP 1 ml/ml	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH (Burgdorf)
Tamoxifen 30 mg	Ratiopharm (Ulm)

## 2.3 Kommerzielle Kits und Reagenzien

<i>Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23-plex Assay</i>	Bio-Rad (München)
<i>DC Protein Assay Kit II</i>	Bio-Rad (München)
<i>DirectPCR Lysis Reagent Tail</i>	PeqLab (Erlangen)
<i>DreamTaq Green PCR Master Mix</i>	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
<i>GeneRuler 100 bp DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
<i>GoTaq Flexi DNA Polymerase Kit</i>	Promega (Mannheim)
<i>GoTaq Hot Start Polymerase</i>	Promega (Mannheim)
<i>Liquid DAB+ Substrate Chromogen System</i>	Dako (Hamburg)
LPS von <i>E. coli</i> 026:B6 (L8274) 100 mg	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>PageRuler Plus Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Phosphatase-Inhibitor <i>PhosSTOP</i>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>Pierce ECL Western Blotting Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)

Protease-Inhibitor <i>cOmplete Mini</i>	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Proteinase K	Roche (Grenzach-Wyhlen)
<i>Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array Kit</i>	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
<i>RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Stain G	Serva (Heidelberg)

## 2.4 Puffer und Lösungen

Citratpuffer	2,9 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 0,5 ml Tween 20, auf 1000 ml Aqua dest., pH 6,0
PBS (20x)	80,06 g NaCl (2,74 M), 2,01 g KCl (54,0 mM), 17,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,2 M), 3,05 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (35,0 mM), auf 500 ml Aqua dest.
PBS (1x)	50 ml PBS (20x), auf 1000 ml Aqua dest.
PBST (1x PBS + 0,1 % Tween)	50 ml PBS (20x), 1 ml Tween 20, auf 1000 ml Aqua dest.
<i>Resolving buffer</i>	90,86 g TRIS (1,5 M), auf 500 ml Aqua bidest., pH 8,8
RIPA-Lysepuffer	3,03 g TRIS (50,0 mM), 4,38 g NaCl (150,0 mM), auf 75 ml Aqua bidest., pH 7,4, 50 ml 10 % Nonidet P40 (1,0 %), 12,5 ml 10 % Na-Desoxycholat (0,25 %), 1 ml EDTA (0,5 M), auf 500 ml Aqua bidest.
<i>Running Buffer</i> (10x)	30 g TRIS (0,25 M), 144 g Glycin (1,92 M), 10 g SDS (1,0 %), auf 1000 ml Aqua bidest.
<i>Sample buffer</i> (5x)	1,18 g Tris-HCl (150,0 mM), 15 ml Glycerol (30 %), 6 ml SDS (12 %), 12 ml β-Mercaptoethanol (24 %), 1 Spatelspitze Bromphenolblau, auf 50 ml Aqua dest.
<i>Stacking buffer</i>	30,29 g TRIS (0,5 M), auf 500 ml Aqua bidest., pH 6,8
TBE (TRIS-Borat-EDTA) (10x)	107,8 g TRIS, 55 g Borsäure, 7,4 g EDTA, auf 1000 ml Aqua dest., pH 8,3

TBS (TRIS- <i>buffered saline</i> )	12,5 ml TRIS (1,0 M), pH 8 (25,0 mM), 15 ml 5,0 M NaCl (150,0 mM), auf 500 ml Aqua dest.
TBST (1x TBS + 0,05 % Tween)	50 ml TRIS (1,0 M), pH 8 (25,0 mM), 60 ml 5,0 M NaCl (150,0 mM), 1 ml Tween 20 (0,05 %), auf 2000 ml Aqua dest.
Transferpuffer	6,06 g TRIS (25,0 mM), 28,53 g Glycin (190 mM), 400 ml Methanol (20%), auf 2000 ml Aqua dest., pH 8,2–8,4

## 2.5 Antikörper

Antikörper für den Western Blot

Antikörper	Spezies	Firma, Bestellnr.	Verdün- nung	Lösung	Blockie- rung
Primäre Antikörper					
Anti-YB-1 (C-terminal)	<i>rabbit</i>	Sigma-Aldrich, Y0396	1:1000	TBST	5 % Milch in TBST
GAPDH	<i>goat</i>	GenScript, A00191-40	1:1000	5 % Milch in TBST	5 % Milch in TBST
Sekundäre Antikörper					
Donkey Anti-Goat IgG	<i>donkey</i>	Jackson ImmunoResearch, 705-035-147	1:10.000	1 % Milch in TBST	
Goat Anti-Rabbit IgG	<i>goat</i>	SouthernBiotech, 4050-05	1:5000	1 % Milch in TBST	

Antikörper für die immunhistochemische Färbung

Antikörper	Spezies	Firma, Bestellnr.	Verdün- nung
Primäre Antikörper			
Fibrinogen $\gamma$ (C-20)	<i>goat</i>	Santa Cruz, sc-18032	1:500
Sekundäre Antikörper			
Donkey Anti-Goat IgG	<i>donkey</i>	Jackson ImmunoResearch, 705-035-147	1:500



## 2.6 Primer

Primer für die Genotypisierung

PCR	Primer	Sequenz
<i>K2A-Ybx1</i> flox	5397_43	5'-AAT CAA ACA TTG GTC CTC TGG-3'
	5397_44	5'-ACC GAT ACC AGT ACC CTT TCC-3'
RosaERT2Cre	Cre-1	5'-GCC TGC ATT ACC GGT CGA TGC AAC GA-3'
	Cre-2	5'-GTG GCA GAT GGC GCG GCA ACA CCA TT-3'
RosaERT2Cre WT	R26Nhe fw	5'-CTG TGG ACA GAG GAG CCA TAA CTG C-3'
	R26Nhe rv	5'-CCA CCA CTG GCT GGC TAA ACT CT-3'
<i>Ybx1</i> flox	4954_133	5'-GCC TAA GGA TAG TGA AGT TTC TGG-3'
	4954_134	5'-CCT AGC ACA CCT TAA TCT ACA GCC-3'

Primer für die RNA-Analyse

PCR	Primer	Sequenz
$\beta$ -Aktin	$\beta$ -Aktin fw	5'-AGA GAG GTA TCC TGA CCC TGA AGT-3'
	$\beta$ -Aktin rv	5'-CAC GCA GCT CAT TGT AGA AGG TGT-3'
IL-6	IL-6 fw	5'-GAG GAT ACC ACT CCC AAC AGA CC-3'
	IL-6 rv	5'-AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA-3'

## 2.7 Verbrauchsmaterialien

96-Well-Platten	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Atemschutzmaske Ecoma Procedure Face Mask	Xianning Eco Medical Artikel Co., Ltd. (Xianning, Hubei, China)
Biopsie-Einbettkassetten	Carl Roth (Karlsruhe)
Blottingpapier Whatman	Carl Roth (Karlsruhe)
Dako Pen Fettstift	Agilent (Santa Clara, Kalifornien, USA)
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Einweg-Pasteurpipetten	Carl Roth (Karlsruhe)
Faltenfilter ROTILABO	Carl Roth (Karlsruhe)
Kapillarblutentnahme GK 150 EDTA	KABE LABORTECHNIK GmbH (Nümbrecht-Elsenroth)
Labor- und Kosmetiktücher	ZVG Zellstoff-Vertriebs-GmbH & Co. KG (Troisdorf)
Nitrocellulose-Membran	Bio-Rad (München)

Objektträger SuperFrost Plus  
 Objektträgerkasten ROTILABO  
 Parafilm M  
 PCR-Tubes, 8er, mit flachem Deckel  
  
 Pinsel  
 Pipettenspitzen Biosphere Filter Tips  
 Pipettenspitzen epT.I.P.S  
 Pipettenspitzen SafeSeal Tips professional  
 Reagiergefäße SafeSeal Tubes  
 Serologische Pipetten CELLSTAR  
  
 Spritzen BD Discardit II (2, 5, 10, 20 ml)  
 Spritzen BD Micro-Fine 1 ml  
 Spritzen Omnican 50 (0,5 ml)  
 Spritzen Omnifix-F 1 ml  
 Sterican Einmal-Dentalkanülen  
 Tubes CELLSTAR  
  
 Vernichtungs-/Folienbeutel

Thermo Fisher Scientific (Dreieich)  
 Carl Roth (Karlsruhe)  
 Bemis (Neenah, Wisconsin, USA)  
 Kisker Biotech GmbH & Co. KG  
 (Steinfurt)  
 Carl Roth (Karlsruhe)  
 SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht)  
 Eppendorf (Hamburg)  
 Biozym (Hessisch Oldendorf)  
 SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht)  
 Greiner Bio-One International GmbH  
 (Kremsmünster, Österreich)  
 Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)  
 Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)  
 B. Braun (Melsungen)  
 B. Braun (Melsungen)  
 B. Braun (Melsungen)  
 Greiner Bio-One International GmbH  
 (Kremsmünster, Österreich)  
 Th. Geyer GmbH & Co. KG  
 (Renningen)

## 2.8 Geräte

-80 °C Forma Ultratiefkühlschrank  
*Advanced Fluorescence Imager*  
  
*Advia 2120i Hämatologie-Analyseautomat*  
*Bio-Plex 200 array reader*  
 Elektrophorese-Sub-Cell GT  
 Färbeküvette  
 Gel-Dokumentations-System E.A.S.Y.  
  
*HistoCore Arcadia H-Paraffinausgießstation*  
*Infinite 200 Multimode-Platten-Reader*  
  
 Käfige  
 Kühl- und Gefrierkombination (4 °C, -20 °C)

Thermo Fisher Scientific (Dreieich)  
 INTAS Science Imaging Instruments  
 GmbH (Göttingen)  
 Siemens Healthcare (Erlangen)  
 Bio-Rad (München)  
 Bio-Rad (München)  
 Carl Roth (Karlsruhe)  
 Herolab GmbH Laborgeräte  
 (Wiesloch)  
 Leica (Wetzlar)  
 Tecan Group AG  
 (Männedorf, Schweiz)  
 Tecniplast (Hohenpeißenberg)  
 Liebherr (Ochsenhausen)

Magnetrührer mit Heizplatte, RCT basic	Avantor (Darmstadt)
Microliter-Spritze	Hamilton Company (Reno, Nevada, USA)
Mikroskop DM6000 B (mit Kamera DFC420)	Leica (Wetzlar)
Mikrowelle	Sharp (Hamburg)
Mikrozentrifuge, <i>MiniStar</i>	Avantor (Darmstadt)
<i>Milli-Q Direct</i> -Wasseraufbereitungssystem	Merck (Darmstadt)
<i>Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell</i>	Bio-Rad (München)
<i>Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell</i>	Bio-Rad (München)
Mischplatte Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)
Mörser	Carl Roth (Karlsruhe)
Multipette E3	Eppendorf (Hamburg)
Narkosekammer	neoLab Migge GmbH (Heidelberg)
Paraffinstreckbad	Medax Nagel GmbH & Co. KG (Kiel)
Paraffinstrecktisch HI1220	Leica (Wetzlar)
PCR Thermocycler <i>FlexCycler</i>	Analytik Jena (Jena)
Pinzetten	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe <i>Accurpette</i>	Avantor (Darmstadt)
<i>PowerPac HV Power Supply</i>	Bio-Rad (München)
Präparierbesteck	Vedena (Braak)
Roller 10 digital	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
Roller Mixer SRT9	Cole-Parmer (Stone, Staffordshire, UK)
Rotationsmikrotom RM2135	Leica (Wetzlar)
<i>ScanDrop</i> UV-Spektrophotometer	Analytik Jena (Jena)
<i>Sprout</i> Mini-Zentrifuge	Heathrow Scientific (Vernon Hills, Illinois, USA)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
<i>TissueRuptor</i>	QIAGEN (Hilden)
Ultraschallbad <i>Ultrasonic Cleaner</i>	Avantor (Darmstadt)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, New York, USA)
Vortex-Schüttler	Avantor (Darmstadt)
Waage <i>Acculab Atilon</i>	Waagen-Kissling (Rimbach)

## 2.9 Software

Name	Version	Hersteller
<i>Bio-Plex Manager</i>	6.1	Bio-Rad (München)
<i>ChemoStarTS</i>	0.5.39.1	INTAS Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen)
<i>E.A.S.Y. Win32</i>	5.0	Herolab GmbH Laborgeräte (Wiesloch)
<i>FlashSoft Pro</i>	1.2	Analytik Jena (Jena)
<i>GraphPad Prism</i>	9.0.2	GraphPad Software (San Diego, Kalifornien, USA)
<i>ImageJ 1.45</i>	1.6.0_20	National Institutes of Health (Bethesda, Maryland, USA)
<i>Labimage 1D</i>	4.1	Kapelan Bio-Imaging GmbH (Leipzig)
<i>Leica Application Suite</i>	3.08.2000	Leica (Wetzlar)
<i>Magellan</i>	6.6	Tecan Group AG (Männedorf, Schweiz)
<i>Microsoft 365</i>	2502	Microsoft Corporation (Redmond, Washington, USA)
<i>Microsoft Office Professional Plus 2013</i>	15.0	Microsoft Corporation (Redmond, Washington, USA)
<i>SPSS Statistics</i>	22.0.0.0	IBM (Armonk, New York, USA)

## 3 Methoden

### 3.1 Tierexperimentelle Methoden

#### 3.1.1 Herstellung der *Ybx1*<sup>ΔRosaCre</sup>- und *Ybx1*<sup>RosaCreK2A</sup>-Tiere

Zur Generierung der Mausstämmen wurde das Cre/LoxP-System eingesetzt. Dabei wurde das Zielgen mit LoxP-Erkennungssequenzen flankiert, ein Vorgang, der als „floxed“ bezeichnet wird. Die Cre-Rekombinase katalysierte die Spaltung und Neuverknüpfung der DNA an den LoxP-Sequenzen. Waren die LoxP *sites* in gleicher Orientierung ausgerichtet, führte dies zur Exzision des flankierten Genabschnitts. Bei entgegengesetzter Orientierung wurde der markierte DNA-Abschnitt stattdessen invertiert. [88]

In dieser Arbeit wurde ein Mausstamm mit einem vollständigen KO des *Ybx1*-Gens eingesetzt (Tabelle 2). Zusätzlich wurde erstmals ein Mausstamm mit sekretionsdefizientem YB-1 generiert. Diese Tiere verfügen weiterhin über intrazelluläres YB-1, sind jedoch nicht mehr in der Lage, das Protein zu sekretieren.

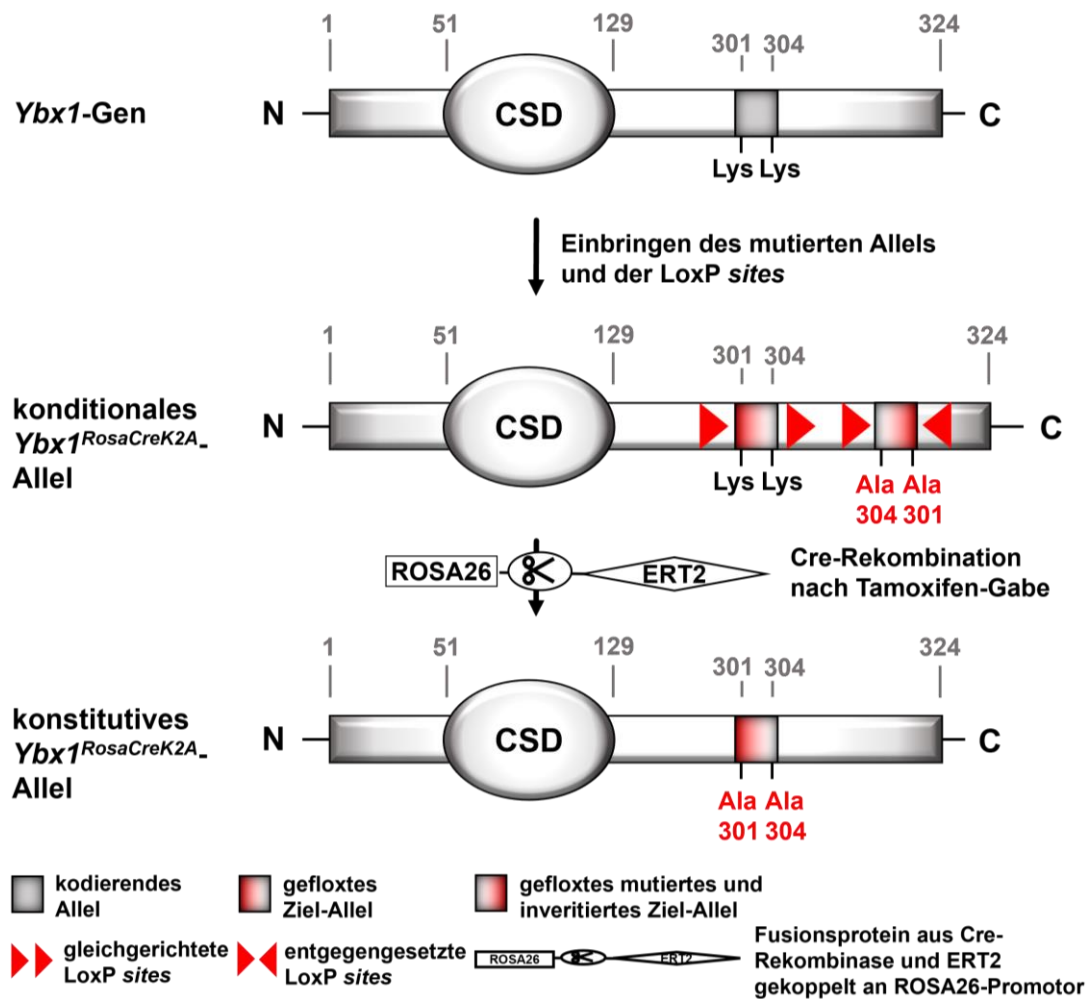
Kompartiment	<i>Ybx1</i> <sup>WT</sup>	<i>Ybx1</i> <sup>ΔRosaCre</sup>	<i>Ybx1</i> <sup>RosaCreK2A</sup>
intrazellulär	ja	nein	ja
extrazellulär	ja	nein	nein

**Tabelle 2: Lokalisation von YB-1 in Zellkompartimenten bei den verschiedenen Mausstämmen.** Die Tabelle fasst die Lokalisation von YB-1 bei den in dieser Arbeit verwendeten Mausstämmen zusammen. In WT(*Ybx1*<sup>WT</sup>)-Tieren ist YB-1 sowohl intra- als auch extrazellulär nachweisbar, während es im *Ybx1*-KO (*Ybx1*<sup>ΔRosaCre</sup>) vollständig fehlt. Im sekretionsdefizienten *Ybx1*-KI-Mausstamm (*Ybx1*<sup>RosaCreK2A</sup>) ist YB-1 weiterhin intrazellulär vorhanden, kann jedoch nicht mehr sekretiert werden kann. Abkürzungen: Knock-in (KI); Knock-out (KO); Wildtyp (WT); *Y-box binding protein-1* (YB-1, *Ybx1*) (eigene Darstellung).

Für den konditionalen *Ybx1*-Ganzkörper-KO wurden *Ybx1*<sup>ΔRosaCre</sup>-Tiere entsprechend der Methode von Bernhardt et al. aus unserer Arbeitsgruppe generiert. [89] Das *Ybx1*-Gen befindet sich auf Chromosom 1 und umfasst 8 Exone. Zur gezielten Deletion wurde Exon 3 durch LoxP *sites* flankiert. Diese Mauslinie wurde als *Ybx1*<sup>flox/flox</sup> bezeichnet, während Tiere ohne flox-Allel als *Ybx1*<sup>wt/wt</sup> klassifiziert wurden. Um einen systemischen KO zu erzielen, wurde in einer zweiten Mauslinie die Cre-Rekombinase an den ubiquitär exprimierten ROSA26-Promotor gekoppelt. [90] Da homozygote *Ybx1*-KO-Tiere embryonal letal sind, wurde ein Tamoxifen-induzierbares konditionales KO-System eingesetzt. [91] Hierfür wurde die Cre-Rekombinase mit einer mutierten Ligandenbindungsdomäne des humanen Östrogenrezeptors T2 (ERT2) fusioniert. [92, 93] Der resultierende Genotyp wurde als WT<sup>RosaERT2Cre</sup> bezeichnet, während Mäuse ohne Cre-Rekombinase als WT<sup>RosaERT2</sup> geführt wurden. Das resultierende Fusionsprotein aus Cre-Rekombinase und ERT2 verbleibt in seiner

inaktiven Form im Zytoplasma, wo es an *heat shock protein 90* (Hsp90) gebunden ist. [94] ERT2 wird von Tamoxifen, einem selektiven Östrogenrezeptormodulator gebunden und aktiviert. Endogenes Östrogen hingegen kann den Rezeptor nicht aktivieren. [95] Durch Kreuzung der  $Ybx1^{flox/flox}$ - mit der  $WT^{RosaERT2Cre}$ -Linie wurde ein  $Ybx1^{\Delta RosaCre}$ -Mausstamm erzeugt, der sowohl für das flox- als auch für das Cre-Allel homozygot ist. Die Induktion des  $Ybx1$ -KOs erfolgte durch Tamoxifen-Gabe. Dieses bzw. der aktive Metabolit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) bindet an ERT2, wodurch das Fusionsprotein aus Cre und ERT2 von Hsp90 freigesetzt wird. Anschließend transloziert der Komplex aus 4-OHT, Cre-Rekombinase und ERT2 in den Zellkern, wo die Cre-Rekombinase Exon 3 des  $Ybx1$ -Gens deletiert. [96] Dies führt zu einer Leserasterverschiebung und damit zu einem vollständigen Funktionsverlust von YB-1. Als Kontrolltiere wurden gekreuzte  $Ybx1^{wt/wt}$ - und  $WT^{RosaERT2Cre}$ -Tiere sowie gekreuzte  $Ybx1^{flox/flox}$ - und  $WT^{RosaERT2}$ -Mäuse verwendet. Diese werden im Folgenden als Wildtypen (WT) bezeichnet.

Für die Generierung des konditionalen sekretionsdefizienten Mausstamm wurde ebenfalls das Cre/LoxP-System genutzt (Abbildung 4). Die Sekretion von YB-1 hängt von der Acetylierung der Lysinreste 301 und 304 ab. Daher wurde ein an diesen Lysinen mutiertes  $Ybx1$ -Allel durch homologe Rekombination in Form eines Knock-ins (KI) hinter das WT-Allel invertiert und mit entgegengesetzten LoxP sites flankiert eingebracht. Die Lysine wurden durch Alaninreste ersetzt. [97] Gleichzeitig wurde das WT-Allel gleichgerichtet gefloxt, um dessen spätere Deletion zu ermöglichen. Der resultierende Genotyp wurde als  $K2A-Ybx1^{flox/flox}$  bezeichnet, während Tiere ohne gefloxt Sequenzen als  $K2A-Ybx1^{wt/wt}$  klassifiziert wurden. Die  $K2A-Ybx1^{flox/flox}$ -Mauslinie wurde anschließend mit der  $WT^{RosaERT2Cre}$ -Linie gekreuzt, wodurch der  $Ybx1^{RosaCreK2A}$ -Mausstamm generiert wurde. Nach der Verabreichung von Tamoxifen wurde die Cre-Rekombinase aktiviert, wodurch das WT-Allel herausgeschnitten und das mutierte Allel in die korrekte Basenabfolge überführt wurde. Die resultierende Inversion führte schließlich zur Aktivierung des mutierten Allels. Da die zur Sekretion von YB-1 erforderlichen Acetylierungsstellen nicht mehr vorhanden sind, kann YB-1 nicht mehr sekretiert werden. Die Tiere weisen somit eine sekretionsdefiziente Variante von YB-1 auf. Als Kontrolltiere wurden hier gekreuzte  $K2A-Ybx1^{wt/wt}$ - und  $WT^{RosaERT2Cre}$ -Mäuse sowie gekreuzte  $K2A-Ybx1^{flox/flox}$ - und  $WT^{RosaERT2}$ -Tiere verwendet. Diese werden ebenso als Wildtypen (WT) bezeichnet.



**Abbildung 4: Generierung des konditionalen *Ybx1<sup>RosaCreK2A</sup>*-Mausstammes.** Zur Herstellung des konditionalen *Ybx1<sup>RosaCreK2A</sup>*-Mausstammes wird durch homologe Rekombination ein an den Lysinen 301 und 304 mutiertes Allel als KI hinter das WT-Allel invertiert eingebracht. Die Lysine 301 und 304 werden durch Punktmutation mit Alanin ersetzt. Das WT-Allel wird mit zwei gleichgerichteten LoxP sites markiert, das mutierte Allel durch zwei entgegengesetzte LoxP-Sequenzen. Nach Tamoxifen-Gabe wird die Cre-Rekombinase aktiviert, die als Fusionsprotein mit ERT2 vorliegt und an den ubiquitär exprimierten ROSA26-Promotor gekoppelt ist. Im Rahmen der Rekombination wird das WT-Allel herausgeschnitten und das mutierte Allel in die regelrechte Basenabfolge überführt. Da die zur Sekretion von YB-1 notwendigen Acetylierungsstellen entfernt wurden, kann YB-1 nicht mehr sekretiert werden. Abkürzungen: Alanin (Ala); C-terminale Domäne (C); *cold shock domain* (CSD); Östrogenrezeptor T2 (ERT2); Knock-in (KI); Lysin (Lys); N-terminale Domäne (N); Wildtyp (WT); *Y-box binding protein-1* (YB-1, *Ybx1*) (eigene Darstellung).

Sowohl *Ybx1<sup>wt/wt</sup>*-, *Ybx1<sup>flox/flox</sup>*-Mäuse als auch *K2A-Ybx1<sup>wt/wt</sup>*- und *K2A-Ybx1<sup>flox/flox</sup>*-Mäuse wiesen einen C57BL/6N-Hintergrund (Taconic) auf. Die *WT<sup>RosaERT2</sup>*- und *WT<sup>RosaERT2Cre</sup>*-Tiere hatten einen C57BL/6J-Hintergrund (Jackson Laboratories).

Zur vereinfachten Darstellung wird der *Ybx1<sup>ΔRosaCre</sup>*-Stamm im weiteren Text als *Ybx1-KO* bezeichnet. Sekretionsdefiziente Tiere des *Ybx1<sup>RosaCreK2A</sup>*-Stammes werden als *Ybx1-KI*-Tiere bezeichnet. In Abbildungen, Tabellen und Überschriften wird die vollständige Nomenklatur verwendet.

### 3.1.2 Tierhaltung

Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. Der Gesundheitsstatus der Tiere entsprach den Richtlinien der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA). Die Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in individuell belüfteten Käfigen gehalten, die mit Weichholzgranulat ausgelegt waren. Den Tieren stand Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Die Haltungsbedingungen umfassten eine Raumtemperatur von 21 bis 22 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 50 % sowie einen Tag-Nacht-Zyklus von 12 h. Die Tierexperimente wurden an Mäusen beider Geschlechter im Alter von 9 bis 17 Wochen durchgeführt. Alle Experimente erfolgten in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und wurden vorab durch das Land Sachsen-Anhalt genehmigt (AZ UniMD 42502-2-1213; 1293).

### 3.1.3 Versuchsablauf

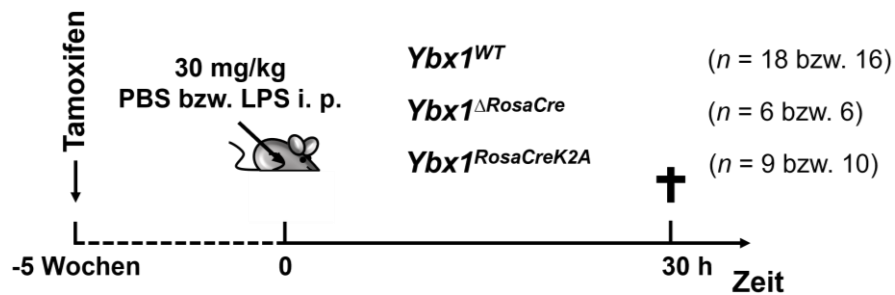
#### **Induktion des *Ybx1*-Knock-outs und des *Ybx1*-Knock-ins durch Tamoxifen-Applikation**

Die Cre-Rekombinase wurde durch Tamoxifen aktiviert. Tamoxifen wurde gemörsert und über Nacht in 20 %igem ClinOleic (2 mg/200 µl) gelöst. Anschließend erfolgte eine intragastrale Applikation von 200 µl der Lösung pro Maus mittels Spritze in Form einer *gavage*.

#### **Induktion des LPS-vermittelten Entzündungsmodells**

Das Experiment wurde etwa 5 Wochen nach Verabreichung von Tamoxifen durchgeführt (Abbildung 5). Den Mäusen wurde LPS in einer gewichtsadaptierten Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht (KG) intraperitoneal (i. p.) verabreicht, was in etwa der mittleren letalen Dosis (LD<sub>50</sub>) entspricht. [98] Für die LPS-Stocklösung wurde LPS von *E. coli* 026:B6 (L8274) in der Konzentration von 3 mg/ml in PBS inkubiert. Zur Aktivierung wurde die Lösung 30 min im Ultraschallbad *Ultrasonic Cleaner* inkubiert. Die Injektion erfolgte mit 10 µl/g KG LPS-Stocklösung, was einer Dosis von 30 mg/kg KG entspricht. Die Kontrolltiere erhielten entsprechend eine Injektion mit PBS. Insgesamt wurde 18 WT-Tieren PBS und 16 WT-Tieren LPS verabreicht. Jeweils 6 *Ybx1*-KO-Tiere erhielten PBS bzw. LPS. In der *Ybx1*-KI-Gruppe wurde 9 Tieren PBS und 10 Tieren LPS injiziert.





**Abbildung 5: Versuchsaufbau des LPS-Toxizitätsmodells.** Für das Experiment erhielten WT( $Ybx1^{WT}$ )-,  $Ybx1$ -KO( $Ybx1^{\Delta RosaCre}$ )- und  $Ybx1$ -KI( $Ybx1^{RosaCreK2A}$ )-Tiere etwa 5 Wochen nach Tamoxifen-Verabreichung eine i. p. Injektion von 30 mg/kg KG PBS bzw. LPS. Nach 30 h wurden die Tiere aufgearbeitet. In Klammern ist die Anzahl der Tiere angegeben, die jeweils PBS bzw. LPS erhielten. Abkürzungen: intraperitoneal (i. p.); Knock-in (KI); Knock-out (KO); Lipopolysaccharide (LPS); phosphate-buffered saline (PBS); Wildtyp (WT); Y-box binding protein-1 ( $Ybx1$ ) (eigene Darstellung).

## Probenaufbereitung

30 h nach der LPS- bzw. PBS-Injektion erfolgte die Aufarbeitung der Tiere. Zur Narkotisierung wurden die Mäuse einzeln in eine mit Isofluran vernebelte Kammer gesetzt und nach Eintritt der Bewusstlosigkeit auf der Arbeitsfläche fixiert. Die Probenentnahme erfolgte zunächst bei den LPS-injizierten Tieren. Nach Eröffnung des Thorax wurde das Herz mit einer mit Natriumcitrat gefüllten Spritze punktiert, um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern. Das Blut wurde vollständig entnommen, um einen sicheren Tod zu erzielen. Der Blutkreislauf wurde anschließend mit 25 ml PBS und Heparin-Natrium gespült, um eine bessere Beurteilung der Organe in der histologischen Untersuchung zu ermöglichen.

Für die spätere Blutbildanalyse wurden vom gewonnenen Blut je 20  $\mu$ l entnommen und in Kapillarblutentnahme GK 150 EDTA-Röhrchen im Verhältnis 1:10 mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Die Blutbildanalyse wurde nach Versuchsende mit Hilfe des *Advia 2120i* Hämatologie-Analyseautomaten in der Klinik für Hämatologie und Onkologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg durchgeführt.

Das verbliebene Vollblut wurde zur Plasmagewinnung bei Raumtemperatur mit 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand, der dem Plasma entsprach, wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Anschließend erfolgte die Entnahme der Nieren, der Lunge, der Leber und der Schwanzspitze. Die Nieren wurden halbiert, Lunge und Leber in jeweils vier Teile zerschnitten. Drei Teile jedes Organs wurden für Protein- und RNA-Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Ein Teil wurde zur späteren histologischen Untersuchung in Biopsie-Einbettkassetten für 24 h in 4 %igem Paraformaldehyd bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden die Gewebeproben im Institut für Pathologie der Universität Magdeburg dehydriert und mithilfe der *HistoCore Arcadia H*-Paraffinausgießstation eingebettet. Die Schwanzspitzen wurden zur

späteren Genotypisierung ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### **Überlebensanalyse und Gesundheitsbewertung**

Die Überlebensanalyse erfolgte in einem separaten Experiment. Hierfür erhielten die Tiere analog zum ersten Experiment eine i. p. Injektion von 30 mg/kg KG LPS. Die Kontrolltiere erhielten eine entsprechende Injektion mit PBS. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 72 h beobachtet. Überlebende Tiere wurden anschließend unter Narkose mit Isofluran durch zervikale Dislokation getötet.

Parallel zur Überlebensanalyse wurde der Gesundheitsstatus der Tiere regelmäßig evaluiert. Hierbei wurde das Verhalten der Tiere auf einer Skala von 0 bis 12 Punkten bewertet. Ein Wert von 12 entsprach einem vollkommen gesunden Zustand, während verstorbene Tiere mit 0 Punkten bewertet wurden. Tiere, die sich weiterhin aktiv verhielten, erhielten Werte zwischen 10 und 12 Punkten. Desinteressiertes Verhalten wurde durch 7 bis 9 Punkte definiert. Ein Wert von 4 bis 6 Punkten wurde bei lethargischem Verhalten vergeben, während teilnahmslose Tiere mit 1 bis 3 Punkten bewertet wurden.

Die Datenverwaltung der Überlebensanalyse und Gesundheitsbewertung erfolgte mithilfe der *Microsoft Excel 2013* Software. Die Erstellung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven und der Graphen des Gesundheitsstatus wurden mit der *GraphPad Prism* Software und die statistische Auswertung mit *SPSS* durchgeführt.

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* [PCR]) diente der gezielten Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen. Als Ausgangsmaterial dienten ein- oder doppelsträngige DNA-Fragmente mit zum Teil bekannten Sequenzen. Die Amplifikation erfolgte mithilfe zweier spezifischer Primer, die an komplementären Sequenzen der DNA banden, sowie einer hitzestabilen Polymerase, die einzelne Nukleosidtriphosphate anfügte. Zunächst wurde die doppelsträngige DNA bei 95 °C denaturiert, wodurch sie in Einzelstränge zerfiel. Nach Abkühlung auf etwa 51 bis 67 °C banden die zugesetzten Primer an ihre komplementären Basensequenzen (*Annealing*). Anschließend erfolgte bei 72 °C die Elongation durch die Polymerase, die von den Primern ausgehend einen komplementären Strang synthetisierte. Dieser Zyklus wurde etwa 30- bis 40-mal wiederholt, bis die gewünschte DNA-Menge erreicht war.

## Genotypisierung

Für die Genotypisierung der Mausstämmen wurden die bei -80 °C gelagerten Schwanzspitzen zunächst lysiert. Dazu wurde ein Lysepuffer aus 100 µl *DirectPCR Lysis Reagent Tail* und 1,25 µl (25 µg) Proteinase K pro Probe angesetzt. Anschließend wurden je 100 µl Lysepuffer auf die Proben gegeben und diese über Nacht bei 55 °C mit 650 rpm im Thermomixer inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Proteinase K durch Erhitzen der Proben auf 96 °C mit 650 rpm für 10 min inaktiviert. Nach Homogenisierung der Proben erfolgte eine Zentrifugation des Lysats bei 4 °C mit 14.000 rpm für 5 min. Der Überstand wurde abgenommen und für die anschließende PCR auf Eis gelagert.

Für jeden Mausstamm wurden drei PCR-Ansätze benötigt. Die Genotypisierung des *Ybx1*-KOs erfolgte mithilfe der *Ybx1*-, der RosaERT2Cre WT- und der RosaERT2Cre-PCR. Zur Genotypisierung des *Ybx1*-KI-Mausstammes wurden die *K2A-Ybx1*-, die RosaERT2Cre WT- und die RosaERT2Cre-PCR genutzt.

Die Primer wurden im Verhältnis 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Jede PCR wurde mit einer Negativkontrolle (Nuklease-freies Wasser) sowie Positivkontrollen (DNA von zuvor sicher identifizierten Mäusen) durchgeführt. Folgende PCR-Ansätze wurden hergestellt:

Reaktionsansatz <i>Ybx1</i> -PCR		Reaktionsansatz <i>K2A-Ybx1</i> -PCR	
Nuklease-freies Wasser	6 µl	Nuklease-freies Wasser	7 µl
Primer 4954_133 (10,0 µM)	1 µl	Primer 5397_43 (10,0 µM)	0,5 µl
Primer 4954_134 (10,0 µM)	1 µl	Primer 5397_44 (10,0 µM)	0,5 µl
<i>DreamTaq Green PCR Master Mix</i>	10 µl	<i>DreamTaq Green PCR Master Mix</i>	10 µl
DNA-Probe	2 µl	DNA-Probe	2 µl

Reaktionsansatz RosaERT2Cre WT-PCR		Reaktionsansatz RosaERT2Cre-PCR	
Nuklease-freies Wasser	8 µl	Nuklease-freies Wasser	8 µl
Primer R26Nhe fw (10,0 µM)	0,5 µl	Primer Cre-1 (10,0 µM)	0,5 µl
Primer R26Nhe rv (10,0 µM)	0,5 µl	Primer Cre-2 (10,0 µM)	0,5 µl
<i>DreamTaq Green PCR Master Mix</i>	10 µl	<i>DreamTaq Green PCR Master Mix</i>	10 µl
DNA-Probe	1 µl	DNA-Probe	1 µl

Die Amplifikation erfolgte in dem PCR Thermocycler *FlexCycler* mit folgenden Programmen:

PCR-Programm <i>Ybx1</i>			PCR-Programm <i>K2A-Ybx1</i>		
95 °C	5 min		95 °C	5 min	
95 °C	30 s	} 35 Zyklen	95 °C	30 s	} 35 Zyklen
60 °C	30 s		60 °C	30 s	
72 °C	1 min		72 °C	1 min	
72 °C	10 min		72 °C	10 min	
4 °C	-		4 °C	-	

PCR-Programm <i>RosaERT2Cre WT</i>			PCR-Programm <i>RosaERT2Cre</i>		
94 °C	5 min		94 °C	5 min	
94 °C	30 s	} 6 Zyklen	94 °C	30 s	} 6 Zyklen
62 °C	30 s		67 °C	30 s	
72 °C	2 min		72 °C	2 min	
94 °C	30 s	} 24 Zyklen	94 °C	30 s	} 28 Zyklen
59 °C	30 s		64 °C	30 s	
72 °C	2 min		72 °C	2 min	
72 °C	7 min		72 °C	7 min	
4 °C	-		4 °C	-	

Die Analyse der amplifizierten DNA-Sequenzen erfolgte durch Gelelektrophorese gemäß Kapitel 3.2.3.

### 3.2.2 RNA-Analyse

Zur RNA-Analyse aus Nierengewebe erfolgte nach RNA-Isolation eine Herstellung von *complementary DNA* (cDNA) aus mRNA und anschließender Amplifikation der cDNA mittels PCR.

#### RNA-Isolation aus Gewebeproben

Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten, sofern nicht anders angegeben, auf Eis. Zunächst wurde das Gewicht der bei -80 °C gelagerten Nierengewebeproben bestimmt. Anschließend wurden pro 100 mg Gewebe 1 ml Trizol hinzugefügt und die Proben mittels *TissueRuptor* homogenisiert. Dem Lysat wurden 200 µl Chloroform zugesetzt, worauf eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur folgte. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C

mit 12.000 rpm für 15 min. Die obere wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde in ein RNase-freies Gefäß überführt und mit eiskaltem Isopropanol im Verhältnis 1:1 versetzt. Zur Präzipitation wurde die RNA über Nacht bei -80 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die gefrorenen Proben bei 4 °C mit 12.000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das RNA-Pellet wurde anschließend zweimal mit 500 µl kaltem, 80 %igem Ethanol bei 4 °C mit 9650 rpm für 5 min gewaschen. Der 80 %ige Ethanol wurde aus Ethanol absolut durch Verdünnung mit Aqua destillata (Aqua dest.) im Verhältnis 8:2 hergestellt. Der Überstand wurde verworfen und das getrocknete Pellet in 11 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Die Proben wurden für mindestens 2 h bei -80 °C gelagert.

Die RNA-Konzentration wurde mit dem *ScanDrop* UV-Spektrophotometer und der *FlashSoft Pro* Software bestimmt.

### Herstellung von cDNA

Die isolierte mRNA wurde mithilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, eine DNA-Variante ohne Introne. Eine Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Die Synthese erfolgte entsprechend dem Protokoll des *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*. Alle Proben und Reagenzien wurden dabei auf Eis gelagert. Zu Beginn wurden 5 µg mRNA aus Nierengewebe mit 1 µl *oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer* versetzt und mit Nuklease-freiem Wasser auf 12 µl ergänzt. Die Lösung wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Anschließend wurde ein Mastermix hergestellt und auf die RNA-Lösung gegeben wurde.

#### Reaktionsansatz Mastermix

<i>5x Reaction Buffer</i>	4 µl
<i>RiboLock RNase Inhibitor (20 u/µl)</i>	1 µl
<i>10 mM dNTP Mix</i>	2 µl
<i>RevertAid Reverse Transkriptase (200 U/µl)</i>	1 µl

Die Synthese erfolgte für 1 h bei 42 °C und wurde durch Erhitzen auf 70 °C für 5 min beendet. Die cDNA wurde anschließend bei -80 °C gelagert oder unmittelbar für die nachfolgende PCR verwendet.

### PCR der cDNA

Zur Amplifikation der cDNA wurde das *GoTaq Flexi DNA Polymerase Kit* verwendet. Als DNA-Polymerase diente hier die *GoTaq Hot Start Polymerase*.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Für jede Probe wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

Reaktionsansatz IL-6-PCR			Reaktionsansatz $\beta$ -Aktin-PCR		
	Konz.	Menge		Konz.	Menge
<i>5x Green GoTaq Flexi Buffer</i>		10 $\mu$ l	<i>5x Green GoTaq Flexi Buffer</i>		10 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2,5 mM	5 $\mu$ l	<i>MgCl<sub>2</sub> 25 mM</i>	2,5 mM	5 $\mu$ l
<i>PCR Nucleotide Mix 10mM</i>		1 $\mu$ l	<i>PCR Nucleotide Mix 10mM</i>		1 $\mu$ l
Primer IL-6 fv	0,5 $\mu$ M	0,25 $\mu$ l	Primer $\beta$ -Aktin fw	0,5 $\mu$ M	0,25 $\mu$ l
Primer IL-6 rv	0,5 $\mu$ M	0,25 $\mu$ l	Primer $\beta$ -Aktin rv	0,5 $\mu$ M	0,25 $\mu$ l
<i>GoTaq Hot Start Polymerase 5 u/<math>\mu</math>l</i>	1,25 u	0,25 $\mu$ l	<i>GoTaq Hot Start Polymerase 5 u/<math>\mu</math>l</i>	1,25 u	0,25 $\mu$ l
cDNA-Probe		0,1 $\mu$ g	cDNA-Probe		0,1 $\mu$ g

Um eine cDNA-Menge von 0,1  $\mu$ g zu erhalten, wurden aus der gewonnenen cDNA aus Nierengewebe jeweils 0,4  $\mu$ l verwendet. Folgende PCR-Programme schlossen sich an:

PCR-Programm IL-6			PCR-Programm $\beta$ -Aktin		
95 °C	4 min		95 °C	4 min	
95 °C	45 s	} 35 Zyklen	95 °C	45 s	} 30 Zyklen
51 °C	45 s		55 °C	45 s	
72 °C	1 min		72 °C	1 min	
72 °C	5 min		72 °C	5 min	
4 °C	-		4 °C	-	

Die Analyse der amplifizierten cDNA erfolgte mittels Gelelektrophorese nach dem Protokoll unter Abschnitt 3.2.3. Die Quantifizierung wurde mit der *Labimage 1D* Software durchgeführt.

### 3.2.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung der DNA nach ihrer Größe durchgeführt. Anhand eines Markers konnte die Größe der mittels PCR amplifizierten Genabschnitte bestimmt werden. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden 2 %ige Agarose-Gele für DNA-Fragmente bis 300 bp und 1 %ige Agarose-Gele für größere Fragmente verwendet. Die Agarose-Gele wurden unmittelbar vor ihrer Benutzung frisch hergestellt. Pro Gel wurde die entsprechende Menge Agarose in 100 ml TBE-Puffer (1x) gelöst. Dazu wurde TBE-Puffer (10x) im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Die Agarose-Lösung wurde für 2,5 min

in der Mikrowelle bei 800 W erhitzt und anschließend durch Schwenken homogenisiert, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Zur Sichtbarmachung der DNA im Gel wurden 2 µl Stain G/100 ml Lösung hinzugegeben. Nach einer 5-minütigen Abkühlung wurde die Lösung in eine Gelkammer mit eingesetzten Kämme gegossen, auf waagrechten Stand überprüft und 30 min zum Härten stehengelassen. Danach wurde das Gel in die Elektrophorese-Sub-Cell GT eingelegt und die Kammer mit TBE-Puffer (1x) aufgefüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war. Nach Entfernen der Kämme und Spülen der Taschen mit TBE-Puffer (1x) wurden jeweils 15 µl PCR-Produkt in die Taschen pipettiert. Der Mastermix bzw. *Flexi Buffer* enthielt bereits einen Ladepuffer, sodass die Proben direkt aufgetragen werden konnten. Als Marker wurden 5 µl *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* verwendet. Die Elektrophorese-Sub-Cell GT wurde anschließend 1 h lang bei 100 V durchgeführt. Danach erfolgte die Entwicklung der Gele mit dem Gel-Dokumentations-System E.A.S.Y. unter Nutzung der *E.A.S.Y. Win32* Software.

### 3.3 Proteinanalytik

Die Proteinanalytik diente dem Nachweis spezifischer Proteine. Hierzu erfolgte zunächst eine Isolation von Proteinlysaten aus Nieren-, Lungen- und Lebergewebe. Nach einer Konzentrationsbestimmung wurden die Proteine mittels Western Blots sichtbar gemacht.

#### 3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Gewebe

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis, sofern nicht anders angegeben. Zur Proteinextraktion wurden die gefrorenen Gewebeproben in 400 µl RIPA-Lysepuffer resuspendiert. Zuvor wurden jeweils 1 Tablette des Protease-Inhibitors *cOmplete Mini* und des Phosphatase-Inhibitors *PhosSTOP* in 10 ml RIPA-Lysepuffer gelöst. Anschließend erfolgten eine Homogenisierung mittels *TissueRuptor* und eine Inkubation der Lösung für 30 min. Das Lysat wurde danach für 30 min bei 4 °C mit 15.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt, das Pellet verworfen. Die gewonnenen Proteinlysate wurden bei -80 °C gelagert.

Die Proteinmenge wurde mit dem *DC Protein Assay Kit II* quantifiziert. Eine Standardreihe wurde aus der *Protein Standard II (BSA)-Stammlösung* und Aqua bidestillata (Aqua bidest.) wie folgt hergestellt:

Konzentration [mg/ml]	<i>Protein Standard II (BSA)- Stammlösung [10 mg/ml]</i>	Aqua bidest.
0,00	-	500,0 µl
0,10	5,0 µl	495,0 µl
0,25	12,5 µl	487,5 µl
0,50	25,0 µl	475,0 µl
1,00	50,0 µl	450,0 µl
1,50	75,0 µl	425,0 µl
2,00	100,0 µl	400,0 µl
3,00	150,0 µl	350,0 µl

Die Lysate wurden im Verhältnis 1:10 mit RIPA-Lysepuffer verdünnt. Insgesamt wurde je Probe aus 10 µl Lysat und 90 µl RIPA-Lysepuffer ein Gesamtvolumen von 100 µl hergestellt. Mit *Reagenz S* und *Reagenz A* aus dem *DC Protein Assay Kit II* wurde bei Raumtemperatur im Verhältnis 1:50 ein Mix hergestellt. Jeweils 5 µl der verdünnten Probe bzw. Standardlösung wurden auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Es erfolgte stets eine Doppelbestimmung. Nachfolgend wurden 25 µl des Mixes in jedes Well hinzugegeben. Unter Lichtausschluss wurden 200 µl des *Reagenz B* pro Well pipettiert und Luftblasen entfernt. Nach einer Inkubation von 15 min im Dunkeln erfolgte die Messung der Proteinkonzentration mithilfe des *Infinite 200 Multimode-Platten-Readers*. Die Messung erfolgte bei 750 nm mit der *Magellan* Software. Die Standardreihe lieferte eine Standardkurve. Die Proteinkonzentration der Gewebeproben wurde durch Vergleich mit dieser ermittelt. Die Proben wurden nun im Verhältnis 1:5 mit *Sample Buffer* (5x) und entsprechend der errechneten Proteinkonzentration mit RIPA-Lysepuffer auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl in Leberlysaten bzw. 1,5 µg/µl in Nieren- und Lungenlysaten verdünnt. Nach Erhitzen auf 95 °C mit 650 rpm für 5 min wurden die Proben kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt.

### 3.3.2 Western Blot

Der Western Blot ermöglichte den spezifischen Nachweis von Proteinen. Hierbei wurde das Proteingemisch zunächst mittels *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) im elektrischen Feld aufgetrennt. Dabei wanderten die Proteine entsprechend ihrer Größe und Ladung im Polyacrylamidgel unterschiedlich weit. Im anschließenden Blotting-Verfahren wurden die Proteine im elektrischen Feld auf eine Membran übertragen und dort mittels Immundetektion durch Antikörper sichtbar gemacht.



## Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde mit dem *Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell System* durchgeführt. Zunächst wurden 10 %ige Polyacrylamidgele mit einer Stärke von 1,0 mm hergestellt. Die folgenden Chemikalien wurden entsprechend der angegebenen Menge und Reihenfolge für ein 10 %iges Trenngel gemischt. Die Lösung wurde mittels Einweg-Pasteurpipette zwischen zwei Glasplatten gegossen, die in einer Halterung mit definiertem Abstand eingespannt waren. Zur Vermeidung von Blasenbildung wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 min war das Gel vollständig polymerisiert und das Isopropanol wurde vorsichtig entfernt. Für das Sammelgel wurden nachfolgend genannte Reagenzien gemischt. Die Lösung wurde auf das Trenngel gegossen und ein Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Das Sammelgel härtete nach 20 min aus. Die Gele konnten nun verwendet oder feucht verschlossen für kurze Zeit bei 4 °C gelagert werden.

Trenngel		Sammelgel	
Anzahl der Gele	2	Anzahl der Gele	2
Konzentration	10 %		
H <sub>2</sub> O	4 ml	H <sub>2</sub> O	2,4 ml
<i>Resolving Buffer</i>	2,5 ml	<i>Stacking Buffer</i>	1,0 ml
SDS 10%	100 µl	SDS 10%	40 µl
Acrylamid/Bis-Lösung 30%	3,4 ml	Acrylamid/Bis-Lösung 30%	520 µl
APS 10%	100 µl	APS 10%	50 µl
TEMED	10 µl	TEMED	5 µl

Die Gele wurden in eine mit *Running Buffer* (1x) gefüllte *Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell* eingesetzt. Der *Running Buffer* (10x) wurde im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Die Kämme wurden entfernt und die Taschen mit *Running Buffer* (1x) gespült. Anschließend wurden 20 µl der Probe (entsprechend 20 bzw. 30 µg Protein) mit einer Microliter-Spritze in jede Tasche pipettiert. Als Marker wurde 5 µl des *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* verwendet. Leere Taschen wurden mit *Sample Buffer* (5x) befüllt. Die Proben wurden für 20 min bei 80 V im Sammelgel aufgetrennt. Anschließend wurde die Spannung für 1 h auf 120 V erhöht.

## Blotting

Die aufgetrennten Proteinbanden wurden auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, ein Vorgang, der als *blotting* bezeichnet wird. Die Membranen wurden zuerst für 1 min in Aqua dest. aktiviert und dann für 5 min in Transferpuffer eingeweicht. Schaumkissen und

Blottingpapier wurden ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Nach dem Lösen des Gels aus den Glasplatten wurde das SDS für 5 min in Transferpuffer ausgewaschen. Gel und Membran wurden übereinandergelegt und mit jeweils zwei Blottingpapieren sowie einem Schaumkissen in die *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* eingespannt. Die Kammer wurde mit 4 °C kaltem Transferpuffer gefüllt. Zum Schutz vor Wärmeentwicklung wurde ein Eisakku innerhalb der Kammer und Eis außerhalb der Kammer verwendet. Das Blotting erfolgte für 1,5 h bei 100 V und maximal 200 mA.

### **Immundetektion**

Nach dem Transfer wurden die Membranen dreimal für 5 min in TBST gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur in einer Blockierungslösung. Anschließend folgten drei 5-minütige Waschschrte in TBST. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal für 5 min in TBST gewaschen und danach mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei 5-minütige Waschschrte in TBST und ein 5-minütiger Waschschrte in TBS. Zur Entwicklung wurde das *Pierce ECL Western Blotting Substrate* verwendet. Die Membranen wurden mit 1 ml einer Mischung aus *Detection Reagent 1* und *Detection Reagent 2* im Verhältnis 1:1 für 1 min im Dunkeln inkubiert. Die Antikörperbindung wurde mithilfe des *Advanced Fluorescence Imagers* und der *ChemoStarTS* Software sichtbar gemacht, indem Fotografien in regelmäßigen Zeitabständen zwischen 30 s und 5 min aufgenommen wurden.

Die Blots wurden zur langfristigen Lagerung getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Quantifizierung erfolgte mit der *Labimage 1D* Software.

## **3.4 Histologische Methoden**

### **3.4.1 Herstellung von Gewebeschnitten**

Gewebeschnitte wurden aus zuvor angefertigten Paraffingewebeblöcken mithilfe des Rotationsmikrotoms RM2135 hergestellt. Die Blöcke wurden über Nacht bei -20 °C gelagert. Die Schnittdicke betrug 3 µm. Zur Entfaltung wurden die Schnitte mit einem Pinsel auf ein 37 °C warmes Paraffinstreckbad gelegt und anschließend auf einen SuperFrost Plus Objektträger gezogen. Zur Trocknung wurden die Objektträger auf dem Paraffinstrecktisch HI1220 bei 65 °C über Nacht gelagert.

Zur anschließenden Färbung wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert und rehydriert. Die Objektträger wurden je nach Färbung in Küvetten mit den folgenden Reagenzien inkubiert.

80 %iger Ethanol wurde aus Ethanol absolut durch Verdünnung mit Aqua dest. im Verhältnis 8:2 hergestellt.

<b>Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung</b>		<b>Immunhistochemische Färbung</b>	
ProTaq Clear	2 x 5 min	ProTaq Clear	2 x 5 min
Ethanol absolut	2 x 5 min	Ethanol absolut	2 x 5 min
Ethanol 96 %	2 x 5 min	Ethanol 96 %	1 x 5 min
Ethanol 80 %	1 x 5 min	Ethanol 80 %	1 x 5 min
Ethanol 70 %	1 x 5 min	Ethanol 70 %	1 x 5 min
Aqua dest.	2 x 5 min	Aqua dest.	3 x 5 min

### 3.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung ist ein Standardverfahren, mit dem verschiedene Gewebestrukturen dargestellt werden. Hämatoxylin ist ein basischer Farbstoff, der saure (basophile) Strukturen, wie Zellkerne und das raue endoplasmatische Retikulum, blau färbt. Eosin ist ein saurer Farbstoff, der basische (eosinophile) Strukturen, wie Proteine des Zytoplasmas und Mitochondrien, rot färbt.

Nach dem Entparaffinieren und Rehydrieren wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten für 10 min in Hämalau-Lösung inkubiert, welche zuvor mit einem Faltenfilter filtriert wurde. Nach kurzem Spülen mit Aqua dest. wurden die Proben für 15 min unter fließendem, lauwarmem Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden sie mit Aqua dest. gespült und für 5 min in Eosin G-Lösung inkubiert, wobei 1 Tropfen Essigsäure auf 100 ml Eosin G-Lösung hinzugefügt wurde. Abschließend wurde mit Aqua dest. gespült.

### 3.4.3 Immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemie ermöglicht die Darstellung spezifischer Proteine durch markierte Antikörper. Das Prinzip beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der der primäre Antikörper an das zu detektierende Epitop bindet. Daran bindet ein sekundärer Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist. Das Enzym setzt einen Farbstoff um, der unter dem Durchlichtmikroskop sichtbar gemacht werden kann.

Nach dem Entparaffinieren und Rehydrieren wurden die Schnitte für 5 min in Citratpuffer in der Mikrowelle bei 800 W erhitzt und dann für etwa 10 min auf Eis gelagert. Nach einem 5-minütigen Waschschriff in Aqua dest. wurden die Schnitte zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase für 15 min in einer 3 %igen  $H_2O_2$ -Lösung inkubiert, die im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt wurde. Nach jeweils 5-minütigem Waschen in Aqua dest. und PBST erfolgte

eine Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation in einer Blockierungslösung (20 % FCS in PBST) für 1 h bei Raumtemperatur. Der primäre Antikörper wurde in 1 % FCS in PBST verdünnt. Nach einem 5-minütigen Waschschrift in PBST wurden die Objektträger mit einem fusselfreien Tuch leicht getrocknet. Um das Überlaufen von Substanzen in benachbarte Bereiche zu verhindern, wurden die Gewebeschnitte mit einem Dako Pen Fettstift umkreist. Es wurden jeweils 70 µl der Antikörper-Lösung auf die Schnitte pipettiert. Bei allen Proben wurden Negativkontrollen durch Hinzugeben von PBST mit 1 % FCS mitgeführt. Die Schnitte wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und danach dreimal für 5 min in PBST gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde in PBST verdünnt und die Schnitte anschließend für 1 h bei Raumtemperatur damit inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit PBS (1x) erfolgte bei *horseradish peroxidase*(HRP)-konjugierten Antikörpern die Farbentwicklung nach den Anweisungen des Herstellers mittels des *Liquid DAB+ Substrate Chromogen Systems*. Hierbei diente Diaminobenzidin (DAB) als Substrat der Peroxidase. Auf 1 ml *DAB+ Substrate Buffer* wurde 1 Tropfen *DAB+ Chromogen* gegeben. Je Gewebeschnitt wurden 70 µl des DAB-Substrats hinzugegeben und die Objektträger für 30 min inkubiert. Die Färbung wurde durch zwei 5-minütige Waschschriffe in Aqua dest. beendet. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte für 45 s in Hämalaun-Lösung gegeben und anschließend für ca. 3 min unter fließendem, lauwarmem Leitungswasser gebläut. Abschließend folgten zwei 5-minütige Waschschriffe in Aqua dest.

Nach Beendigung der Färbungen wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert:

HE-Färbung		Immunhistochemische Färbung	
Ethanol 70%	1 x 2 min	Ethanol 70%	1 x 2 min
Ethanol 80%	1 x 2 min	Ethanol 80%	1 x 2 min
Ethanol 96%	1 x 2 min	Ethanol 96%	1 x 2 min
Ethanol absolut	1 x 2 min	Ethanol absolut	2 x 2 min
ProTaq Clear	2 x 2 min	ProTaq Clear	2 x 2 min

Zum Eindecken der Schnitte wurde ein Tropfen Roti-Histokitt II auf die Objektträger gegeben und diese mit einem Deckglas abgedeckt. Die Aushärtung der Schnitte erfolgte über Nacht. Anschließend wurden die Objektträger bei Raumtemperatur in Objektträgerkästen gelagert.

### 3.4.4 Bilderfassung und Auswertung

Die Bilderfassung der Präparate erfolgte mit dem Mikroskop DM6000 B und der *Leica Application Suite* Software.

Die HE-Färbung wurde angewandt, um allgemeine Gewebeschäden zu beurteilen, wobei der Fokus auf Nieren- und Lungenschäden lag. Der Nierenschaden wurde im Bereich des renalen Kortex bewertet. Zur Schadensbewertung wurden folgende Kriterien herangezogen: [99]

- dilatierte Tubuluslumina
- Tubulusnekrosen mit abgeflachten, vakuolisierten Epithelien
- interstitielles Ödem mit infiltrierenden Immunzellen

Lungenschäden wurden im gesamten Gewebe beurteilt. Als Schadenskriterien galten: [100, 101]

- fibrinreiches interstitielles Lungenödem
- Atelektasen mit verminderter Anzahl an Alveolen
- Verbreiterung der Alveolarmembranen
- alveoläre Infiltration von Entzündungszellen

Mithilfe der immunhistochemischen Färbung wurden Fibrinogenablagerungen in den Organen untersucht. Für die Färbung wurde der Fibrinogen  $\gamma$  (C20)-Antikörper verwendet.

Es wurden jeweils repräsentative Bildausschnitte ausgewählt.

### 3.5 Zytokin-Assays

Mithilfe des Zytokin-Assays war eine gleichzeitige Bestimmung mehrerer Zytokinexpressionslevel in einer Probe möglich. Das Prinzip des Verfahrens beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Die zu detektierenden Zytokine wurden von spezifischen Antikörpern gebunden und durch weitere Nachweisreaktionen sichtbar gemacht.

Die Zytokinanalyse des Plasmas wurde mithilfe des *Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array* Kits durchgeführt. Dieses basiert auf dem Prinzip eines membranbasierten Sandwich-Immunoassays. Zytokine wurden von Antikörpern, die auf Nitrocellulose-Membranen fixiert waren, gebunden. Durch biotinylierte Antikörper wurden diese markiert und mittels Streptavidin-HRP und Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben nach folgendem Protokoll. Zur Vorbereitung wurden alle Reagenzien bei Raumtemperatur gelagert, die Plasmaproben auf Eis. Alle Arbeitsschritte erfolgten zur Verhinderung von Kontamination mit einer Atemschutzmaske. Zu Beginn wurden die Schutzfolien der Membranen mithilfe einer Pinzette entfernt. Die anschließende Behandlung der Membranen erfolgte mit Handschuhen und Pinzette. Zunächst wurde der *Cytokine Detection Antibody Cocktail* in 200  $\mu$ l Aqua dest. gegeben. *Array Buffer 4* und *Wash Buffer* wurden bis zur vollständigen Lösung des Bodensatzes geschüttelt. Zur Herstellung

von 1x *Array Buffer 4/6* erfolgte die Mischung von 4 ml *Array Buffer 4* mit 8 ml *Array Buffer 6*. Zum Erhalt von 1x *Wash Buffer* wurden 40 ml des *Wash Buffers* in 960 ml Aqua dest. gegeben. Für jede Membran wurde 1 ml von *Chemi Reagent Mix* benötigt. Hierzu erfolgte die Mischung von *Chemi Reagent 1* und 2 in gleichen Volumina. Der Mix wurde anschließend dunkel gelagert. Unmittelbar vor Verwendung erfolgte eine Verdünnung von *Streptavidin-HRP* in *Array Buffer 6* nach Herstellerangaben. Zur Durchführung des Arrays wurden 2 ml *Array Buffer 6* in jede Vertiefung der *4-Well Multi-dish* pipettiert. *Array Buffer 6* diente hierbei als Blocksubstanz. Jede Membran wurde in ein separates Well gegeben, wobei die Nummern der Membranen nach oben zeigten. Zur Blockierung erfolgte eine einstündige Inkubation auf einer Mischplatte. Zur Vorbereitung der Proben wurde zu je 200 µl Plasma-Probe 0,5 ml *Array Buffer 4* gegeben und mit *Array Buffer 6* auf 1,5 ml aufgefüllt. Nach der Inkubation wurde *Array Buffer 6* aus den Wells entfernt und die Proben in die Vertiefungen gegeben. Die *4-Well Multi-dish* wurde anschließend mit einem Deckel verschlossen und bei 2 bis 8 °C über Nacht auf einer Mischplatte inkubiert. Danach wurden die Membranen in separate Gefäße mit je 20 ml 1x *Wash Buffer* gegeben und für 10 min auf einer Mischplatte gewaschen. Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Die Platte wurde anschließend mit Aqua dest. gespült und getrocknet. Für jede Membran erfolgte die Zugabe von 30 µl *Detection Antibody Cocktail* zu 1,5 ml 1x *Array Buffer 4/6*. 1,5 ml des verdünnten *Detection Antibody Cocktail* wurde hieraufhin in jedes Well der *4-Well Multi-dish* pipettiert. Die Membranen wurden anschließend aus der Waschlösung in die Wells zurückgelegt und die Platte mit dem Deckel verschlossen. Eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur auf der Mischplatte schloss sich an. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift. 2 ml 1x *Streptavidin-HRP* wurden anschließend in jedes Well pipettiert. Die Membranen wurden wieder in die *4-Well Multi-dish* zurückgelegt und die Platte verschlossen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur auf der Mischplatte. Anschließend wurde jede Membran wie zuvor dreimal gewaschen. Die Membranen wurden anschließend auf einem Tuch vorsichtig abgetropft und auf die untere Seite eines ca. 10 x 12 cm zurechtgeschnittenen Folienbeutels gelegt. Dieser wies drei offene und eine geschlossene Seite auf. Die Nummern der Membranen zeigten hierbei wieder nach oben. Anschließend wurde 1 ml des vorbereiteten *Chemi Reagent Mix* auf jede Membran getropft. Die Folie wurde geschlossen und alle Luftblasen ausgestrichen. Es folgte eine Inkubation für eine Minute. Nachdem überschüssige Flüssigkeit an den Rändern der Folie vorsichtig mit Papiertüchern entfernt wurde, erfolgte die Entwicklung der Membranen im *Advanced Fluorescence Imager* mithilfe der *ChemoStarTS* Software. Hierzu wurden Fotografien in regelmäßigen Zeitabständen zwischen 30 s und 5 min aufgenommen. Positive Signale konnten durch Platzieren eines *transparency overlay templates* auf dem Bild identifiziert werden. Die Referenzpaare wurden hierzu an die drei Ecken jedes Arrays ausgerichtet, wobei

die Nummern auf der linken Seite platziert waren. Die anschließende Auswertung erfolgte mithilfe des *Dot Blot Analyzer* der *ImageJ 1.45* Software.

Die Zytokinanalyse im Nierengewebe wurde mit dem *Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23-plex* Assay durchgeführt. Dieser Assay basiert auf *magnetic beads*. Hierbei wurde die Probe auf farbkodierte *beads* gegeben, die mit spezifischen Antikörpern besetzt waren. Die Zytokine banden an die entsprechenden Antikörper. Über biotinylierte Antikörper erfolgte eine Chemilumineszenz-Reaktion, bei der Phycoerythrin(PE)-konjugiertes Streptavidin band. Der *Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23-plex* Assay wurde nach Herstellerangaben wie folgt durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden *assay buffer*, *wash buffer* und *sample diluent* bei Raumtemperatur gelagert, alle anderen Reagenzien sowie die Proteinlysate auf Eis. Anschließend wurden die Proben mit 0,5 % BSA in *Bio-Plex sample diluent* im Verhältnis 1:2 auf eine Konzentration von 200 bis 900 µg/ml Protein verdünnt. Zur Herstellung von *1x wash buffer* erfolgte eine Verdünnung von 60 ml *10x wash buffer* im Verhältnis 1:10 mit 540 ml Aqua dest. Standardlösungen von 500 µl wurden aus *standard diluent* hergestellt, für 5 s mit dem Schüttler homogenisiert und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Herstellung der Standardreihe nach Angabe des Herstellers. Als nächstes wurden 575 µl *10x beads* für 30 s mit dem Schüttler homogenisiert, mit 5175 µl *assay buffer* auf eine 1x-Lösung verdünnt und anschließend dunkel gelagert. Zur Durchführung des Assays wurde die verdünnte *beads*-Lösung erneut für 10 bis 20 s mit dem Schüttler homogenisiert und dann je 50 µl in jedes Well der assay Platte pipettiert. Es folgten zwei Waschschrte mit je 100 µl *wash buffer*. Die Proben und Standards wurden anschließend mit dem Schüttler homogenisiert und je 50 µl in jedes Well gegeben. Nach Verschließen der Platte erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur mit 850 rpm für 30 min. 300 µl *10x detection antibodies* wurden anschließend für 5 s mit dem Schüttler homogenisiert und mit 2700 µl *detection antibodies diluent* im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Platte wurde nach der Inkubation dreimal mit 100 µl *wash buffer* gewaschen. Nach erneuter Homogenisierung der verdünnten *detection antibodies* mit dem Schüttler wurden je 25 µl der Lösung in jedes Well aufgetragen. Nach Abdichtung der Platte erfolgte eine nochmalige Inkubation bei Raumtemperatur mit 850 rpm für 30 min. Das *100x SA-PE* wurde anschließend für 5 s mit dem Schüttler homogenisiert. Zur Herstellung einer 1x-Verdünnung erfolgte die Mischung von 60 µl *100x SA-PE* und 5940 µl *assay buffer*. Die Lösung wurde anschließend dunkel gelagert. Nach Inkubation der Platte folgte erneut ein dreimaliger Waschschrte mit je 100 µl *wash buffer*. Anschließend wurde je 50 µl der verdünnten *SA-PE*-Lösung in jedes Well pipettiert. Es folgte eine Inkubation der Platte bei Raumtemperatur mit 850 rpm für 10 min. Ein dreimaliger Waschschrte mit je 100 µl *wash buffer* schloss sich an. Die *beads* wurden daraufhin in 125 µl *assay buffer* suspendiert und die Platte für 30 s mit 850 rpm inkubiert.

Anschließend erfolgte die Messung mit dem *Bio-Plex 200 array reader* und der *Bio-Plex Manager* Software.

### **3.6 Statistische Auswertung**

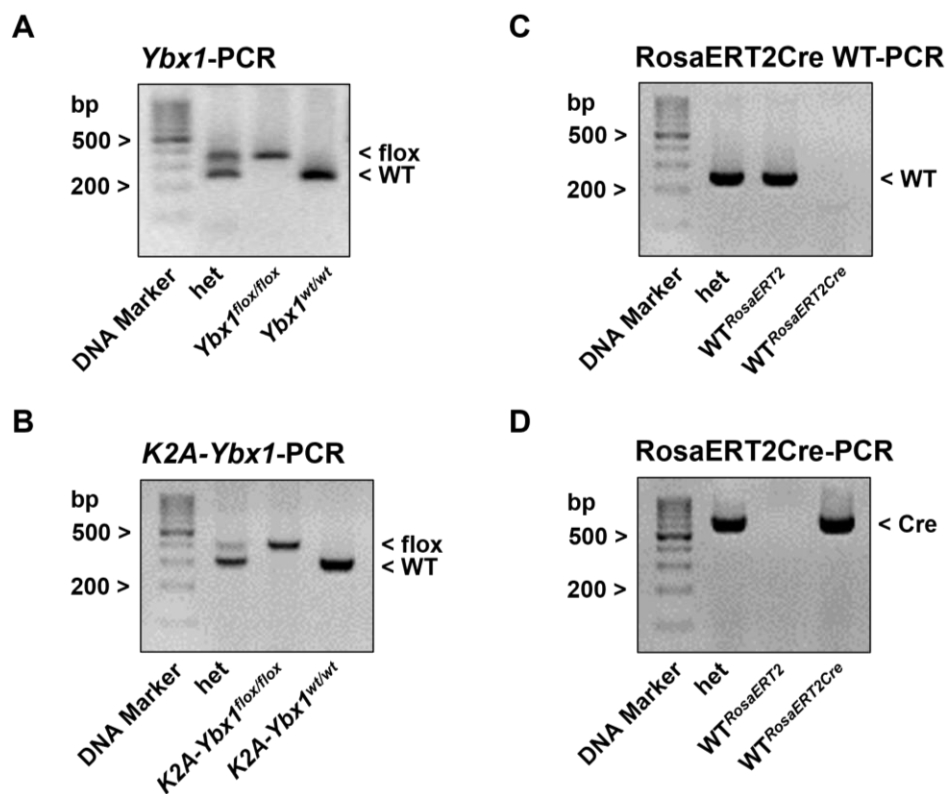
Alle Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. Die Datenverwaltung erfolgte mit *Microsoft Excel 2013*, die statistische Auswertung wurde unter Verwendung der *GraphPad Prism* Software sowie *SPSS Statistics* durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwerte angegeben. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (*analysis of variance* [ANOVA]) mit anschließendem Šidák Post-hoc-Test durchgeführt. Für die Auswertung des Gesundheitsstatus wurde eine zweifaktorielle ANOVA gefolgt von Tukey's Post-hoc-Test angewendet. Die Überlebenskurven wurden mithilfe des Log-Rank-Tests analysiert. Alle  $p$ -Werte mit  $p < .05$  (\*),  $p < .01$  (\*\*), und  $p < .001$  (\*\*\*) wurden als statistisch signifikant betrachtet.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Generierung von *Ybx1*<sup>ΔRosaCre</sup>- und *Ybx1*<sup>RosaCreK2A</sup>-Tieren

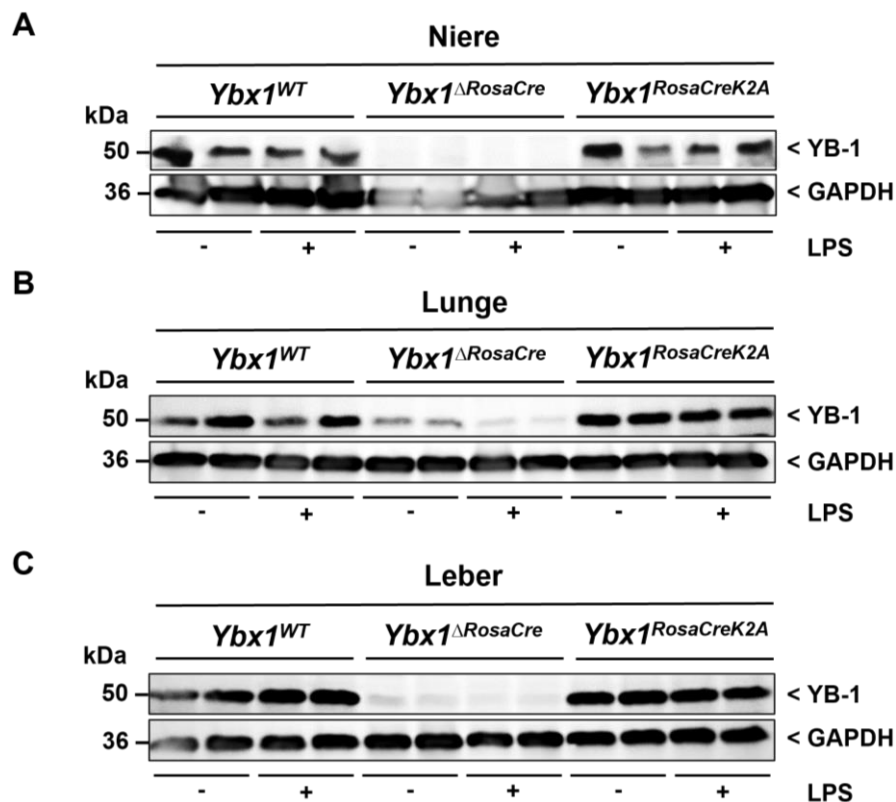
Um die Beteiligung des Kälteschockproteins YB-1 an den toxischen Effekten von LPS aufzuklären, wurden sowohl ein Ganzkörper-*Ybx1*-KO- als auch ein für YB-1 sekretionsdefizienter Mausstamm eingesetzt. Für den konditionalen Ganzkörper-*Ybx1*-KO wurde ein *Ybx1*<sup>ΔRosaCre</sup>-Stamm verwendet. Hierfür wurden für das *Ybx1*-Gen gefloxt Tiere (*Ybx1*<sup>flox/flox</sup>) mit einer WT<sup>RosaERT2Cre</sup>-Linie gekreuzt. [89] Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig ein für YB-1 sekretionsdefizienter Mausstamm generiert. Hierzu wurde ein konditionaler *Ybx1*<sup>RosaCreK2A</sup>-Stamm hergestellt, indem eine *K2A-Ybx1*<sup>flox/flox</sup>-Linie mit der WT<sup>RosaERT2Cre</sup>-Linie verpaart wurde. Vor Induktion der Rekombinase durch Tamoxifen erfolgte eine Genotypisierung der Mausstämme mittels PCR, um das Vorhandensein der geflochten Sequenzen und der Cre-Allele zu bestätigen (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Genotypisierung der *Ybx1*<sup>ΔRosaCre</sup>- und *Ybx1*<sup>RosaCreK2A</sup>-Tiere.** Die Abbildung zeigt die erwarteten PCR-Produkte für WT (*Ybx1*<sup>WT</sup>), *Ybx1*-KO (*Ybx1*<sup>ΔRosaCre</sup>) und *Ybx1*-KI (*Ybx1*<sup>RosaCreK2A</sup>). **(A)** Die *Ybx1*-flox-Bande korrespondiert zu 351 bp, die *Ybx1*-WT-Bande zu 240 bp. **(B)** Die *K2A-Ybx1*-flox-Bande stellt sich bei 444 bp dar, die *K2A-Ybx1*-WT-Bande bei 326 bp. Somit ergibt sich ein homozygoter WT-Stamm bei Vorliegen einer WT-Bande, ein homozygoter *Ybx1*-KO bzw. -KI bei Darstellung einer flox-Bande und eine Heterozygotie bei gleichzeitigem Bestehen eines flox- und eines WT-Allels. **(C)** Die erwarteten Produkte der RosaERT2Cre WT-PCR zeigen für das WT-Allel eine Bande bei 270 bp. **(D)** Für die RosaERT2Cre-PCR liegt die zu erwartende Bande bei 750 bp. Das Vorliegen eines homo- oder heterozygoten Genotyps für das Cre-Allel ergibt sich aus der Zusammenschau der beiden PCRs. Abkürzungen: Östrogenrezeptor T2 (ERT2); heterozygot (het); Knock-in (KI); Knock-out (KO); Wildtyp (WT); Y-box binding protein-1 (*Ybx1*) (eigene Darstellung).

## 4.2 Induktion des *Ybx1*-Knock-outs durch Tamoxifen

Die Verabreichung von Tamoxifen erfolgte, um den KO in den *Ybx1*<sup>ΔRosaCre</sup>-Tieren zu induzieren. Dieses führte zur Aktivierung des Cre-Enzyms, wodurch die Rekombination der geflochtenen Sequenzen eingeleitet wurde. Um den Erfolg des KOs zu bestätigen, wurde in allen Mausstämmen mittels Western Blot ein Proteinnachweis in Nieren-, Lungen- und Lebergewebe durchgeführt (Abbildung 7). Die Analyse ergab, dass in den *Ybx1*-KO-Tieren kein YB-1 exprimiert wurde. Im Gegensatz dazu wiesen WT- und *Ybx1*-KI-Tiere YB-1 in den untersuchten Organen auf.



**Abbildung 7: Induktion des *Ybx1*-Knock-outs durch Tamoxifengabe bei *Ybx1*<sup>ΔRosaCre</sup>-Tieren.** In (A) Niere, (B) Lunge und (C) Leber ist nach Induktion des *Ybx1*-KOs (*Ybx1*<sup>ΔRosaCre</sup>) durch Tamoxifen kein YB-1 detektierbar. Die WT(*Ybx1*<sup>WT</sup>)- und *Ybx1*-KI(*Ybx1*<sup>RosaCreK2A</sup>)-Tiere hingegen exprimieren YB-1 in den untersuchten Organen. Proteinlysate aus Nieren-(1,5 µg/µl), Lungen-(1,0 µg/µl) und Lebergewebe (1,0 µg/µl) wurden mittels Western Blot aufgetrennt. Die Immundetektion erfolgte mit einem Anti-YB-1 (C-terminal)-Antikörper. GAPDH diente als Ladekontrolle [Niere (1,5 µg/µl), Lunge (1,5 µg/µl), Leber (1,0 µg/µl)]. Abkürzungen: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH); Knock-in (KI); Knock-out (KO); Lipopolysaccharide (LPS); Wildtyp (WT); *Y-box binding protein-1* (YB-1, *Ybx1*) (eigene Darstellung).

Die Ergebnisse bestätigen, dass die Tamoxifen-Gabe erfolgreich einen KO des *Ybx1*-Gens in den *Ybx1*<sup>ΔRosaCre</sup>-Tieren induzierte. Die Gabe von LPS führte zu keiner sichtbaren Veränderung des YB-1-Proteingehalts in den Zelllysaten.

### 4.3 Phänotypisierung des *Ybx1*<sup>RosaCreK2A</sup>-Mausstammes

Zur Untersuchung phänotypischer Unterschiede zwischen *Ybx1*-KI- und WT-Tieren wurden Blutbild und Gewichtsentwicklung verglichen. Wie in Tabelle 3 dargestellt, wurden im Blutbild keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und *Ybx1*-KI-Tieren festgestellt. In Bezug auf die Gesamtzahl der Leukozyten sowie der Leukozyten-Subpopulationen (Lymphozyten und neutrophile Granulozyten) zeigten sich keine Unterschiede. Auch der Vergleich von Thrombozyten und Erythrozyten ergab keine signifikanten Abweichungen. Zudem unterschied sich die Gewichtsentwicklung nicht zwischen WT- und *Ybx1*-KI-Tieren (Daten nicht gezeigt).

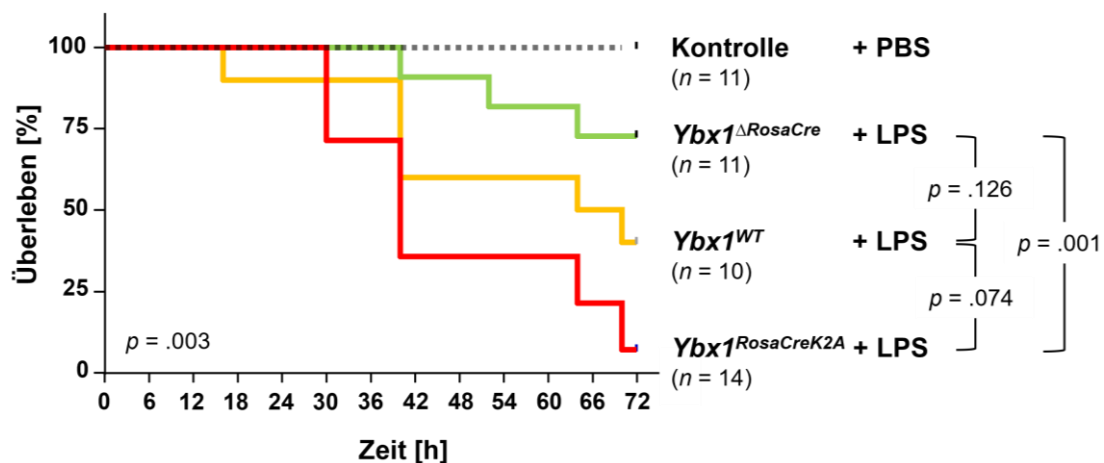
	<i>Ybx1</i> <sup>WT</sup> (n = 18)	<i>Ybx1</i> <sup>RosaCreK2A</sup> (n = 9)	p
Leukozyten (x10 <sup>9</sup> /l)	4,7	4,2	.886
Lymphozyten (%)	0,84	0,89	.971
Neutrophile Granulozyten (%)	0,04	0,04	> .999
Thrombozyten (x10 <sup>9</sup> /l)	1157	1082	.994
Erythrozyten (x10 <sup>12</sup> /l)	8,8	8,4	.990

**Tabelle 3: Phänotypisierung des *Ybx1*<sup>RosaCreK2A</sup>-Mausstammes hinsichtlich peripherem Blutbild.** Die Tabelle zeigt die absolute Anzahl an Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten sowie den prozentualen Anteil der Leukozyten-Subpopulationen (Lymphozyten und neutrophile Granulozyten) bei WT(*Ybx1*<sup>WT</sup>)- und *Ybx1*-KI(*Ybx1*<sup>RosaCreK2A</sup>)-Tieren aus einer Blutbildanalyse. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt ( $p > .05$ ). Die Daten repräsentieren den Mittelwert. Abkürzungen: Knock-in (KI); Wildtyp (WT); *Y-box binding protein-1* (*Ybx1*) (eigene Darstellung).

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die *Ybx1*-KI-Tiere hinsichtlich ihres peripheren Blutbildes und ihrer Gewichtsentwicklung nicht von den WT-Tieren unterscheiden.

#### 4.4 Einfluss der LPS-Applikation auf das Überleben von Wildtyp-, $Ybx1^{\Delta RosaCre}$ - und $Ybx1^{RosaCreK2A}$ -Tieren

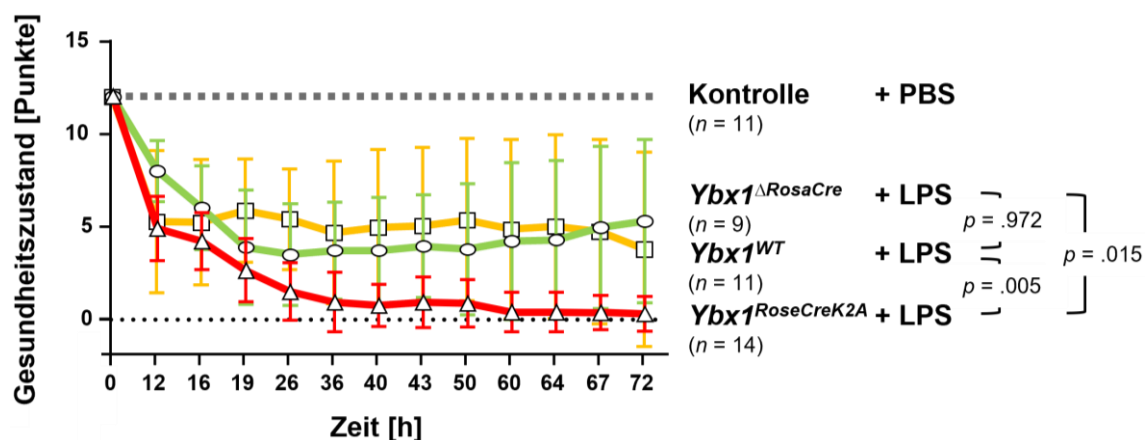
Zur Untersuchung der Rolle von YB-1 im Verlauf einer systemischen Entzündungsreaktion wurde den Versuchstieren LPS verabreicht. Die Analyse erfolgte durch das Erheben von Kaplan-Meier-Überlebenskurven für die verschiedenen Genotypen. Abbildung 8 zeigt die Überlebenskurven über einen Zeitraum von 72 h. Nach LPS-Gabe überlebten ca. 73 % der  $Ybx1$ -KO-Tiere, die damit die höchste Überlebensrate aufwiesen.  $Ybx1$ -KI-Tiere hatten mit ca. 7 % die niedrigste Überlebenswahrscheinlichkeit. WT-Mäuse zeigten eine Überlebensrate von 40 %. Ein Versterben einzelner WT- und  $Ybx1$ -KI-Tiere nach LPS-Injektion trat früher ein als bei  $Ybx1$ -KO-Tieren. Das erste WT-Tier starb nach 16 h, das erste  $Ybx1$ -KI-Tier nach 30 h, während in der  $Ybx1$ -KO-Gruppe das erste Tier nach 40 h verstarb. Sowohl der Vergleich der Überlebenskurven der  $Ybx1$ -KO- und  $Ybx1$ -KI-Tiere als auch das Gesamtergebnis der Überlebensanalyse ergaben statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen ( $p = .001$  bzw.  $p = .003$ ).



**Abbildung 8: Überlebenskurven nach LPS-Injektion bei den verschiedenen Genotypen.**  $Ybx1$ -KO( $Ybx1^{\Delta RosaCre}$ )-Tiere zeigen nach Verabreichung von LPS die höchste Überlebensrate,  $Ybx1$ -KI( $Ybx1^{RosaCreK2A}$ )-Mäuse weisen die geringste Überlebenswahrscheinlichkeit auf. Die Unterschiede zwischen  $Ybx1$ -KO- und  $Ybx1$ -KI-Tieren sowie das Gesamtergebnis der Überlebensanalyse erreicht statistische Signifikanz ( $p = .001$  bzw.  $p = .003$ ). Die Abbildung zeigt die Überlebensanalyse nach i. p. Injektion von 30 mg/kg KG LPS bei WT( $Ybx1^{WT}$ )-,  $Ybx1$ -KO- und  $Ybx1$ -KI-Tieren bzw. von PBS in der Kontrollgruppe innerhalb eines Zeitraums von 72 h. Abkürzungen: intraperitoneal (i. p.); Knock-in (KI); Knock-out (KO); Lipopolysaccharide (LPS); phosphate-buffered saline (PBS); Wildtyp (WT); Y-box binding protein-1 ( $Ybx1$ ) (eigene Darstellung).

Parallel zur Überlebensanalyse wurde der Gesundheitsstatus der Tiere regelmäßig bewertet. Abbildung 9 zeigt die Veränderung des Gesundheitsstatus bei den verschiedenen Genotypen nach der Verabreichung von LPS. Analog den Überlebensdaten wiesen  $Ybx1$ -KO-Tiere nach LPS-Gabe die höchsten Punktwerte auf, während Tiere des  $Ybx1$ -KI-Stammes die niedrigsten Werte erzielten. Unmittelbar nach LPS-Verabreichung zeigte sich bei allen Tieren

ein beeinträchtigt Verhalten. Nach 12 h erreichten WT- und *Ybx1*-KI-Tiere einen Punktwert von etwa 5, während *Ybx1*-KO-Tiere einen Wert von etwa 8 aufwiesen. Nach 36 h war die Beeinträchtigung in der Gruppe der *Ybx1*-KI-Tiere deutlicher ausgeprägt als bei WT- und *Ybx1*-KO-Tieren. WT-Tiere wiesen nach 36 h einen Punktwert von etwa 5 und *Ybx1*-KO-Tiere von etwa 4 auf, während *Ybx1*-KI-Mäusen auf einen Wert von 1 Punkt absanken. Zum Ende des Experiments verbesserte sich der Gesundheitsstatus der *Ybx1*-KO-Tiere. Nach 72 h lag ihr Punktwert bei etwa 5, während WT-Tiere einen Wert von etwa 4 erreichten. In der Gruppe der *Ybx1*-KI-Tiere reduzierte sich der Punktwert bis zum Versuchsende auf 0. Die Unterschiede in der Gesundheitsbewertung zwischen WT- und *Ybx1*-KI-Tieren sowie zwischen *Ybx1*-KO- und *Ybx1*-KI-Tieren waren statistisch signifikant ( $p = .005$  bzw.  $p = .015$ ).



**Abbildung 9: Veränderung des Gesundheitsstatus im Rahmen des LPS-Toxizitätsmodells.** Nach LPS-Gabe kann bei allen Genotypen eine Beeinträchtigung des Gesundheitsstatus festgestellt werden. Während sich *Ybx1*-KO(*Ybx1* $\Delta$ *RosaCre*)-Tiere zum Ende des Experiments erholen, verschlechtert sich der Gesundheitsstatus der *Ybx1*-KI(*Ybx1*<sup>*RosaCreK2A*</sup>)-Tiere bis 36 h nach LPS-Gabe und verbleibt auf niedrigem Niveau. Die Unterschiede zwischen WT(*Ybx1*<sup>WT</sup>)- und *Ybx1*-KI-Tieren sowie zwischen *Ybx1*-KO- und *Ybx1*-KI-Tieren erreichen statistische Signifikanz ( $p = .005$  bzw.  $p = .015$ ). Die Abbildung zeigt den Gesundheitsstatus nach i. p. Injektion von 30 mg/kg KG LPS bei WT-, *Ybx1*-KO- und *Ybx1*-KI-Tieren bzw. PBS in der Kontrollgruppe über 72 h. Die Bewertung erfolgte in regelmäßigen Abständen anhand des Verhaltens der Tiere mit einer maximalen Punktzahl von 12. Verstorbene Tiere wurden mit 0 Punkten bewertet. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SD. Abkürzungen: intraperitoneal (i. p.); Knock-in (KI); Knock-out (KO); Lipopolysaccharide (LPS); *phosphate-buffered saline* (PBS); Wildtyp (WT); *Y-box binding protein-1* (*Ybx1*) (eigene Darstellung).

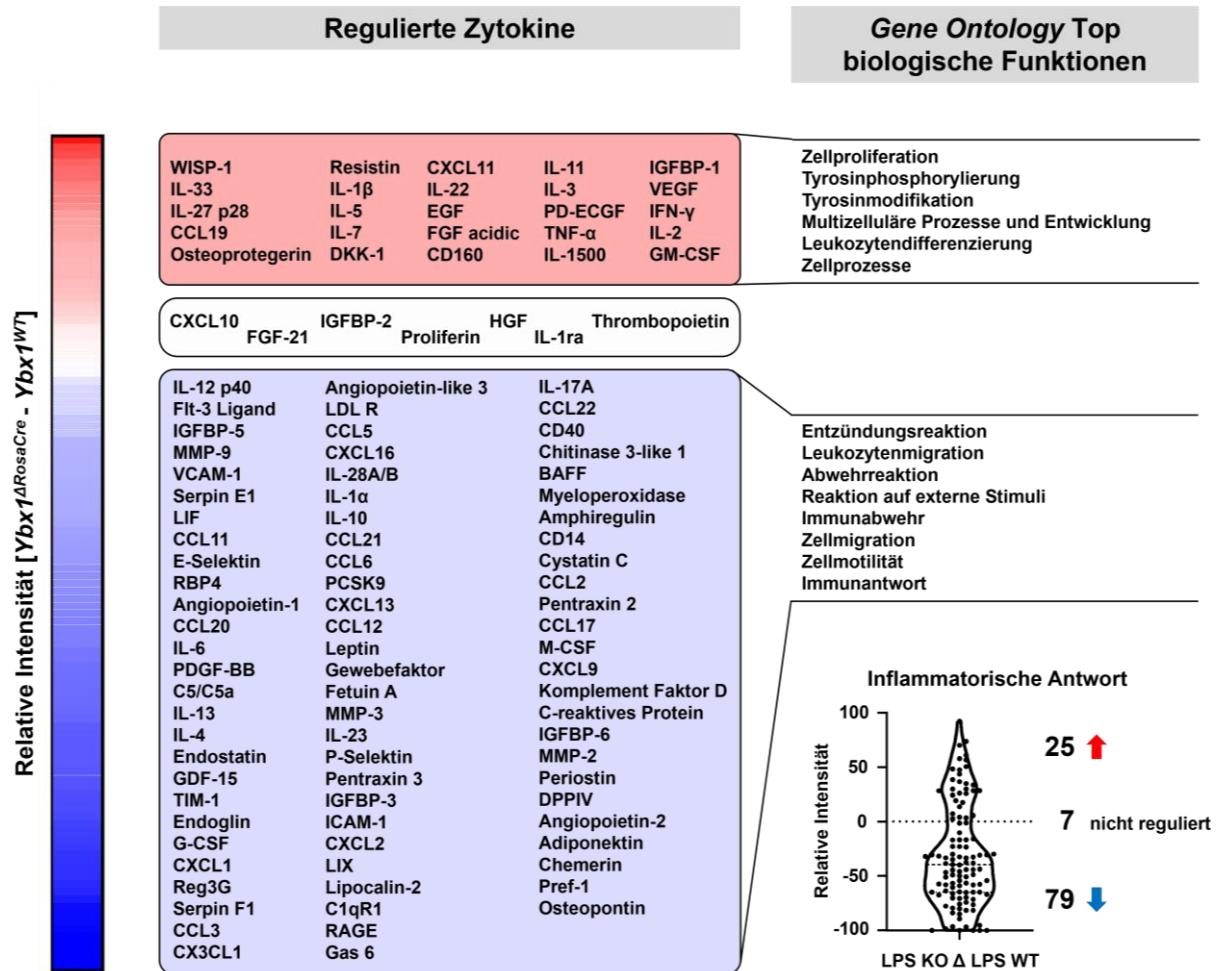
Die Ergebnisse der Überlebensanalyse zeigen, dass der *Ybx1*-KO im Rahmen des LPS-induzierten Entzündungsmodells mit einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit sowie einem besseren Gesundheitsstatus zum Ende des Beobachtungszeitraums assoziiert war. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei *Ybx1*-KI-Tieren eine reduzierte Überlebensrate und eine ausgeprägte Beeinträchtigung als Reaktion auf die LPS-Applikation.

## 4.5 Testung auf das inflammatorische Milieu in den Tierstämmen nach LPS-Applikation

Bei der Freisetzung von Endotoxinen kommt es zu einer Stimulation des Immunsystems, wobei systemische Spiegel für Entzündungsmediatoren ansteigen. Diese fördern die Rekrutierung von Immunzellen ins periphere Gewebe. Die Gewebszellen induzieren anschließend selbst eine Entzündungsreaktion, welche mit einer gesteigerten Zytokinproduktion im Gewebe einhergeht. [3]

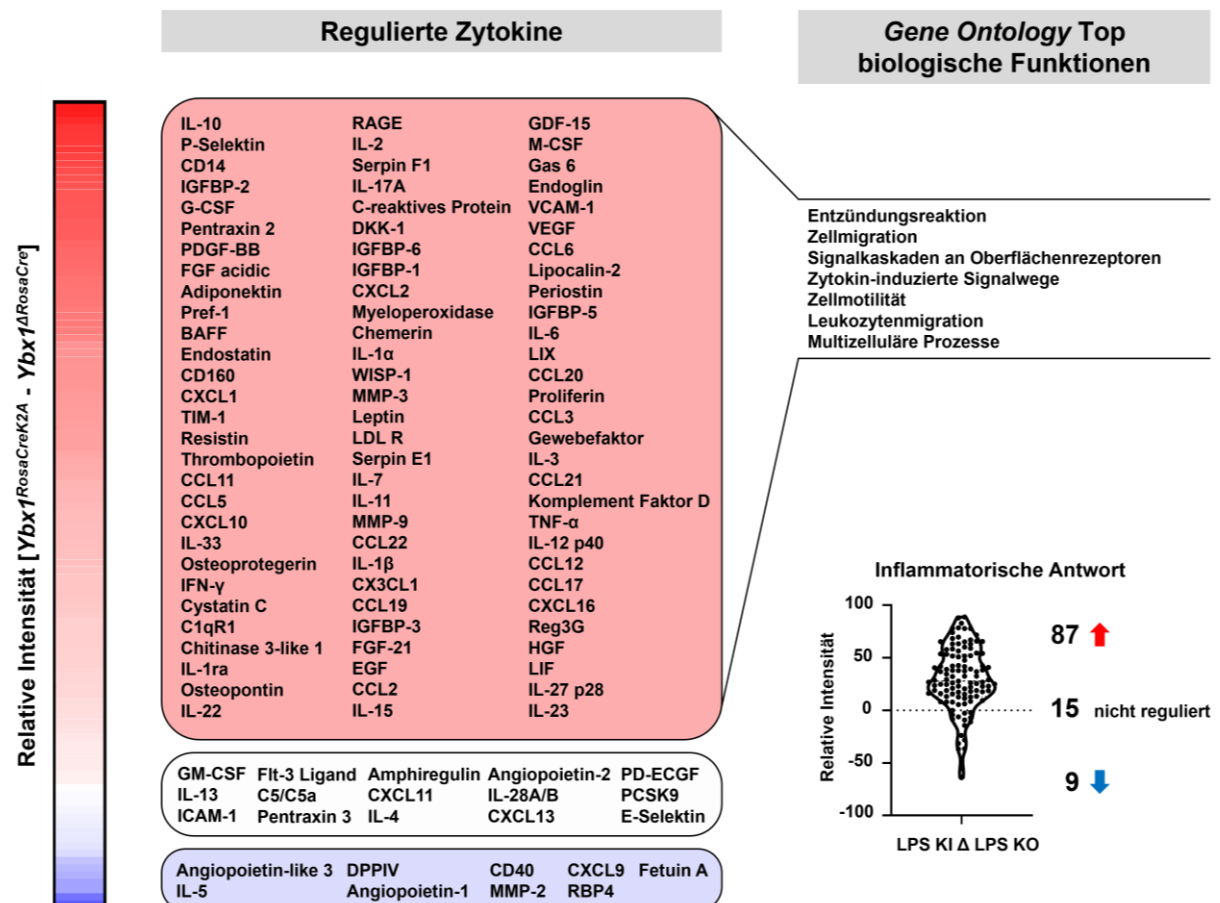
Zunächst wurde untersucht, ob der *Ybx1*-KO bzw. der *Ybx1*-KI im LPS-vermittelten Entzündungsprozess die Zytokinproduktion im Plasma beeinflusst. Hierzu wurden mithilfe eines Assays 111 Zytokine im Plasma quantifiziert.

Die Analyse ergab, dass in *Ybx1*-KO-Tieren nach LPS-Injektion im Vergleich zu WT-Tieren 79 Zytokine herunterreguliert, 25 hochreguliert und 7 Zytokine nicht reguliert waren (Abbildung 10). Insbesondere die Zytokine, welche für eine pro-inflammatorische Reaktion verantwortlich sind, zeigten sich vermindert exprimiert, wie zum Beispiel IL-1 $\alpha$ , IL-12 p40 und IL-23. Diese sind bekanntermaßen an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt. Auch IL-6, das die Differenzierung von B-Zellen zu reifen Plasmazellen sowie die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen fördert, war in der Konzentration verringert. Ebenfalls zeigte sich eine abgeschwächte Produktion von Akute-Phase-Proteinen, wie C-reaktivem Protein und Komplement Faktor D, sowie zahlreicher Chemokine. Zudem war die Menge der Proteine *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) und E-Selektin, welche die Zelladhäsion von Leukozyten fördern, geringer. Die *Gene Ontology* Analyse detektierte in *Ybx1*-KO-Tieren Zytokine hochreguliert, die an der Zellproliferation beteiligt sind, u. a. *epidermal growth factor* (EGF), *fibroblast growth factor* (FGF) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF). [102]



**Abbildung 10: Regulation der zirkulierenden Zytokinspiegel bei  $Ybx1^{\Delta RosaCre}$ -Tieren nach Gabe von LPS.** Bei  $Ybx1$ -KO ( $Ybx1^{\Delta RosaCre}$ )-Tieren zeigen sich im Plasma im Vergleich zu WT ( $Ybx1^{WT}$ )-Tieren nach LPS-Gabe die meisten Zytokine herunterreguliert. Hochreguliert sind im  $Ybx1$ -KO Zytokine, welche der Zellproliferation dienen. Die Abbildung zeigt die Regulation von 111 Zytokinen im Vergleich zwischen  $Ybx1$ -KO- und WT-Tieren. Rot hinterlegt sind hochregulierte Zytokine, blau herunterregulierte und weiß zeigt keine Veränderung der Zytokinspiegel an. Die Zytokine sind jeweils nach Intensität sortiert. Mittels *Gene Ontology* erfolgte eine Analyse der biologischen Funktionen der jeweiligen Zytokingruppe. Das Violindiagramm stellt das Ergebnis graphisch dar. Die Analyse erfolgte 30 h nach LPS-Gabe (30 mg/kg KG) mittels *Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array* aus Plasmaproben ( $n = 1-3$ ). Abkürzungen: Knock-out (KO); Lipopolysaccharide (LPS); Wildtyp (WT); *Y-box binding protein-1* ( $Ybx1$ ) (eigene Darstellung).

*Ybx1*-KI-Tiere zeigten im Vergleich zu *Ybx1*-KO-Tieren nach LPS-Gabe 87 Zytokine hochreguliert, 9 Zytokine herunterreguliert und 15 Zytokine nicht reguliert (Abbildung 11). Die *Gene Ontology* Analyse detektierte hier, dass Zytokine der inflammatorische Reaktion, der Zellmigration und Zellkommunikation hochreguliert waren. Herunterreguliert waren Zytokine, welche u. a. in Prozessen des Fett-, Zuckerstoffwechsels und allergischer Erkrankungen involviert sind.

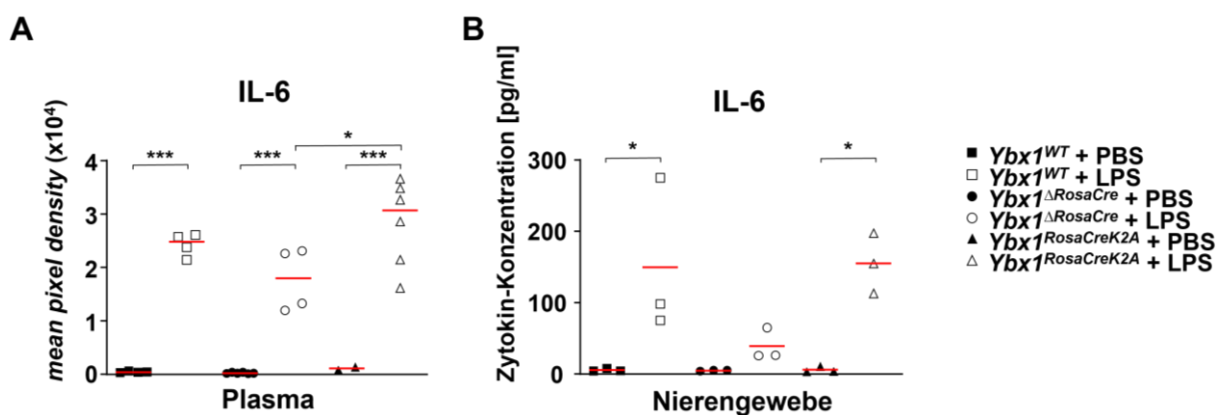


**Abbildung 11: Hochregulation inflammatorischer Zytokine bei *Ybx1*<sup>RosaCreK2A</sup>-Tieren nach LPS-Gabe.** Bei *Ybx1*-KI(*Ybx1*<sup>RosaCreK2A</sup>)-Tieren zeigt sich im Plasma im Vergleich zum *Ybx1*-KO (*Ybx1*<sup>ΔRosaCre</sup>) nach Gabe von LPS eine Hochregulation vieler Zytokine. Diese weisen insbesondere eine pro-inflammatorische Funktion auf. Herunterreguliert sind Zytokine, welche in Stoffwechselprozesse eingebunden sind. Die Abbildung zeigt die Regulation von 111 Zytokinen verglichen zwischen *Ybx1*-KI- und *Ybx1*-KO-Tieren. Rot hinterlegt sind hochregulierte Zytokine, blau herunterregulierte und weiß zeigt keine Veränderung der Zytokinspiegel an. Die Zytokine sind jeweils nach Intensität sortiert. Mittels *Gene Ontology* erfolgte eine Analyse der biologischen Funktionen der jeweiligen Zytokingruppe. Das Violindiagramm stellt das Ergebnis graphisch dar. Die Analyse erfolgte 30 h nach LPS-Gabe (30 mg/kg KG) mittels *Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array* aus Plasmaproben ( $n = 1-3$ ). Abkürzungen: Knock-in (KI); Knock-out (KO); Lipopolysaccharide (LPS); *Y-box binding protein-1* (*Ybx1*) (eigene Darstellung).



IL-6 wurde als inflammatorisches Zytokin genauer analysiert. Nach LPS-Gabe war der IL-6-Spiegel im Plasma bei allen Genotypen signifikant erhöht ( $p < .001$ ) (Abbildung 12A). Im *Ybx1*-KO konnte im Rahmen des systemischen Entzündungsgeschehens gegenüber WT-Tieren ein trendmäßig und gegenüber *Ybx1*-KI-Tieren ein signifikant verminderter IL-6-Gehalt festgestellt werden ( $p = .020$ ).

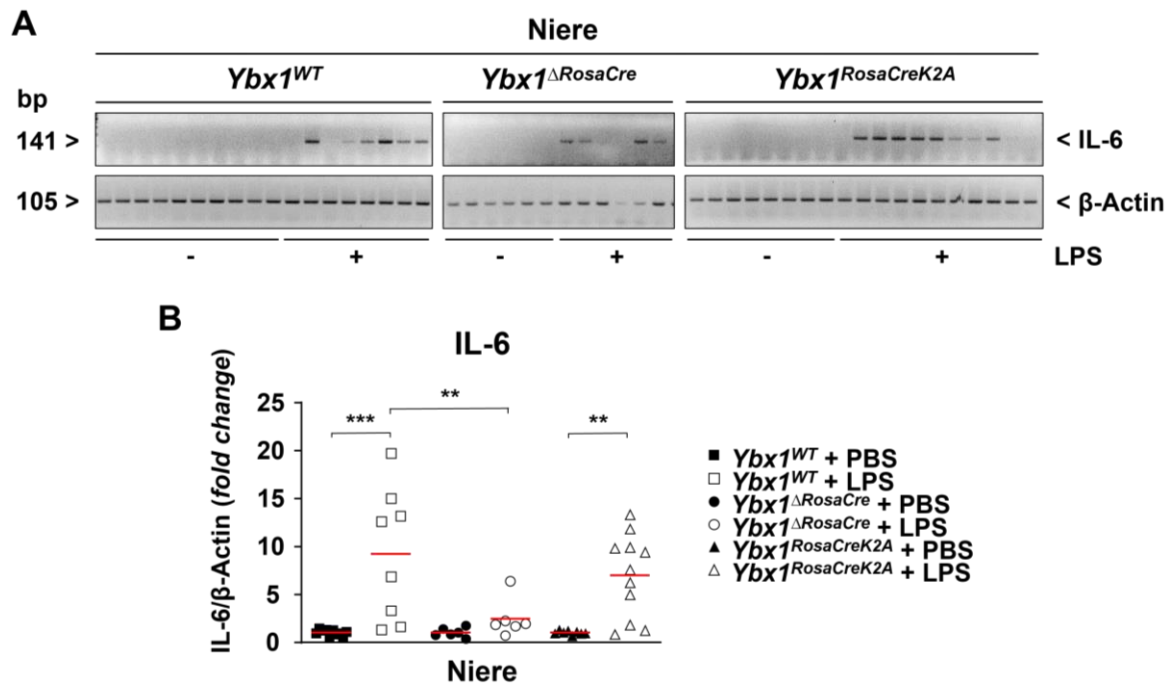
Weiterhin wurde der Zytokinegehalt von IL-6 im Nierengewebe untersucht (Abbildung 12B). Hier zeigte sich die IL-6-Konzentration bei WT- und *Ybx1*-KI-Tieren nach LPS-Gabe ebenso signifikant gesteigert im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p = .032$  bzw.  $p = .025$ ). In *Ybx1*-KO-Tieren war nach Gabe von LPS kein Anstieg der IL-6-Konzentration im Nierengewebe detektierbar.



**Abbildung 12: Quantifizierung von IL-6 bei *Ybx1*<sup>ΔRosaCre</sup>- und *Ybx1*<sup>RosaCreK2A</sup>-Tieren nach LPS-Gabe in Plasmaproben und Nierenlysaten.** (A) IL-6 kann nach LPS-Gabe bei allen Genotypen in signifikant höheren Konzentrationen im Plasma nachgewiesen werden ( $p < .001$ ). Im *Ybx1*-KO (*Ybx1*<sup>ΔRosaCre</sup>) ist der IL-6-Gehalt gegenüber dem *Ybx1*-KI (*Ybx1*<sup>RosaCreK2A</sup>) signifikant geringer ( $p = .020$ ). (B) IL-6 steigt im Nierengewebe bei WT(*Ybx1*<sup>WT</sup>)- und *Ybx1*-KI-Tieren nach LPS-Gabe signifikant an ( $p = .032$  bzw.  $p = .025$ ). *Ybx1*-KO-Tiere weisen nach LPS-Exposition keine Veränderung des IL-6-Gehalts auf. Die Graphen stellen die Quantifizierung des Zytokinegehalts im Plasma sowie im Nierengewebe 30 h nach LPS- bzw. PBS-Gabe (30 mg/kg KG) dar. Die Analyse im Plasma erfolgte mittels *Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array*, die Analyse im Nierengewebe mittels *Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23-plex Assay* aus Proteinlysaten. In den Plasma-Analysen ist die *mean pixel density* dargestellt, in der Gewebe-Analyse die Zytokinkonzentration. Die rote Linie repräsentiert den Mittelwert, \* $p < .05$ , \*\*\* $p < .001$ . Abkürzungen: Interleukin-6 (IL-6); Knock-in (KI); Knock-out (KO); Lipopolysaccharide (LPS); phosphate-buffered saline (PBS); Wildtyp (WT); Y-box binding protein-1 (*Ybx1*) (eigene Darstellung).

Für YB-1 sind regulierende Funktionen im Sinne eines Transkriptionsfaktors beschrieben. Im Zellkern bindet YB-1 direkt an DNA oder interagiert mit anderen Transkriptionsfaktoren. [49, 54] Um die molekularen Mechanismen zu untersuchen, die zu den unterschiedlichen Zytokinspiegeln der Mausstämmen führten, erfolgte im nächsten Schritt die Quantifizierung der IL-6-Transkripte mittels PCR. Abbildung 13 zeigt die Transkriptzahlen von IL-6 im Nierengewebe. Bei WT- und *Ybx1*-KI-Tieren konnte unter dem Einfluss von LPS eine signifikant höhere Zahl an Transkripten nachgewiesen werden ( $p < .001$  bzw.  $p = .007$ ). Im *Ybx1*-KO wurde nach LPS-Injektion dagegen keine signifikante Änderung der Transkriptzahl

festgestellt. Die Transkriptzahl war nach LPS-Gabe bei *Ybx1*-KO-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren signifikant geringer ( $p < .01$ ), gegenüber dem *Ybx1*-KI war sie trendmäßig geringer.



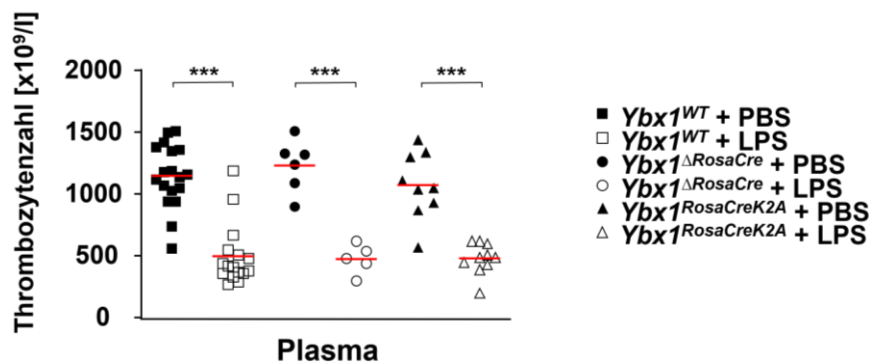
**Abbildung 13: IL-6-Transkripte bei den verschiedenen Genotypen nach LPS-Exposition. (A)** Bei WT(*Ybx1*<sup>WT</sup>)- und *Ybx1*-KI(*Ybx1*<sup>RosaCreK2A</sup>)-Tieren kann nach LPS-Gabe eine signifikant höhere Transkript-Menge an IL-6 festgestellt werden ( $p < .001$  bzw.  $p = .007$ ). Der mRNA-Gehalt ist unter dem Einfluss von LPS bei *Ybx1*-KO(*Ybx1*<sup>ΔRosaCre</sup>)-Tieren gegenüber WT-Tieren signifikant ( $p < .01$ ) und gegenüber *Ybx1*-KI-Tieren trendmäßig vermindert. Die PCR amplifiziert die mRNA-Menge von IL-6 30 h nach LPS- bzw. PBS-Injektion (30 mg/kg KG) in der Niere. β-Aktin dient als Ladekontrolle. **(B)** Das Diagramm stellt die relative Änderung (*fold change*) der Banden-Intensität gegenüber β-Aktin quantifiziert dar. Die rote Linie repräsentiert den Mittelwert,  $**p < .01$ ,  $***p < .001$ . Abkürzungen: Interleukin-6 (IL-6); Knock-in (KI); Knock-out (KO); Lipopolysaccharide (LPS); phosphate-buffered saline (PBS); Wildtyp (WT); Y-box binding protein-1 (*Ybx1*) (eigene Darstellung).

Die Analyse der IL-6-Transkripte bestätigte die zuvor im Plasma und Gewebe beobachteten Veränderungen der Zytokinspiegel. Während die Verabreichung von LPS bei WT- und *Ybx1*-KI-Tieren zu einer signifikanten Steigerung von IL-6 führte, konnte diese im *Ybx1*-KO nicht festgestellt werden.

## 4.6 Nachweis der Gerinnungsaktivierung nach LPS-Applikation

Bei einer Sepsis wird das Gerinnungssystem aktiviert, was zur Bildung von Mikrothromben führt. Dies geht mit einem Verbrauch von Thrombozyten einher. Daher kann die Thrombozytenzahl als indirekter Marker für die Aktivierung der Gerinnungskaskade betrachtet werden. [3]

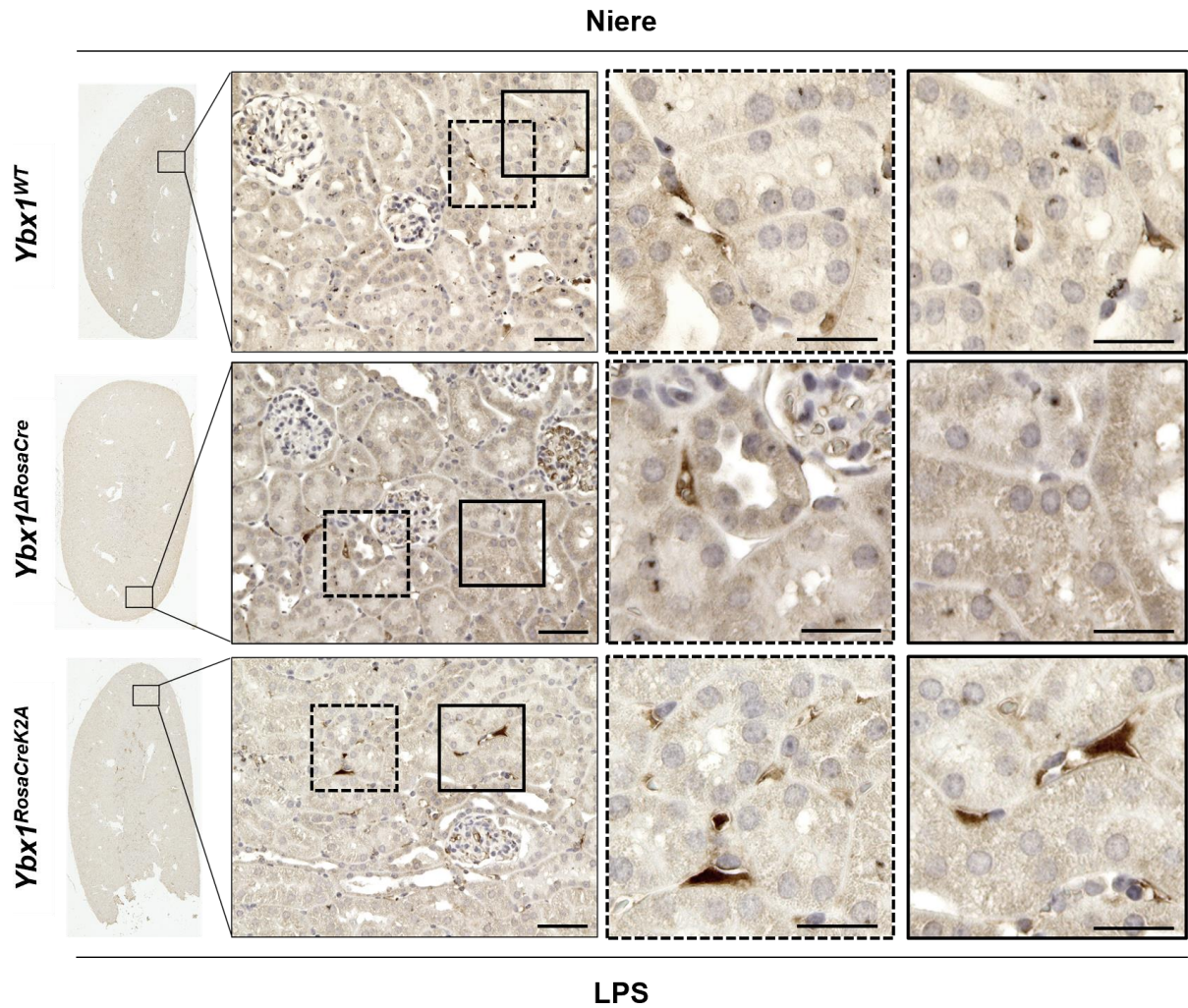
Um den Einfluss von YB-1 auf den Gerinnungsprozess im Rahmen der LPS-vermittelten systemischen Entzündung zu überprüfen, wurde die Thrombozytenzahl bestimmt (Abbildung 14). Hierzu erfolgte nach Verabreichung von LPS eine Blutbildanalyse der Tiere. Die Analyse ergab, dass LPS in allen Mausstämmen eine signifikante Abnahme der Thrombozytenzahl verursachte ( $p < .001$ ). Zwischen den einzelnen Genotypen bestand kein Unterschied.



**Abbildung 14: Quantifizierung der Thrombozytenzahl zur Abschätzung einer systemischen Aktivierung des Gerinnungssystems nach LPS-Applikation.** Nach LPS-Applikation fallen in allen Genotypen die Thrombozytenzahlen deutlich ab ( $p < .001$ ). Das Diagramm zeigt die absolute Zahl an Thrombozyten bei WT( $Ybx1^{WT}$ )-,  $Ybx1$ -KO( $Ybx1^{\Delta RosaCre}$ )- und  $Ybx1$ -KI( $Ybx1^{RosaCreK2A}$ )-Tieren 30 h nach LPS- bzw. PBS-Gabe (30 mg/kg KG). Die Werte wurden mittels *Coulter Counter* bei der Blutbildanalyse gewonnen. Die rote Linie repräsentiert den Mittelwert ( $n = 5-18$ ), \*\*\* $p < .001$ . Abkürzungen: Knock-in (KI); Knock-out (KO); Lipopolysaccharide (LPS); *phosphate-buffered saline* (PBS); Wildtyp (WT); *Y-box binding protein-1* ( $Ybx1$ ) (eigene Darstellung).

Zentraler Bestandteil eines Thrombus ist Fibrin, das durch Proteolyse aus der Vorstufe Fibrinogen entsteht. Fibrinogen gilt als Risikofaktor und Modulator entzündlicher Prozesse und wird zudem als Akute-Phase-Protein freigesetzt. [103, 104] Daher eignet sich Fibrinogen als Marker zur Bewertung des Gewebeschadens. Um den Einfluss von YB-1 auf diese Schädigungsprozesse zu untersuchen, wurde eine immunhistochemische Färbung von Fibrinogen in verschiedenen Organen durchgeführt.

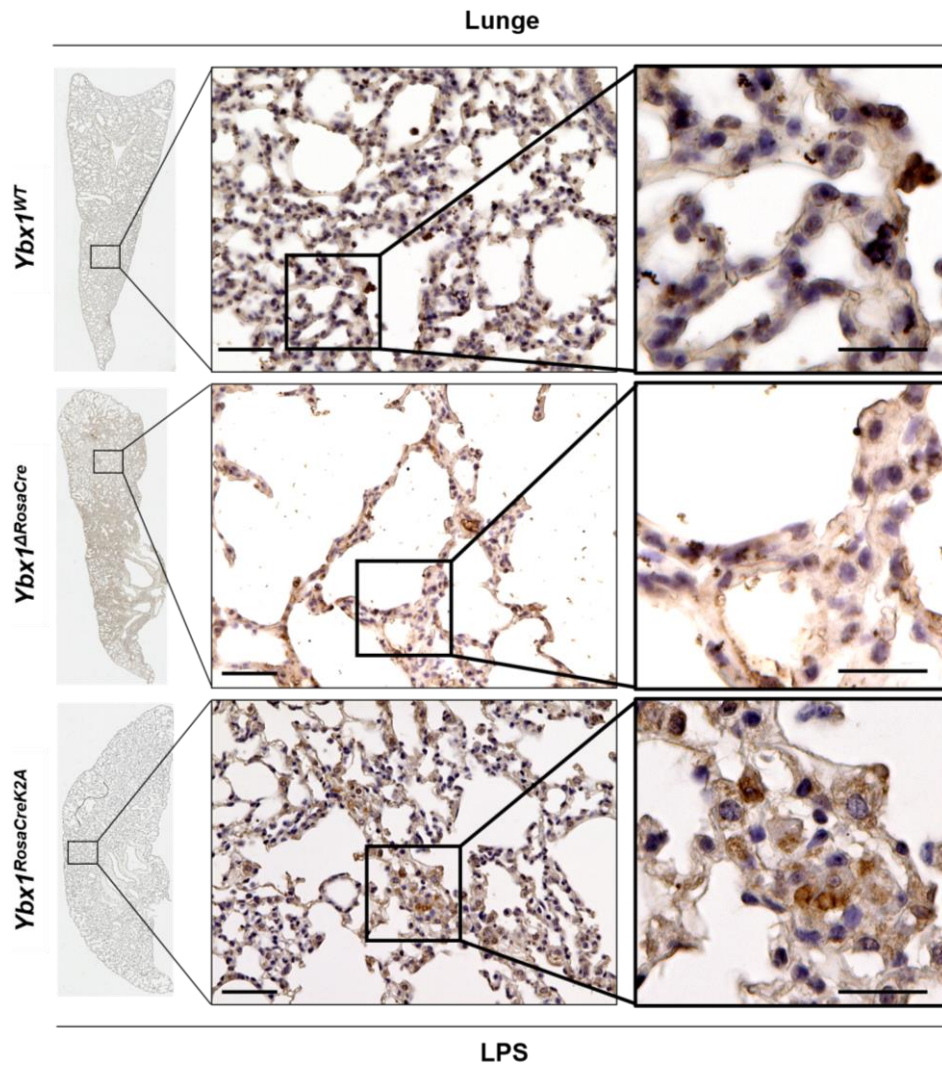
Abbildung 15 zeigt das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung von Fibrinogen in der Niere. Nach LPS-Behandlung wurde bei  $Ybx1$ -KI-Tieren eine ausgeprägte Fibrinogenablagerung festgestellt. WT- und  $Ybx1$ -KO-Tiere wiesen dagegen geringere Mengen an Fibrinogen auf. Unter der Gabe von PBS konnte kein Fibrinogen detektiert werden (Abbildung 20, Anhang).



**Abbildung 15: Fibrinogenablagerung in den Nierengefäßen nach LPS-Gabe.** Der *Ybx1*-KI (*Ybx1<sup>RosaCreK2A</sup>*)-Stamm weist nach LPS-Gabe in der Niere eine stärkere Fibrinogenablagerung auf als der WT (*Ybx1<sup>WT</sup>*)- und *Ybx1*-KO (*Ybx1<sup>ΔRosaCre</sup>*)-Stamm. Die Abbildung zeigt repräsentative Bildausschnitte einer immunhistochemischen Färbung mit einem Fibrinogen  $\gamma$  (C20)-Antikörper 30 h nach LPS-Behandlung (30 mg/kg KG) in der Niere. Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m (Mitte) bzw. 25  $\mu$ m (rechts). Abkürzungen: Knock-in (KI); Knock-out (KO); Lipopolysaccharide (LPS); Wildtyp (WT); *Y-box binding protein-1* (*Ybx1*) (eigene Darstellung).



In der Lunge zeigte sich nach Applikation von LPS bei *Ybx1*-KI-Tieren die stärkste Ablagerung von Fibrinogen, während sie bei WT- und *Ybx1*-KO-Tieren schwächer ausgeprägt war (Abbildung 16). Unter der Gabe von PBS zeigte sich kein Fibrinogen (Abbildung 21, Anhang).

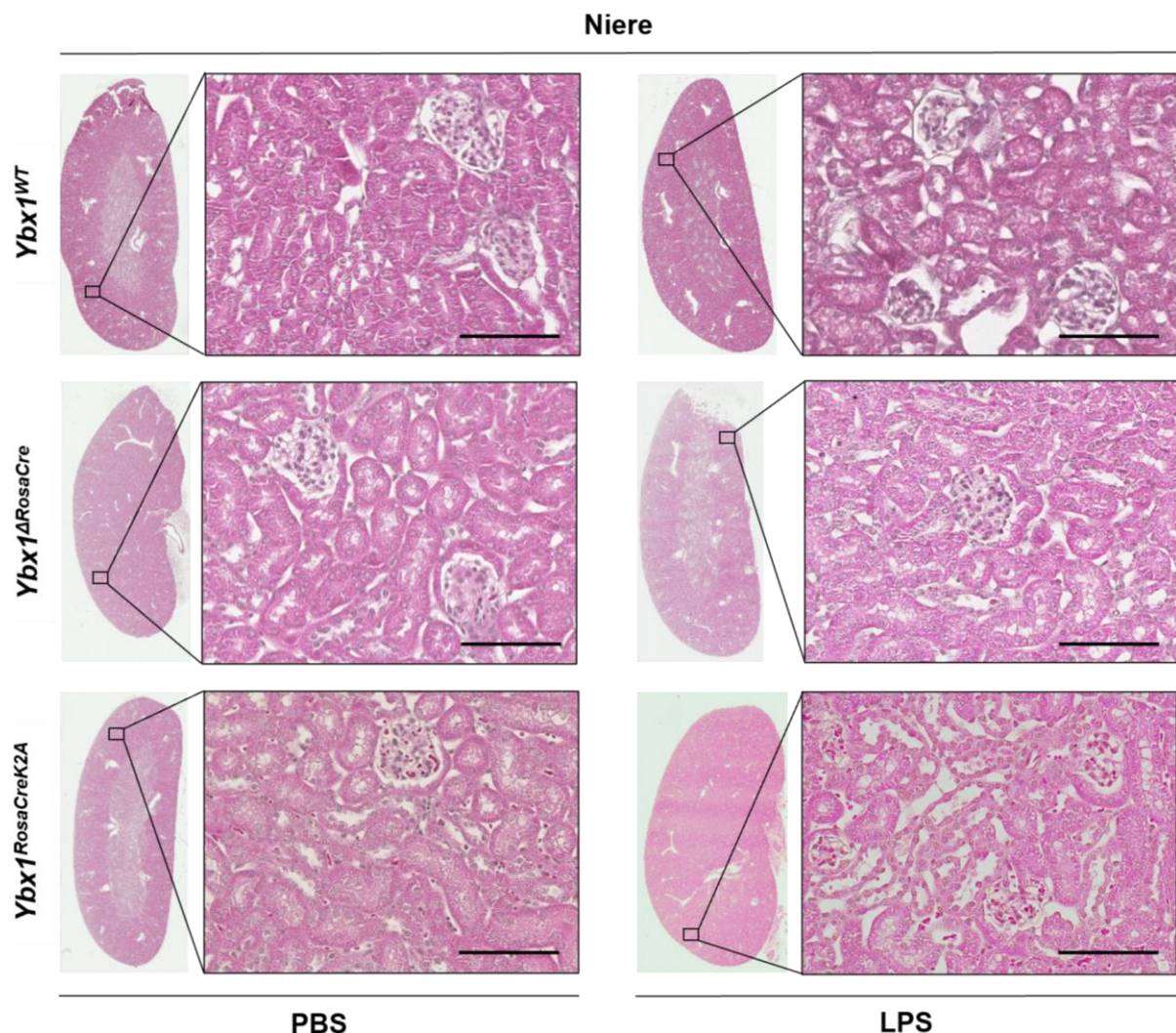


**Abbildung 16: Fibrinogenablagerung im LPS-Toxizitätsmodell in der Lunge.** Der *Ybx1*-KI (*Ybx1<sup>RosaCreK2A</sup>*)-Stamm weist nach LPS-Gabe die meisten Fibrinogenablagerungen auf. Im WT (*Ybx1<sup>WT</sup>*) und *Ybx1*-KO (*Ybx1<sup>ΔRosaCre</sup>*) ist das detektierte Fibrinogen geringer. Die Abbildung zeigt repräsentative Bildausschnitte einer immunhistochemischen Färbung mit einem Fibrinogen  $\gamma$  (C20)-Antikörper in der Lunge 30 h nach LPS-Applikation (30 mg/kg KG). Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m (Mitte) bzw. 25  $\mu$ m (rechts). Abkürzungen: Knock-in (KI); Knock-out (KO); Lipopolysaccharide (LPS); Wildtyp (WT); *Y-box binding protein-1* (*Ybx1*) (eigene Darstellung).

## 4.7 Analyse der durch LPS beeinflussten Organschädigung

Zur Bewertung entzündungsbedingter Organschäden wurden Gewebeproben histologisch untersucht. Hierzu wurde eine HE-Färbung durchgeführt. Der Organschaden wurde anhand spezifischer Schädigungsmerkmale, wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben, bewertet.

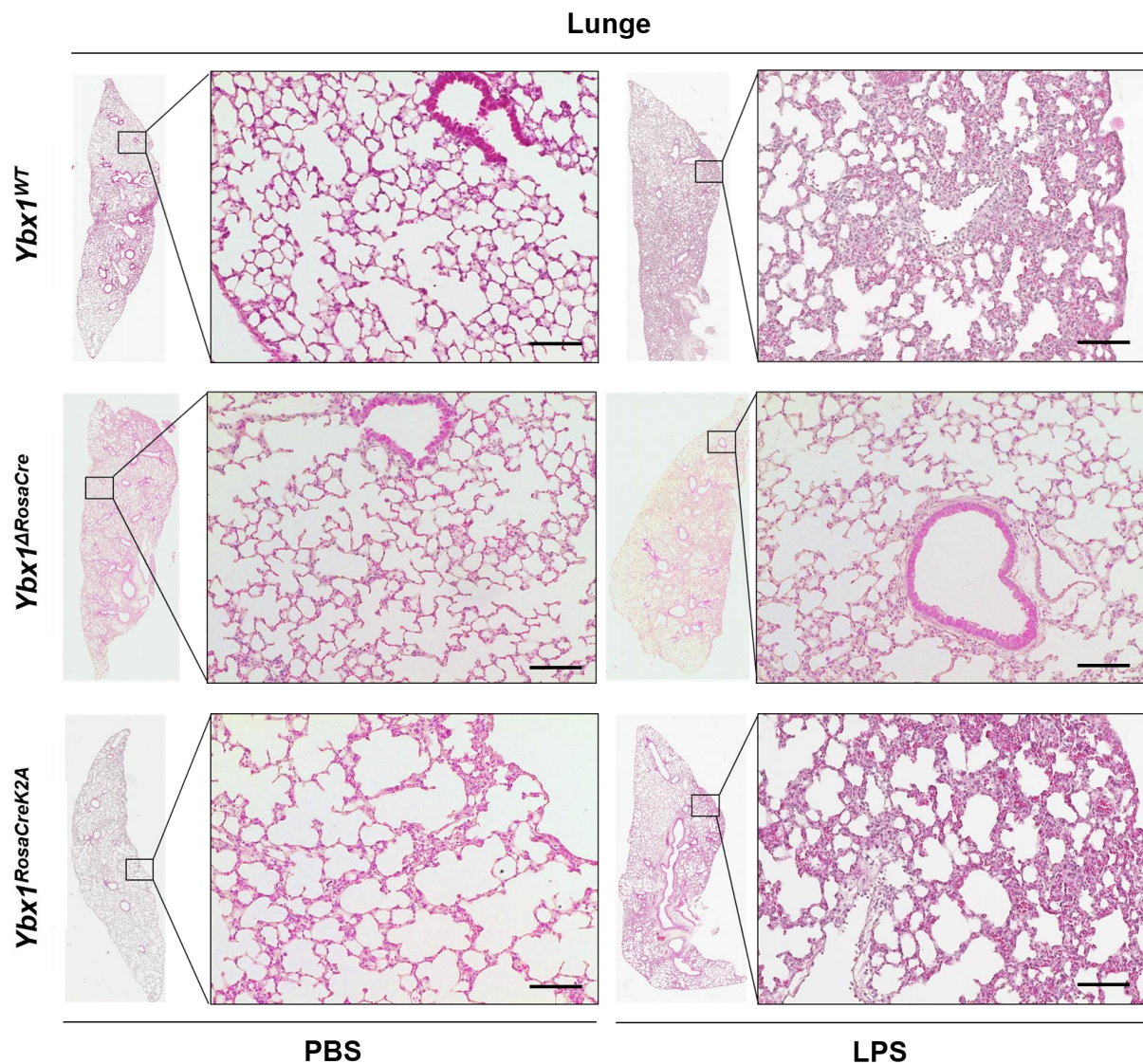
Abbildung 17 zeigt die histologischen Veränderungen im Nierenkortex unter dem Einfluss von LPS. In durch LPS geschädigten Nieren fanden sich dilatierte Tubuluslumina, Tubuluszellnekrosen mit abgeflachten, vakuolisierten Epithelien sowie ein interstitielles Ödem mit Immunzellinfiltration. Bei WT- und *Ybx1*-KI-Tieren konnte nach der Behandlung mit LPS ein deutlicher Organschaden beobachtet werden. *Ybx1*-KO-Tiere wiesen im Rahmen des LPS-Toxizitätsmodells dagegen keine sichtbare Organschädigung auf.



**Abbildung 17: Nierenschädigung unter dem Einfluss von LPS.** WT(*Ybx1*<sup>WT</sup>)- und *Ybx1*-KI(*Ybx1*<sup>RosaCreK2A</sup>)-Tiere weisen nach LPS-Behandlung im Gegensatz zu *Ybx1*-KO(*Ybx1*<sup>ΔRosaCre</sup>)-Tieren eine deutliche Schädigung der Niere auf. Die Abbildung zeigt repräsentative Bildausschnitte des Nierenkortex 30 h nach LPS- bzw. PBS-Behandlung (30 mg/kg KG) in einer HE-Färbung. Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m. Abkürzungen: Hämatoxylin-Eosin (HE); Knock-in (KI); Knock-out (KO); Lipopolysaccharide (LPS); phosphate-buffered saline (PBS); Wildtyp (WT); Y-box binding protein-1 (*Ybx1*) (eigene Darstellung).



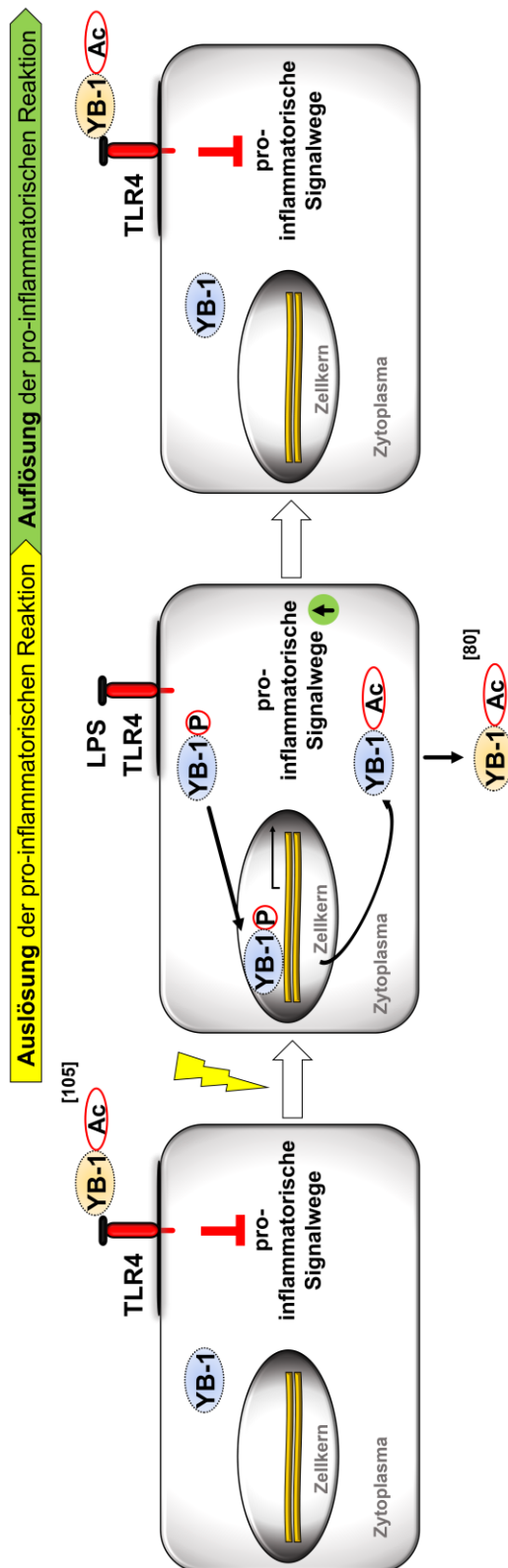
Abbildung 18 zeigt die durch LPS vermittelten histologischen Veränderungen des Lungengewebes. Es zeigte sich ein fibrinreiches interstitielles Lungenödem mit Atelektasen, eine verbreiterte Alveolarmembran und eine alveoläre Infiltration von Entzündungszellen. Hierbei führte die Verabreichung von LPS bei WT- und *Ybx1*-KI-Tieren zu einer deutlichen Organschädigung, während bei *Ybx1*-KO-Tieren keine Veränderung festgestellt werden konnte.



**Abbildung 18: Lungenschäden im Rahmen der LPS-Toxizität.** Nach der Behandlung mit LPS zeigt sich bei WT(*Ybx1*<sup>WT</sup>)- und *Ybx1*-KI(*Ybx1*<sup>RosaCreK2A</sup>)-Tieren eine deutliche Schädigung des Lungengewebes. Im *Ybx1*-KO (*Ybx1*<sup>ΔRosaCre</sup>) kann keine Veränderung des Gewebes gesehen werden. Die Abbildung stellt repräsentative Bildausschnitte 30 h nach LPS- bzw. PBS-Behandlung (30 mg/kg KG) in der HE-Färbung dar. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm. Abkürzungen: Hämatoxylin-Eosin (HE); Knock-in (KI); Knock-out (KO); Lipopolysaccharide (LPS); *phosphate-buffered saline* (PBS); Wildtyp (WT); *Y-box binding protein-1* (*Ybx1*) (eigene Darstellung).

## 4.8 Schematische Darstellung der Rolle von YB-1 im LPS-induzierten Entzündungsgeschehen

Abbildung 19 fasst die Ergebnisse im Kontext des LPS-induzierten systemischen Entzündungsprozesses zusammen.



**Abbildung 19: Schematische Darstellung der Ergebnisse in den Tiermodellen nach LPS-Applikation.** YB-1 ist intra- und extrazellulär lokalisiert. Intrazelluläres YB-1 befindet sich im Zytoplasma. Extrazelluläres YB-1 bindet an TLR4. Hierdurch werden pro-inflammatorische Signalwege gehemmt. Im Rahmen des systemischen Entzündungsprozesses bindet LPS an TLR4. Intrazelluläres YB-1 wird folglich phosphoryliert und transloziert in den Zellkern. Im Zellkern aktiviert YB-1 die eigene Expression und fördert die Transkription pro-inflammatorischer Zielgene. Zudem kommt es zur Acetylierung mit anschließender Sekretion von YB-1 in den Extrazellulärraum. Sekretiertes YB-1 bindet erneut an TLR4, wodurch eine weitere Aktivierung pro-inflammatorischer Signalwege unterdrückt wird. Abkürzungen: Acetyl (Ac); Lipopolysaccharide (LPS); Phosphat (P); Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4); Y-box binding protein-1 (YB-1) (eigene Darstellung, Rana et al. [105], Frye et al. [80]).



## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Ergebnisse

Diese Arbeit untersucht die komplexen Mechanismen, durch die YB-1 an der Pathophysiologie der Sepsis beteiligt ist. Der Einfluss von YB-1 auf die systemische Entzündung wurde in einem *in vivo*-LPS-Toxizitätsmodell untersucht, wobei sowohl ein vollständiger Verlust von YB-1 als auch eine Sekretionsdefizienz betrachtet wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass *Ybx1*-KO-Tiere eine reduzierte Entzündungsreaktion und eine erhöhte Überlebensrate aufweisen. Die hohe Überlebensrate der *Ybx1*-KO-Tiere belegt, dass der vollständige Verlust von YB-1 die LPS-vermittelte Entzündungsreaktion einschränkt.

Im Gegensatz dazu verstärkt eine Sekretionsdefizienz von YB-1 die inflammatorische Reaktion erheblich und führt zu einer erhöhten Sterblichkeit der Mäuse. Dieses Ergebnis kann so interpretiert werden, dass extrazelluläres YB-1 wohl protektive Funktionen in dem LPS-Toxizitätsmodell einnimmt. Dies könnte über die extrazelluläre Hemmung der TLR4-Signalkaskade während der Auflösung der Entzündungsreaktion erfolgen. Der Verlust dieser hemmenden Funktion könnte zu einer stärkeren TLR4-Aktivierung durch LPS führen.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie in Kooperation mit der AG Isermann bestätigte erstmals mechanistisch und funktionell die protektive Funktion von extrazellulärem YB-1. [105] Dabei wurde gezeigt, dass von Podozyten sekretiertes YB-1 die TLR4-Signalkaskade in Tubuluszellen hemmt, wodurch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B verhindert und sterile Entzündungen in der Niere reduziert werden. Eine Störung dieses YB-1-vermittelten Signals, etwa durch Schädigung der Podozyten mit folglich verminderter YB-1-Sekretion, führt zu einer verstärkten TLR4-vermittelten Entzündungsreaktion. Diese Ergebnisse verdeutlichen die komplexe und kontextabhängige Rolle von YB-1 in der Regulation entzündlicher Vorgänge in der Niere.

In Zusammenschau mit den Ergebnissen dieser Arbeit kann die initial formulierte Hypothese bestätigt werden: YB-1 beeinflusst den systemischen Prozess der Entzündung im Rahmen der Immunantwort auf LPS je nach subzellulärer Lokalisation in unterschiedlicher Weise. Während intrazelluläres YB-1 pro-inflammatorische Prozesse fördert, agiert extrazelluläres YB-1 als zentraler anti-inflammatorischer Regulator, der die TLR4-abhängige Inflammation begrenzt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Zytokinexpression, zur Aktivierung des Gerinnungssystems und die organspezifischen Schäden diskutiert:

**YB-1 in der Regulation der LPS-vermittelten Zytokinexpression.** Die Bindung von LPS an Zellrezeptoren aktiviert Signalwege, die zur Zytokinexpression führen. [3] Es wurde gezeigt, dass die LPS-Gabe bei WT-Tieren sowohl im Plasma als auch in der Niere einen Anstieg der Zytokinspiegel bewirkte (Abbildung 10, 12, 13). Alves et al. wiesen bei WT-Mäusen 24 h nach

i. p. Injektion von LPS (20 mg/kg KG) ebenso eine erhöhte Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS), des *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1), TNF- $\alpha$  und des *C-C chemokine receptor type 2* (CCR2) im Lungengewebe nach. [106] Li et al. konnten im Plasma bei WT-Tieren bereits 1,5 und 3 h nach i. p. Verabreichung von LPS (27 mg/kg KG) erhöhte Zytokinspiegel an TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 messen. [98]

In den Analysen wurden bei *Ybx1*-KO-Tieren unter dem Einfluss von LPS geringere Zytokinkonzentrationen als bei WT-Tieren gemessen (Abbildung 10, 12, 13). In anderen Arbeiten wurden im *Ybx1*-KO im Rahmen von Entzündungsreaktionen ebenso geringere Zytokinspiegel beobachtet. Hanssen et al. konnten bereits 6 h nach i. p. Injektion von LPS (1,5 mg/kg KG) in der Peritoneallavage von heterozygoten *Ybx1*-KO-Tieren einen reduzierten Zytokingehalt an IL-6, IL-17, des *C-C chemokine ligand*(CCL)2 und CCL5 messen. [86] Häberer et al. wiesen bei homozygoten *Ybx1*-KO-Tieren 6 Tage nach Induktion einer tubulointerstitiellen Nephritis eine verringerte Expression der Zytokine CCL5 und MCP-1 in der Niere nach. [84] Die verringerte Zytokinfreisetzung in *Ybx1*-KO-Tieren spricht für eine abgeschwächte inflammatorische Reaktion.

*Ybx1*-KI-Tiere wiesen nach der Gabe von LPS im Vergleich zu *Ybx1*-KO-Tieren eine Hochregulation von Zytokinen der inflammatorischen Reaktion, der Zellmigration und Zellkommunikation auf (Abbildung 11, 12, 13). Die Abwesenheit von sekretiertem YB-1 geht mit einer verstärkten Entzündungsreaktion einher.

Hieraus kann gefolgert werden, dass der inflammatorische Prozess im Rahmen des LPS-Toxizitätsmodells möglicherweise durch intrazelluläres YB-1 initiiert wird, während extrazelluläres YB-1 eine begrenzende Rolle im weiteren Verlauf der Entzündungsreaktion spielen könnte.

**YB-1 als Modulator der LPS-induzierten Mikrothrombenbildung.** Bei Sepsis-Patienten lässt sich eine DIC nachweisen, die durch die Bildung von Mikrothromben mit dem Verbrauch von Gerinnungsfaktoren, u. a. Thrombozyten, gekennzeichnet ist. [3] Nach LPS-Verabreichung sank die Thrombozytenzahl bei allen Versuchstieren signifikant ab (Abbildung 14). de Pádua Lúcio et al. konnten diese Beobachtung bereits 24 h nach i. p. Injektion von LPS (10 mg/kg KG) bestätigen. [107] In der vorliegenden Arbeit wurde kein Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen nachgewiesen.

Dennoch konnte ein Einfluss von YB-1 auf die Bildung von Thromben im Rahmen der LPS-Toxizität nachgewiesen werden. Die Verabreichung von LPS führte bei den WT-Tieren zu einer Gerinnselbildung in den kleinen tubulointerstitiellen Gefäßen der Niere sowie den Gefäßen der Lunge, was als Fibrinogenablagerungen in der Immunhistochemie sichtbar wurde (Abbildung 15, 16). Bhan et al. konnten im LPS-Sepsis-Modell (36,7 mg/kg KG) bei WT-Tieren ebenso erhöhte Transkript-Mengen an Fibrinogen in der Niere feststellen. Darüber hinaus wiesen sie auch im Blinddarmligatur und -punktion(*cecal ligation and puncture*[CLP])-

Modell eine gesteigerte Menge an Fibrinogen-mRNA im Mesenterium sowie in der Niere und Lunge nach. [104] In dieser Arbeit zeigten *Ybx1*-KI-Tiere eine stärkere Fibrinogenablagerung in Niere und Lunge als WT- und *Ybx1*-KO-Tiere (Abbildung 15, 16). Die stärkeren Fibrinogenablagerungen in Niere und Lunge bei *Ybx1*-KI-Tieren sprechen für eine Beteiligung von intrazellulärem YB-1 an der Aktivierung des Gerinnungssystems, während extrazelluläres YB-1 möglicherweise eine schützende Funktion hat.

**YB-1 in der Vermittlung von LPS ausgelösten Organschäden.** Nach der Verabreichung von LPS zeigten WT-Tiere Gewebeschäden in Niere und Lunge (Abbildung 17, 18). Hung et al. wiesen bereits 20 h nach i. p. Injektion von LPS (50 mg/kg KG) Gewebeschäden in Niere und Lunge nach. [100] Ni et al. konnten dies im gleichen Versuchsaufbau mit einer i. p. Injektion von nur 10 mg/kg KG LPS ebenso belegen. [101]

In der vorliegenden Arbeit wurde im *Ybx1*-KO in Niere und Lunge im Gegensatz zu WT-Tieren nach LPS-Gabe kein sichtbarer Organschaden festgestellt (Abbildung 17, 18). Hanssen et al. zeigten 6 h nach i. p. Injektion von LPS (1,5 mg/kg KG) in der Niere von heterozygoten *Ybx1*-KO-Tieren reduzierte Transkript-Mengen des *kidney injury molecule-1* (KIM-1) als tubulärer Schädigungsmarker. [86] Wang et al. konnten ebenso bei heterozygoten YB-1-defizienten Tieren 5 Tage nach unilateraler Ureterobstruktion eine verminderte Nierenschädigung in der Histologie nachweisen. [108] Häberer stellte bei homozygoten *Ybx1*-KO-Tieren 6 Tage nach unilateraler Ureterobstruktion eine verringerte KIM-1-Expression fest. [84] Unsere Ergebnisse belegen, dass der Verlust von YB-1 Nieren- und Lungenschäden im LPS-Toxizitätsmodell reduziert.

Auf der anderen Seite legen die Ergebnisse der *Ybx1*-KI-Tiere nahe, dass extrazelluläres YB-1 möglicherweise eine protektive Wirkung hat, da in diesen Tieren eine stärkere Ausprägung der Organschäden und ein Anstieg der Zytokinspiegel beobachtet wurden (Abbildung 11, 12, 13, 17, 18). Umgekehrt könnten die Daten auf eine Funktion von intrazellulärem YB-1 hindeuten, die mit einer Beteiligung an Entzündungsreaktionen in den verschiedenen Organen assoziiert sein könnte.

Zusammenfassend zeigt sich eine komplexe, duale Rolle von YB-1 in der Regulation von Entzündungsreaktionen. Sowohl fördernde als auch hemmende Funktionen in der Vermittlung von Entzündungsreaktionen werden durch YB-1 vermittelt. Diese Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung einer gezielten Intervention, bei der bevorzugt intrazelluläres YB-1 modifiziert werden sollte.

## 5.2 Limitationen

Eine Einschränkung dieser Studie liegt in der Wahl des Sepsis-Modells. Die Induktion des Toxizitätsmodells erfolgte durch die Verabreichung von LPS. Das in der Membran von gramnegativen Bakterien enthaltene LPS führt zu einer spezifischen Aktivierung von TLR4, der die inflammatorische Reaktion über spezifische Signalkaskaden vermittelt und zu einem schnellen und hohen Anstieg von Zytokinspiegeln im Blut führt. [3, 21, 29] Beim Menschen kommt es während der Sepsis durch eine größere Bandbreite an Pathogenen zu einer Aktivierung variabler Rezeptoren. [109] Diese führen zu einer Induktion verschiedener Signalwege. Daher lassen sich die Ergebnisse nicht vollständig auf die *in vivo*-Situation des Menschen übertragen, insbesondere wenn andere Pathogene beteiligt sind. [110, 111] Zukünftige Untersuchungen im Mausmodell könnten mit anderen Pathogenen als Auslöser einer Sepsis erfolgen, z. B. durch Verabreichung von lebenden Bakterien anstelle von LPS. Ein alternatives Modell zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis ist das CLP-Sepsis-Modell, das einen Darmverschluss mit Perforation simuliert. [112]

Ein weiterer kritischer Aspekt, der in zukünftigen Studien berücksichtigt werden sollte, ist die Geschlechtsspezifität. Geschlechtsspezifische Unterschiede beeinflussen die Inzidenz, den Verlauf und die Immunantwort bei Sepsis. Männliche und weibliche Individuen können unterschiedliche Reaktionen auf Infektionen und Entzündungsprozesse zeigen, was möglicherweise auf Unterschiede in der Hormonproduktion, der Genexpression und der Immunregulation zurückzuführen ist. [113] In der vorliegenden Arbeit wurde bei den Tieren nicht zwischen den Geschlechtern differenziert. Zukünftige Studien sollte eine Analyse der Unterschiede in der Entzündungsreaktion bei männlichen und weiblichen Mäusen einbeziehen.

## 5.3 Ausblick

Um die zellulären Mechanismen der YB-1-vermittelten Entzündungsprozesse weiter zu untersuchen, sind *in vitro*-Experimente mit YB-1-defizienten und sekretionsdefizienten Makrophagen erforderlich. Da Makrophagen eine wichtige Rolle in Entzündungsreaktionen spielen, können Zytokinanalysen aus Zellkulturen beitragen, ein besseres Verständnis der durch YB-1 regulierten Zytokine zu entwickeln.

Darüber hinaus ist der Einsatz eines chronischen LPS-Toxizitätsmodells bei *Ybx1*-KO- und *Ybx1*-KI-Tieren geplant, um über die akute Phase der Sepsis hinausgehende Effekte zu untersuchen. Durch regelmäßig wiederholte LPS-Injektionen in niedriger Dosierung über einen Zeitraum von 2 Wochen können die einzelnen Phasen der Entzündungskaskade nachgestellt und ein chronischer Prozess simuliert werden.

Ob die abgeschwächte inflammatorische Reaktion bei *Ybx1*-KO-Tieren hauptsächlich von Immunzellen oder residenten Zellen ausgeht, ist noch unklar. Experimente mit Knochenmarkstransplantationen könnten helfen, den Beitrag der zirkulierenden Immunzellen zur Entzündungsregulation besser zu verstehen, indem sie die Auswirkungen des *Ybx1*-KOs in den verschiedenen Zellpopulationen untersuchen.

## 6 Zusammenfassung

Das Kälteschockprotein *Y-box binding protein-1* (YB-1) reguliert lokale Entzündungsprozesse. Über die Funktion von YB-1 im systemischen Prozess der Inflammation, u. a. der Sepsis, liegen nur wenige Daten vor. Es ist bekannt, dass YB-1 im Rahmen der Sepsis exprimiert und sekretiert wird. [86] Insbesondere die Differenzierung der Funktion von intra- und extrazellulär lokalisiertem YB-1 soll in dieser Arbeit geklärt werden.

Um den Einfluss von YB-1 im systemischen Modell der Entzündung zu überprüfen, wurde *Ybx1*-Ganzkörper-KO- sowie sekretionsdefizienten *Ybx1*-KI-Mäusen LPS intraperitoneal verabreicht. Der sekretionsdefiziente *Ybx1*-KI-Mausstamm wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig erfolgreich generiert. Da die Sekretion von YB-1 von der Acetylierung zweier Lysine abhängig ist, wurden diese Positionen durch Punktmutationen genetisch durch einen Knock-in verändert.

Im Rahmen des LPS-Toxizitätsmodells wird bei *Ybx1*-KO-Tieren ein schützender Effekt aufgrund der fehlenden Expression von YB-1 nachgewiesen, was mit einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit einhergeht. Zytokinanalysen belegen im *Ybx1*-KO ein vermindertes inflammatorisches Milieu. Immunhistochemische und histologische Untersuchungen weisen eine reduzierte Gerinnungsaktivierung sowie eine geringere Organschädigung nach. Im Gegensatz dazu zeigen sekretionsdefiziente *Ybx1*-KI-Tiere unter dem Einfluss von LPS eine erhöhte Letalitätsrate auf. Zytokinanalysen belegen bei diesen Tieren eine signifikant verstärkte inflammatorische Reaktion, die in der Immunhistochemie mit einer gesteigerten Gerinnungsaktivität und in der Histologie mit einem erhöhten Gewebeschaden assoziiert ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine duale Rolle von YB-1 im systemischen Entzündungsmodell. Intrazellulär lokalisiertes YB-1 fördert die pro-inflammatorische Reaktion, während extrazelluläres YB-1 anti-inflammatorische Aktivitäten vermittelt. Diese Erkenntnisse ermöglichen gezielte Interventionen gegen YB-1, wobei die anti-inflammatorischen Effekte bei einem kompletten Knock-out von YB-1 einen deutlichen Überlebensvorteil bieten.

## Literaturverzeichnis

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M et al: The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*. 315(8). 801–810 (2016)
- [2] Fleischmann-Struzek C, Schwarzkopf D, Reinhart K: Sepsis incidence in Germany and worldwide: Current knowledge and limitations of research using health claims data. *Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin*. 117(4). 264–268 (2022)
- [3] Huang M, Cai S, Su J: The pathogenesis of sepsis and potential therapeutic targets. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(21) (2019)
- [4] Vincent J-L, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD et al: International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 302(21). 2323–2329 (2009)
- [5] Fleischmann-Struzek C, Mikolajetz A, Schwarzkopf D, Cohen J, Hartog CS, Pletz M et al: Challenges in assessing the burden of sepsis and understanding the inequalities of sepsis outcomes between National Health Systems: secular trends in sepsis and infection incidence and mortality in Germany. *Intensive Care Medicine*. 44(11). 1826–1835 (2018)
- [6] Chen AX, Simpson SQ, Pallin DJ: Sepsis Guidelines. *The New England Journal of Medicine*. 380(14). 1369–1371 (2019)
- [7] Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C et al: Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Critical Care Medicine*. 49(11). e1063-e1143 (2021)
- [8] Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A: Sepsis and septic shock. *The Lancet*. 392(10141). 75–87 (2018)
- [9] Rhee C, Gohil S, Klompas M: Regulatory mandates for sepsis care - Reasons for caution. *The New England Journal of Medicine*. 370(18). 1673–1676 (2014)
- [10] van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG: The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nature Reviews Immunology*. 17(7). 407–420 (2017)
- [11] Thompson K, Venkatesh B, Finfer S: Sepsis and septic shock: current approaches to management. *Internal Medicine Journal*. 49(2). 160–170 (2019)
- [12] Prescott HC, Angus DC: Enhancing recovery from sepsis: A review. *JAMA*. 319(1). 62–75 (2018)
- [13] Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR et al: Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*. 395(10219). 200–211 (2020)
- [14] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124(4). 783–801 (2006)
- [15] Liu Y, Zhu L, He W: Toll-like receptor and innate immunity in phylogenesis. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 24(4). 433–436 (2002)
- [16] Oppenheim JJ, Yang D: Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current Opinion in Immunology*. 17(4). 359–365 (2005)

- [17] Beutler B, Rietschel ET: Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology*. 3(2). 169–176 (2003)
- [18] Bertani B, Ruiz N: Function and biogenesis of lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*. 8(1) (2018)
- [19] Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M et al: Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *The Journal of Experimental Medicine*. 179(1). 269–277 (1994)
- [20] Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, van Huffel C, Du X et al: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 282(5396). 2085–2088 (1998)
- [21] Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F: Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(16). 10689–10692 (1999)
- [22] Ryu J-K, Kim SJ, Rah S-H, Kang JI, Jung HE, Lee D et al: Reconstruction of LPS transfer cascade reveals structural determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for efficient LPS recognition and transfer. *Immunity*. 46(1). 38–50 (2017)
- [23] Akira S, Takeda K: Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*. 4(7). 499–511 (2004)
- [24] Kuzmich NN, Sivak KV, Chubarev VN, Porozov YB, Savateeva-Lyubimova TN, Peri F: TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis. *Vaccines*. 5(4). 34 (2017)
- [25] Arthur JSC, Ley SC: Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*. 13(9). 679–692 (2013)
- [26] Husebye H, Halaas Ø, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger Ø, Bogen B et al: Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *The EMBO Journal*. 25(4). 683–692 (2006)
- [27] Venet F, Monneret G: Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nature Reviews Nephrology*. 14(2). 121–137 (2018)
- [28] Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA: Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nature Reviews Immunology*. 8(10). 776–787 (2008)
- [29] Opal SM: Endotoxins and other sepsis triggers. *Contributions to Nephrology*. 167. 14–24 (2010)
- [30] Solomkin JS, Jenkins MK, Nelson RD, Chenoweth D, Simmons RL: Neutrophil dysfunction in sepsis. II. Evidence for the role of complement activation products in cellular deactivation. *Surgery*. 90(2). 319–327 (1981)
- [31] Cheng S-C, Scicluna BP, Arts RJW, Gresnigt MS, Lachmandas E, Giamarellos-Bourboulis EJ et al: Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. *Nature Immunology*. 17(4). 406–413 (2016)
- [32] Rocha M, Herance R, Rovira S, Hernández-Mijares A, Victor VM: Mitochondrial dysfunction and antioxidant therapy in sepsis. *Infectious Disorders - Drug Targets*. 12(2). 161–178 (2012)



- [33] Quoilin C, Mouithys-Mickalad A, Lécart S, Fontaine-Aupart M-P, Hoebeke M: Evidence of oxidative stress and mitochondrial respiratory chain dysfunction in an in vitro model of sepsis-induced kidney injury. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1837(10). 1790–1800 (2014)
- [34] Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH et al: Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *The Journal of Immunology*. 168(5). 2493–2500 (2002)
- [35] Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, Wagner TH, Coopersmith CM, Karl IE: Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *The Journal of Immunology*. 174(8). 5110–5118 (2005)
- [36] Paunel-Görgülü A, Kirichevska T, Lögters T, Windolf J, Flohé S: Molecular mechanisms underlying delayed apoptosis in neutrophils from multiple trauma patients with and without sepsis. *Molecular Medicine*. 18(1). 325–335 (2012)
- [37] Wu B, Walker J, Spur B, Rodriguez A, Yin K: Effects of Lipoxin A4 on antimicrobial actions of neutrophils in sepsis. *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids*. 94. 55–64 (2015)
- [38] Dhainaut J-F, Shorr AF, Macias WL, Kollef MJ, Levi M, Reinhart K et al: Dynamic evolution of coagulopathy in the first day of severe sepsis: relationship with mortality and organ failure. *Critical Care Medicine*. 33(2). 341–348 (2005)
- [39] Franco RF, de Jonge E, Dekkers PE, Timmerman JJ, Spek CA, van Deventer SJ et al: The in vivo kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation. *Blood*. 96(2). 554–559 (2000)
- [40] Wolffe AP, Tafuri S, Ranjan M, Familiari M: The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from *Escherichia coli* to man. *The New Biologist*. 4(4). 290–298 (1992)
- [41] Jones PG, VanBogelen RA, Neidhardt FC: Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 169(5). 2092–2095 (1987)
- [42] Tafuri SR, Wolffe AP: DNA binding, multimerization, and transcription stimulation by the *Xenopus* Y box proteins in vitro. *The New Biologist*. 4(4). 349–359 (1992)
- [43] Kolluri R, Torrey TA, Kinniburgh AJ: A CT promoter element binding protein: definition of a double-strand and a novel single-strand DNA binding motif. *Nucleic Acids Research*. 20(1). 111–116 (1992)
- [44] Stickeler E, Fraser SD, Honig A, Chen AL, Berget SM, Cooper TA: The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4. *The EMBO Journal*. 20(14). 3821–3830 (2001)
- [45] Wolffe AP: Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *BioEssays*. 16(4). 245–251 (1994)
- [46] Lindquist JA, Mertens PR: Cold shock proteins: from cellular mechanisms to pathophysiology and disease. *Cell Communication and Signaling*. 16(1). 63 (2018)
- [47] Kudo S, Mattei M-G, Fukuda M: Characterization of the gene for dbpA, a family member of the nucleic-acid-binding proteins containing a cold-shock domain. *European Journal of Biochemistry*. 231(1). 72–82 (1995)

- [48] Tekur S, Pawlak A, Guellaen G, Hecht NB: Contrin, the human homologue of a germ-cell Y-box-binding protein: cloning, expression, and chromosomal localization. *Journal of Andrology*. 20(1). 135–144 (1999)
- [49] Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, Ashizuka M, Kuwano M: The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *BioEssays*. 25(7). 691–698 (2003)
- [50] Yang J, Medvedev S, Yu J, Schultz RM, Hecht NB: Deletion of the DNA/RNA-binding protein MSY2 leads to post-meiotic arrest. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 250(1-2). 20–24 (2006)
- [51] Makino Y, Ohga T, Toh S, Koike K, Okumura K, Wada M et al: Structural and functional analysis of the human Y-box binding protein (YB-1) gene promoter. *Nucleic Acids Research*. 24(10). 1873–1878 (1996)
- [52] Toh S, Nakamura T, Ohga T, Koike K, Uchiumi T, Wada M et al: Genomic organization of the human Y-box protein (YB-1) gene. *Gene*. 206(1). 93–97 (1998)
- [53] Evdokimova VM, Wei CL, Sitikov AS, Simonenko PN, Lazarev OA, Vasilenko KS et al: The major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family. *The Journal of Biological Chemistry*. 270(7). 3186–3192 (1995)
- [54] Eliseeva IA, Kim ER, Guryanov SG, Ovchinnikov LP, Lyabin DN: Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Biochemistry (Moscow)*. 76(13). 1402–1433 (2011)
- [55] Didier DK, Schiffenbauer J, Woulfe SL, Zacheis M, Schwartz BD: Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85(19). 7322–7326 (1988)
- [56] Ruzanov PV, Evdokimova VM, Korneeva NL, Hershey JW, Ovchinnikov LP: Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments. *Journal of Cell Science*. 112(20). 3487–3496 (1999)
- [57] Kloks CPAM, Spronk CAEM, Lasonder E, Hoffmann A, Vuister GW, Grzesiek S et al: The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1. *Journal of Molecular Biology*. 316(2). 317–326 (2002)
- [58] Coles LS, Lambrusco L, Burrows J, Hunter J, Diamond P, Bert AG et al: Phosphorylation of cold shock domain/Y-box proteins by ERK2 and GSK3 $\beta$  and repression of the human VEGF promoter. *FEBS Letters*. 579(24). 5372–5378 (2005)
- [59] van Roeyen CRC, Scurt FG, Brandt S, Kuhl VA, Martinkus S, Djudjaj S et al: Cold shock Y-box protein-1 proteolysis autoregulates its transcriptional activities. *Cell Communication and Signaling*. 11. 63 (2013)
- [60] Bader AG, Vogt PK: Inhibition of protein synthesis by Y box-binding protein 1 blocks oncogenic cell transformation. *Molecular and Cellular Biology*. 25(6). 2095–2106 (2005)
- [61] Jurchott K, Bergmann S, Stein U, Walther W, Janz M, Manni I et al: YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(30). 27988–27996 (2003)
- [62] Koike K, Uchiumi T, Ohga T, Toh S, Wada M, Kohno K et al: Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Letters*. 417(3). 390–394 (1997)

- [63] Stein U, Jürchott K, Walther W, Bergmann S, Schlag PM, Royer HD: Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(30). 28562–28569 (2001)
- [64] Holm PS, Bergmann S, Jurchott K, Lage H, Brand K, Ladhoff A et al: YB-1 relocates to the nucleus in adenovirus-infected cells and facilitates viral replication by inducing E2 gene expression through the E2 late promoter. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(12). 10427–10434 (2002)
- [65] Lodomery M, Sommerville J: A role for Y-box proteins in cell proliferation. *BioEssays*. 17(1). 9–11 (1995)
- [66] En-Nia A, Yilmaz E, Klinge U, Lovett DH, Stefanidis I, Mertens PR: Transcription factor YB-1 mediates DNA polymerase alpha gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(9). 7702–7711 (2005)
- [67] Shibao K, Takano H, Nakayama Y, Okazaki K, Nagata N, Izumi H et al: Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas. *International Journal of Cancer*. 83(6). 732–737 (1999)
- [68] Lenz J, Okenquist SA, LoSardo JE, Hamilton KK, Doetsch PW: Identification of a mammalian nuclear factor and human cDNA-encoded proteins that recognize DNA containing apurinic sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87(9). 3396–3400 (1990)
- [69] Hasegawa SL, Doetsch PW, Hamilton KK, Martin AM, Okenquist SA, Lenz J et al: DNA binding properties of YB-1 and dbpA: binding to double-stranded, single-stranded, and abasic site containing DNAs. *Nucleic Acids Research*. 19(18). 4915–4920 (1991)
- [70] Ise T, Nagatani G, Imamura T, Kato K, Takano H, Nomoto M et al: Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Research*. 59(2). 342–346 (1999)
- [71] Izumi H, Imamura T, Nagatani G, Ise T, Murakami T, Uramoto H et al: Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'-5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Research*. 29(5). 1200–1207 (2001)
- [72] Gaudreault I, Guay D, Lebel M: YB-1 promotes strand separation in vitro of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifications, exhibits endonucleolytic activities and binds several DNA repair proteins. *Nucleic Acids Research*. 32(1). 316–327 (2004)
- [73] Chansky HA, Hu M, Hickstein DD, Yang L: Oncogenic TLS/ERG and EWS/Fli-1 fusion proteins inhibit RNA splicing mediated by YB-1 protein. *Cancer Research*. 61(9). 3586–3590 (2001)
- [74] Evdokimova V, Ruzanov P, Imataka H, Raught B, Svitkin Y, Ovchinnikov LP et al: The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *The EMBO Journal*. 20(19). 5491–5502 (2001)
- [75] Chernov KG, Mechulam A, Popova NV, Pastre D, Nadezhdina ES, Skabkina OV et al: YB-1 promotes microtubule assembly in vitro through interaction with tubulin and microtubules. *BMC Biochemistry*. 9. 23 (2008)

- [76] Davydova EK, Evdokimova VM, Ovchinnikov LP, Hershey JW: Overexpression in COS cells of p50, the major core protein associated with mRNA, results in translation inhibition. *Nucleic Acids Research*. 25(14). 2911–2916 (1997)
- [77] Evdokimova VM, Kovrigina EA, Nashchekin DV, Davydova EK, Hershey JW, Ovchinnikov LP: The major core protein of messenger ribonucleoprotein particles (p50) promotes initiation of protein biosynthesis in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(6). 3574–3581 (1998)
- [78] Lutz M, Wempe F, Bahr I, Zopf D, von Melchner H: Proteasomal degradation of the multifunctional regulator YB-1 is mediated by an F-Box protein induced during programmed cell death. *FEBS Letters*. 580(16). 3921–3930 (2006)
- [79] Sorokin AV, Selyutina AA, Skabkin MA, Guryanov SG, Nazimov IV, Richard C et al: Proteasome-mediated cleavage of the Y-box-binding protein 1 is linked to DNA-damage stress response. *The EMBO Journal*. 24(20). 3602–3612 (2005)
- [80] Frye BC, Halfter S, Djudjaj S, Muehlenberg P, Weber S, Raffetseder U et al: Y-box protein-1 is actively secreted through a non-classical pathway and acts as an extracellular mitogen. *EMBO reports*. 10(7). 783–789 (2009)
- [81] Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R: A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *The EMBO Journal*. 9(5). 1503–1510 (1990)
- [82] Brandt S, Raffetseder U, Djudjaj S, Schreiter A, Kadereit B, Michele M et al: Cold shock Y-box protein-1 participates in signaling circuits with auto-regulatory activities. *European Journal of Cell Biology*. 91(6-7). 464–471 (2012)
- [83] Raffetseder U, Liehn EA, Weber C, Mertens PR: Role of cold shock Y-box protein-1 in inflammation, atherosclerosis and organ transplant rejection. *European Journal of Cell Biology*. 91(6-7). 567–575 (2012)
- [84] Häberer S: Die Depletion des Kälteschockproteins YB-1 hat einen protektiven Effekt auf die tubulointerstitielle Nephritis. Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg. Verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.25673/35714> (2020)
- [85] Bernhardt A, Fehr A, Brandt S, Jerchel S, Ballhause TM, Philipsen L et al: Inflammatory cell infiltration and resolution of kidney inflammation is orchestrated by the cold-shock protein Y-box binding protein-1. *Kidney International*. 92(5). 1157–1177 (2017)
- [86] Hanssen L, Alidousty C, Djudjaj S, Frye BC, Rauen T, Boor P et al: YB-1 is an early and central mediator of bacterial and sterile inflammation in vivo. *The Journal of Immunology*. 191(5). 2604–2613 (2013)
- [87] Wang J, Djudjaj S, Gibbert L, Lennartz V, Breitkopf DM, Rauen T et al: YB-1 orchestrates onset and resolution of renal inflammation via IL10 gene regulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 21(12). 3494–3505 (2017)
- [88] Hoess RH, Ziese M, Sternberg N: P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 79(11). 3398–3402 (1982)
- [89] Bernhardt A, Häberer S, Xu J, Damerau H, Steffen J, Reichardt C et al: High salt diet-induced proximal tubular phenotypic changes and sodium-glucose cotransporter-2 expression are coordinated by cold shock Y-box binding protein-1. *The FASEB Journal*. 35(10). e21912 (2021)

- [90] Vooijs M, Jonkers J, Berns A: A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. *EMBO reports*. 2(4). 292–297 (2001)
- [91] Lu ZH, Books JT, Ley TJ: Cold shock domain family members YB-1 and MSY4 share essential functions during murine embryogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. 26(22). 8410–8417 (2006)
- [92] Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P: Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92(15). 6991–6995 (1995)
- [93] Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P et al: Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Research*. 27(22). 4324–4327 (1999)
- [94] Catelli MG, Binart N, Jung-Testas I, Renoir JM, Baulieu EE, Feramisco JR et al: The common 90-kd protein component of non-transformed '8S' steroid receptors is a heat-shock protein. *The EMBO Journal*. 4(12). 3131–3135 (1985)
- [95] Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P: Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 237(3). 752–757 (1997)
- [96] Kumar V, Chambon P: The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell*. 55(1). 145–156 (1988)
- [97] Zhang Z, Lutz B: Cre recombinase-mediated inversion using lox66 and lox71: method to introduce conditional point mutations into the CREB-binding protein. *Nucleic Acids Research*. 30(17). e90 (2002)
- [98] Li Q, Li L, Fei X, Zhang Y, Qi C, Hua S et al: Inhibition of autophagy with 3-methyladenine is protective in a lethal model of murine endotoxemia and polymicrobial sepsis. *Innate Immunity*. 24(4). 231–239 (2018)
- [99] Yu C, Qi D, Sun J-F, Li P, Fan H-Y: Rhein prevents endotoxin-induced acute kidney injury by inhibiting NF- $\kappa$ B activities. *Scientific Reports*. 5. 11822 (2015)
- [100] Hung Y-L, Fang S-H, Wang S-C, Cheng W-C, Liu P-L, Su C-C et al: Corylin protects LPS-induced sepsis and attenuates LPS-induced inflammatory response. *Scientific Reports*. 7. 46299 (2017)
- [101] Ni J, Zhao Y, Su J, Liu Z, Fang S, Li L et al: Toddalolactone protects lipopolysaccharide-induced sepsis and attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response by modulating HMGB1-NF- $\kappa$ B translocation. *Frontiers in Pharmacology*. 11. 109 (2020)
- [102] Commins SP, Borish L, Steinke JW: Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125(2). 53–72 (2010)
- [103] Davalos D, Akassoglou K: Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Seminars in Immunopathology*. 34(1). 43–62 (2012)

- [104] Bhan C, Dash SP, Dipankar P, Kumar P, Chakraborty P, Sarangi PP: Investigation of extracellular matrix protein expression dynamics using murine models of systemic inflammation. *Inflammation*. 42(6). 2020–2031 (2019)
- [105] Rana R, Manoharan J, Elwakiel A, Zimmermann S, Lindquist JA, Gupta D et al: Glomerular-tubular crosstalk via cold shock Y-box binding protein-1 in the kidney. *Kidney International*. 105(1). 65–83 (2024)
- [106] Alves JN, Pires KMP, Lanzetti M, Barroso MV, Benjamim CF, Costa CA et al: Critical role for CCR2 and HMGB1 in induction of experimental endotoxic shock. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 537(1). 72–81 (2013)
- [107] de Pádua Lúcio K, Rabelo ACS, Araújo CM, Brandão GC, de Souza GHB, da Silva RG et al: Anti-inflammatory and antioxidant properties of Black Mulberry (*Morus nigra* L.) in a model of LPS-induced sepsis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018. 5048031 (2018)
- [108] Wang J, Gibbert L, Djudjaj S, Alidousty C, Rauen T, Kunter U et al: Therapeutic nuclear shuttling of YB-1 reduces renal damage and fibrosis. *Kidney International*. 90(6). 1226–1237 (2016)
- [109] Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England Journal of Medicine*. 348(16). 1546–1554 (2003)
- [110] Fisher CJ, Dhainaut JF, Opal SM, Pribble JP, Balk RA, Slotman GJ et al: Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *JAMA*. 271(23). 1836–1843 (1994)
- [111] Fisher CJ, Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC et al: Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. *The New England Journal of Medicine*. 334(26). 1697–1702 (1996)
- [112] Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Star RA: Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *The Journal of Clinical Investigation*. 119(10). 2868–2878 (2009)
- [113] Chang Z, Lu J, Zhang Q, Wu H, Liang Z, Pan X et al: Clinical biomarker profiles reveals gender differences and mortality factors in sepsis. *Frontiers in Immunology*. 15. 1413729 (2024)

## **Danksagung**

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

## Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Das Kälteschockprotein YB-1 vermittelt pro- und anti-inflammatorische Effekte in einem Lipopolysaccharid(LPS)-induzierten Entzündungsmodell der Maus.“**

in der Universitätsklinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten, Diabetologie und Endokrinologie

mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. med. Peter R. Mertens

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 07.04.2025

Julia Schiwietz

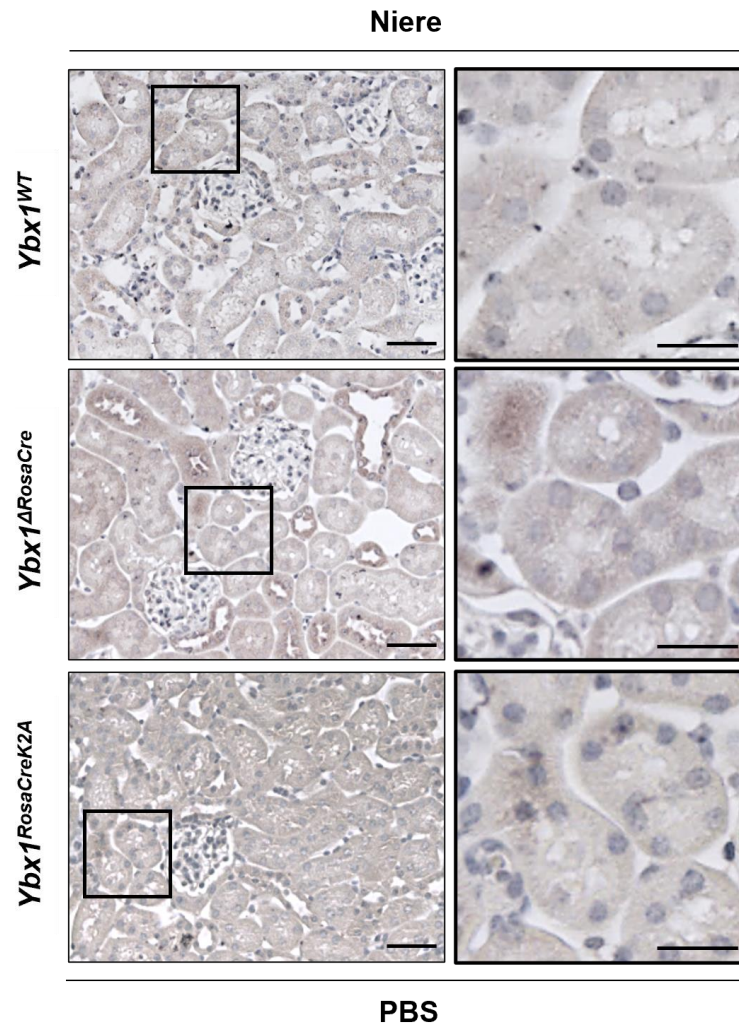


## **Darstellung des Bildungsweges**

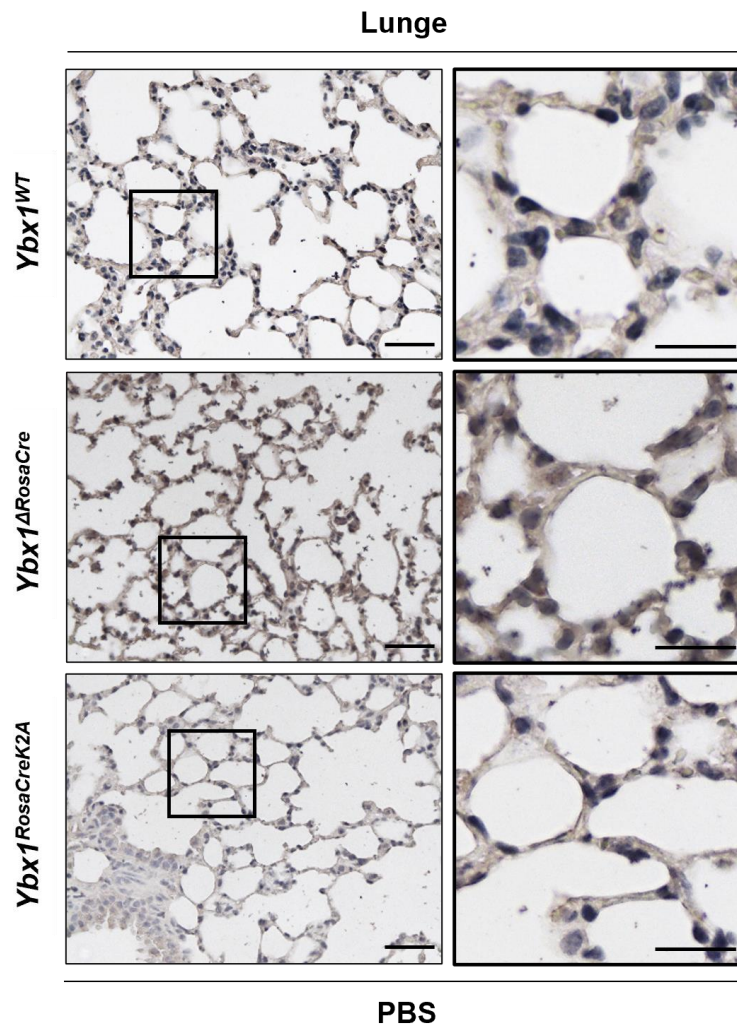
Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

## Anhang



**Abbildung 20: Fibrinogenfärbung in den Nierengefäßen nach PBS-Gabe.** Bei WT( $Ybx1^{WT}$ )-,  $Ybx1$ -KO( $Ybx1^{\Delta RosaCre}$ )- und  $Ybx1$ -KI( $Ybx1^{RosaCreK2A}$ )-Tieren zeigt sich nach PBS-Gabe in der Niere keine Fibrinogenablagerung. Die Abbildung zeigt repräsentative Bildausschnitte einer immunhistochemischen Färbung mit einem Fibrinogen  $\gamma$  (C20)-Antikörper 30 h nach PBS-Behandlung (30 mg/kg KG) in der Niere. Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m (links) bzw. 25  $\mu$ m (rechts). Abkürzungen: Knock-in (KI); Knock-out (KO); *phosphate-buffered saline* (PBS); Wildtyp (WT); *Y-box binding protein-1* ( $Ybx1$ ) (eigene Darstellung).



**Abbildung 21: Fibrinogenfärbung nach PBS-Gabe in der Lunge.** Bei WT ( $Ybx1^{WT}$ ),  $Ybx1$ -KO ( $Ybx1^{\Delta RosaCre}$ )- und  $Ybx1$ -KI ( $Ybx1^{RosaCreK2A}$ )-Tieren zeigt sich nach PBS-Gabe in der Lunge keine Ablagerung von Fibrinogen. Die Abbildung zeigt repräsentative Bildausschnitte einer immunhistochemischen Färbung mit einem Fibrinogen  $\gamma$  (C20)-Antikörper in der Lunge 30 h nach PBS-Behandlung (30 mg/kg KG). Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m (links) bzw. 25  $\mu$ m (rechts). Abkürzungen: Knock-in (KI); Knock-out (KO); *phosphate-buffered saline* (PBS); Wildtyp (WT); *Y-box binding protein-1* ( $Ybx1$ ) (eigene Darstellung).